

Optimisation de modèles de culture 3D pour la différenciation des cellules souches mésenchymateuses : application à la chondrogénèse

Jingwei Yang

▶ **To cite this version:**

Jingwei Yang. Optimisation de modèles de culture 3D pour la différenciation des cellules souches mésenchymateuses : application à la chondrogénèse. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2006. Français. NNT : 2006NAN11305 . tel-01747456

HAL Id: tel-01747456
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747456

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE NANCY 1 – HENRI POINCARE – Faculté de Médecine

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTE - ENVIRONNEMENT

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY 1

Spécialité : Bioingénierie

Présentée et soutenue publiquement

Par

JINGWEI YANG

Le 18 Juillet 2006

OPTIMISATION DE MODELES DE CULTURE 3D POUR LA DIFFERENCIATION DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES APPLICATION A LA CHONDROGENESE

Directeur de thèse : Docteur S. MULLER

Co-Directeur de thèse : Docteur C. GIGANT-HUSELSTEIN

JURY

Rapporteurs :	M.	R. SANTUS	Professeur	MNHN, Paris
	M	D. ISABEY	Professeur	UMR 651, Créteil
Examinateurs :	Mme	S. MULLER	CR/INSERM	LEMTA, Nancy
	M.	J.F. STOLTZ	Professeur	UHP-Nancy 1
	M.	P. GILLET	Professeur	UHP-Nancy 1
Invitée :	Mme	C. HUSELSTEIN	Maître de Conférence	UHP-Nancy 1

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS

Avant-propos et remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique entre le Groupe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire (LEMTA-UMR CNRS 7563, Faculté de Médecine, UHP Nancy 1), l'IFR 111 « Bioingénierie», l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire de CHU de Nancy et le département de Physiopathologie de la faculté de Médecine de l'université de Wuhan, Chine, avec le soutien de l'ambassade de France à Beijing.

A mes parents et à toute ma famille!

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 manifester ma gratitude à Monsieur le Professeur **Jean-François STOLTZ**, directeur du laboratoire, qui m'a fait l'honneur de m'accueillier 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 plus spécialement pour les nombreuses discussions et suggestions précieuses et pour la patience et le courage dont elle a témoigné lors de la correction de ce manuscrit.

J'exprime également ma reconnaissance à Madame le Docteur **Céline GIGANT-HUSELSTEIN,** maître de conférence, ma co-directrice de recherche, pour ses nombreux conseils scientifiques durant ces trois années. Je la remercie plus spécialement pour la patience et le courage dont elle a témoigné lors de la correction de ce manuscrit.

Je remercie très sincèrement Madame le Professeur **Jing-Ping OUYANG**, directeur de laboratoire à Wuhan, pour m'avoir donné la possibilité de participer à cette collaboration scientifique, pour son aide et ses conseils scientifiques.

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

J'exprime ma profonde reconnaissance également à Madame le Docteur **Assia ELJAAFARI**, pour son implication dans mon travail au cours de ma thèse et pour son aide et ses précieux conseils.

J'exprime ma gratitude et mon profond respect à Monsieur le professeur **René SANTUS**, et à Monsieur le professeur **Daniel ISABEY** pour avoir accepté d'être rapporteurs

de ma thèse, ainsi qu'à Monsieur le Professeur **Pierre GILLET,** qui a accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie beaucoup **Claude WENDLING**, pour sa gentillesse, son aide et sa disponibilité.

Mesdames **Ghislaine CAUCHOIS, Monique GENTILS, Brigitte GUERBER et Carine LORCIN,** pour leur gentillesse à mon égard et leur soutien constant. Je leur exprime ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur **Dominique DUMAS,** Ingénieur de Recherche, et Monsieur le Docteur **Luc MARCHAL,** Ingénieur d'Etudes, pour leur sympathie, leurs conseils et leur aide concernant notamment la microscopie de fluorescence et de transmission.

Je tiens à remercier Madame le Docteur **Natalia DE ISLA**, pour ses conseils éclairés, ses encouragements et pour son amitié.

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

Assia, Caroline, Cédric, Cédryck, Elisabeth, Halima, Ke Li, Lei W, Lei Zh, Li Na, Mariama, Shalaw, Vanessa, Yinping, Yun.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS 2
TABLE DES MATIERES 7
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES 12
LISTE DES ABREVIATIONS 14
TABLES DES ILLUSTRATIONS 18
INTRODUCTION GENERALE 24

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 28
A. CARTILAGE ET CHONDROCYTES 29
A.I. Physiologie du cartilage articulaire et des chondrocytes 31
A.I.1. Structure du cartilage articulaire 31
A.I.2. Les constituants 31
A.1.2.1. Les chondrocytes 31
A.I.2.2. La matrice extracellulaire 34
A.I.3. Homéostasie du cartilage 40
A.I.3.1. Les cytokines 41
A.I.3.2. Les facteurs de croissance 42
A.I.3.3. Autres facteurs solubles 42
A.I.3.4. L'environnement physico-chimique du chondrocyte 42
A.I.4. La fonction de cartilage articulaire et mécanobiologie 43

A.II. Les lésions cartilagineuses de la physiopathologies aux traitements 45
A.II.1. Les lésions cartilagineuses 45
A.II.1.1. Differents types de lésions 46
A.II.1.2. Facteurs impliqués dans les lésions cartilagineuses 48
A.II.2. Differents types de traitement des lésions 50
A.II.2.1. La viscosupplémentation locale 50
A.II.2.2. La chirurgie 50

B. INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE 55
B.I. Les cellules utilisées en ingénierie tissulaire 56
B.I.1. Chondrocytes 56
B.I.2. Cellules souches 57
B.I.2.1. Les cellules souches embryonnaires (CSEs) 57

B.I.2.2. : les cellules souches mésenchymateuses 60

B.II. Systèmes de culture 68
B.II.1. Système de culture en micromasses et 'pellet' 69
B.II.2. Culture dans des biomatériaux 69
B.II.2.1. Les biopolymères naturels 69
B.II.2.2. Les polymères synthétiques 71

B.III. Facteurs solubles utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage 75
B.III.1. TGF-βs 75
B.III.2. BMPs 76

C. LA CHONDROGENESE 77
C.I. Les étapes de la chondrogénèse 77
C.I.1. La condensation des cellules souches mésenchymateuses 77
C.I.2. La différenciation chondrocytaire 78

C.II. Etude de la chondrogénèse *in vitro* 82
C.II.1. Milieux de culture permettant la différenciation chondrocytaire *in vitro* 83
C.II.1.1. Conditions de culture sans sérum pour favoriser la différenciation chondrocytaire 83
C.II.1.2. Utilisation de composés chimiques non-protéiques 83
C.II.2. Coculture de cellules 84
C.II.3. Utilisation de modifications génétiques dans la différenciation chondrocytaire 86
C.II.4. Effet du facteur mécanique sur la différenciation chondrocytaire 86

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES 88
A. METHODOLOGIE GENERALE 89
A.I. Culture de cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse humaine 89
A.I.1. Culture des cellules souches mésenchymateuses en monocouche 89
A.I.2. Culture des cellules souches mésenchymateuses dans un modèle de micromasse 90
A.I.3. Culture des cellules souches mésenchymateuses dans des biomatériaux à base d'alginate 92
A.I.4. Cryoconservation des cellules souches mésenchymateuses. 93

A.II. Isolation de chondrocytes humains 94
A.II.1. Prélèvement du cartilage articulaire 94
A.II.2. Obtention des chondrocytes à partir de cartilage humain 94

B. METHODOLOGIE ANALYTIQUE 96
B.I. Activité métabolique 96

B.II. Marquage en immuno-fluorescence 97

B.III. Etudes Microscopiques 101
B.III.1. Microscopie électronique à transmission 101

B.IV. Cytométrie en flux 103
B.IV.1. Immunomarquage des molécules d'adhérence qualitativement et quantitativement 103
B.IV.2. Viabilité cellulaire 108
B.IV.3. Cycle cellulaire 109

B.V. Etudes moléculaires : Détection des ARNm par RT-PCR 113
B.V.1. Principe 113
B.V.2. Extraction des ARN totaux à partir des cellules 116
B.V.3. Rétrotranscription des ARN extraits 119
B.V.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR). 119

C. ANALYSE STATISTIQUE 122

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION 123
A. Identification des cellules souches mésenchymateuses humaines en monocouche. 124
A.I. Caractérisation morphologique 124
A.II. Caractérisation phénotypique 125
A.III. Discussion 126

B. Différenciation des cellules souches mésenchymateuses en modèle 3D – les micromass 127

B.I. Viabilité et métabolisme des cellules souches mésenchymateuses 127
B.I.1. Activité métabolique 127
B.I.2. Viabilité des cellules souches mésenchymateuses humaines en culture de micromasses 128
B.I.3. Cycle cellulaire 129
B.I.4. Viabilité et métabolisme des CSMs – Commentaires 130

B.II. Différenciation des cellules souches mésenchymateuses : suivi phénotypique 131
B.II.1. Expression des marqueurs CD90 131
B.II.2. Expression des marqueurs CD166 132
B.II.3. Expression des marqueurs CD105 134
B.II.4. Discussion 134

B.III. Analyse de la Matrice extracellulaire synthétisée par les cellules souches mésenchymateuses au cours de leur différenciation. 135
B.III.1. Observation ultrastructurelle de la MEC par microsopie électronique 135
B.III.2. Analyse RT-PCR de l'expression du collagène de type I, II et des Agrécanne 137
B.III.3. Analyse de la MEC synthétisé par les CSMs au cours de leur différenciation – Commentaires 138

B.IV. Discussion Générale. 140

C. Optimisation des conditions de culture de l'alginate sur des CSMs humaines 142
C.I. Suivi de la viabilité des cellules souches mésenchymateuses humaines dans différentes conditions de culture d'alginate 142
C.II. Cycle cellulaire des cellules souches mésenchymateuses humaines dans 4 conditions de culture d'alginates 145
C.III : Comparaison des modèles de culture – Discussion 148

CHAPITRE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES 149

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 154

PUBLICATION 177

LISTE DES PUBLICATIONS

ET

COMMUNICATIONS PERSONNELLES

Publications dans des revues internationales

1. **Jing-Wei Yang**, Natalia de Isla, Céline Huselstein, Marie-Nathalie Sarda-Kolopp, Na Li, Yin-Ping Li, Jing-Ping Ou-Yang, Jean-François Stoltz, Assia Eljaafari. Evaluation of hMSC cell cycle, viability and differentiation in micromass culture. Biorheology 2006 (sous presse)

2. De Isla N.G., **Yang JW**, Huselstein C., Stoltz J.F. IL-1β synthesis by chondrocyte analyzed by 3D microscopy and flow cytometry: Effect of Rhein. Biorheology 2006 (sous presse)

3. **Yang JW**., de Isla N.G., Huselstein C., Wang Y., Stoltz J.F, Muller S. Evaluation of human Mesenchymal Stem Cells viability in different alginate culture conditions. Bio-Medical Materials and Engineering 2007 (accepté).

4. **Jing-Wei Yang**, Natalia de Isla, Céline Huselstein, Yun Wang, Jean-François Stoltz, Sylvaine Muller. The phenotypic markers of hMSCs for the identification of hMSCs differentiation (Article en préparation).

5. **Yang JW**, Ouyang JP, Liao WJ, Tian J, Liu YM, Wei L, Wang BH, Li K.The effects of Chinese herb Angelica in focal cerebral ischemia injury in the rat. Clin Hemorheol Microcirc. 2005; 32(3):209-15.

Communications dans des congrès

1. **Jing-Wei Yang**, Natalia de Isla, Céline Huselstein, Marie-Nathalie Sarda-Kolopp, Na Li, Yin-Ping Li, Ou-Yang Jing-Ping, Jean-François Stoltz, Assia Eljaafari. Evaluation of hMSC cell cycle, viability and differentiation in micromass culture. 4th international symposium on mechanobiology of cartilage and chondrocyte. Budapest, Hungary, May 20-22, 2005.

2. **Jing-Wei Yang**, Natalia De Isla, Céline Huselstein, Luc Marchal, Marie-Nathalie Sarda-Kolopp, Jing-Ping Ou-Yang, Jean-François Stoltz, Assia Eljaafari. Evaluation of hMSC differentiation and viability in micromass culture. China-France Medicine Symposium 2005, Cell and Tissue Therapy: From Engineering to Patients, Wuhan, China June 6-8, 2005.

3. **Yang JW**, de Isla N.G., Huselstein C., Wang Y., Dumas D., Marchal L., Stoltz J.F., ElJaafari A. Chondrogenesis of human MSC in micromass culture. A fluorescence and electron microscopy approach. Cell and tissue bioengineering and therapy. Nancy, France, May 10-11, 2005.

4. **Jing-Wei Yang**, Natalia De Isla, Céline Huselstein, Yun Wang, Jean-François Stoltz, Sylvaine Muller. Evaluation of human Mesenchymal Stem Cells viability in different alginate culture conditions. 3rd international meeting on "medical engineering and therapy", Nancy, France, May 15-16, 2006.

LISTE DES ABREVIATIONS

3D	Tridimensionnel
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ALCAM	Activated Leukocyte-Cell Adhesion Molecule
Alg	Alginate
ARN	Acide Ribonucléique
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
BSA	Albumine de Sérum Bovine
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate
CD	Cluster de différenciation
COMP	Cartilage Oligo Matrix Protein
CSAs	Cellules Souches Adultes
CSEs	Cellules Souches Embryonnaires
CSHs	Cellules Souches Hématopoïétiques
CSMs	Cellules Souches Mésenchymateuses
DEPC	Diethypyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DO	Densité Optique
EDTA	Acide Ethylènedinitrilotétraacétique
ERK-1	Extracellular Signal-Regulated Kinase-1
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Isothiocyanate de Fluorescéine
FSC	Diffusion aux Petits Angles
GAGs	Glycosaminoglycannes
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
KAT1	TGFβ Activated Kinase 1
KDa	Kilo Dalton
HA	Acide Hyaluronate
HACs	Chondrocytes Articulaires Humains
HBSS	Hank's Balanced Salts Solution
HG	High Glucose
Ht	High tension

ICM	Inner Cell Mass.
Ig	Immunoglobuline
IGF	Insulin Like Growth Factor
IL-1,4,6,10	Interleukine-1,4,6,10
IMF	Intensité Moyenne de Fluorescence
IP	Iodure de Propidium
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LEF-1	Lymphoid Enhancing Factor-1
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LG	Low Glucose
ITS	Insulin, Transferring, Selenous acid
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MEC	Matrice Extracellulaire
MPa	Méga Pascal
MPC	Mesenchymal Progenitor Cell
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NO	Monoxyde d'azote
Pa	Pascal
PBS	Phosphate Buffer Saline
PGA	Acide Polyglycolique
PGs	Protéoglycannes
PLGA	Acide Poly L-lactique-co-glycolide
PLLA	Acide Poly L-lactique
PMT	Photomultiplicateur
PNC	Protéines Non Collagéniques
PS	Phosphatidylsérine
PTHrP	Parathyroid Hormone Related Protein
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SFKs	Src Family Kinases
SSC	Side Scatter
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TBE	Tris/Boric Acid/EDTA Buffer
TCF	T-cell factor
TGF-β	Transforming Growth Factor β

TNF-α	Tumor Necrosis Factor α

TABLES 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 de genou

Figure I- 3 : Représentation schématique de la structure de matrice extracellulaire de cartilage articulaire

Figure I- 4 : Structure du collagène

Figure I- 5 : Représentation schématique de l'organisation des collagènes de type II, XI et IX dans le tissu cartilagineux

Figure I- 6 : Structure du hyaluronate

Figure I- 7 : Facteurs influençant l'homéostasie du cartilage

Figure I- 8 : Localisation des lésions du cartilage articulaire

Figure I-9 : Schéma de la régénération d'une lésion superficielle et d'une lésion profonde du cartilage

Figure I-10 : Principe de l'ingénierie tissulaire depuis l'isolation de cellules justque la greffe tissulaire (Application au cartilage)

Figure I-11 : Vue d'ensemble de la dérivation des cellules souches embryonnaires et de leur pluripotentialité

Figure I-12 : Filiation proposée pour les différentes populations de cellules présentes dans la moelle osseuse

Figure I-13 : Différentes étapes de la chondrogénèse au cours du éveloppement des os longs

Figure I-14 : Représentation schématique de l'expression des régulateurs transcriptionnels lors des différentes étapes de la chondrogénèse et d'ossification endochondral.

Figure I-15 : Mécanisme de signalisation des BMP

Chapitre II :

Figure II- 1 : Billes d'alginate

Figure II- 2 : Principe de l'immuno-fluorescence indirecte

Figure II- 3 : Principe de l'immuno-fluorescence directe

Figure II- 4 : Shéma d'un microscope électronique à transmission

Figure II- 5 : Détermination du nombre de sites antigèniques à la surface celllaire

Figure II- 6 : Histogrammes de fluorescense

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 cytomérie en flux

Figure II-10 : Représentation schématique de la structure d'ADN et d'ARN

Figure II-11 : Représentation schématique d'une réaction de RT-PCR

Figure II-12: Image d'un gel d'électrophorèses des ARN ribosomaux (ARNr) provenant de cellules du foie ou de la rate

Chapitre III

Figure III- 1 : Image de CSMs adhérentes au passage 1

Figure III- 2 : Analyse de l'expression des molécules de surface des CSMs humaines-P3

Figure III- 3 : Influence du temps sur le métabolisme cellulaire dans les micromasses

Figure III- 4 : Influence de la durée de culture sur la viabilité des CSMs humaines en micromasses

Figure III- 5 : Influence du temps sur le cycle cellulaire des CSMs humaines dans un modèle de micromasses

Figure III- 6 : Expression des molécules de surface CD90 sur des CSMs humaines cultivées en micromasses

Figure III- 7 : Expression des molécules de surface CD166 sur des CSMs humaines cultivées en micromasses

Figure III- 8 : Expression des molécules de surface CD105 sur des CSMs humaines cultivées en micromasses et des chondrocytes

Figure III- 9 : Images de microscopie électronique à transmission de CSMs humaines en micromasses (J1)

Figure III-10 : Images de microscopie électronique à transmission de CSMs humaines en micromasses

Figure III-11 : Expression des ARNm du collagène de type I, II et Sox 9 et des agrécannes dans les micromasses après culture avec du TGF-β1

Figure III-12 : Bilan des résultats obtenus dans le modèle de culture 3D en micromasse

Figure III-13 : Influence des caractéristiques des hydrogels sur la viabilité des CSMs humaines

Figure III-14 : Influence des caractéristiques des hydrogels et de la présence de sérum sur la viabilité cellulaire

Figure III-15 : Analyse par cytométrie en flux du cycle cellulaire des CSMs humaines en culture en alginate sans sérum mais avec TGF-β1 (10ng/ml)

Figure III-16 : Analyse par cytométrie en flux du cycle cellulaire des CSMs humaines en culture en alginate avec sérum

Chapitre IV

Figure IV- 1 : Travaux en perspectives issus de notre étude

Tableaux

Chapitre I :

Tableau I- 1 : Composition ionique du cartilage articulaire de têtes fémorales humaines

Tableau I- 2 : Classification et caractéristiques des cellules souches

Tableau I- 3 : Caractéristiques des principaux marqueurs des surface permettant d'identifier les CSMs et les cellules hématopoïétiques

Tableau I- 4 : Expression de quelques marqueurs à la surface des cellules souches hématopoïétiques, des CSMs et des chondrocytes

Tableau I- 5 : Utilisation de biomatériaux et de CSMs humaines en ingénierie tissulaire du cartilage: études in vivo

Tableau I- 6 : Exemples de résultats obtenus lors de l'utilisation de biomatériaux et de CSMs humaines en ingénierie tissulaire du cartilage : études in vitro

Tableau I- 7 : Facteurs chimiques et non-protéiques favorisant la différenciation des CSMs en chondrocytes

Chapitre II :

Tableau II- 1 : Proportion et concentration de chaque polymère dans le biosystème

Tableau II- 2 : Caractéristiques et références des anticorps impliqués dans un immunomarquage direct

Tableau II- 3 : Caractéristiques et références des anticorps primaires et secondaires dans les immunomarquages indirects

Tableau II- 4 : Structure des acides nucléiques

Tableau II- 5 : Composants de la réaction de rétrotranscription

Tableau II- 6 : Ordres des amorces des gènes de collagènes de type I, II, des agrécannes, Sox9 et de la β-actine

Tableau II- 7 : Composant de la phase d'amplification

Chapitre III :

Tableau III- 1 : Influence des conditions de culture absence ou non de sérum sur le cycle cellulaire.

Tableau a : Phase G0/G1

Tableau b: PhaseS

Tableau c: Phase G2/M.

INTRODUCTION GENERALE

Les cellules progénitrices mésenchymateuses adultes (ou cellules souches mésenchymateuses) ont été identifiées comme étant de possibles « cellules réparatrices » de nombreux tissus, en raison de leurs potentialités de différenciation en différents types cellulaires issus de la lignée mésenchymateuse (Yang et al, 2002, Reyes M et al, 2001, Angele P et al, 2003). Les cellules souches mésenchymateuses peuvent être obtenues à partir de la moelle osseuse et sont capables de se différencier en ostéoblastes, chondroblastes, myoblastes, adipocytes. Récemment, il a été démontré dans des modèles murins que les cellules souches mésenchymateuses pouvaient donner naissance à des cardiomyocytes voire à des neurones.

L'ingénierie tissulaire est reconnue aujourd'hui comme une technique émergente qui consiste en des manipulations biologiques et physiques sur des cellules pour la régénération et la reconstruction de tissus et d'organes. Elle attire de plus en plus l'attention de chercheurs et d'ingénieurs de formations différentes et présente des intérêts scientifiques et des retombées économiques très importants (estimation 50 milliards d'euros à l'horizon 2020). Son objectif est de régénérer, à partir de cellules différentiées ou des cellules souches adultes, des tissus naturels afin de remplacer des tissus ou des organes déficients ou inopérants. Cette technique peut être considérée comme la troisième voie de thérapie en médecine régénératrice après les deux principales thérapies existantes : transplantation d'organes et chirurgie reconstructrice. C'est une voie alternative qui devrait permettre d'éviter certains problèmes rencontrés par les techniques classiques de réparation, en particulier le manque de donneurs, une médication immunosuppressive permanente. Elle ne nécessite pas l'implantation de matériaux artificiels qui peuvent présenter une biocompatibilité médiocre. L'ingénierie tissulaire offre de nouvelles voies thérapeutiques prometteuses en orthopédie, notamment dans les domaines de la réparation ligamentaire ou cartilagineuse.

Cependant, il est nécessaire de prendre en compte tous les paramètres qui permettent aux cellules de développer un phénotype propre à chaque tissu, tant du point de vue biochimique que mécanique.

Aujourd'hui, la régénération de certains tissus de soutien comme l'os ou le cartilage est le plus souvent proposée par thérapie cellulaire combinée à un biomatériau vecteur et/ou tuteur.

En effet, le cartilage est un tissu avasculaire soumis à des contraintes mécaniques. Ces contraintes mécaniques résultent d'une combinaison complexe de mécanismes de tension, de cisaillement et de compression, cette dernière étant déterminante au sein du cartilage.

Au cours de certaines atteintes articulaires (traumatismes accidentels ou pathologies dégénératives telles que l'arthrose), on assiste à une dégradation plus ou moins importante du cartilage qui est incapable de se régénérer. Les traitements les plus innovants font ainsi appel au concept d'ingénierie tissulaire qui consiste à ensemencer un biomatériau avec des chondrocytes ou des cellules progénitrices (CSMs ou cellules souches mésenchymateuses) pour préparer *in vitro* une matrice cartilagineuse réimplantable.

Cependant dans cette nouvelle approche thérapeutique plusieurs questions restent sans réponse et notamment :

- Comment choisir le protocole optimal permettant la différenciation des CSMs dans la voie désirée ?
- Quelle est l'importance des propriétés physicochimiques de la matrice support sur ces paramètres cellulaires de base, telles que la prolifération, les capacités de synthèse d'une matrice extracellulaire, sur la régulation de l'expression génique et la physiologie des cellules véhiculées dans le site lésionnel par le biomatériau?
- Le tissu de réparation obtenu acquiert-il et/ou conserve-t-il les propriétés physico-chimiques et biochimiques du tissu natif lorsqu'il est soumis aux contraintes mécaniques après réimplentation ?

Pour tenter de répondre à ces interrogations, nous avons étudié, dans ces travaux, différents protocoles visant à favoriser la différenciation cellulaire et à induire la synthèse d'un néo-cartilage.

En effet, après une étude bibliographique exhaustive sur le cartilage, l'ingénierie tissulaire et l'utilisation des cellules souches dans ce domaine, nous avons cherché à optimiser les conditions de différenciation des CSMs ainsi qu'à définir leur utilisation dans un biomatériau présentant des caractéristiques adéquates pour être utilisé à des fins de matrice biodégradable en ingénierie tissulaire du cartilage.

Dans un premier temps, nous avons tout d'abord contrôlé le phénotype des CSMs de moelle osseuse isolées et standardisé cette méthode.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la différenciation cellulaire en micromasse, de manière à se mettre en conditions tridimensionnelles pour optimiser les contacts intercellulaires et mimer les conditions physiologiques du cartilage ; tout en favorisant des phénomènes impliqués dans la différenciation. Dans ces conditions, la différenciation sera mise en évidence par l'analyse de l'expression des marqueurs de différenciation en cytométrie en flux, ainsi que l'observation de la formation d'une matrice

extracellulaire, avec en parallèle l'étude des paramètres de prolifération cellulaire (ie, cycle cellulaire). Cette étude s'inscrit sur une période de 21 jours de culture.

Dans un troisième temps, nous avons testé les différentes caractéristiques physico-chimiques (viscosité et pourcentage d'alginate) d'un biomatériau du point de vue de la toxicité cellulaire d'une part, et du cycle cellulaire

Enfin, nous terminerons par définir les protocoles qui peurront être développés à la suite de cette étude, avec toujours pour objectif la reconstitution d'un nouveau tissu cartilagineux.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Cartilage et chondrocytes

Le cartilage est un tissu conjonctif hautement spécialisé avasculaire et non innervé. Ce tissu est composé d'un seul type cellulaire, les chondrocytes, assurant la synthèse d'une matrice extracellulaire responsable de ces propriétés mécaniques. Chez l'homme adulte, on distingue trois types de cartilage (Figure I-1), caractérisés par la composition de la matrice extracellulaire [Mallein-Gerin et al, 1996], c'est-à-dire :

- Le cartilage hyalin ou articulaire. On le trouve au niveau du nez, de la trachée, des bronches, des costaux et des articulations (Figure I-1). Le cartilage articulaire est situé à la surface de l'os et en regard du liquide synovial (Figure I-2). Il est constitué d'une matrice extracellulaire importante, riche en collagènes de type II, VI, IX, X et XI et en protéoglycannes. Cette matrice est produite par un nombre relativement restreint de chondrocytes (représentant environ 10% du volume tissulaire). La composition biochimique de la matrice extracellulaire rend compte des propriétés mécaniques de ce cartilage : à savoir la possibilité de transmettre, d'amortir et de distribuer des charges importantes. Enfin, il assure le glissement des pièces osseuses entre elles avec un coefficient de friction très bas.

- Le cartilage élastique. Le cartilage élastique est caractérisé par la présence de fibres élastiques et constitue le pavillon de l'oreille, la trompe d'eustache, l'épiglotte et certains cartilages du larynx (Figure I-1). Il contient des chondroblastes et des chondrocytes et se caractérise par sa matrice extracellulaire. Elle comporte les mêmes composants (protéoglycannes et collagènes) que le cartilage articulaire mais également des fibres élastiques plus ou moins bien orientées. Ses fibres élastiques permettent de conserver la forme de la structure tout en assurant au cartilage une grande flexibilité.

- Le fibrocartilage. On le trouve dans les disques intervertébraux, à la symphyse pubienne et sur les ménisques des genoux (Figure I-1). Il est riche en fibres de collagène. Il Structurellement il'est un intermédiaire entre le tissu conjonctif et le cartilage hyalin. Ces fibres permettent une bonne résistance aux contraintes de traction et de compressions : il constitue les disques intervertébraux et les zones d'insertion des tendons.

Compte tenu de l'objet de notre travail, il ne sera traité dans cette étude bibliographique que du cartilage articulaire.

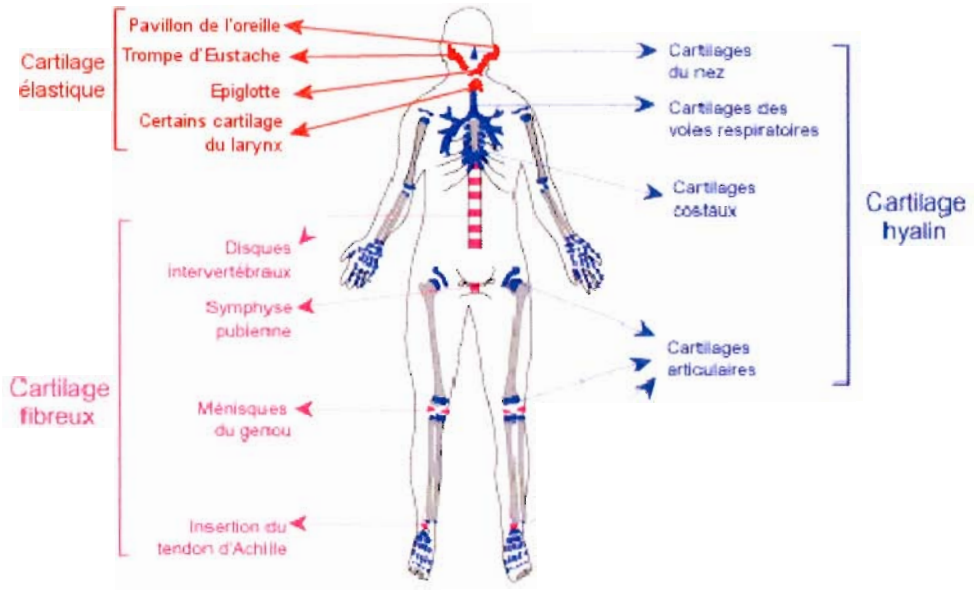


Figure I-1 : Localisation chez l'homme adulte des différents types de cartilage : hyalin (bleu), fibreux (rose) et élastique (rouge) [Mallein-Gerin F et al, 1996].

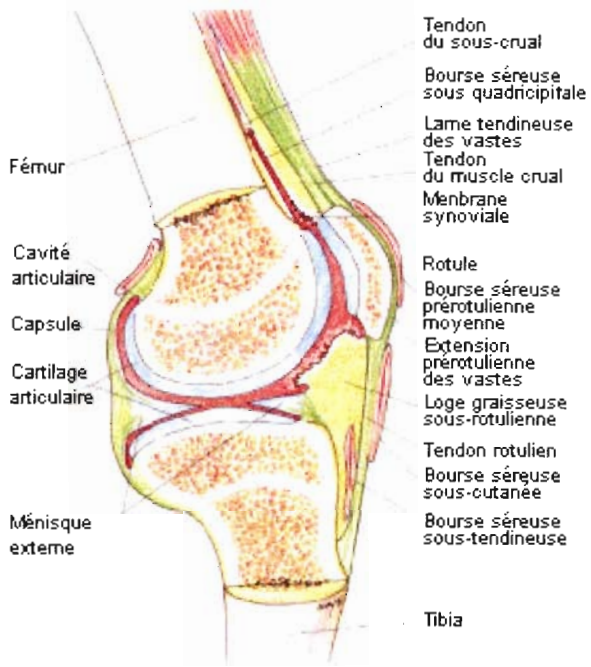


Figure I-2 : Représentation schématique d'une coupe externe du genou [Vignon E, 1995].

A. I. Physiologie du cartilage articulaire et des chondrocytes

A.I.1 : Structure du cartilage articulaire

Le cartilage normal apparaît blanc, brillant, discrètement translucide et sa richesse en protéoglycanes 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 micro-scopie électronique du cartilage articulaire montrent des structures fibreuses incluses, comme les chondrocytes dans une substance fondamentale homogène. Les études bio-chimiques ont montré qu'environ 40 % du poids sec du cartilage articulaire correspond au collagène. A la fin du processus de synthèse, les cellules cartilagineuses excrètent du pro-collagène qui est polymérisé en collagène à l'extérieur de la cellule. Les fibrilles formées ont un diamètre variable: environ 40 nm dans la couche superficielle, de 70 à 100 nm dans la couche moyenne du cartilage et environ 150 nm en profondeur. Les études par microscope à polarisation font apparaître une nette disposition préférentielle des faisceaux de fibrilles Leur trajet de même que la forme et l'organisation des chondrocytes, déterminent plusieurs couches dans le cartilage articulaire [Peyron J et al, 1994].

A.I.2 : Les constituants :

Ainsi que nous l'avons dit plus haut, le cartilage est constitué de deux éléments :

Une cellule type : le chondrocyte ;

Une matrice extra-cellulaire ; dont le principal composant est l'eau (environ 75 %), retenue en son sein grâce au pouvoir hydrophile des protéoglycannes [Muir H et al, 1986].

A.I.2.1 : Les chondrocytes

Les chondrocytes, comme toutes cellules des tissus conjonctifs et de soutien, dérivent du mésenchyme embryonnaire. La différenciation de 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 s'écartent plus en plus; ainsi le cartilage apparaît pauvre en cellules. Le cartilage est pauvre en cellules, puisque les chondrocytes occupent entre 1 et 10% du volume du tissu. De plus, cette

densité cellulaire varie en fonction de la profondeur du cartilage [Stockwell RA et al, 1971] en fonction de l'individu et, pour un même individu, en fonction du type d'articulation considéré. La zone superficielle comporte le plus de cellules. Il semble exister un nombre fixe de chondrocytes dont le nombre va décroissant à partir de l'âge de 20 ans chez l'homme.

Morphologie des chondrocytes

Le chondrocyte a une forme sphérique et mesure de 10 à 30 µm de diamètre [Vignon E et al, 1987]. 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 glycogéniques et des liposomes [Vignon E et al, 1987]. Les chondrocytes utilisent essentiellement le glucose comme substrat énergétique. En raison du caractère avasculaire du cartilage, il reçoit peu d'oxygène et donc doit privilégier la voie de la glycolyse anaérobie [Muir H et al, 1986]. De plus, il consomme une quantité importante de glucose, qu'il convertit en glucosamine pour réaliser la synthèse des proteoglycannes [Chevalier X et al, 1996]. Il est important de souligner que les chondrocytes sont non seulement capables de produire la matrice extracellulaire et les facteurs de croissance qui gouvernent cette synthèse, mais il sécrète également les enzymes capables de la détruire: dans des cas pathologiques, il peut aussi produire des cytokines pro-inflammatoires provoquant la destruction du cartilage. Le contenu intracytoplasmique (appareil de Golgi, mitochondries et lysosomes) augmente progressivement de la surface vers la profondeur du cartilage [Brighton CT et al, 1990].

Lors de la croissance chondrocytaire, quatre types de cellules sont observés:

- les cellules actives caractérisées par une membrane cytoplasmique hérissée, une dilatation parfois vacuolaire du réticulum, un appareil de Golgi très développé, de nombreuses mitochondries et peu de glycogène.
- les cellules de surcharge ou de réserve, volumineuses, dont le noyau est normal mais dont le cytoplasme ne contient que l'appareil de Golgi, des microfilaments, du glycogène et des lipides. Ces cellules peuvent évoluer essentiellement vers une forme active mais aussi vers la nécrose. Elles sont absentes de la couche superficielle.
- les cellules en dégénérescence, présentes surtout dans la zone profonde, caractérisées par un noyau encoché et un cytoplasme ne contenant qu'un appareil de Golgi dilaté et des enclaves lipidiques.
- les cellules nécrotiques, plus ou moins réduites à des débris cellulaires.

Les chondrons

Dans le cartilage articulaire, une matrice extra-cellulaire par un espace dit péricellulaire entoure un ou plusieurs chondrocytes. Cet espace n'est pas une lacune comme cela était précédemment supposé mais un espace clef où le pH est plus acide (pH 6,1) que dans le reste du tissu (pH 7,4). Les enzymes lysosomiales (cathepsines B) qui y sont libérées, étant activées par le pH acide, peuvent donc dégrader la matrice extracellulaire. De plus, dans cet espace péricellulaire, les proteoglycannes et les collagènes présents, comme par exemple le collagène de type VI [Marcelino J et al, 1995] est utilisé pour réaliser l'ancrage des chondrocytes à la matrice par l'intermédiaire de protéines membranaires. L'ensemble, chondrocyte - matrice péricellulaire forme le chondron [Poole CA et al, 1997].

Division et renouvellement des chondrocytes

Dans le cartilage immature, les chondrocytes se divisent et le pourcentage de cellules en mitose diminue progressivement pendant la période de croissance [Mankin HJ et al, 1964]. En revanche, chez l'adulte, la division des chondrocytes existe dans une proportion si faible qu'elle est impossible à déceler [Mankin HJ et al, 1981].

Dans certaines situations telles que certaines pathologies, les chondrocytes sont capables de se diviser par mitoses.

Métabolisme des chondrocytes

Les chondrocytes sont des cellules actives qui assurent la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire. Le chondrocyte est une véritable usine métabolique. Chez l'adulte, il ne se divise pas et sa densité diminue mais il assure toujours la synthèse de la matrice en particulier les protéoglycannes. En raison du caractère avasculaire du cartilage, les sources d'énergie sont, en majeure partie, constituées par la glycolyse anaérobie [Muir H et al, 1986]. Ainsi, les chondrocytes possèdent toutes les enzymes impliquées dans la glycolyse, le métabolisme du glycogène et celui des lipides. Les nutriments nécessaires à la synthèse des éléments extracellulaires parviennent aux cellules par le liquide synovial grâce à un processus de double diffusion passive favorisé par la mobilité de l'articulation. Il assure également la dégradation de la matrice en sécrétant des enzymes de dégradation comme les métalloprotéases en particulier l'agrécannase, la stromélysine et la collagénase. L'activité du chondrocyte est régulée par des facteurs mécaniques, la déformation de la matrice engendrant des signaux mécaniques, électriques et physicochimiques. Un certain nombre de facteurs

autocrines assurent la régulation de l'activité cellulaire. Il s'agit de l'Insulin-like growth factor (IGF), du Transforming Growth Factor bêta (TGF-β) et des Bone Morphogenetic Proteins (BMP) qui exprimés par le chondrocyte stimulent la synthèse des constituants de la matrice. En cas de lésion, le Fibroblast Growth Factor (FGF) et la Parathyroid Hormone Related Protein (PTH rP) favorisent la prolifération cellulaire.

Nutrition

Le cartilage étant avasculaire, sa nutrition s'effectue par la diffusion du liquide interstitiel, qui provient du liquide synovial et de l'os sous-chondral sur lequel repose le cartilage [Szirrmai JA et al, 1967]. Pendant l'enfance, les 2 voies semblent d'importance égale puis avec l'âge le flux du liquide interstitiel se tarit et représente moins de 20% du flux total du cartilage chez le sujet âgé. La composition du liquide interstitiel est liée aux propriétés physico-chimiques de la substance fondamentale du cartilage qui se comporte comme un filtre sélectif. Ainsi, les molécules de taille inférieure à 60 kDa diffusent facilement au sein du cartilage. En revanche, les protéines insolubles comme l'amylase et les précipités protéiques (complexe anticorps-antigènes) ne diffusent pas dans le cartilage mais s'accumulent sous sa surface.

La vitesse de diffusion des produits à travers le cartilage articulaire est bien définie. L'eau, le glucose, les cations pénètrent plus vite que les nonélectrolytes ou les anions. Pour Maraudas, le coefficient de diffusion est inversement proportionnel au poids moléculaire. La teneur de la matrice en protéoglycanes intervient dans la vitesse de diffusion du liquide synovial. Les facteurs mécaniques jouent un rôle prépondérant dans la nutrition du cartilage articulaire. Expérimentalement, l'immobilisation d'une articulation entraîne une méta-chromasie cellulaire avec apparition d'une lésion cartilagineuse. A l'inverse, la mobilisation articulaire favorise la pénétration du liquide et assure la nutrition.

A.I.2.2 : La matrice extracellulaire

Les composants majeurs de la matrice extracellulaire (MEC) du cartilage (Figure I-3) sont l'eau (65-80% du poids humide du tissu), le collagène, les protéoglycannes et le hyaluronate (environ 20% du poids humide), une phase ionique (Na^+, Ca^{++}, Cl^-, etc. ; < 1% du poids humide) permettant de neutraliser les charges des protéoglycannes et des collagènes [Mow VC et al, 1999]. [Figure I-3]

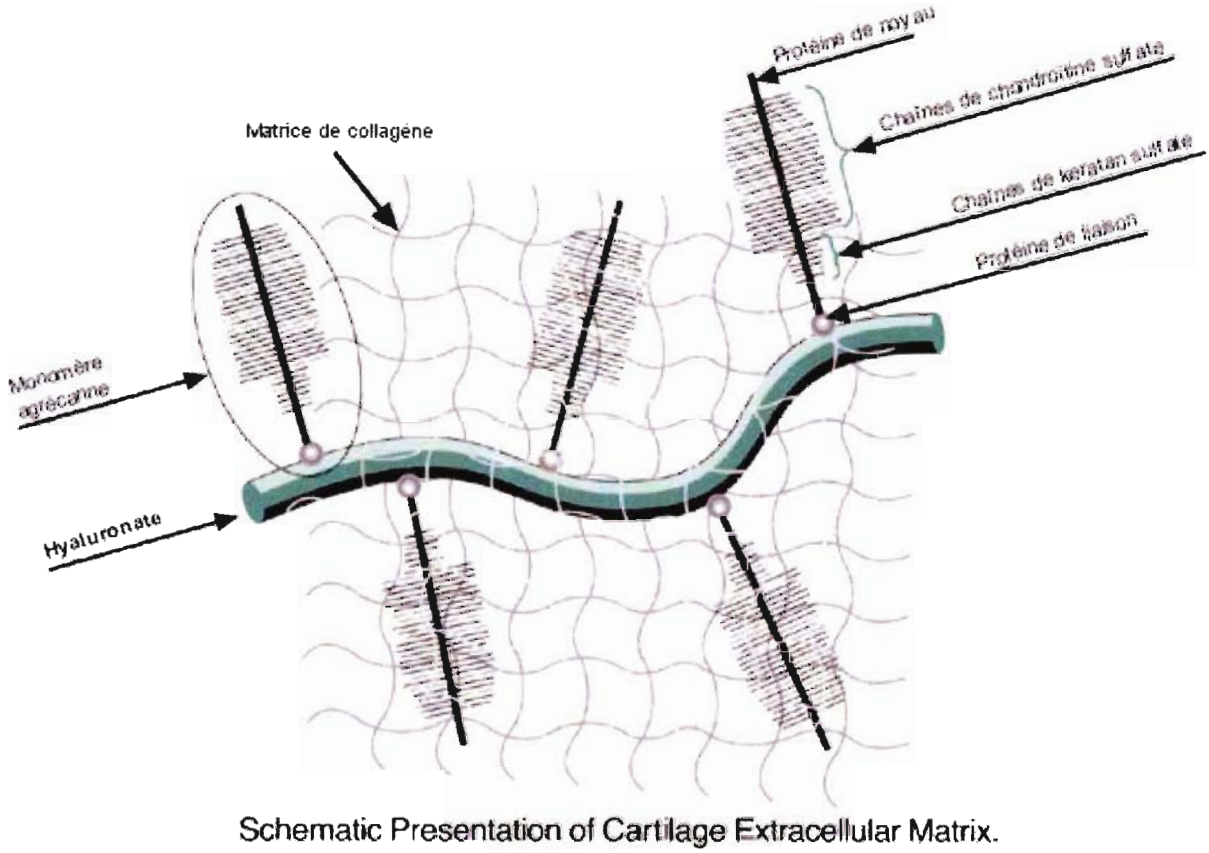


Figure I-3 : Représentation schématique de la structure de matrice extracellulaire du cartilage articulaire [www.peprotech.com/ uploadedimages/chart-2(1).jpg]

Les grands protéoglycannes sont de grosses molécules formées par la liaison des monomères d'agrécannes sur une longue molécule d'acide hyaluronique. Ils assurent l'attraction de l'eau. Les petits protéoglycannes (décorine, biglycanne et fibromoduline) jouent un rôle important dans la formation et l'association entre les fibres. Le collagène de type II homotrimère est formé de trois chaînes α1 et représente 95% du collagène du cartilage. Les collagènes mineurs étant les collagènes de type VI, IX, X et XI. De nombreuses autres protéines (anchorine CII, COMP (cartilage oligo matrix protein), fibronectine, ténascine) interviennent également dans l'assemblage de la matrice et dans l'homéostasie du cartilage.

L'eau

Le cartilage possède un contingent hydrique très important, de 80 % du poids total [Buckwalter JA, 1998] dans la zone superficielle à 65 % dans la zone profonde. Sa teneur diminue avec l'âge et la profondeur du tissu. L'eau existe sous forme libre et liée aux protéoglycannes. L'eau liée confère au tissu sa consistance élastique et l'eau libre véhicule les

substances nutritives et les déchets métaboliques. L'interaction entre l'eau et les macromolécules de la matrice influence les propriétés mécaniques du tissu.

Les collagènes

Les collagènes jouent un rôle de soutien des tissus conjonctifs. Toutes les protéines collagèniques suivent la structure suivante [Figure I-4].

- Présence de domaines en triple hélice : cette structure est possible du fait de la répétition de la structure primaire $[Gly\text{-}X\text{-}Y]_n$. X est le plus souvent une proline et Y une hydroxyproline ou une hydroxylysine. Les trois chaînes sont stabilisées par des liaisons hydrogène qui protègent la triple hélice des protéases non spécifiques.
- Formation d'agrégats supramoléculaires (fibrilles, filaments, réseaux, dimères) seuls ou en association avec d'autres composants matriciels.
- Rôle de structuration des matrices extracellulaires.

Les collagènes interviennent également dans le contrôle de l'adhérence, de la morphologie, de la croissance, du déplacement et de l'état de différenciation cellulaire.

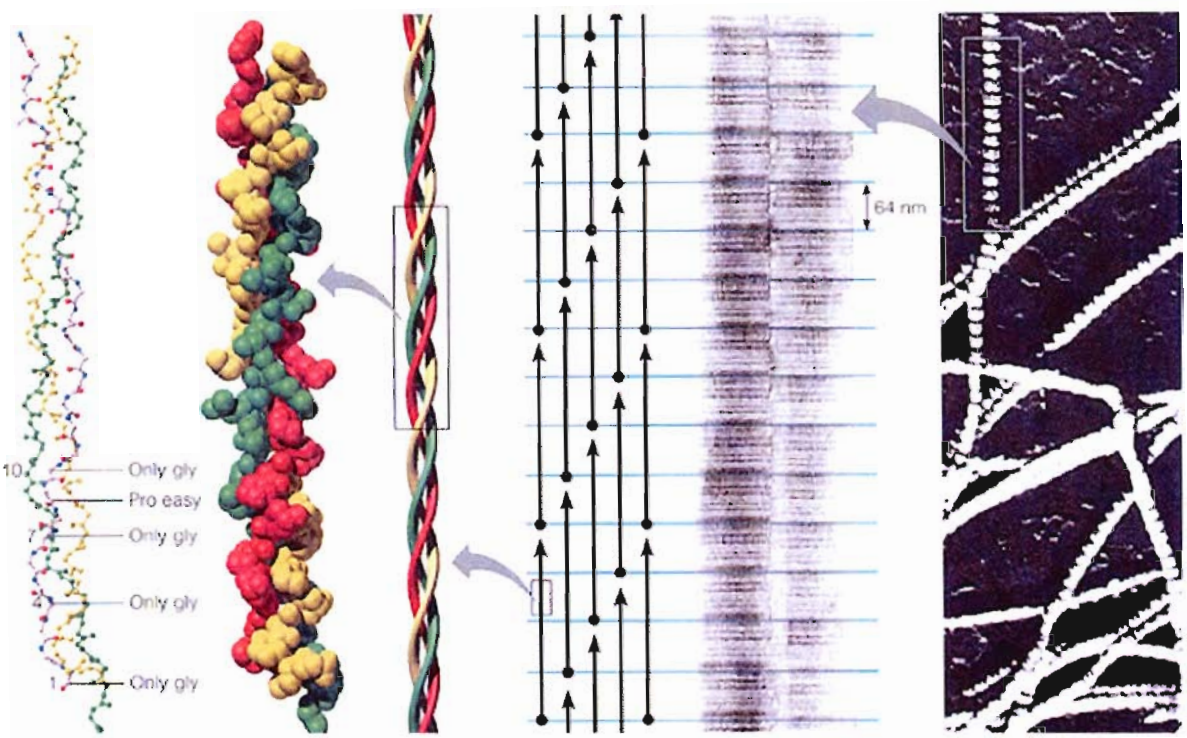


Figure I-4 : Structure du collagène [wwwfac.mcdaniel.edu/Proteins/Collagen.jpg]

Vingt-sept types de collagènes ont été identifiés à ce jour. Dans le cartilage articulaire, les principaux collagènes rencontrés sont essentiellement :

Le collagène de type II, homotrimère composé de trois chaines α1 (11), est le plus représenté (92 % à 95 %). 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'attache le collagène de type IX. Les fonctions des collagènes de type IX et XI sont mal connues [Figure I-5].

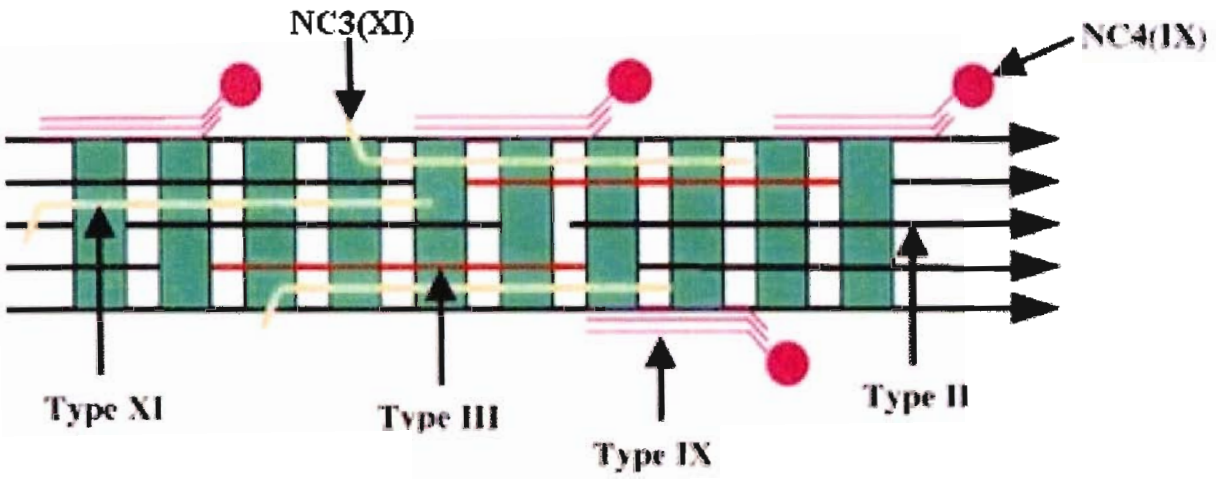


Figure I-5 : Représentation schématique de l'organisation des collagènes de type II, XI et IX dans le tissu cartilagineux. *NC3=terminal globulaire aminé du collagène XI; NC4=terminal globulaire aminé du collagène IX.* [www.cardiff.ac.uk/.../staff/duance.html]

Les collagènes de type IX et XI correspondent, respectivement, à 3% et 10% selon l'origine du cartilage (espèce et nature de l'articulation) et l'âge [Cremer MA et al, 1998]. Ils contribueraient à la formation et à la stabilité du réseau collagénique. Le type IX interviendrait plus particulièrement dans la liaison entre fibrilles et les interactions avec les protéoglycannes. Le type XI régulerait l'organisation tridimensionnelle des fibrilles et leur diamètre.

Le collagène de type X est aussi retrouvé en faible quantité au sein du cartilage [Linsenmayer TF et al, 1988] dans la zone superficielle. Ce dernier 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. Il se dépose sous la forme d'un tapis uniquement autour des chondrocytes du cartilage calcifié et des chondrocytes hypertrophiques.

Le collagène de type I est présent en faible quantité à la surface du cartilage articulaire sain. [Peyron J et al, 1994].

Les collagènes de type V, VI (à proximité des chondrocytes qu'il aide à s'arrimer à la matrice) et VII sont aussi présents au sein du cartilage [Buckwalter JA et al, 1998]. Ces molécules confèrent au cartilage sa rigidité.

Les protéoglycannes

Ils représentent 5 à 10% du poids humide du cartilage. Ils peuvent retenir l'eau à l'intérieur du cartilage ce qui lui confère des propriétés physiques uniques. Le cartilage contient plusieurs classes de protéoglycannes: les grands protéoglycannes appelés agrécannes qui forment des agrégats en s'associant par des liaisons non covalentes à l'acide hyaluronique constituant ainsi la masse principale des protéoglycannes, de grands protéoglycannes non associés à l'acide hyaluronique, des petits protéoglycannes (la décorine, le biglycanne et la fibromoduline), des protéoglycannes associées à la membrane des chondrocytes ou faisant partie de la membrane et enfin des fragments de grands protéoglycannes [Peyron J et al, 1994]. Ce sont des macromolécules formées d'une protéine porteuse sur laquelle se fixent des chaînes de glycosaminoglycannes (GAGs, kératanes sulfates, chondroïtines sulfates) et des sucres (oligosaccharides). Ces protéoglycannes sont amarrés par une protéine de jonction sur une chaîne polypeptidique linéaire [Peyron J et al, 1994; Hardingham TE et al, 1972]. Le caractère hydrophile de ces molécules permet une augmentation de volume du cartilage toutefois limitée par le maillage des fibres de collagène. Les protéoglycannes chargés négativement attirent les ions positifs tel que l'ion sodium, d'où un afflux d'eau. Elles sont ainsi responsables de la déformation réversible du cartilage et de son élasticité. Elles jouent un rôle primordial dans l'organisation structurale et les propriétés mécaniques du cartilage articulaire.

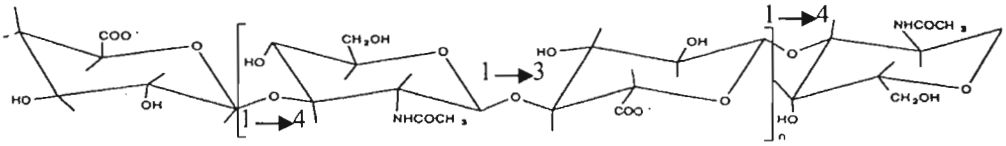
Les petits protéoglycannes

Ces petits protéoglycannes représentés dans le cartilage par la décorine, le biglycanne et la fibromoduline se lient aux composants matriciels comme le collagène de type II, la fibronectine ou la thrombospondine afin de participer à l'intégrité de la matrice cartilagineuse. De plus, ils peuvent se lier aux facteurs de croissance de type TGF-β dont ils régulent la biodisponibilité ainsi que l'activité biologique [Rédini F et al, 2001]. Des modifications de ces protéoglycannes entraînent des modulations dans l'activité biologique de facteurs de croissance tels que le TGF-β et l'IGF indispensables à la réparation du cartilage.

Le hyaluronate (HA)

Sa structure est connue depuis les travaux de Weissman B[1975] et Jeanloz RW[1982]. Il s'agit d'un polysaccharide composé d'un enchaînement linéaire non ramifié de motifs disaccharidiques constitués d'acide P-D-glucuronique lié en $\vdash\!\!\rightarrow 3$ à la N-acétyl-β-D-glucosamine. L'enchaînement de ces deux résidus donne une unité disaccharidique appelée

acide N-acétyl-hyalobiuronique. Les motifs disaccharidiques sont associés les uns aux autres en 1 4. Le polysaccharide est formé de 10000 à 12000 unités disaccharidiques.



Acide N-acétyl-hyalobiuronique

Figure I-6: Structure du hyaluronate (HA)

Le HA joue un rôle structural indispensable au niveau de la matrice cartilagineuse puisqu'il participe à la formation des agrégats de protéoglycannes (Figure I-6).

De plus, le HA influence de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la migration, l'adhérence ou la prolifération cellulaire [Lindenhayn K et al, 1999]. Au niveau de la matrice extracellulaire, 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 du phénomène de respiration cellulaire a par ailleurs été mis en évidence *in vitro* sur des explants cartilagineux [Larsen NE et al, 1992].

Les Protéines non collagéniques (PNC) et glycoprotéines

La COMP qui a valeur de marqueur du renouvellement et de la dégénération de la matrice extracellulaire, la chondroadhérine, la fibronectine, l'anchorine II, la thrombospondine, la laminine et la tenascine C sont les principales protéines non collagèniques et glycoprotéines retrouvées dans le cartilage [Buckwalter JA et al, 1998]. Les protéines non collagéniques du cartilage ont été moins étudiées que les collagènes. Elles jouent pourtant un rôle important dans l'homéostasie du cartilage et interviennent dans les interactions chondrocytes-macromolécules. Leur rôle précis n'est pas toujours bien défini ainsi que leur nombre exact mais l'on peut citer : l'annexine, l'anchorine qui interviennent dans les liaisons collagène II-chondrocytes. La chondrocalcine joue un rôle dans la minéralisation. La thrombospondine contient des domaines de liaison avec les GAGs et joue un rôle dans l'adhérence cellulaire *via* la fixation aux séquences RGD (arginine-glycine-acide aspartique). La fibronectine se lie au collagène et aux protéoglycannes. La ténascine joue un rôle au cours de l'embryogenèse.

Le rôle de ces protéines non collagéniques est essentiel dans les interactions cellules-matrice et donc dans les phénomènes d'adhésion et de migration cellulaire au sein de la matrice. La liaison avec les chondrocytes se réalise par des protéines transmembranaires, les intégrines. Ces protéines sont reliées au cytosquelette par leur coté cytosolique et peuvent induire des mécanismes de transduction du signal et activer des gènes. L'expression de ces PNC est faible dans un cartilage normal mais important dans le cartilage arthrosique. Ainsi, la fibronectine jouerait un rôle important dans la réparation du cartilage, sa synthèse s'accompagnant d'une augmentation de la production de protéoglycannes.

A.I.3 : Homéostasie du cartilage

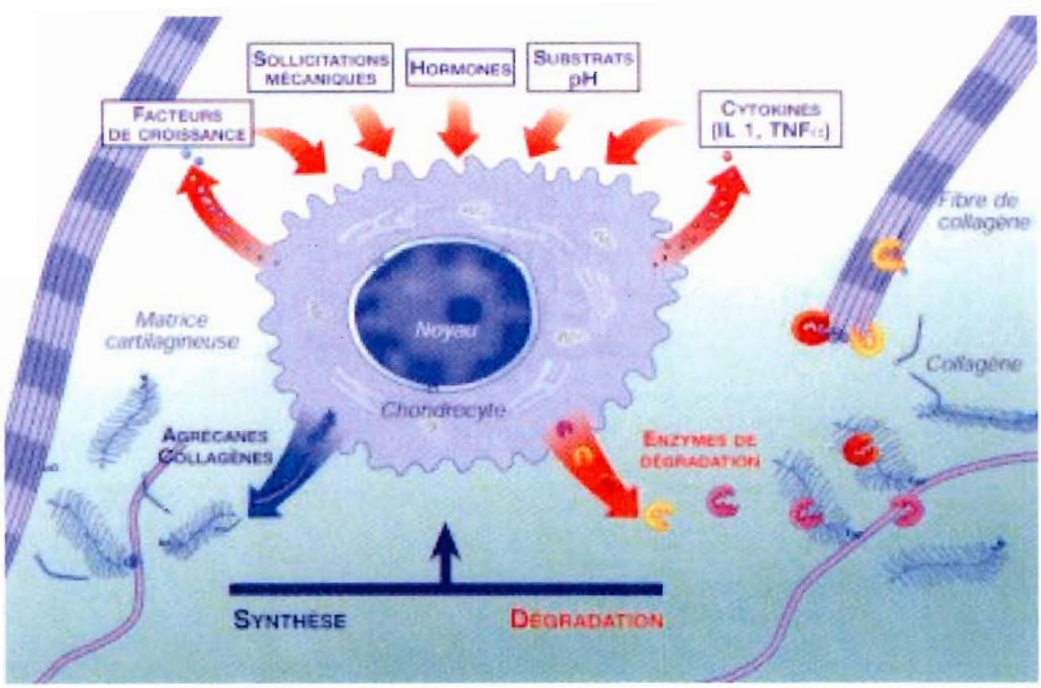


Figure I- 7 : Facteurs influençant l'homéostasie du cartilage [Negma Lerads, 2001].

Dans le cartilage articulaire normal, les chondrocytes maintiennent un équilibre entre la synthèse (anabolisme) et la dégradation (catabolisme) de la matrice extracellulaire. L'homéostasie est influencée par certains facteurs solubles tels que les hormones ou les vitamines mais également les cytokines, les facteurs de croissance et aussi par l'environnement physico-chimique des chondrocytes et les contraintes mécaniques qui y sont associées. Lorsque cet équilibre est rompu, une dégradation à terme du tissu est observée (Figure I-7).

A.I. 3.1: Les cytokines

Deux types de cytokines interviennent dans l'homéostasie du cartilage : les cytokines impliquées dans l'anabolisme et celles impliquées dans le catabolisme de la matrice extracellulaire.

L'Interleukine 1 (IL-1), l'IL-6 et le tumor necrosis factor α (TNF-α) sont des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la dégradation du cartilage. Le chondrocyte possède le matériel génétique nécessaire à leur synthèse. L'IL-1 et le TNF-α augmentent la production des métalloprotéases (collagénases et protéoglycanases) qui détruisent la matrice du cartilage. Ils inhibent également la synthèse du collagène de type II et des protéoglycannes [Mathieu P et al, 1999; Lequesne M et al, 1995]. La synthèse d'IL-6 par les chondrocytes peut être induite à la fois par l'IL-1 et par le TNF-α [Nietfeld JJ et al, 1990; Malfait AM et al, 1994]. De plus, au cours de pathologie telle que les lésions cartilagineuse, la présence de l'IL-6 stimule l'expression des récepteurs membranaires de l'IL-1 et du TNF-α [Nietfeld JJ et al, 1990]. Mais il a également été montré que l'IL-6 pouvait avoir aussi des effets chondroprotecteurs, puisqu'elle peut stimuler l'expression de l'antagoniste soluble du récepteur de l'IL-1 [Jordan M et al, 1995], inhiber la production de monoxyde d'azote (NO) (connu pour sa contribution dans les phénomènes inflammatoires), ainsi que la dégradation des constituants matriciels [Shingu M et al, 1994]. Il semblerait que ces effets protecteurs dépendent de la présence conjointe de son récepteur soluble [Silacci P et al, 1998].

L'IL-4 et l'IL-10 sont en revanche des cytokines protégeant la matrice d'une éventuelle dégradation [Van Roon JA et al, 1996]. En effet, l'IL-4 a un effet chondroprotecteur, puisqu'elle agit comme un antagoniste de la voie de signalisation induite par l'IL-1. Elle inhibe la production des métalloprotéases induite par l'IL-1 [Nemoto O et al, 1997].

Certaines cytokines (essentiellement l'IL-4 et l'IL-6) interviennent également dans la régulation de l'expression des petits protéoglycannes comme la décorine et le biglycanne. Ainsi, l'IL-6 inhibe l'expression du biglycanne, tandis que l'IL-4 stimule celle de la décorine [Rédini F et al, 2001].

A.I.3.2 : Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des protéines de bas poids moléculaire qui jouent un rôle important dans la préservation du cartilage articulaire. Parmi les facteurs identifiés, trois

semblent prépondérants : l'IGF1 (Insulin like Growth Factor 1), le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) et le TGF-β (Transforming Growth Factor β).

L'IGF1 est capable de stimuler la synthèse matricielle mais aussi la multiplication et la différenciation des chondrocytes. Il semblerait également que l'IGF1 inhibe la dégradation des protéoglycannes induites par l'IL1 ainsi que la production de médiateurs de l'inflammation tels que la phospholipase A2 et les prostaglandines E2 [Verschure PJ et al, 1996].

Le bFGF possède des effets anaboliques mais il augmente aussi l'expression des récepteurs à l'IL1 à la surface des chondrocytes et potentialise l'effet de l'IL-1 sur la production des métalloprotéases. A l'inverse, il est capable d'augmenter la synthèse des IGF [Chandrasekhar S et al 1989].

Les effets du TGF-β sur le cartilage articulaire restent encore mal connu. Il a cependant été montré que sur des explants en culture, ce facteur de croissance peut stimuler ou inhiber la synthèse des protéoglycannes par les chondrocytes ainsi que leur prolifération [Van der Kraan PM et al, 1992 ; Vivien D et al, 1990]. Selon Van Osch et al, l'action du TGF-β se traduit différemment selon la phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule cible [Van Osch GJ et al, 1998].

A.I.3.3 : Autres facteurs solubles

D'autres facteurs solubles, tels que des vitamines (acide rétinoïque ou acide ascorbique) ou des hormones peuvent influencer l'homéostasie du cartilage.

L'acide rétinoïque dérivant de la vitamine A induit une dédifférenciation des chondrocytes en fibroblastes et agit comme un inhibiteur de la chondrogenèse [Wang W et al, 2002]. En revanche, il est montré *in vitro* que l'acide ascorbique (vitamine C) stimule la prolifération des chondrocytes et influence la production des collagènes [Hering TM et al, 1999].

A.I.3.4 : L'environnement physico-chimique du chondrocyte

Les chondrocytes sont maintenus dans une matrice riche en protéoglycannes polyanioniques. La matrice extracellulaire contient également une forte concentration de cations Na^+, K^+, Ca^{2+} provenant du liquide synovial (Tableau I-1). La concentration de ces cations dépend de la localisation des protéoglycannes dans le cartilage [Maroudas A et al, 1979]. Elle est donc plus importante dans les zones intermédiaire et profonde du cartilage. La

concentration ionique totale et par conséquent l'osmolarité du tissu est significativement plus importante dans le tissu que dans le liquide synovial, ce qui engendre une pression hydrostatique. C'est cette pression hydrostatique qui influence l'homéostasie du cartilage, puisqu'elle varie selon les activités physiques [Maroudas A et al, 1981].

Tableau I-1 : Composition ionique du cartilage articulaire de têtes fémorales humaines [Mobasheri et al, 1998].

	Na^+ (mM)	K^+ (mM)	Ca^{2+} (mM)	Cl^- (mM)	pH
Cartilage	240-350	7-12	6-20	60-100	6,9-7,1
Liquide synovial	140	5	1,5	145	7,4

Le pH extracellulaire est également un facteur pouvant influencer l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme de la matrice. Il dépend d'une part de la concentration en charges négatives des protéoglycannes [Maroudas A et al, 1979] mais aussi du métabolisme énergétique des chondrocytes. En effet, ces cellules produisent de l'énergie à partir de la glycolyse anaérobie. L'acide lactique produit diffuse de la zone profonde du cartilage vers le liquide synovial, produisant des gradients de concentration et par conséquent des variations de pH [Holm S et al, 1981].

A.I.4 La fonction de cartilage articulaire et mécanobiologie

Le tissu cartilagineux vît pour et par le mouvement. Il est édifié dans sa diversité, dans sa structure et dans sa forme d'après sa fonction. Il associe la transmission des charges avec effet d'amortissement et le glissement des surfaces articulaires avec une usure pratiquement nulle. Le cartilage est un tissu spécialisé et adapté aux contraintes de compression mécanique. Il a mortit dans le temps et répartit dans l'espace les forces mécaniques auxquels il est soumis. Il maintient le glissement entre les deux épiphyses opposées lors de l'application d'une charge. La lubrification entre les deux surfaces est assurée par le liquide synovial, riche en hyaluronate.

Le cartilage est un tissu semi-dur; il est légèrement déformable lorsqu'une force est appliquée et peut reprendre sa forme initiale à l'arrêt de cette compression. Les propriétés

biomécaniques du cartilage dépendent de l'intégrité des éléments fibrillaires ou non [Lohmander LS et al, 1996]. Le réseau de collagène donne sa forme au tissu et le taux d'agrécanne influence la résistance à la compression [Hardingham T et al, 1996]. Les agrégats de protéoglycannes et d'acide hyaluronique lui confèrent une densité de charges négatives élevée. Ces charges, qui se repoussent mutuellement, attirent les cations extracellulaires et de grandes quantités d'eau (équilibre de Donnan) [Hadler NM et al, 1977]. La présence du réseau fibrillaire collagénique diminue l'hydrophilie du cartilage par la mise en tension permanente des fibres avec les agrégats de protéoglycannes.

Les propriétés rhéologiques du cartilage lui permettent de supporter des charges importantes [Afoke NY et al, 1987]. Lorsqu'il subit une déformation, la pression osmotique s'élève en raison des fuites d'eau et d'électrolytes qui s'effectuent vers l'extérieur du réseau de protéoglycannes. Il s'établit alors un équilibre avec la charge appliquée [Oloyede A et al, 1993]. Sa capacité à se déformer de façon réversible lui permet de jouer un rôle d'amortisseur aux extrémités osseuses en répartissant, de façon homogène, les forces appliquées.

Sous l'effet des contraintes mécaniques, le cartilage subit une pression. Cette pression est amortie, répartie afin d'en diminuer les effets et les contraintes en tension. Les contraintes en pression sont assumées par les proteoglycannes, les contraintes en tension par les fibres de collagène. Il faut distinguer la charge permanente (station debout) et la charge intermittente (marche ou course).

Charge permanente

La résistance du cartilage à la compression est due à sa forte hydrophilie et au réseau collagène. L'eau et les électrolytes vont quitter la zone comprimée ce qui s'accompagne d'une concentration des proteoglycannes et un rapprochement des charges anioniques (SO4-COO) d'où une augmentation de la résistance à la déformation. Cette augmentation de pression augmente l'anabolisme des chondrocytes. Lorsque la pression cesse, le cartilage reprend son volume d'abord rapidement (phase élastique) puis progressivement (phase plastique) par effet de Gibbs-Donnan. La persistance de la charge en durée et intensité peut avoir un effet inverse sur la synthèse des proteoglycannes.

Charge intermittente

Selon l'importance et la fréquence de la charge, la déformation est soit minime, avec récupération immédiate du volume (réponse élastique), soit importante, avec un mouvement transitoire de l'eau (réponse plastique), la récupération de volume se faisant après suppression de la charge. L'effet de pompage intermittent est plus bénéfique pour le chondrocyte que la pression permanente. Les activités de synthèse sont améliorées.

Charge excessive

Elle a pour conséquence une fuite de l'eau tissulaire en zone de charge avec une augmentation de la tension de la trame fibrillaire sur le pourtour avec risque de rupture du réseau collagène. Après suppression de la charge, la fragilisation du collagène se traduit par une hyperhydratation (œdème). Les chondrocytes sous la zone de pression sont altérés et leur capacité de synthèse diminue. Il apparaît un déséquilibre entre catabolisme et anabolisme au profit du premier et une activité enzymatique néfaste.

Mise en décharge

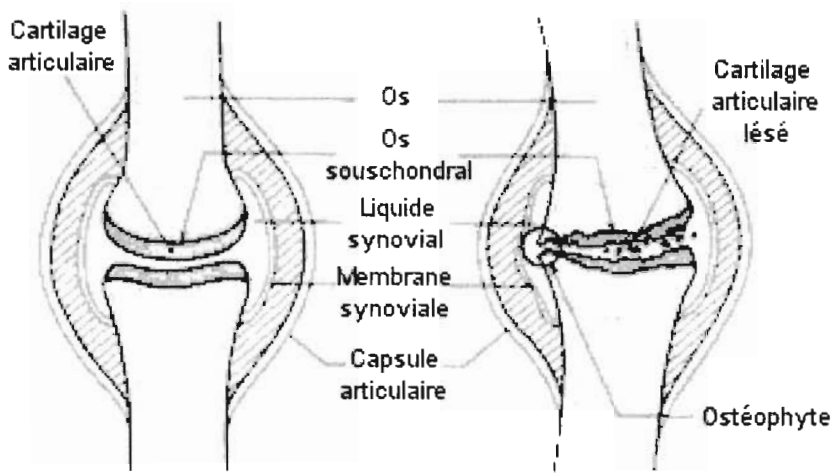
L'absence de charge est aussi délétère que son excès, ce qui a bien été démontré dans la littérature. La synthèse chondrocytaire diminue, le cartilage perd sa résistance et devient plus mou et fragile. Cette phase est réversible à condition d'une remise en charge progressive et pas trop tardive.

La physiologie du cartilage est donc étroitement liée aux contraintes biomécaniques qui s'y appliquent. La visco-élasticité de l'os sous-chondral est un élément de protection indispensable du cartilage. L'altération de la trame collagénique, la perte des protéoglycannes et le dysfonctionnement chondrocytaire sont les éléments clés dans le déterminisme de l'lésions cartilagineuse.

A.II : Les lésions cartilagineuses : De la physiopathologies aux traitements

A.II.1 : Les lésions cartilagineuses

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 [Figure I-8]. Il existe en plus, des lésions dites ostéochondrales et qui apparaissent sur des matrices saines. Ces lésions ont, pour la plupart, une origine traumatologique. Elles sont consécutives à des entorses graves ou à des luxations rotuliennes. Ces lésions peuvent également apparaître à la suite d'une ostéochondrite juvénile ou après une corticothérapie. En effet, les corticoïdes engendrent alors l'apparition d'une ostéonécrose, un effondrement du plancher sous-chondrale osseux, des cassures ainsi que des fissurations sévères au niveau du cartilage.



a : Cartilage articulaire sain b : Cartilage articulaire lésé

Figure I-8: Localisation des lésions du cartilage articulaire. La figure a représente un schéma du cartilage articulaire sain et la figure b représente un schéma d'un cartilage lésé. [http://www.cforyourself.com/Conditions/Arthritis/arthritis.html]

A.II.1.1 : Differents types de lésions

Les lésions cartilagineuses superficielles

Il s'agit pour la plupart de fissurations ou de lésions de surface plus étendues dites « à l'emporte-pièce ». Ces lésions respectent la couche de cartilage calcifié et l'os sous-chondral (Figure II-10). On parle alors de lésions chondrales. Cependant, un cartilage mature est incapable de produire un tissu nouveau de qualité permettant une réparation stable au niveau de la lésion superficielle. Ceci est en grande partie dû au caractère avasculaire du cartilage. En effet, la réponse inflammatoire propre aux tissus vasculaires fait défaut et le schéma classique de réparation tissulaire en trois phases n'est alors plus envisageable (nécrose, réaction inflammatoire et vasculaire puis phase de réparation avec envahissement du réseau fibrineux par des néo-vaisseaux) [Mainard D et al, 1997].

De Palma [De Palma A et al, 1966] fût le premier à décrire une réparation de lésions cartilagineuses superficielles en montrant que le tissu normal situé en périphérie tente de fournir des composants matriciels nécessaires à la réparation.

Les lésions cartilagineuses profondes

Il s'agit de lésions profondes qui atteignent l'os sous-chondral au-delà de la «tide mark» et de la zone du cartilage calcifié (Figure I-9). On parle de lésions ostéochondrales. La

Plaie superficielle Intracartilagineuse Plaie profonde ostéochondrale

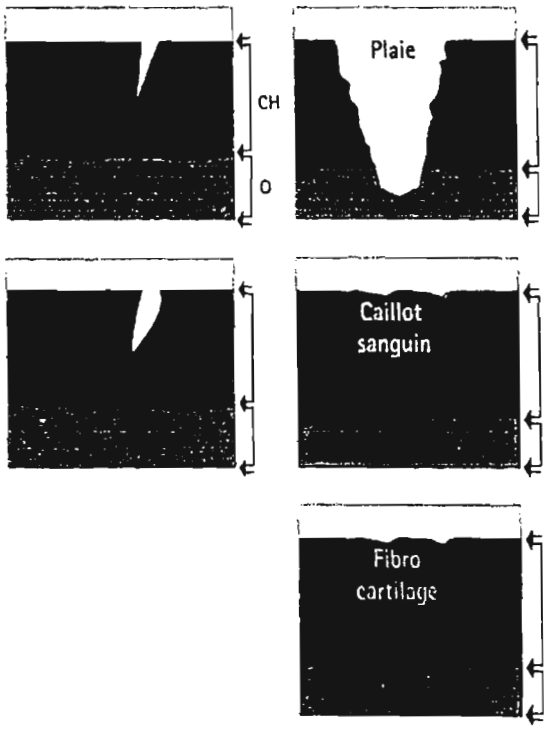


Figure I-9 : Schéma de la régénération d'une lésion superficielle et d'une lésion profonde du cartilage. CH : cartilage hyalin ; O : os sous-chondral.

moelle osseuse est le réservoir de cellules « précurseurs » qui est le plus proche du cartilage. De plus, elle contient les facteurs de croissance et les vaisseaux qui manquent au cartilage. Ainsi l'espace médullaire qui s'ouvre au fond d'un défect ostéochondral aide à sa réparation [Hunziker EB et al, 1999]. Il s'ensuit une réponse spécifique avec formation d'un caillot, provenant de la vascularisation osseuse, qui comble la lésion [Shapiro F et al, 1993]. En moins de vingt quatre heures, il apparaît un réseau riche en fibrine au niveau duquel sont emprisonnés des éléments cellulaires des lignées rouges et blanches. Une néo-vascularisation apparaît en périphérie et migre vers le centre du caillot en cinq jours. La réparation osseuse est rapide et se fait depuis l'os sous jacent en direction de l'articulation. Par contre, la synthèse de matrice extracellulaire ne débute qu'après une semaine et la différenciation cellulaire en chondrocytes ne s'ébauche qu'après douze jours. Au bout de deux semaines, le tissu de réparation atteint la surface articulaire [Mainard D et al, 1997]. Les avis divergent quant à l'état d'activité des chondrocytes bordant la lésion. Selon Shapiro, ces cellules ne participent en rien au processus de réparation [Shapiro F et al, 1993].

Dans les meilleurs cas, la réparation a un aspect de cartilage mais de nature fibrocartilagineuse. On retrouve un tissu conjonctif contenant tous les constituants d'un cartilage normal mais en quantité moindre et sans organisation architecturale. Sa tenue mécanique est réduite et il tend à se dégrader à long terme [Hunziker EB et al, 1999].

A.II.1.2 : Facteurs impliqués dans les lésions cartilagineuses

Plusieurs facteurs d'origine mécanique, génétique ou plus généraux sont impliqués dans l'apparition des lésions cartilagineuses.

Les facteurs locaux

Parmi les facteurs locaux, les causes mécaniques jouent un rôle important, mais ne sont pas encore totalement comprises. Ces causes incluent des blessures, l'augmentation ou la diminution de la charge sur la surface des articulations, des frottements, la lubrification de l'articulation, des forces de cisaillement, mais également la géométrie de la surface commune. Ainsi, parmi ces causes, l'hyperpression s'exerçant anormalement dans une zone portante de l'articulation va entraîner une hyperactivité du chondrocyte. Au début, l'équilibre entre anabolisme et catabolisme se maintient mais avec une régénération plus rapide de la matrice. A terme, le chondrocyte finit en quelque sorte par s'épuiser et les facteurs anaboliques n'arrivent plus à compenser les facteurs cataboliques. Les autres facteurs locaux regroupent, à la fois, des causes strictement localisées à une articulation (exemples : maladie de Paget sous-chondrale, dysplasie focale) et des maladies généralisées touchant plusieurs articulations (exemple : dysplasie polyépiphysaire).

Le facteur génétique

Peu de choses sont connues des influences génétiques sur les lésions cartilagineuses, mais beaucoup d'hypothèses sont avancées. Parmi des antécédents familiaux, quelques uns ont été découverts et montrent les premières étapes des lésions cartilagineuses. Les variations génétiques susceptibles d'être à l'origine des lésions cartilagineuses incluent les collagènes, la matrice, les chondrocytes, et les agrécannes anormaux. Par exemple, il a pu y avoir différents 'cross-links' spécifiques hérités du collagène: fragilité, quantité, structure moléculaire. L'existence de mutations ponctuelles dans le gène du procollagène de type II au cours de certaines chondrodysplasie familiales a été montrée [Knowltow RG et al 1990]. Dans ce cas, les fibrilles du collagène articulaire présentes dans le cartilage sont beaucoup plus fines et donc beaucoup plus fragiles. L'étude de souris transgéniques exprimant le collagène de type II muté a permis de confirmer la responsabilité des anomalies génétiques dans le développement de lésions cartilagineuses chez les membres de familles porteurs de la mutation. Cependant, aucune association allélique significative entre le gène de la chaîne α1 du collagène de type II et la présence d'une forme généralisée de lésions cartilagineuses, n'a

pu être mise en évidence dans les études portant sur des paires de jumeaux [Loughin J et al 1994]. Enfin, des études sur des cohortes de malades ont permis d'établir des liens significatifs entre la coxlésion cartilagineuse et certains allèles dans le gène du procollagène de type II, ainsi qu'entre certaines répartitions alléliques dans le gène de la protéine porteuse de l'agrecanne et les lésions cartilagineuses digitales chez l'Homme [Horton W et al 1996, Slagboom PE et al 1996].

Autres facteurs

Une variété d'activités similaires à des activités inflammatoires est déjà connue pour être associées aux lésions cartilagineuses. Celles-ci incluent des protéases trouvées dans le cartilage articulaire, d'apparence normale, d'une articulation arthritique. Les mêmes protéases sont trouvées dans des zones de cartilage présentant clairement une lésion cartilagineuse dégénérative de la même articulation. La même observation peut être faite pour des cytokines telles que le TNF-α aussi bien que l'Il-1, l'Il-6, des chemokines qui incluent Mcp-1, Mip-1,... Les lésions cartilagineuses pourraient être déclenchée par la présence de ces molécules. Il semble plausible qu'une désactivation de ces molécules entraînerait le ralentissement ou l'arrêt de la progression des lésions cartilagineuses. Le processus arthrosique est très lent : l'intervalle de temps entre les premiers symptômes jusqu'au remplacement de l'articulation, peut atteindre 12 à 18 ans.

L'obésité est statistiquement liée à la gonarthrose, mais outre l'effet mécanique, des facteurs hormonaux pourrait également intervenir. Ces facteurs hormonaux interviendraient également dans la genése des lésions cartilagineuses digitales, voire de la gonarthrose plus communément observée chez la femme.

Le cartilage sénescent de l'adulte n'est pas un cartilage normal, mais les modifications biochimiques sont cependant différentes de celles rencontrées au cours de lésions cartilagineuses [Szimai JA et al 1969; Stuhlzat HW et al 1982]. Plusieurs travaux ont montré qu'il y avait une modification dans la composition biochimique du cartilage vieillissant [Kuettner KE et al 1991]. Il s'agit d'un cartilage moins bien hydraté. Il existe une augmentation de la concentration totale en GAGs, mais la longueur de ces GAGs est inférieure à celle retrouvée dans un cartilage jeune. Il existe également plus de formes monomériques non amarrées aux agrégats de PC. De plus, la composition des protéoglycannes diffère avec l'augmentation de la teneur en kératane sulfate et une tendance à l'inversion du rapport entre les chondroïtines sulfatées en position 6 et les chondroïtines sulfatées en position 4. Enfin, le contenu en cellules semble diminuer avec l'âge.

Ces modifications de structure quantitatives et qualitatives pourraient expliquer que le cartilage vieillissant soit moins résistant aux sollicitations mécaniques et prépare l'apparition de lésions cartilagineuses.

A.II.2 : Differents types de traitement des lésions

A.II.2.1 : La viscosupplémentation locale

Outre les traitements symptomatiques prescrits dans le cadre d'arthrose ou de lésions peu sévères et dont l'objectif est de calmer la douleur et de limiter les phénomènes inflammatoires (antalgiques, anti-inflammatoires non stéroïdiens...), un nouveau type de traitement a fait son apparition depuis quelques années. Il s'agit de la viscosupplémentation qui consiste en des injections intra-articulaires d'acide hyaluronique de haut poids moléculaire (de l'ordre de 106 g/mol) [Rosier RN et al, 2000]. Ces injections répétées à intervalles réguliers conduisent à une forte diminution de la douleur et l'articulation traitée retrouve une bonne mobilité [Altman RD et al, 1998]. Ce traitement permet de remplacer un liquide synovial pathologique lors d'arthrites rhumatoïdes ou d'arthroses [Rosier RN et al, 2000]. En effet, l'apport de hyaluronate exogène permet de redonner au liquide synovial des propriétés rhéologiques adéquates notamment en ce qui concerne son rôle de lubrificateur et d'absorbeur de chocs. Il semblerait que ces injections induisent la synthèse endogène de hyaluronate par les synoviocytes et réduise la réaction inflammatoire [Goa KL et al, 1994]. De même, des travaux ont montré que le HA inhibe la stromelysine-1 (MMP-3) et l'inhibiteur TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloprotéinase- 1) intervenant dans le phénomène arthrosique [Han F et al, 1999]. Cependant, le hyaluronate injecté est éliminé de la cavité articulaire au bout de 24 heures [Laurent TC et al, 1992]. C'est pour cette raison qu'on lui préfère souvent des dérivés réticulés : les hylanes [Balazs EA et al, 1993]. Ces derniers présentent une viscosité plus importante et prolongent le temps de séjour dans l'articulation en raison de leur dilution plus lente dans le liquide synovial.

A.II.2.2 : La chirurgie

Dans le cas des lésions profondes avec atteinte de l'os sous-chondral plusieurs techniques et options faisant appel à la chirurgie peuvent être envisagées.

Les forages et les abrasions.

Une des techniques chirurgicales les plus anciennes est le forage de Pridie [Brittberg M et al, 1994]. Un forage est effectué au niveau de l'os sous-chondral. Ceci permet de faire communiquer l'espace médullaire et le défect. Cette technique est aisée mais elle conduit à une réparation fibrocartilagineuse. En effet, les forages donnent des réparations initiales de bonne qualité, avec création d'un cartilage d'aspect hyalin et activation mitotique et métabolique des chondrocytes [Menche DS et al, 1996; Kelberine F et al, 1999]. Cependant, après 8 à 12 mois, la majorité des études a mis en évidence une dégénérescence du cartilage. Ceci se caractérise par une diminution des taux de protéoglycannes et une perte de l'architecture classique du cartilage. Au final, il n'y a plus d'orientation particulière des fibres de collagène et le tissu devient fibrocartilagineux [Buckwalter JA et al, 1994].

Ficat et al [Ficat RP et al, 1979] ont pratiqué des résections en bloc de tout le cartilage lésé jusqu'à apparition de l'os sous-chondral. Ces arthroplasties ont conduit à la formation d'un caillot riche en fibrine et des résultats sensiblement équivalents aux forages de Pridie. Quelques auteurs ont proposé une abrasion chondrale au niveau de lésions [Kelberine F et al, 1999 ; Nehrer S et al, 1999] afin d'éviter, pour une courte période, les douleurs symptomatiques dues aux reliefs créés par la lésion. Arthroplastie ou abrasion chondrale donnent cependant des résultats peu convaincants quant à la qualité du tissu de réparation (fibreux, pauvre en collagène) [Buckwalter JA et al, 1994; Nehrer S et al, 1999].

Les greffes de tissu

a) Greffes de tissus mous

Des greffons de périoste et de périchondre donnent les meilleurs résultats [Hunziker EB et al, 1999; Stein BE et al, 1999]. Le périoste présente, en plus, l'avantage d'être abondant au niveau de l'organisme. Les cellules mésenchymateuses progénitrices, présentes au niveau du périoste, sont capables de se différencier en chondrocytes et de proliférer [Chu CR et al, 1997]. Cette différenciation est possible en raison de la faible pression partielle en oxygène au niveau du cartilage.

Des études cliniques chez l'homme ont révélé que les greffes de périchondre donnaient des résultats mitigés. Dans la moitié des cas seulement, une augmentation de la mobilité et une diminution de la douleur ont été observées [Engkvist O et al, 1980]. L'âge influence lourdement le pronostic de ce type de greffe. Pour une application clinique, les greffes de périoste ou de périchondre sont adaptées uniquement à des lésions récentes chez un sujet jeune [Minas T et al, 1997]. Selon Seradge et al. [Seradge H et al, 1984], aucune réparation

satisfaisante ne peut être obtenue par ces techniques pour des individus âgés de plus de 40 ans.

La raison principale des succès mitigés de ce type de technique provient d'une mauvaise fixation du greffon. Des recherches sur des adhésifs ont donc été entreprises. Un des premier adhésif utilisé fut un mélange de collagène et de tissu fibreux de nature protéique appelé Ossocol®. De nombreuses réactions allergiques furent cependant observées avec des conséquences négatives sur l'évolution clinique [Pitman ML et al, 1989]. La fibrine donne de bons résultats pour des réparations de ménisques [Grande DA et al, 1989], alors qu'elle aggrave le processus de réparation sur des lésions fémorales [Brittberg M et al, 1997]. Les résines époxy ou acrylique, le polyuréthane, le cyanoacrylate ou bien un mélange de facteur XIII et de fibrinogène ont été testées avec des résultats peu satisfaisants [Pitman ML et al, 1989].

Actuellement, les greffons sont préférentiellement suturés au niveau du cartilage et ils sont le plus souvent associés à des chondrocytes autologues [Nehrer S et al, 1999 ; Brittberg M et al, 1997].

b) Greffes ostéochondrales

Les greffes ostéochondrales ont été extrêmement étudiées aussi bien chez l'homme que chez l'animal. L'autogreffe de cartilage constitue un traitement de référence car elle sauvegarde l'architecture complexe du cartilage. Cependant, le cartilage ayant une structure complexe et hétérogène, la greffe peut avoir des difficultés d'intégration [Hunziker EB et al, 1999].

Des greffes ostéochondrales ont été réalisées chez l'homme à partir de tissus frais [Minas T et al, 1997]. L'évolution dans le temps de ce type de greffe est médiocre. Le cartilage tend à se fissurer, il y a perte de matrice et dégénérescence chondrocytaire. Au final, très peu de patients présentent un tissu de réparation proche du cartilage hyalin. Beaucoup présentent du fibrocartilage et chez certains, l'os sous-chondral est à nu. Les auteurs pensent qu'un affaissement dû à une altération de la partie osseuse du greffon est à l'origine de la mauvaise qualité des réparations. Certains travaux ont cependant obtenu de meilleurs résultats. Mahomed et al [Mahomed MN et al, 1992] ont réalisé des allogreffes sur des condyles fémoraux et ont observé 75% de bonne réparation avec des reculs cliniques de cinq ans.

La technique la plus récemment employée est la mosaïoplastie qui utilise de petits cylindres de cartilage autologue prélevés sur des zones non-portantes de l'articulation

[Hangody L et al, 1997 ; 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 [Mareaeei M et al, 1999]. 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.

Les allogreffes de cartilage frais, congelé ou lyophilisé ont pratiquement été abandonnées. En effet, les risques de transmission d'agents infectieux, de réponses immunoallergiques et le taux de survie aléatoire des chondrocytes rendent cette technique rédhibitoire [Newman AP et al, 1998; Hunziker EB et al, 1999]. De plus, un effondrement subchondral est généralement observé au bout d'un temps relativement court [Brown DM et al, 1997]. Ceci conduit à une altération fonctionnelle de l'articulation et à la destruction du cartilage.

Les transplantations chondrocytaires

Les transplantations de chondrocytes autologues

Ce type de greffes a été réalisé, chez l'homme par, Brittberg et al [Brittberg M et al, 1994]. Les cellules sont préalablement cultivées et transplantées dans des lésions ostéochondrales post traumatiques de 1,6 à 6,5 cm^2 de diamètre. Une fois comblée, les lésions sont suturées avec une membrane de périoste. Pour les lésions localisées au niveau des têtes fémorales, les réparations sont de très bonne qualité. Après 12 mois, dans 11 cas sur 16, le tissu a un aspect de cartilage hyalin et il contient du collagène de type IL Ces résultats sont encore meilleurs après 24 mois. De tels résultats sont dus, selon les auteurs, à une synergie entre les chondrocytes implantés et le périoste qui sert de suture. Des études plus récentes chez l'homme ont également montré une bonne diminution de la douleur dans 50% des cas à 3 mois et 80% à 6 mois [Minas T et al, 1997]. Enfin, une évaluation des transplantations de chondrocytes autologues avec un recul de 9 ans a été entreprise. Les résultats ont été bons à excellents pour 92% des lésions sur des condyles de tête fémorale, 89% des ostéochondrites juvéniles, 65% des lésions rotuliennes et 75% des lésions condyliennes faisant suite à une rupture des ligaments croisés [Peterson L et al, 2000].

Cette technique obtient de remarquables résultats mais elle est très onéreuse et seulement recommandée pour des patients de moins de 50 ans. C'est en particulier une

technique bien indiquée pour la chondromalacie ou les défects cartilagineux au niveau des têtes fémorales de genoux [Menche DS et al, 1998]. De plus la technique opératoire doit être irréprochable, car la moindre anomalie notamment au niveau de la suture de la membrane périostée conduit à la création d'un tissu majoritairement fibreux [Nehrer S et al, 1999].

Or, le but du traitement des lésions cartilagineuses est d'arrêter et d'inverser sa progression localement et globalement par l'intermédiaire de méthodes biologiques. Cependant, les traitements actuellement disponibles pour réparer le cartilage articulaire endommagé sont loin d'être satisfaisants, et restituent rarement totalement sa fonction ou sa condition physiologique.

L'ingénierie tissulaire offre de grandes promesses pour la régénération de tissus malades et endommagés tel le cartilage.

B. Ingénierie tissulaire du cartilage

Grâce aux récents progrès réalisés en biologie, en médecine et en ingénierie, la possibilité que le corps humain puisse être réparé aussi facilement qu'une automobile ne relève plus du domaine de la science-fiction. Depuis l'émergence de l'ingénierie tissulaire, en 1980, de nombreuses applications n'ont cessé d'être mises au point. Ce domaine semble tout désigné pour offrir des solutions aux problèmes actuels de pénurie d'organes et de défaillance des biomatériaux.

L'ingénierie tissulaire peut se définir comme l'ensemble des techniques et des méthodes s'inspirant des principes de l'ingénierie et des sciences de la vie pour développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus. La recherche dans ce domaine utilise les connaissances de secteurs variés, tels que la culture de cellules, les polymères et les sciences de la vie, la mécanique, la physique,..... Elle nécessite une source abondante de cellules saines qui peuvent être autologues (du même individu), homologue (d'un autre individu de même espèce) ou hétérologue (d'un individu d'une autre espèce). Ces cellules peuvent être jeunes, adultes ou embryonnaires (indifférenciées) [Griffith LG et al, 2002]. Différentes stratégies peuvent être employées pour faire croître les tissus de façon contrôlée. L'une des premières a été d'encourager la croissance *in vitro* de tissus s'organisant d'eux-mêmes [Stock UA et al, 2001]. Les problèmes qui ont surgi portaient surtout sur la cohésion du tissu. En effet, les colonies cellulaires étaient incapables de s'organiser d'elles-mêmes en tissus ou en organes pouvant être implantés. En fait, les cellules ont besoin de signaux biochimiques et de guides extrinsèques pour former des tissus ou des organes tridimensionnels et fonctionnels. La méthode qui est de plus en plus employée, actuellement, et qui semble la plus prometteuse, est celle de la croissance *in vitro* de cellules sur une matrice biodégradable ayant une structure et une géométrie spécifiques du tissu choisi [Stock UA et al, 2001]. Le principe de base est d'utiliser une matrice, structurellement et mécaniquement saine, biocompatible, ensemencée avec les cellules appropriées de cellules, puis soumise à l'action de molécules bio-actives et/ou de contraintes mécanique pour favoriser la différenciation et/ou la maturation cellulaire (figure I-10).

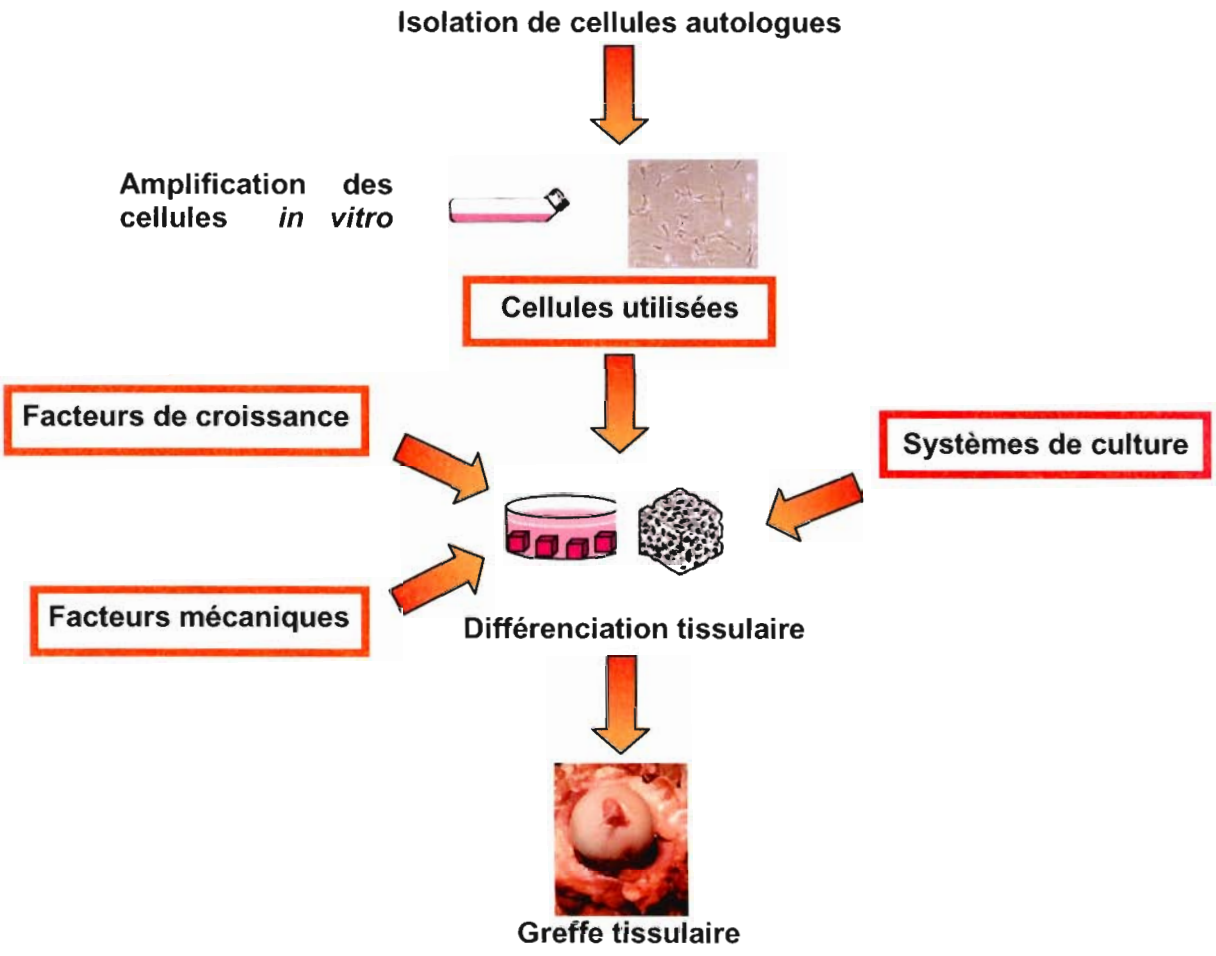


Figure I-10: Principe de l'ingénierie tissulaire depuis l'isolation de cellules justque la greffe tissulaire (Application au cartilage)

B.I : Cellules utilisées en ingénierie tissulaire du cartilage

Le choix du type cellulaire est conditionné par la nécessité d'obtenir une néomatrice 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 cellules chondroprogénitrices et les chondrocytes présents au sein du cartilage.

B.I.1. Chondrocytes

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

Cependant, le nombre limité de cellules (obtenues par prélèvement autologue) nécessite une amplification de celles-ci afin d'obtenir un nombre suffisant pour une réparation de qualité aux dépens d'une dédifférenciation cellulaire.

Les études utilisant les chondrocytes comme source cellulaire montrent que le tissu néosynthétisé ne retrouve pas ses propriétés biologiques et mécaniques initiales, et présente des caractéristiques de fibro-cartilage.

B.I.2 Cellules souches

Par définition, les cellules souches offrent des possibilités intéressantes de différenciation en différents tissus. Il est facile de les expandre en maintenant leur état indifférencié, ce qui suggère que ces cellules pourraient être une source intéressante de cellules pour l'ingénierie du cartilage.

Les cellules souches sont caractérisées par leur capacité de s'autorenouveler sur une très longue durée ou de se différencier en cellules spécifiques de tel ou tel organe.

Tableau I-2 : Classification et caractéristiques des cellules souches

Types de cellules souche	Capacités et rôles	Exemples
Totipotentes	Premières cellules embryonnaires directement issues du zygote, du premier au quatrième jour Ebauche d'embryon complet	Zygote et cellules filles immédiates
Pluripotentes	Peuvent se différencier en n'importe quel tissu organique (=200 variétés) Ne peuvent pas reproduire un être humain dans son entier	Cellules souches embryonnaires du blastocyte Cellules germinales embryonnaires
Multipotentes	Peuvent se différencier en plusieurs lignées cellulaires différentes	Cellules souches hématopoïétiques Cellules souches mésenchymateuses
Unipotentes	Ne peuvent se différencier que vers un seul tissu spécifique	Kératinocytes Oligodendrocytes immatures

Le terme de cellules souches recouvre en fait plusieurs sous-types cellulaires présentant d'importantes différences biologiques et fonctionnelles (Tableau I-2). Selon les sous-types, les cellules souches peuvent être identifiées au sein du blastocyste embryonnaire, de quelques tissus fœtaux, dans le cordon ombilical, le placenta et, semble-t-il, dans différents organes adultes.

B.I.2.1 Les cellules souches embryonnaires (CSEs)

Définition de CSEs humaines

Les lignées de CSEs humaines sont dérivées de cellules isolées du blastocyste. Le blastocyste correspond à un stade précoce du développement embryonnaire.

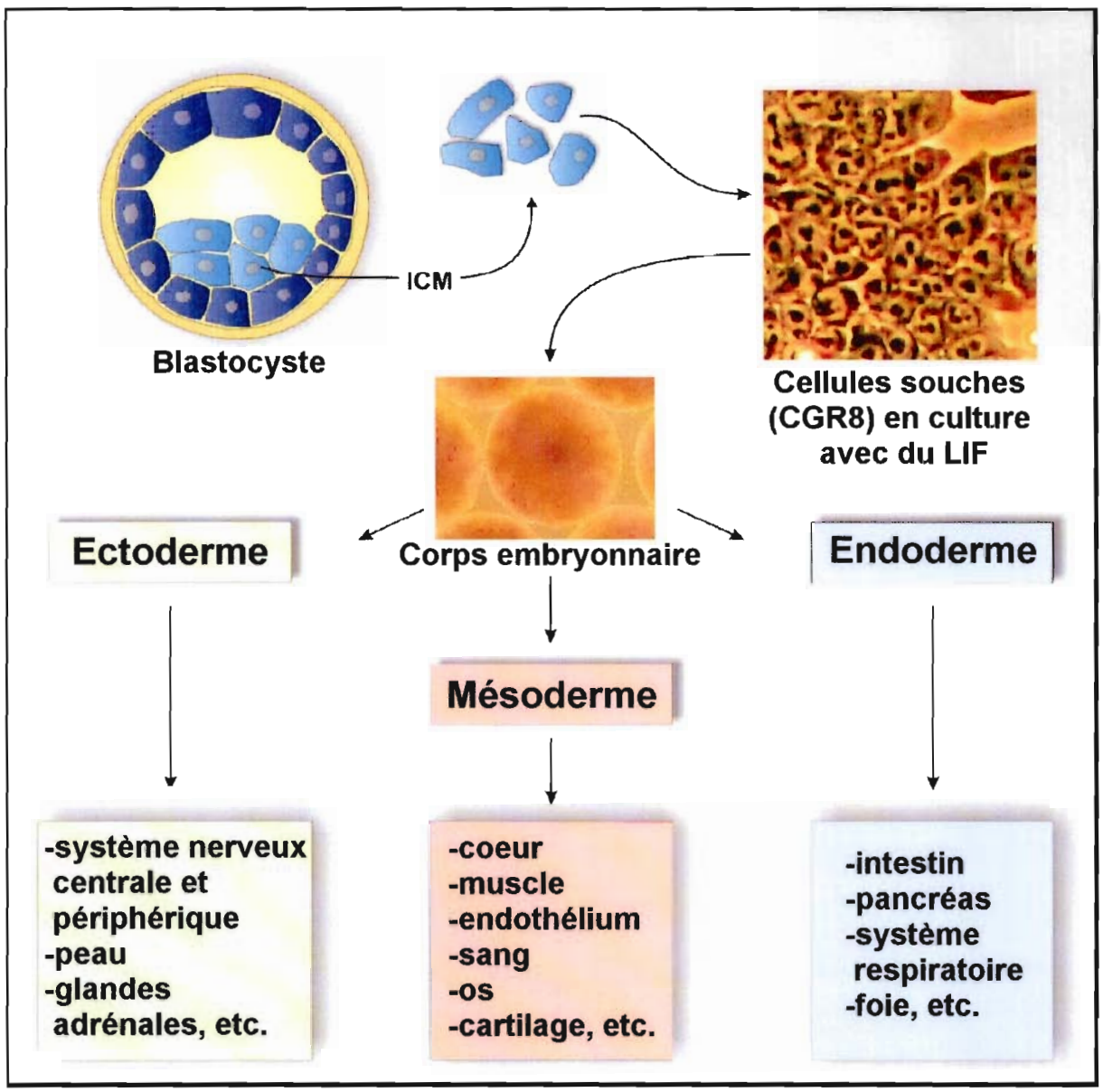


Figure I-11 : Vue d'ensemble de la dérivation des cellules souches embryonnaires et de leur pluripotentialité. *Les cellules souches embryonnaires sont dérivées des ICM des blastocystes précoces et placés extérieurement en culture. Le corps ESCA/Embryonnaire est une étape intermédiaire pendant la différenciation in vitro des cellules souches embryonnaires en chacune des trois couches différentes de germe et leurs dérivés. ICM: 'inner cell mass'; LIF: 'leukemia inhibitory factor' [Doss MX et al, 2004]*

Les CSEs humaines ont deux propriétés importantes : elles peuvent s'autorenouveller indéfiniment et peuvent se différencier pour donner naissance aux trois feuillets embryonnaires, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme qui sont à l'origine de tous les

tissus de l'organisme. Elles peuvent également se différencier vers les tissus extraembryonnaires (Figure I-11). Cependant, il est très important d'insister sur le fait que ces cellules ne peuvent pas donner un être humain, même replacées in utero, car in vitro, ces cellules n'ont pas d'axe de symétrie de développement embryonnaire et ne peuvent plus individuellement reproduire un être vivant dans son entier.

Utilisation des CSEs humaines en ingéniérie tissulaire

L'extraction et la culture *in vitro* des CSEs blastocytaires humaines ont pu être réalisées avec succès en 1998 à partir d'embryons surnuméraires de fécondation *in vitro* [Thomson JA et al, 1998]. Une autre source potentielle de CSEs est la création, *de novo* d'embryons humains en partant de la technique utilisée pour le clonage reproductif animal. Ainsi, le transfert de noyau de cellule somatique a été utilisé par First NL et al pour étudier la chondrogénèse [First NL et al, 1998]. Le noyau d'un ovocyte provenant d'une cellule donneuse (et contenant son ADN) est extrait et remplacé par le noyau (et son ADN) d'une cellule somatique différenciée du receveur potentiel. L'ovocyte contenant le nouveau matériel génétique est ensuite engagé dans un cycle de divisions jusqu'au stade blastocytaire, d'où sont extraites, puis mises en culture, les CSEs.

Bien qu'une telle technique ait été envisagée récemment par Hwang WS dans un modèle humain, d'importantes difficultés techniques sont décrites [Hwang WS et al, 2005]. Afin de réduire tout risque de rejet, une autre alternative serait de créer une banque de cellules souches embryonnaires avec différents génotypes de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou de modifier génétiquement les cellules embryonnaires en régulant négativement l'expression du gène du CMH [Heng BC et al, 2004].

Limitations de l'utilisation potentielle des cellules CSEs humaines en clinique

Avant d'arriver à une étape finale d'application en clinique, plusieurs problèmes devront être résolus [Odorico JS et al, 2001]. La coculture, utilisant des produits et des cellules d'origine animale, représente un danger potentiel de contamination des cellules souches embryonnaires par des virus ou par des prions, ce qui représente un obstacle irrémédiable à leur utilisation clinique. En outre, le maintien en culture de CSEs peut entraîner des mutations génétiques, et induire un risque de développement ultérieur de tumeurs [Draper JS et al, 2004]. Une autre difficulté majeure, non résolue à ce jour, est l'absence de facteurs contrôlant de façon systématisée la différenciation cellulaire *in vitro* pour pouvoir orienter spécifiquement les CSEs vers un lignage tissulaire défini.

Cependant, l'obstacle majeur au développement de la recherche sur les cellules souches embryonnaires humaines reste toutefois, pour le moment, d'ordre éthique.

B.I.2.2 : Les cellules souches mésenchymateuses

Définition

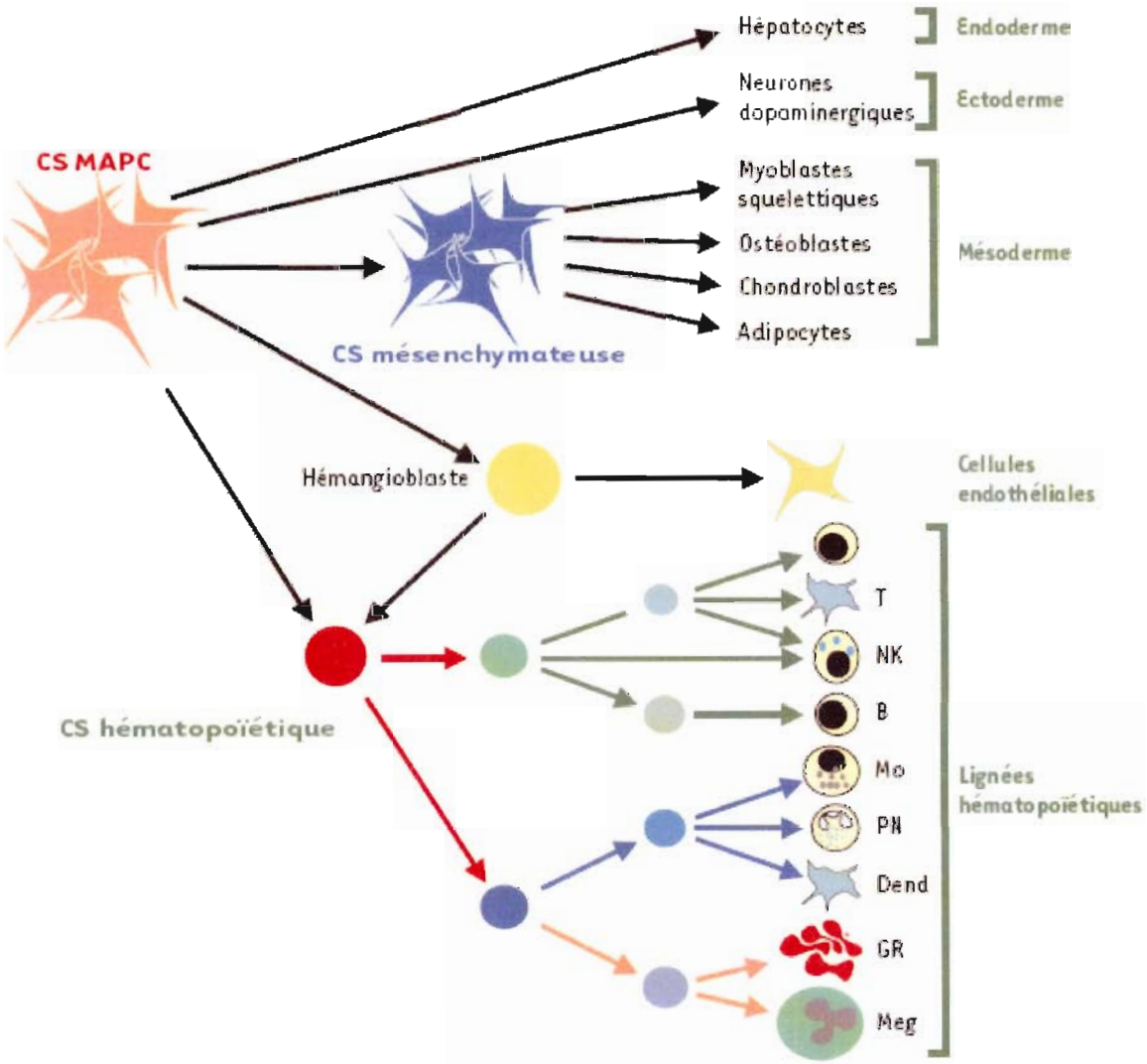


Figure I-12 : Filiation proposée pour les différentes populations de cellules présentes dans la moelle osseuse. *Ce schéma, qui fait des MAPC (multipotent adult progenitor cell) les ancêtres de toutes les populations hématopoïétiques et mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse, est encore spéculatif. En particulier, la filiation des progéniteurs endothéliaux et de l'hémangioblaste est encore mal définie. CS: cellule souche; GR: globule rouge; PN: polynucléaires neutrophiles; NK: natural killer; Mo: monocytes; Meg: mégacaryocytes; T, B: lymphocytes T et B; Dend: cellules dendritiques [Coulombel L et al, 2003].*

Dans la moelle osseuse dite 'rouge', il y a au moins deux lignées de cellules souches/progénitrices : les cellules hématopoïétiques et mésenchymateuses [Pittenger M.F et

al, 1999]. Ces deux lignées ont des destinées très différentes, et sont organisées en une hiérarchie de cellules aux potentiels variés (Figure I-12). La cohérence du tissu médullaire est assurée par un stroma nourricier qui constitue la niche écologique des cellules hématopoïétiques, indispensables à la production des cellules sanguines.

Parmi les différentes cellules du stroma, certaines ont la capacité d'adhérer aux surfaces en condition de culture simple (milieu nutritif standard additionné de 10 à 20 % de sérum de veau foetal). Dans ce milieu, les cellules différenciées du microenvironnement médullaire, telles que les ostéoblastes, les adipocytes ou les cellules endothéliales, ne prolifèrent pas et les cultures cellulaires s'enrichissent, au fur et à mesure des passages, de cellules d'allure fibroblastique ayant certaines caractéristiques des cellules musculaires lisses [Galmiche MC et al, 1993]. Ce sont les cellules que l'on appelle les CSMs.

Ces CSMs présentent les propriétés de cellules souches, telles que la forte capacité de prolifération, la multipotence, la transplantabilité et l'autorenouvellement. Elles ne représentent que 0,001 à 0,01 % de la population de cellules nuclées de la moelle osseuse [Pittenger MF et al, 1999]. Cependant, elles peuvent être isolées et amplifiées avec efficacité avant de se différencier, *in vitro*, en diverses lignées selon des protocoles de culture bien définis

Caractérisation biologique des CSMs

Les CSMs sont généralement collectées lors d'une ponction de moelle osseuse extraite de la crête iliaque supérieure du bassin chez l'homme [Digirolamo CM et al, 1999; Pittenger MF et al, 1999]. Les CSMs peuvent également être collectées dans les compartiments de moelle tibiale et fémorale [Murphy JM et al, 2002; Oreffo RO et al, 1988], ainsi que dans le colonne lombaire et thoracique [D'Ippolito G et al, 1999]. Elles sont ensuite isolées de la fraction de cellules mononucléaires de moelle osseuse suivant leur adhérence sélective, comparée aux cellules hématopoïétiques, sur les surfaces en plastique [Kassem M et al, 1993; Luria EA et al, 1971; Rickard DJ et al, 1996]. Les cultures primaires sont habituellement maintenues pendant 12 à 16 jours, pendant lesquels la fraction hématopoïétique non-adhérente de cellules est épuisée.

Morphologiquement, les CSMs sont fusiformes, comme des cellules fibroblastiques. Leur capacité de prolifération *in vitro* est très importante, dépassant celle des cellules hématopoïétiques et, dans certains cas, avec une stabilité étonnante de leurs propriétés [Prockop DJ et al, 1997 ; Pittenger MF et al, 1999].

Des progrès considérables ont été accomplis vers la caractérisation du profil antigénique des marqueurs de surface des populations de CSMs dérivées de la moelle osseuse. Cependant, un marqueur simple qui trace définitivement les CSMs doit encore être identifié [Gronthos S et al, 1994; Pittenger MF et al, 1999; Minguell JJ et al, 2001; Tocci A et al, 2003]. Les cellules sont négatives pour les marqueurs hématopoïétiques typiques: CD34, CD45, CD14, CD31, CD133 et positives pour CD90 (Thy1), CD105 (SH2), CD166, CD73 (SH3), STRO1, CD29, CD49a, CD54, CD71, CD106, CD120a, CD55, CD13 et CD44 [Reyes M et al. 2001; Pittenger et al, 1999; D'ippolito et al, 2004] (Tableaux I-3 et I-4).

Un immuno-phénotypage de ces cellules peut être réalisé à partir de ces marqueurs lors de différentes études comme la différenciation des CSMs en chondrocytes où certains marqueurs, caractérisant les cellules non différenciées, disparaissent tandis que d'autres apparaissent (Tableau I-4).

Ainsi, il est possible de distinguer les cellules souches hématopoïétiques des CSMs, de suivre la différenciation des CSMs au cours de la chondrogénèse. Dans notre travail, les molécules de surface CD34, CD45 vont servir à caractériser les cellules souches hématopoïétiques tandis que les molécules de surface CD73, CD105, CD166 ou CD90 vont servir à suivre la différenciation des CSMs.

Tableau I-3 : Caractéristiques des principaux marqueurs des surface permettant d'identifier les CSMs et les cellules hématopoïétiques. CD : classe de différenciation.

Marqueurs de surface	Autres noms	Poids moléculaire (KD)	Distribution	Fonction
CD13	Aminopeptidase N, APN	150-170	Cellules myéloïdes	Métalloprotéinase zinc-liant, traitement antigène, récepteur pour des variétés de virus coronaires
CD14	LPS-R	53-55	mono, mac, cellules Langerhans, granlow	récepteur pour LPS/LBP, reconnaissance de LPS
CD29	Integrin β1	130	lymphe, mono, granlow, plaquettes, cellules mastes, fibroblastes, endoth	Récepteur w/ CD49a (VLA-1) pour VCAM-1, MAdCAM-1 et ECM
CD31	PECAM-1	130-140	mono, plaquettes, gran, endoth, sous-ensemble de lymphes	Récepteur CD38, adhérence
CD34		105-120	Précurseurs hématopoïétiques, endoth capillaire, fibroblastes embryonnaires	Marqueur de cellules souches, adhérence, récepteur CD62L
CD44	H-CAM, Pgp-1	80-95	Cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques, sauf les plaquettes, hépatocytes, testicule	Lie l'acide hyaluronique, adhérence
CD45	LCA, T200, B220	180-240	Cellules hématopoïétiques, isoformes multiples de lépissure alternative	Phosphatase de tyrosine, améliore les signaux TCR & BCR
CD49a	VLA-1	210	LCA, T200, B220	integrin α1, adhérence, CD49a/CD29 lient le collagène et le laminin
CD54	ICAM-1	90-110	endoth, mono, lymphe (élevé jusqu'à activation)	récepteur pour CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (Mac-1) et rhinovirus
CD55	DAF	60-70	hématopoïétique, endoth	lie C3b, régulation complémentaire
CD71		95	Cellules de prolifération, réticulocytes, précurseur érythroïde	Récepteur de transferrine, régulation du fer
CD73		69	Sous-ensemble B, sous-ensemble T, FDC, épithe	ecto-5'-nucléotidase, régulation de nucléoside, costimulation T, adhérence lymphatique
CD90	Thy-1	25-35	Sous-ensemble CD34+ hématopoïétique, neurones	Sous-ensemble CD34+ hématopoïétique, neurones
CD105	Endogline	95	endoth, sous-ensemble de moëlle osseuse, mac activé	Réponse cellulaire au TGF-β1
CD106	VCAM-1	110	Endoth activaté , FDC	Récepteur VLA-4 (CD49d/CD29), adhérence leucocytaire, migration, costimulation
CD120a	TNFR-1	50-60	Cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques	Récepteur pour TNF-α et pour TNF-β
CD133	AC133, prominin-like 1	120	Sous-ensemble de cellules souches hématopoïétiques, epith, endoth	
CD166	ALCAM	105	neurones, mono, epith, fibroblastes, Tact	Ligand: CD6, adhérence

Tableau I-4 : Expression de marqueurs caractéristiques à la surface des cellules souches hématopoïétiques, des CSM et des chondrocytes (liste non exhaustive). CD = Cluster de Différenciation, ND = Non Déterminé

Marqueurs de surface	Cellules Hématopïétiques	CSMs	Chondrocytes	Références
CD10	+	+	-	*Jones EA et al., 2004; Diaz-Romero J et al., 2005; Waller EK et al,1995.*
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	+	-	-	*Brakebusch C et al. , 2005; 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; Jinquan T et al,2000*
CD49e	+	+	+	*Zhow 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; Diaz-Romero J et al., 2005;*
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; Waller EK et al,1995*
CD105	+	+	+	*Jones EA et al., 2004; Diaz-Romero J et al., 2005; Waller EK et al,1995*
CD106	+	+	+	*Szilvassy SJ et al., 2003; Diaz-Romero J et al., 2005; Waller EK et al,1995*
CD120a	**ND**	+	+	*Diaz-Romero J et al., 2005*
CD151	**ND**	**ND**	+	*Diaz-Romero J et al., 2005*
CD166	+	+	**(<5%)**	*Mareschi K et al., 2006; Diaz-Romero J et al., 2005*

CD34

CD34 est une molécule de surface exprimée sur une faible proportion des cellules hématopoïétiques de morphologie indifférenciée, en particulier d'origine médullaire. L'expression de CD34 n'est pas restreinte au tissu hématopoïétique. Quelques populations de cellules non hématopoïétiques expriment l'antigène CD34. C'est le cas en particulier des cellules endothéliales dont l'origine à partir d'un progéniteur commun avec les lignées hématopoïétiques est aujourd'hui avérée [Baumhueter S et al, 1994]. CD34 est une glycoprotéine transmembranaire fortement glycosylée dont le poids moléculaire est voisin de 115 KDa, qui appartient à une famille des sialomucines [Sassetti C et al, 2000]. Le domaine intracytoplasmique de CD34 s'associe à la protéine Crkl [Felschow D et al, 2001]. Dans un modèle de lignée cellulaire, la fixation d'anticorps spécifiques sur l'antigène CD34 induit une phosphorylation des protéines tyrosine kinases intracytoplasmiques Syk et Lyn [Tada J et al, 1999]. Une publication récente vient conforter l'hypothèse du rôle probable de CD34 dans les phénomènes d'adhérence cellulaire [Drew E et al, 2005].

CD45

CD45 est une molécule transmembranaire exprimée à la surface de toutes les cellules hématopoïétiques nucléées et de leurs précurseurs excepté les érythrocytes et les plaquettes matures [Trowbridge IS et al, 1994]. Il est également présent sur les cellules souches hémopoïétiques et la plupart des clones leucémiques. CD45 est largement accepté dans la communauté scientifique en tant que régulateur positif critique de la signalisation négociée des récepteurs des cellules T (TCR) et des cellules B (BCR), exigée pour l'activation et le développement des lymphocytes [Kishihara K et al, 1993; Byth Kf et al, 1996]. Une étude récente a identifié une nouvelle fonction inattendue du CD45 en tant que phosphatase JAK hématopoïétique qui régule négativement la signalisation des récepteurs cytokines, et influençant ainsi la prolifération des récepteurs-négociés cytokines, la différenciation et les réponses antivirales [Irie-Sasaki J et al, 2001].

CD73

CD73 (ecto-59-nucléotidase, NT, E.C.3.1.3.5) est une enzyme catabolique de purine avec une spécificité de substrat large qui catalyse la déphosphorylation de ribo- et de déoxyribonucléoside monophosphates de purine et de pyrimidine aux nucléosides correspondants [Naito Y et al, 1981]. Ces nucléosides peuvent alors pénétrer dans la cellule par l'intermédiaire de la diffusion facilitée [Plagemann PGW et al, 1981] et soit participent à

la voie de récupération de purine soit se dégradent. En plus de sa fonction d'enzyme dans le métabolisme de purine, CD73 a été postulé jouer un rôle dans l'adhérence cellulaire, car les anticorps monoclonaux (mAbs) à cette protéine empêchent l'adhésion des lymphocytes humains aux cellules endothéliales cultivées [Airas L et al, 1995]. Les anticorps CD73 empêchent également la propagation des fibroblastes embryonnaires de poulet sur un substrat de laminin [Codogno P et al, 1988] et le gésier de poulet CD73 a été montré pour agir à la fois sur le laminin et la fibronectine [Stochaj U et al, 1989]. Une troisième fonction du CD73 est celle de molécule co-stimulatoire pour les cellules de T.

CD166/Sb-10

L'anticorps Sb-10 s'est avéré être réactif avec un antigène présent sur des CSMs indifférenciées, qui a disparu une fois que les cellules sont embarquées sur la voie ostéogénique et ont commencé à exprimer la phosphatase alcaline de cellules extérieures [Bruder SP et al, 1997]. L'antigène spécifique à Sb-10 a été identifié comme étant la molécule CD166 (activated leukocyte-cell adhesion molecule, ALCAM) [Bruder SP et al, 1998]. C'est un membre de la super-famille des immunoglobulines. L'ALCAM/CD166 intervient dans des interactions cellule-cellule [Swart GW et al, 2002] et, l'expression du CD166 est habituellement limitée aux sous-ensembles de cellules impliquées dans la croissance dynamique et/ou la migration [Swart GW et al, 2002]. L'ALCAM/CD166 peut également jouer un rôle dans la progression de la différenciation ostéogénique, bien que le mécanisme précis demeure peu clair. En plus d'être exprimé sur les CSMs et sur les cellules hématopoïétiques, l'ALCAM/CD166 est exprimé dans les mélanomes métastasiques, les cellules neuronales, les cellules endothéliales, et les cellules ostéoblastiques. ALCAM/CD166 a été récemment trouvé à la surface des chondrocytes [Diaz-Romero JP et al, 2005].

CD105/Endogline

L'anticorps SH-2 [Haynesworth SE et al, 1992], dirigé contre les CSMs humaines, réagit avec un épitope présent sur l'endogline (CD105), avec le recepteur des TGF-β [Barry FP et al, 1999]. Cet anticorps a été employé dans des méthodes de sélection immunomagnétique pour les CSMs humaines bien que les CD105 soient principalement associés aux cellules endothéliales [Cheifetz S et al, 1992]. Le CD105 est exprimé sur la surface des cellules comme une protéine transmembranaire de structure homodimérique (180 kDa) [Quackenbush EJ et al, 1985; Gougos A et al, 1988a]. Une variété de fonctions importantes des CD105 a été découverte. La plupart de ces fonctions est susceptible d'être associées à la signalisation du

TGF-β puisque le ligand de ce récepteur est les TGF-β1 et TGF-β3 [Quackenbush EJ et al, 1985; Gougos A et al, 1988b]. Cependant, la sur-expression de CD105 affecte la morphologie et l'adhérence des cellules même en l'absence de TGF-β [Guerrero-Esteo M et al, 1999]. Cela suggère une fonction pouvant être indépendante des voies de signalisation du TGF-β. Des récepteurs CD105 lient d'autres facteurs de croissance tels que l'activine A et 'bone morphogenic protein' (BMP) -7 et -2 [Barbara NP et al, 1999]. Les cellules progénitrices issues de la moelle osseuse et exprimant le marqueur CD105 sont capables de s'engager dans la voie de différenciation chondrocytaire [Majumdar MK et al, 2000].

CD90/Thy-1

Le CD90/Thy-1 est une glycoprotéine glycosylphosphatidylinositol (GPI)-ancrée dans la membrane. C'est un membre du groupe des molécules d'adhésion de la super-famille des immunoglobulines. Thy-1 est une glycoprotéine de surface de cellules avec une masse moléculaire de 35 kDa précédemment signalée dans une minorité de chondrocytes dans le cartilage articulaire normal [Summers KL et al, 1995]. Les résultats d'une récente étude montrent que l'expression des CD90 s'associe avec des cellules ayant une capacité de prolifération et non avec des chondrocytes articulaires [Diaz-Romero J et al, 2005]. Le rôle biologique des CD90 demeure énigmatique. Les CD90 sont associées au feuillet externe de la membrane plasmique, et co-habitent avec les molécules du 'signaling' cellulaire, telles que les Src Family Kinases (SFKs), situées dans la couche de lipidique interne [Kasahara K et al, 2000]. Les SFKs sont impliqués dans la régulation de l'organisation du cytosquelette et dans l'adhérence cellulaire [Frame MC et al, 2002; Arcucci A et al, 2003]. Ce lien direct entre les SFKs et les CD90 a été récemment établi dans la modulation des fibres de stress et des points d'adhérence focale dans les fibroblastes. L'expression des CD90 empêche l'activation des SFKs provoquant la formation de fibres de stress et les points d'adhésion focaux [Barker et al, 2004]. Étant donné que la dédifferentiation des chondrocytes est également associé à l'adhérence focale et à l'organisation des fibres de stress [Arcucci A et al, 2003], l'expression de CD90 sur des chondrocytes cultivés en monocouche peut avoir pour conséquence l'induction de fibres de stress et la formation de points d'adhésion focaux *via* l'inhibition de SFK. Par conséquent, les molécules CD90 peuvent être des marqueurs de la redifférenciation de chondrocytes humains dédifférenciés dans le processus de régénération de cartillage.

Remarque : Une étude récente a montré que lorsque les chondrocytes articulaires humains se dédifférenciaient lors d'une culture en monocouche, ils exprimaient les marqueurs

CD166, CD105 et CD90 à des niveaux semblables aux CSMs non-différenciées. Par ailleurs, ils acquièreraient également la capacité de se différencier vers diverses lignées issues des CSMs. **Ceci suggère que le suivi de l'expression des marqueurs CD166, CD105 et CD90 pourraient être appropriés pour évaluer la différenciation des CSMs en chondrocytes [Diaz-Romero J et al, 2005].**

Perspectives cliniques

Les cellules souches régénèrent non seulement des tissus issus de lignées mésenchymales, telles que le cartilage des disques intervertébraux [Crevensten G et al, 2004], les os [Chamberlain JR et al, 2004; Arinzeh TL et al, 2003], les cardiomyocytes [Grinnemo K.H et al, 2004], le cartilage articulaire aux niveau du genou [Barry FP et al, 2003], mais se différencient également en cellules dérivées d'autres couches embryonnaires, y compris les neurones [Sugaya K et al, 2003] et l'épithelium cutané et pulmonaire, le foie, l'intestin, les reins, et la rate [Chapel A et al, 2003; Deng Y et al, 2003]. Ces applications montrent la plasticité de ces cellules souches adultes et leur utilité dans la réparation et la régénération de tissu et dans les applications de thérapie cellulaire. Il est également remarquable que ni les CSMs autologues ni les CSMs allogéniques n'induisent une quelconque immunoréactivité chez l'hôte en transplantation locale ou administration systémique [Arinzeh TL et al, 2003, Grinnemo KH et al, 2004, Deng Y et al, 2003, Liechty KW et la, 2000]. Les CSMs sont ainsi considérées comme transporteur idéal pour "distribuer" des gènes dans les tissus-cibles pour des applications de thérapie génique et de réparation tissulaire.

B.II : Systèmes de culture

Les approches en ingénierie tissulaire sont principalement concentrées sur la restauration de tissus et d'organes pathologiquement altérés; restauration basée sur une transplantation cellulaire, en combinaison avec des matrices et des facteurs de croissance. Le développement de greffes vitales est simultanément soutenu par de nouveaux systèmes de culture cellulaire 3D : culture dans des systèmes de micromasse ou culture en 'pellet') [De Bari C et al, 2004; Sakaguchi Y et al, 2005] ou encore dans des biomatériaux (par exemple collagène, agarose, alginate et fibrine) [Martin I et al. 2001]. Ces structures 3D ont pour objectif de créer un micro-environement cellulaire le plus proche possible de celui observé *in vivo*. Les CSMs, telles que les chondrocytes, subissent un processus de dédifférenciation phénotypique et fonctionnelle une fois cultivés dans les systèmes monocouches où il manque

l'influence cruciale des interactions physiologiques cellule-cellule et des interactions cellule-matrice extracellulaire (MEC). De nombreuses études indiquent que ces interactions, qui influencent directement le signal cellulaire *via* des molécules d'adhérence sont essentielles pour l'ensemble des fonctions cellulaires [Knudson W et al, 2002].

B.II.1 : Système de culture en micromasses et 'pellet'

La différenciation des CSMs en chondrocytes suit plusieurs étapes commençant par une phase de condensation des cellules pendant laquelle elles s'agrègent avec une forte densité dans le noyau du pré-cartilage.

Les cultures *in vitro* à haute densité (micromasses et 'pellet') sont des systèmes d'analyses qui imitent la première étape de la condensation des cellules souches mésenchymateuses. En effet, les changements dans la composition des matrices extracellulaires qui se produisent 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. Par conséquent, la culture en micromasses est largement utilisée pour initier la chondrogénèse ou encore étudier les événements de signalisation impliqués dans cette différenciation des CSMs en chondrocytes [Nakahara H, et al 1991; Weston AD, et al 2000].

B.II.2 : Culture dans des biomatériaux

Le biomatériau idéal devrait posséder un certain nombre de propriétés. Il devrait être : biocompatible, biodégradable, poreux et mécaniquement stable. Il devrait également permettre la production de matrices extracellulaires et la transmission de signaux moléculaires. Il y a un certain nombre de matériaux candidats pour l'élaboration de matrices conçues dans une optique d'ingénierie tissulaire du cartilage. Ils incluent des biopolymères naturels, tels que l'agarose, l'alginate et le collagène, et des polymères synthétiques, tels que l'acide polyglycolique (PGA), acide poly L-lactique (PLLA) et leurs copolymères, poly (D, L-lactique-co-glycolide) (PLGA) [Li WJ et al, 2003].

B.I.2.1 Les biopolymères naturels :

L'alginate

Le terme d'alginate se rapporte à une famille de copolymères polyanioniques dérivés des algues de mer brunes et comprennent des 1,4-lié b-d-mannuronics (M) et des résidus

alguluroniques (G) dans des proportions variables. L'alginate de sodium est soluble dans des solutions aqueuses et forme un gel stable à température ambiante en présence de cations bivalents (Ba2+, Ca2+) à des concentrations non-cytotoxiques par l'interaction ionique entre le groupe des acides guluroniques. L'alginate de sodium a principalement trouvé des applications biomédicales en tant que biomatériau pour l'encapsulation et l'immobilisation d'une variété de cellules permettant des traitements immunoisolatoires et biochimiques. [Trivedi N et al, 2001; Park JK et al, 2000; Lindenhayn K et al, 1999].

Un certain nombre de modèles animaux ont montré *in vivo* la biodégradation de l'alginate de sodium [Ishikawa K et al, 1999; Wu SF et al, 2002] bien que de grandes différences soient rapportées au niveau des temps de dégradation, probablement en raison des différences dans le modèle expérimental, dans le volume implanté et la forme du matériel. Dans une étude comparant les résultats de diverses matrices, l'alginate de sodium s'est avéré une matrice efficace quand il est utilisé dans le cas de greffes d'os prévascularisées [Vogelin E et al, 2002].

Le gel d'alginate permet aux chondrocytes de maintenir un phénotype différencié sain et de synthétiser des macromolécules telles que les protéoglycannes et les collagènes de type II [Aydelotte MB et al, 1988; Glowacki J et al, 1983; Benya PD et al, 1982]. Le fait que les chondrocytes ne se dédifférencient pas dans les gels d'alginate a entraîné leur exploitation dans le domaine de l'ingénierie tissulaire du cartilage, où ce matériel est intensivement employé [Anderer U et al, 2002; Marijnissen WJ et al, 2002; Chang SCN et al, 2001].

Collagène

Le collagène en tant que matière première est employé en raison de ses caractéristiques anti-irritatives et hémostatiques, et convient pour un usage externe et interne [Mian et al, 1992]. En raison de ces caractéristiques, les matrices sont employées pour la thérapie de brûlures graves afin d'augmenter la guérison et limiter la formation de cicatrices [Hansbrough et al, 1989].

Des biomatériaux faits de composants semblables à des MEC du tissu désiré pourrait être approprié à la régénération du cartilage [Lee JE et al, 2004]. La matrice idéale doit imiter les caractéristiques des MEC et devrait former une structure avec des propriétés physiques semblables au tissu désiré. On a rapporté que des composants spécifiques de la MEC tels que le collagène et glycosaminoglycannes, jouent un rôle important pendant qu'ils régulent l'expression du phénotype chondrogénique et de la chondrogénèse, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [Lee JE et al, 2004 ; Nettles DL et al, 2002].

Agarose

Dans la recherche biomédicale, le gel d'agarose est couramment employé dans des systèmes de culture de tissu parce qu'il laisse s'accroître des cellules et des tissus dans une suspension tridimensionnelle. C'est particulièrement important dans l'application des concepts d'ingénierie tissulaire pour la réparation de cartilage parce qu'il soutient le phénotype des cellules du cartilage. L'étude de la réponse à la pression du gel d'agarose a montré que la transmission de cette contrainte était complète et immédiate, dans toute la gamme des pressions, des fréquences, des volumes appliqués, et des viscosités examinées.

B.I.2.2 Matrices de polymères synthétiques

Les matrices de matière biologique spécifiques sont un des composants clés de l'ingénierie tissulaire. La recherche est concentrée sur le développement de matrices biorésorbables qui présentent des propriétés physiques optimales couplées à une excellente biocompatibilité. Les matrices agissent en tant que patron, pour la forme et pour le guidage, pour le développement in vitro et in vivo de tissu [Honda M et al, 2000]. Pour des tissus de cartilage et d'os, une matrice appropriée fournit la stabilité mécanique initiale et soutient une distribution homogène de cellules.

Des gels polymères naturels, tels que l'acide hyaluronique, le collagène, l'alginate [Atala A et al, 1994] et le chitosan, ont été employés avec succès [Risbud M et al, 2001]. Ces matrices permettent une immobilisation 3D des cellules et maintiennent le phénotype chondrocytaire [Roche S et al, 2001]. Cependant, leur comportement mécanique est insuffisant pour une transplantation tissulaire. Ainsi des matrices en fibre biorésorbable pleine ou d'autres structures poreuses sont employées pour réaliser la stabilité biomécanique initiale [Rodriguez A et al, 1999]. Des matrices poreuses sont de plus en plus employées pour faciliter la colonisation cellulaire tout en présentant des propriétés mécaniques supérieures.

Les poly électrolytes PLLA, PGA et PLGA :

Les poly électrolytes biodégradables (les hydroxy-esters) comme l'acide L-polylactique (PLLA), l'acide polyglycolique (PGA) et le copolymère PLGA ont été intensivement employés dans ce contexte [Ma PX et al, 1995]. Freed et al. ont montré que les taux de prolifération de chondrocyte et de dépôt des glycosaminoglycannes spécifiques du cartilage sont significativement plus élevés pour les matrices basées sur l'acide polyglycolique (PGA) par rapport à ceux basés sur le PLLA [Freed LE et al, 1993], tandis qu'il a été montré que ces deux polymères favorisent la synthèse de protéoglycannes à des taux plus élevés que

pour des matrices de collagène [Grande DA et al, 1997]. La capacité des polymères biodégradables à base de polyester favorise la prolifération, la maturation, et la différenciation des chondrocytes, ainsi que des propriétés mécaniques supérieures. Ces données suggèrent fortement la possibilité de les appliquer dans la réparation du cartilage.

Les hydrogels à base d'oxyde de polyéthylène :

Des biomatériaux injectables sont également considérés comme des applications de l'ingénierie tissulaire du cartilage afin d'éviter la nécessité d'une chirurgie envahissante. Il a été montré avec succès que le gel dérivé de polysaccharide, d'alginate, permet la conservation du phénotype chondrocytaire par une encapsulation des cellules dans un environnement 3D [Hauselmann HJ et al, 1994]. Il en est de même pour les hydrogels à base d'oxyde de polyéthylène ; leur excellente biocompatibilité, résorbabilité, et malléabilité, ne leur confèrent des propriétés biomécaniques.

Des préparations polymèriques avec 'crosslinking', injectables *in situ*, et enfermant des cellules ont été conçues [Silverman RP et al, 1999], et des techniques combinant les avantages des structures à fibres poreuses et des gels sont explorées en tant que solutions alternatives aux matrices de fibrilles ou aux gels [Sittinger M et al, 1994].

Les copolymères :

Une nouvelle approche pour améliorer de manière significative les propriétés mécaniques implique la combinaison de polymères biodégradables avec de l'alginate en tant que matrice pour permettre la différenciation et la transplantation de CSMs ou de chondrocytes. En effet, les polymères fournissent un soutien adéquat au gel mécaniquement instable, facilitant de ce fait l'implantation *in vivo*. Par exemple, Caterson et al. ont utilisé un matrice biodégradable tridimensionnel d'amalgame de PLA-alginate en combinaison avec du TGF -β1 pour soutenir la fixation/maintien et la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses, tout en conférant une stabilité mécanique à la construction [Caterson EJ et al, 2001]. Marijnissen et al. ont également comparé une matrice déminéralisée osseuse à une 'résille' PLA-PGA, en conjonction avec un gel d'alginate, dans leur capacité à soutenir le phénotype chondrocytaire *in vivo*. L'homogénéité structurale ainsi que le maintient du phénotype chondrocytaire s'est avérée plus importantes dans les constructions de PLA-PGA-alginate [Marijnissen WJ et al, 2000], confirmant la possibilité d'utilisation de tels polymères biodégradables en ingénierie tissulaire du cartilage.

A partir de la description de ces biomatériaux, il apparaît qu'un large panel peut être utilisé en ingénierie du cartilage. Plusieurs études ont ainsi été réalisées *in vivo* et *in vitro* en utilisant les CSMs humaines comme source cellulaire. Les tableaux I-5 et I-6 résument les principaux résultats obtenus.

Tableau I-5 : Utilisation de biomatériaux et de CSMs humaines en ingénierie tissulaire du cartilage: études *in vivo* *(Exemples de résultats tirés de la littérature)*

Biomatériau *(Références)*	***Origine des cellules***	***Espèce ayant subie l'implantation***	***Durée d'étude de l'implant (semaines)***	***Résultats obtenus***
Eponge de gélatine *(Ponticiello MS et al, 2000)*	Moelle osseuse	Condyle fémoral de lapin	4	Inflammation minime Dégradation importante de la gélatine Formation d'os et à quelques endroits de cartilage 10 à 20% de lésion restante
Disque d'alginate à 1,2%, faible viscosité *(Erickson GR et al, 2002)*	Tissu adipeux	Souris « nude »	12	Formation de collagène de type II et VI. Cellules s'organisant dans une matrice ressemblant à celle du cartilage hyalin
Glue de Fibrine *(Dragoo JL et al, 2003)*	Tissu adipeux	Souris	6	Organisation de la matrice extracellulaire proche de celle du cartilage hyalin
Gel de collagène *(Zhang X et al, 2006)*	Placenta	Souris et rats « nude »	6	A la surface de la lésion, formation d'une matrice proche du cartilage hypertrophique Dans la partie inférieure de la lésion, formation d'une matrice proche de celle du cartilage hyalin

Tableau I-6 : Exemples de résultats obtenus lors de l'utilisation de biomatériaux et de CSMs humaines en ingénierie tissulaire du cartilage : études *in vitro*

Biomatériau *(Références)*	***Origine des cellules***	***Temps de culture (jours)***	***Résultats obtenus***
Alginate à 1,2% *(De Angelis L et al, 1999)*	Moelle osseuse	21	Environnement favorisant la chondrogénèse Expression des collagènes de type II
Alginate faible viscosité à 1,2% *(Ma HL et al, 2003)*	Moelle osseuse	28	Viabilité >90%, Morphologie ronde Abondante expression des collagènes de type II et des GAGs
Eponge de Hyaluronate (HYAFF11) *(Radice M et al, 2000)*	Moelle osseuse	21	Prolifération pendant 2 semaines puis plateau Adhésion des cellules au biomatériau Présence des collagènes de types II, III, IV et fibronectine
Eponge de gélatine *(Ponticiello MS et al, 2000)*	Moelle osseuse	21	Prolifération Augmentation de la teneur en GAGs, collagènes de type II
Eponge de collagène de type I *(Chen G et al, 2004)*	Origine inconnue	70	Distribution uniforme, bonne viabilité, synthèse des GAGs Expression des collagènes de type II, des aggrécannes Baisse de l'expression des collagènes de type I
Mélange alginate / PLA *(Caterson EJ et al, 2002)*	Moelle osseuse	21	Localisation des fibres de collagènes de type II, des PGs dans la matrice Expression des gènes de collagènes de type II, IX et des aggrécannes
Eponge de PLA *(Li WJ et al, 2005)*	Moelle osseuse	21	Présence de PGs sulfatés dans la matrice Détection de collagène de type II en périphérie
Fibrine *(Dragoo JL et al, 2003)*	Tissu adipeux	21	Production de matrice extracellulaire Présence de collagène de type II et d'aggrécannes Absence de collagène de type X
Alginate faible viscosité à 1,2% *(Erickson GR et al, 2002)*	Tissu adipeux	14	Phénotype chondrocytaire Synthèse de collagène de type II, VI et de C4S
Agarose *Awad HA et al, 2004*	Tissu adipeux	28	Synthèse de GAGs et d'hydroxyproline

B.III. Facteurs solubles utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage

Pendant la période de culture 3D, la qualité du néo-tissu formé dépend des apports nutritifs et des facteurs de croissances induisant la différenciation des cellules vers un phénotype spécifique. Ces molécules morphogènes sont plus qu'essentielles pour les cellules souches mésenchymateuses. Un nombre de plus en plus important de membres de la super-famille des TGF-β semblent impliqué dans ce processus.

La famille du TGF-β est composée d'une trentaine de membres que l'on retrouve dans tout le règne animal, comprenant les types de TGF-βs, les activines et les BMPs (Bone Morphogenic Proteins). 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, 1998].

Le TGF- β peut inhiber ou stimuler la prolifération selon le contexte cellulaire, contrôler le turnover de la MEC, ainsi que les interactions épithélio-mésenchymateuses au cours de l'embryogenèse. Ses activités pleïotropes sont impliquées dans la réparation tissulaire et la modulation de la réponse immunitaire.

Les effets chondroinductifs de ces molécules ont été montrés dans de nombreuses études utilisant les cellules mésenchymateuses embryonnaires ou adultes [Noth U et al, 2002; Johnstone B et al, 1998; Denker AE et al, 1999; Sekiya I et al, 2002; Majumdar MK et al, 2001; Mackay AM et al, 1998 ; Barry F et al, 2001]. Des travaux plus récents ont montré que la chondrogénèse par des membres de la super-famille des TGF- β impliquent différentes voies de signalisation intracellulaires.

B.III.1 : TGF-βs

Il existe trois isoformes humaines du TGF- β : TGF- β1, TGF- β2 et TGF- β3, codées par trois gènes distincts. Ces isoformes sont du point de vue structural très similaires puisque 76 à 80 % des séquences protéiques sont concervées.

Les TGF- β peuvent :

- inhiber ou stimuler la prolifération cellulaire
- contrôler le renouvellement de la MEC
- contrôler les interactions cellules-cellules.

Ses activités sont impliquées dans la réparation tissulaire et la modulation de la réponse immunitaire.

Par ailleurs, de nombreuses études ont également montré les effets chondro-inductifs des isoformes du TGF- β sur des cellules souches embryonnaires ou mésenchymateuses

[Nakamura K et al, 1999]. Ces molécules favoriseraient l'expression des gènes spécifiques du cartilage en activant des voies de signalisations intracellulaires [Watanabe H et al, 2001; Tuli R et al, 2002; Nakamura K et al, 1999]. Ces voies empruntées sont celles des MAP Kinases, des N-cadhérines ou encore des Wnts comme cela est décrit dans le paragraphe C traitant de la chondrogénèse.

B.III.2 : BMPs

La famille des BMPs forme un sous-groupe de molécules à l'intérieur de la super-famille des TGFβ. Les BMPs ont été identifiées en vertu de leur capacité à favoriser la formation de cartilage ectopique et d'os [Wozney JM et al, 1989]. Les mécanismes concernant cette capacité unique ont été le sujet d'intenses recherches depuis les deux dernières décennies.

Les systèmes *in vitro* ont été particulièrement utiles pour l'étude des voies des BMPs dans les premières étapes de la chondrogénèse: engagement et condensation. En effet, il a été montré que ces BMPs pouvaient induire une différenciation des cellules mésenchymateuses pluripotentes, telles que les C3H10T1/2, en chondrocytes [Denker AE et al, 1999; Haas AR et al, 1999; Ju W et al, 2000; Kramer J et al, 2000; Majumdar MK et al, 2001]. Le mécanisme par lequel les BMPs induisent la chondrogénèse dans ce système par la sur-régulation de la fonction et de l'expression des N-cadherines, indique qu'un des premiers rôles des BMPs est de favoriser les interactions cellule-cellule. Comme escompté par l'importance des interactions cellule-cellule dans la chondrogénèse, les inhibiteurs N-cadherines neutralisent les effets des BMPs [Haas AR et al, 1999].

C. La chondrogénèse

La chondrogénèse désigne le processus physiologique permettant la formation du cartilage et conduisant *in fine* à l'ossification endochondrale durant le développement du squelette. Tous les éléments du squelette ont pour cellules d'origines les cellules souches mésenchymateuses. Au cours d'une des phases de chondrogénèse appelée phase de condensation, les cellules se divisent pour s'engager dans la lignée chondrocytaire ou encore myogénique. Ces deux lignées aboutissent, respectivement, à terme à la formation du cartilage et des muscles. Les nodules de cartilage apparaissent au milieu du stade blastème, et simultanément, les cellules situées à la périphérie s'allongent pour former le périchondre. Les chondrocytes différenciés peuvent alors proliférer et se diriger vers la phase complexe de la maturation hypertrophique. Il s'agit ici de la seconde phase de la chondrogénèse appelée phase de différenciation.

C.I. : Les étapes de la chondrogénèse

C.I.1 : La condensation des CSMs

La chondrogénèse débute avec la sélection, la migration, la prolifération et la condensation des CSMs (Figure I-13). Ces différentes étapes sont régulées par des interactions entre les CSMs et les cellules épithéliales [Hall BK et al, 2000 ; Tuan RS et al, 2004]. Les interactions cellule-cellule et cellule-matrice sont à l'origine du processus et sont associées à l'augmentation de l'adhésion cellulaire et aux modifications du cytosquelette. Préalablement à la condensation, les CSMs pré-chondrocytes produisent une matrice extra-cellulaire riche en HA et en collagènes de type I et IIa [Sandell LJ et al, 1994]. L'initiation de la condensation est associée à une augmentation de l'activité hyaluronidase et à l'apparition de molécules d'adhésion telles que les N-cadhérines et les N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule). Le facteur de croissance TGF-β, un des premiers stimulus dans la condensation chondrogénique, stimule la synthèse de la fibronectine, qui en retour régule les récepteurs N-CAM. Les syndécanes 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. Ces voies de signalisation font intervenir les FAK et la paxilline pour initier la transformation des chondro-progéniteurs en

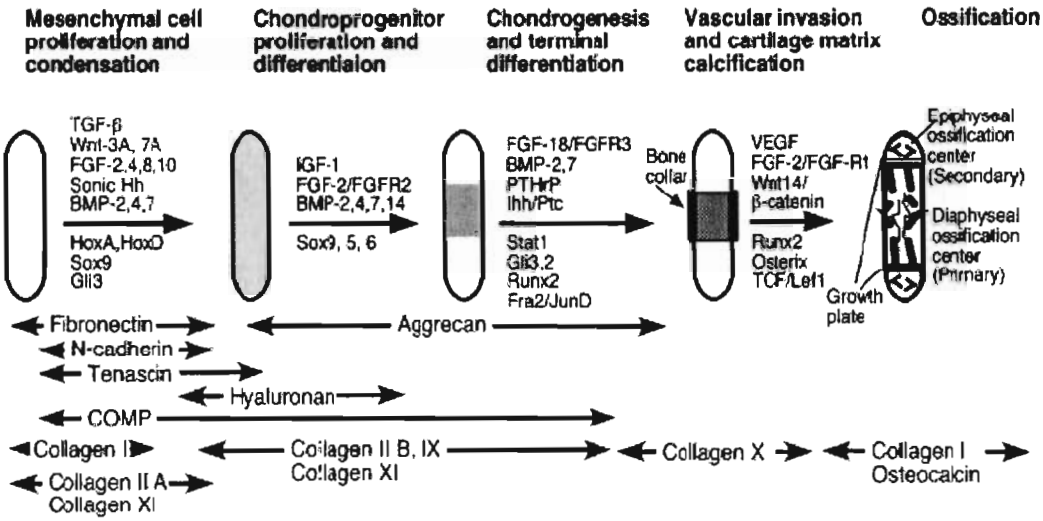


Figure I-13: Différentes étapes de la chondrogénèse au cours du développement des os longs. *Représentation schématique de la chondrogénèse et des facteurs de croissance qui régulent les différentes étapes (au dessus des flèches). Les facteurs transcriptionnels impliqués dans ce processus sont indiqués en dessous des flèches. [Goldring MB et al, 2006]*

chondrocytes matures [DeLise AM et al, 2000]. 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 périchondre.

Plusieurs auteurs ont décrits l'implication de nombreux facteurs transcriptionnels mais aussi la présence de nombreux gènes dans le contrôle de la chondrogénèse (Figure I-14) [DeLise AM et al, 2000 ; Hall BK et al, 2000 ; Olsen BR et al, 2000 ; Eames BF et al, 2003].

C.I.2 : La différenciation chondrocytaire :

La différenciation des chondro-progéniteurs ne peut se faire qu'à partir de certains processus impliqués dans la génèse du squelette. Cette différenciation se caractérise par la formation d'une matrice contenant différents types de collagènes tels que les collagènes de type II, IX et XI mais aussi des agrécannes (Figure I-14).

Rôle du facteur transcriptionnel Sox9 :

Le facteur de transcription Sox9 est un des premiers facteurs permettant aux cellules de commencer l'étape de condensation (Figure I-14). 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 ColXIa2 [Lefebvre V et al, 2001 ; Eames BF et al 2003]. Deux autres membres de la famille des facteurs transcriptionnels Sox sont co-exprimés dans la phase de différenciation chondrocytaire : L-Sox5 et Sox6. Alors que L-Sox5 et Sox6 ne sont pas exprimés pendant la phase de

condensation, leur co-expression avec Sox9 est indispensable pour permettre la différenciation des chondro-progéniteurs en chondrocytes [Lefebvre V et al, 1998]. Contrairement à Sox9, LSox5 et Sox6 ne possèdent pas de domaine d'activation transcriptionnel. Ils peuvent cependant former des homo- ou hétérodimères. L'expression de ces protéines Sox dépend de la signalisation des BMP et plus particulièrement des protéines BMP-R1A et BMP-R1B [Yoon BS et al, 2005]. Ainsi, l'expression de LSox5 et Sox6 permet

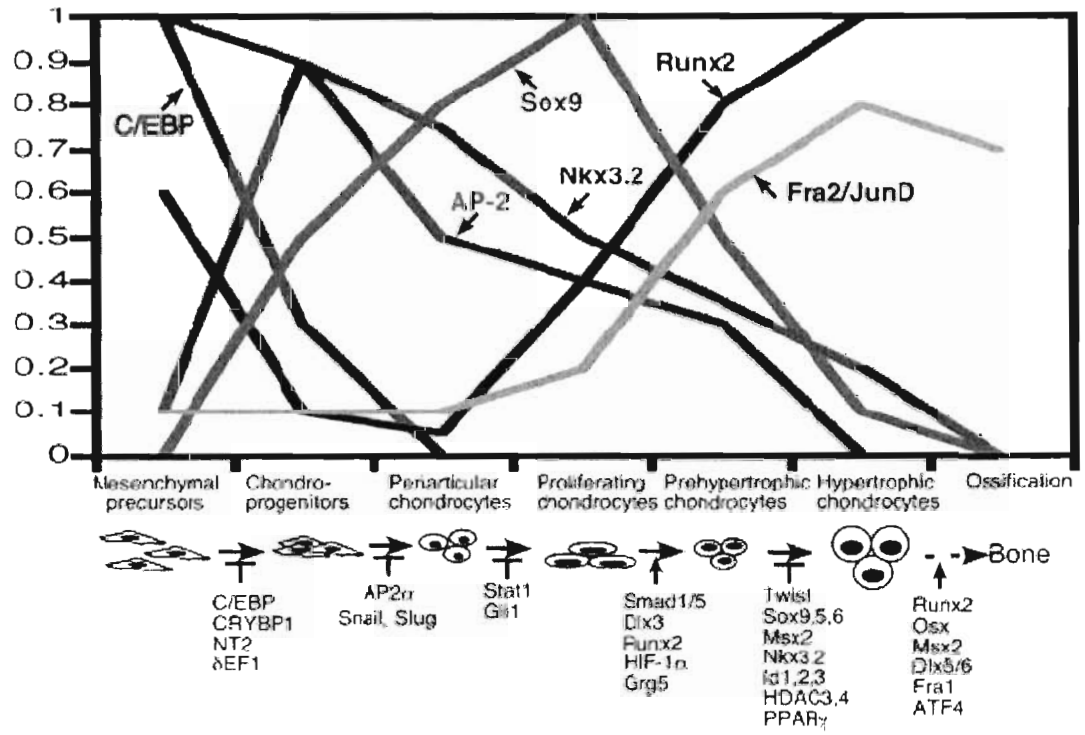


Figure I-14: Représentation schématique de l'expression des régulateurs transcriptionnels lors des différentes étapes de la chondrogénèse et d'ossification endochondral. *Des facteurs de transcription additionnels, qui sont des inhibiteurs ou des activateurs des différentes étapes, sont indiqués en-dessous du schéma. [Goldring MB et al, 2006]*

l'expression des collagènes de type II, IX, des agrécannes et des protéines de liaison permettant ainsi la formation des PGs [Smits P et al, 2001]. Un autre facteur de transcription intervient dans la phase de différenciation chondrocytaire. Il s'agit de Run2 (encore appelé Car binding factor, Cbfa1 et Osf2) (Figure I-15). Comme le montre la figure I-15, ce facteur est également présent dans la phase de condensation et plusieurs auteurs le décrivent comme étant également nécessaire dans la différenciation des CSMs en cellules osseuses [Ducy P et al, 1997].

Des études récentes ont montré les rôles critiques des cascades de signalisation intracellulaire activée par des membres de la famille du TGF-β en favorisant l'expression des gènes spécifiques du cartilage [Watanabe H et al, 2001; Tuli R et al, 2002; Nakamura K et al, 1999], comme les 'mitogen-activated protein kinases' (MAPK), les N-cadherines et les Wnts. Les principaux sous-types de MAPK incluent le p38, 'extracellular signal-regulated kinase-1' (ERK-1), et 'c-Jun N-terminal kinase' (JNK). Une étude récente sur la chondrogénèse de cellules progénitrices mésenchymateuses par le TGF- β 1 a montré la nécessité de chacune de ces sous-MAPK. L'expression du gène du facteur de transcription Sox 9 régulateur transcriptionel de gènes spécifiques du cartilage et inducteur du phénotype chondrocytaire [Bi W et al, 1999], est exclusivement régulé par p38, Erk-1, et les sous-types de JNK. Cela montre l'importance de la signalisation des MAPK dans la chondrogénèse et la régulation de l'expression des gènes chondrorégulateurs et des gènes spécifiques aux chondrocytes [Tuli R et al, 2003]. De cette manière, l'activation de chaque voie de MAPK par le TGF- β1 contribue de manière significative à l'induction complète de la différenciation chondrogénique.

L'expression régulée des molécules d'adhérence telles que la N-cadherine, qui agit pendant la condensation mésenchymateuse menant ensuite à une progression vers la différenciation chondrogénique, a été bien établie dans le cas des bourgeons de membres de poussins [DeLise AM, et al 2000, Oberlender, S. A et al 1994] et les systèmes de micromasses de lignée de 'C3H10T1/2' souris [Haas AR et al, 1999]. Nous rapportons ici que l'induction chondrogénique de MPCs adulte exige également le contrôle précis de l'expression de la N-cadherine. L'expression de la N-cadherine dépend des cascades de signalisation de MAPK initié par le TGF-β1, permettant l'adhérence cellule-cellule appropriée nécessaire à la différenciation cellulaire vers un phénotype chondrocytaire.

En plus, le domaine cytoplasmique des N-cadherines est ancré aux fibres d'actine du cytosquelette par des interactions avec les complexes α-, β- et γ-catenine. Or la β-catenine cytoplasmique peut interagir avec d'autres protéines telles que l'axine et la conductine, aussi bien que des régulateurs transcriptionels, 'lymphoid enhancing factor-1 (LEF-1)'/'T-cell factor (TCF)', chacun d'eux jouant des rôles critiques dans la voie des transduction de signaux des Wnts canoniques, récemment impliqués dans la régulation de différenciation des chondrocytes [Behrens J et al, 2000].

Les Wnts sont une famille des glycoprotéines qui agissent à la manière d'une glande paracrine, négociant de ce fait des interactions cellulaires pendant le développement [Behrens J et al, 2000; Cadigan KM et al, 1997]. Le Wnt-7a s'est révélé être chondro-inhibiteur *in vitro* [Rudnicki JA et al, 1997]. La mauvaise expression du Wnt-7a dans les cultures

chondrogéniques de membre mésenchymales a directement mené à l'expression prolongée de la N-cadherine, à la stabilisation de l'adhérence cellule-cellule du à la présence de la N-cadherin, et enfin à l'inhibition de la chondrogènèse [Tufan AC et al 2001, 2002].

De récents rapports de la chondrogénèse des MPCs induites le par TGF- β1 ont montré que cette régulation de la différenciation des MPC par les MAPK implique la modulation indirecte des niveaux d'expression des N-cadherines pour contrôler les événements de condensation du précartilage et la progression de la différenciation chondrogénique. Une cible de l'activation des MAPK dans la régulation des événements d'adhérence cellule-cellule via les N-cadherines est le contrôle des niveaux d'expression des gènes Wnt-7a aussi bien que la signalisation Wnt-négociée suivante par la voie intracellulaire des TCF-catenine-β. Ceci est susceptible de se traduire par la régulation de l'expression des N-cadherines pendant la condensation [Tuli R et al, 2003].

Les voies de transduction du signal de BMP peuvent expliquer l'action des BMP sur la chondrogénèse [Derynck R et al, 2003]. Deux voies distinctes sont décrites: la voie canonique Smad et une voie MAPK [Derynck R et al, 2003]. Les BMPs transmettent les signaux par la formation de complexes hétéromériques des récepteurs de type I et II des 'serine/threonine kinase receptors' (Figure I-15). Au point d'attachement du BMP, les récepteurs de type II phosphorilent les résidus de sérine/thréonine des récepteurs de type I. Trois récepteurs de type I transmettent les signaux BMP: BMP-RIA, BMP-RIB, et Alk-2. Les récepteurs activés de type I phosphorilent les complexes et de ce fait permettent la phosphorilation de récepteurs Smads-régulés (R-Smads). Ensuite, les R-Smad recrutent et s'attachent aux partenaires communs Smads (Co-Smads) pour former des complexes hétérométriques. Ces complexes Smad pénètrent dans le noyau et s'attachent directement à l'ADN ou interagissent avec des protéines d'attachement de l'ADN pour réguler la transcription des gènes cibles.

Les BMPs peuvent également servir de signal par l'activation de 'TGFβ activated kinase 1' (KAT1). Les KAT1 mènent à l'activation des p38 MAPKs. Les aspects de la signalisation des BMPs dans les chondrocytes négociés par les p38 MAPKs sont peu clairs.

Un paramètre assurant la voie de signalisation des BMPs est la disponibilité du ligand. Les Noggins et Chordins se complexent avec les BMPs et inhibent la liaison aux récepteurs.

Alternativement, les activités de nombreux antagonistes des BMPs sont régulées par des mécanismes post-translationels [Derynck R et al, 2003].

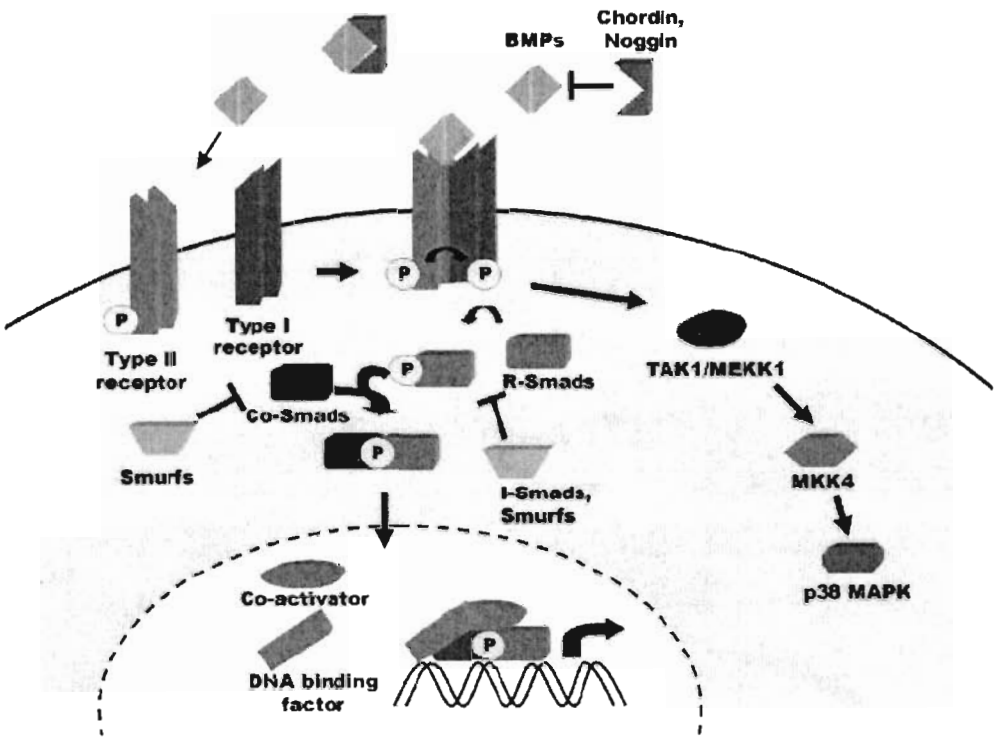


Figure I-15: Mécanisme de signalisation des BMP. *Les facteurs de croissance peuvent se fixer sur 2 types de récepteurs (type I et II). Cette fixation induit la phosphorilation des protéines R-Smads. Ces derniers pourront former des complexes avec Co-Smads et pénétrer dans le noyau pour réguler la transcription de gène cibles. Les BMPs peuvent aussi activer la voie des MAP-kinases.*

Des niveaux de contrôle supplémentaires impliquent la modulation des récepteurs des BMP et la stabilité des R-Smad via la protéolyse induite par l'ubiquitine et l'action des inhibiteurs Smads (I-Smads) et Smurfs.

En conclusion, il y a un degré considérable d'entrecroisements entre des BMPs et les autres voies sont imbriquées. [Von Bubnoff A et al, 2001; Lyons KM et al, 2003]. Pour la plupart, la pertinence physiologique de ces mécanismes modulatoires dans la chondrogénèse n'est pas bien définie.

C.II : Etude de la chondrogénèse *in vitro* :

En ingénierie tissulaire du cartilage, lorsque les CSMs sont utilisées comme source cellulaire, il est important d'utiliser des protocoles de cultures bien définis afin de favoriser tout d'abord leur condensation, puis la différenciation chondrocytaire. Comme cela vient d'être démontré dans le paragraphe C.I, ces protocoles doivent utiliser certains facteurs de croissance et pas d'autres afin d'utiliser des voies de signalisation bien précises permettant

d'engager les CSMs uniquement vers la lignée chondrocytaire. Une autre difficulté est de s'assurer que les cellules obtenues sont bien des chondrocytes et non des cellules plus différenciées comme des chondrocytes hypertrophiques. Ces dernières ne permettant pas la synthèse d'une MEC cartilagineuse fonctionnelle.

C.II.1 : Milieux de culture permettant la différenciation chondrocytaire *in vitro* :

Pour utiliser des cellules souches à des fins cliniques, les protocoles de culture cellulaire doivent être dépourvus de produits d'origine humaine voire animal plus globalement ; ceci afin d'éviter tout risque potentiel de contamination. L'absence de tels produits réduits également toute variabilité liée à l'espèce et peut ainsi permettre un contrôle qualité plus rigoureux. Le milieu de culture « idéal » pour la différenciation des CSMs en chondrocytes doit être :

- Cliniquement bien défini,
- Sans sérum,
- Supplémenté en cytokines recombinante spécifiques et en facteurs de croissance [Wong M et al, 1993 ; Goldsborough MD et al, 1998].

C.II.1.1 : Conditions de culture sans sérum pour favoriser la différenciation chondrocytaire

Pour une utilisation en clinique, il y a plusieurs arguments en faveur d'une culture *in vitro* des CSMs sans sérum. Tout d'abord, la composition du sérum est mal définie, avec un degré considérable de variations 'interbatch', même lorsqu'il est obtenu à partir du même patient ou du même fabricant. De plus, il peut contenir des facteurs de croissance et de différenciations non caractérisées, qui peuvent conduire en une différenciation spontanée non contrôlée des CSMs en de multiples lignées divergentes autres que la lignée chondrocytaire.

C.II.1.2 : Utilisation de composés chimiques non-protéiques

En plus des cytokines à base de protéines et des facteurs de croissance, d'autres composés chimiques non-protéiques peuvent favoriser la différenciation chondrogénique *in vitro* (Tableau I-7). De tels produits chimiques tendent à être moins labiles, avec une plus longue demi-vie active en solution, comparé aux cytokines à base de protéines et aux facteurs de croissance. D'ailleurs, à la différence des protéines qui doivent être synthétisées en cellules vivantes et sujettes à des modifications post-translationnelles complexes (glycosylation,

épissure de peptide, pliage conformationnel), ces composés chimiques peuvent être fabriqués en laboratoire par réactions chimiques et par conséquent sont structurellement et chimiquement mieux définis par rapport aux protéines.

Parmi les composés chimiques non-protéiques qui sont connus pour favoriser la différenciation chondrocytaire *in vitro* (Tableau I-7), on retrouve le dexaméthasone qui est un inducteur efficace de différenciation chondrocytaire pour les CSMs humaines [Johnstone B et al, 1998 ; Mackay AM et al, 1998]. Des hormones thyroïdiennes ont été également impliquées

Tableau I-7 : Facteurs chimiques et non-protéiques favorisant la différenciation des CSMs en chondrocytes.

Facteurs Chimiques	Propriété(s)
Dexaméthasone	Glucocorticoïde synthétique
Hormone thyroïdienne	Dérivés stéroïdiques du métabolisme du cholestérol
1,25-dihydroxy vitamine D_3	Calcitriol, forme active de vitamine D.
Prostaglandine E2	Dérivé du métabolisme de l'acide arachidonique
Acide ascorbique	Vitamine C
Staurosporine	Inhibiteur de protéine kinase C
Dibutryle cAMP	Forme de cAMP perméable aux cellules
Concavalin A	Membre de la famille des lectines des composés chimiques basés sur les carbohydrates
Vanadate	Sel de vanadium inorganique
FK506	Drogue immunosuppressive

dans la différenciation chondrogénique [Wakita R et al, 1998, Siebler T et al, 2002]. La 1,25 dihydroxy vitamine D3, la prostaglandine E2, l'acide ascorbique, l'éthanol, le staurosporine, le dibutryle cAMP et concavaline A ont été remarqués pour leur stimulation de la différenciation chondrogénique des cellules mésenchymateuses de bourgeons embryonnaires de membres ou de culture faciale embryonnaire *in vitro* [Tsonis PA et al, 1991; Harmand MF et al, 1984; Kosher RA et al, 1983; Biddulph DM et al, 2000; Miyamoto M et al, 2003; Farquharson C et al, 1998; Kulyk WM et al, 1996; Hoffman LM et al, 1999; Kulyk WM et al, 1991; Kulyk WM et al, 1992 ; Revillion-Carette F et al, 1986; Mikhailov AT et al, 1988]. Le vanadate a été montré comme favorisant la synthèse de la matrice du cartilage en particulier les PGs dans des cultures de chondrocytes costaux de lapin [Kato Y et al, 1987]. Le FK506 a

été montré comme stimulant la différenciation chondrocytaire d'une variété de cellules embryonnaires issues d'un carcinome murin [Nishigaki F et al, 2002].

C.II.2 : Coculture de cellules

Une autre stratégie pour contrôler la différenciation des CSMs est de cocultiver ces cellules avec une population différente de cellules. La différenciation des CSEs dans la lignée chondrocytaire a été augmentée par coculture avec les cellules progénitrices de 'limb bud' [Sui Y et al, 2003]. Pour les cellules mésenchymateuses, plusieurs études ont rapporté que la coculture avec des macrophages à doublure synoviale [Van Lent PL et al, 2004] et des cellules calvariales embryonnaires [Wong M et al, 1995] stimulaient la différenciation chondrocytaire. L'avantage de ces systèmes de coculture est que ceux-ci permettent des contacts très proches entre les différents types cellulaires favorisant la transduction des signaux moléculaires impliqués dans la différenciation chondrocytaire. Les récepteurs de surface des cellules cocultivées permettent des contacts physiques directs entre les cellules et les facteurs autocrine et de paracrine sécrétés par un type de cellules interagissent aisément avec l'autre type de cellules.

En situation clinique, il ne serait pas pratique de stimuler la différenciation chondrocytaire des cellules souches par coculture avec une autre source de cellules. La coculture de deux ou plusieurs populations distinctes de cellules porte également un risque important de transmission de microbes pathogènes, en particulier des virus. Récemment, plusieurs études ont rapporté que le contact physique pouvait mener à la fusion des différents types de cellules *in vivo*, ayant pour résultat la formation d'hétérocaryons [Terada N et al, 2002]. Un autre inconvénient de la coculture est la difficulté de séparer les populations de cellules cocultivées. Le degré le plus élevé de pureté lors de séparation pourrait être atteint en utilisant un tri de cellules [Herzenberg LA et al, 2002]. Cependant, soit la technique utilisée nécessite une instrumentation chère soit le degré de pureté lors de la séparation est trop faible [Siegel DL et al, 2002]. Pour le problème de séparation des population de cellules, il peut être de conserver les populations cellulaires cocultivées physiquement séparées par l'utilisation de séparateurs Transwell [Van Lent PL et al, 2004].

Une autre alternative serait d'utiliser des milieux de culture conditionnés et filtrés. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté que des milieux de culture conditionnés par des cellules embryonnaires [Wong M et al, 1995], des cellules périchondriales articulaires [Di Nino DL et al, 2001], ou encore des chondrocytes primaires [Shen V et al, 1985] avaient tous des effets stimulants sur la différenciation chondrocytaire. Ceci suggérerait que le contact cellulaire

proche dans la coculture pourrait ne pas être réellement nécessaire pour réaliser une stimulation de la différenciation chondrocytaire. Néanmoins, il est important de noter que l'utilisation de milieux conditionnés filtrés n'allège pas le risque de transmission virale et que les facteurs sécrétés dans les milieux conditionnés peuvent être labiles et par conséquent peuvent ne pas convenir aux durées prolongées de la culture *in vitro*.

C.II.3 : Utilisation de modifications génétiques dans la différenciation chondrocytaire

Une nouvelle alternative pour diriger et contrôler la différenciation chondrocytaire des cellules souches est la modulation génétique. Ceci pourrait être réalisé par transfection des cellules souches avec des constructions d'ADN recombinantes et codant pour l'expression de certaines protéines ou certains facteurs de croissance favorisant la chondrogenèse. Les facteurs de transcription impliqués dans la voie de la différenciation chondrocytaire sont d'un intérêt particulier. En effet, la sur-expression recombinante de Sox9 [Tsuchiya H et al, 2003], de DEC1 [Huang W et al, 2002], et de Brachyury [Hoffmann A et al, 2002] ont tous été rapportés comme accélérant la chondrogenèse. En plus des facteurs de transcription, des auteurs ont également rapporté que l'expression recombinante de plusieurs autres protéines favoriserait la différenciation chondrocytaire. Celles-ci incluent l'IGF-1 [Madry H et al, 2002], le TGF-β2 [Wang WG et al, 2003] et le NCAM [Widelitz RB et al, 1993].

L'inconvénient de diriger la différenciation chondrocytaire par modification génétique est le risque potentiel lié à l'emploi d'une technologie de recombinaison d'ADN en thérapie clinique humaine. Par exemple, la sur-expression constitutive de n'importe quelle protéine particulière ou n'importe quel facteur de croissance particulier à travers des cellules souches transfectées pourrait avoir certainement des effets physiologiques imprévisibles sur la transplantation *in vivo*. Ce problème peut être surmonté en plaçant l'expression recombinante de la protéine particulière sous le contrôle de déclencheurs permutables. De tels déclencheurs permutables pourraient être sensibles à des produits chimiques exogènes, à des chocs thermiques voire à la lumière [Shimizu-Sato S et al, 2002].

C.III.4 : L'effet du facteur mécanique sur la différenciation chondrocytaire

Pendant les processus de réparation *in vivo* des tissus squelettiques, le tissu et les cellules de réparation sont sujets à une variété de forces mécaniques qui peuvent jouer un rôle important dans le taux et/ou dans la qualité de la réparation tissulaire. Dans le cas où les CSMs agissent en tant que cellules réparatrices des tissus squelettiques, cela implique une

phase chondrogénique. Il est probable que ces CSMs soient soumises à des facteurs mécaniques qui auront un impact sur la qualité finale de la réparation. Cependant, peu de choses sont connues concernant l'influence des contraintes biomécaniques sur la production matricielle de cellules mésenchymateuses ou sur leur différenciation en chondrocyte. Angele P et al. ont étudié l'effet d'une pression hydrostatique cyclique et intermittente (4h / jour) sur la différenciation de CSMs issues de moelle osseuse humaine. Cette contrainte appliquée pendant plusieurs jours augmentait significativement la production de composants matriciels (collagène, PGs) [Angele P et al, 2003].

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

A. Méthodologie Générale

A.I : Culture de cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse humaine

Les études sont réalisées sur des cultures de CSMs provenant de moelle osseuse humaine saine. Ces cellules sont utilisées pour étudier la différenciation chondrogénique. La moelle osseuse est extraite, par ponction, de la crête iliaque supérieure du bassin.

A.I.1 : Culture des CSMs en monocouche

A.I.1.1 : Réactifs

1) Milieu de culture et additifs

- Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose (DMEM-LG) (réf. 6046, Sigma, France).
- Sérum de veau fœtal (réf. 10108, GibcoBRL, France) utilisé à 10% (v/v dans DMEM-LG), décomplémenté à 56°C pendant 30 min.
- 2 mM de Glutamine (réf. 25030, GibcoBRL, France)
- 100 U/mL Pénicilline (réf. 15070, GibcoBRL, France)
- 100 µg/mL de Streptomycine (réf. 15710, GibcoBRL, France)
- 2,5 µg/mL Amphotéricine B (réf. 15290, GibcoBRL, France)

L'ajout de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, de glutamine et d'antibiotiques au DMEM-LG constitue ce que l'on appelle le ''milieu de culture complet'' N° 1.

2) Solution de digestion et tampon

Tampon HBSS (Hank's Balanced Salts Solution) (KCl 0,4 g/L, NaCl 8,0 g/L, KH_2PO_4 0,06 g/L, Na_2HPO_4 0,04778 g/L, D-glucose 1,0 g/L et Rouge de phénol 0,011 g/L)

Ce tampon sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} (réf.H2387, Sigma, France), sous forme de poudre, se reconstitue de la manière suivante:

- Ajouter 0,35g de $NaHCO_3$ (réf. S8875, Sigma, France)
- Compléter avec de l'eau distillée jusque 1000 mL (pH 7,2)
- Filtrer la solution sur des filtres 0,22 µm
- Conserver à 4°C

Solution de trypsine-EDTA à 0,5% (réf. 25300, Sigma, France), diluée dans du tampon HBSS. La concentration finale de la solution de trypsine-EDTA est alors de 0,25%.

A.I.1.2 : Méthodologie

$2{,}5.10^6$ cellules nuclées issues de moelle osseuse sont diluées dans 10 ml de milieu de culture complet N° 1 puis réparties dans 2 boîtes de culture de 25 cm^2 (soit 5.10^4 cellules par cm^2). Les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C avec 5% CO_2. Après 48 heures, le milieu de culture est renouvelé. Il sera ensuite changé toutes les semaines jusqu'à confluence. Afin d'amplifier les CSMs arrivées à confluence, les cellules sont lavées avec 10 ml de tampon HBSS pendant 2 minutes. Le tampon HBSS est ensuite retiré des boîtes de culture et 2 ml de trypsine-EDTA à 0,25% sont ajoutés dans chaque boîte de culture. Les cellules sont alors incubées 5-10 minutes à 37°C avec 5% CO_2. Afin d'inhiber l'action de la trypsine, 2 ml de milieu de culture complet sont ajoutés dans chaque boîte de culture. Les cellules en suspension sont alors retirées et placées dans un tube conique afin d'être lavées par centrifugation (300g, pendant 5 minutes). Pendant le lavage, un comptage cellulaire est effectué à l'aide d'une cellule de Thoma.

A l'issu de la centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans un volume de milieu de culture complet N° 1. 10^3 cellules par cm^2 sont remises en culture dans des boîtes de 25 ou 75 cm^2. Les CSMs étant présents en faible quantité dans la moelle osseuse, les 2 premiers passages permettent non seulement d'éliminer les cellules non adhérentes mais aussi d'amplifier les CSMs. Ainsi les cellules du troisième au cinquième passage sont utilisées pour les expériences.

A.I.2. Culture des CSMs dans un modèle de micromasse

A.I.2.1 : Réactifs

1) Milieu de culture et additifs :

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Nut Mix F-12 (réf. 21331, GibcoBRL, France).
- 2 mM de Glutamine (réf. 25030, GibcoBRL, France)
- 100 U/mL de Pénicilline (réf. 15070, GibcoBRL, France)
- 100 µg/mL de Streptomycine à (réf. 15710, GibcoBRL, France)
- 2,5µg/mL Amphotéricine B (réf. 15290, GibcoBRL, France)
- TGF-β1 à 2 µg/tube (réf. T7093, Sigma, France) utilisé à 10 ng/ml (dans DMEM Nut Mix F-12).

- Acide L-ascorbique à 25g (réf. A4544, Sigma, France) utilisé à 0,1 mM (dans DMEM Nut Mix F-12).
- Pyruvate de sodium à 25g (réf. P5280, Sigma, France) utilisé à 1 mM (dans DMEM Nut Mix F-12).
- Dexamethasone à 100mg (réf. D4902, Sigma, France) utilisé à 10^{-7}M (dans DMEM Nut Mix F-12).
- BSA (Albumine de Sérum Bovine) à 50g (réf. A9647, Sigma, France) utilisé à 0,5mg/ml (dans DMEM Nut Mix F-12).
- Acide linoléique à 10mg (réf. L5900, Sigma, France) utilisé à 4,7µg/ml (dans DMEM Nut Mix F-12).
- L-proline à 25g (réf. P5607, Sigma, France) utilisé à 40 µg/ml (dans DMEM Nut Mix F-12).
- ITS (Insulin, Transferring, Selenous acid) à 25mg (réf. I1884, Sigma, France) utilisé à 1% (p/v dans DMEM Nut Mix F-12).

Lorsque tous ces additifs sont ajoutés au DMEM Nut Mix F-12, nous obtenons le ''milieu de culture complet N° 2''. Ce dernier favorise la différenciation des CSMs.

2) Solution de digestion

- Collagénase B (ref. 1088815, Roche Applied Science, USA) reconstituée à 2mg/mL dans du milieu DMEM Nut Mix F-12.

A.I.2.2 : Méthodologie

Lorsque les CSMs, cultivées en P4, sont décrochées, selon le protocole décrit dans la paragraphe A.I.1.2, un test de viabilité cellulaire est effectué à l'aide du bleu de trypan. A l'issu de la centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu afin d'obtenir 2.0 x 10^7 cellules viables/ml. Les micromasses sont obtenues par le dépôt d'une goutte de 15µL de suspension cellulaire au milieu de chaque puits d'une plaque de culture cellulaire de 24 puits [De Bari C et al, 2004]. La plaque est placée, pendant 3 heures, dans une étuve à 37 °C et 5% CO_2 afin que les cellules puissent adhérer au plastique. A l'issue de cette incubation, les micromasses sont précautionneusement immergées dans 1mL de milieu de culture/puit. Ce milieu de culture est renouvelé 2 fois par semaine jusqu'au 21ème jour. Après 1, 7, 14 et 21 jours de culture, les cellules cultivées dans le modèle micromasse sont isolées en utilisant de la collagènase B à 0,2% pendant 30 min à 37 °C, afin d'être analysées.

A.I.3. Culture des CSMs dans des biomatériaux à base d'alginate

A.I.3.1 : Réactifs

1) Les polymères : L'alginate (Alg) est issu de l'algue *Macrocystis Pyriferia*

Deux polymères de viscosité différente sont utilisés dans notre travail :

- Faible viscosité (FV) : ~250 cP de viscosité (2 %, 25 °C) (A-2158, Sigma Aldrich, France).
- Moyenne viscosité (MV) : ~3,500 cP de viscosité (2 %, 25 °C) (A-2033, Sigma Aldrich, France).

2) Solutions

- Chlorure de calcium (réf. C4901, Sigma-Aldrich, France) 100 mM dans l'eau distillée.
- Chlorure de sodium (NaCl) stérile à 0,9% (réf. Braun, France).

3) Milieu de culture et additifs

3mL de $CaCl_2$ à 100mM sont ajoutés à 100mL de milieu de culture complet N° 1 ou 2 pour obtenir une concentration finale de 3 mM en $CaCl_2$.

A.I.3.2 : Méthodologie

Préparation des solutions de polymères :

Chacun des polymères sera utilisé à 1,2 % et 2 %. Les 4 solutions d'Alg sont préparées selon le protocole suivant : les poudres d'Alg (FV ou MV) sont stérilisées par autoclavage (121°C, 20 minutes) avant d'être solubilisées dans du NaCl 0,9%. La concentration finale d'Alg est de 12 g/L ou 20g/L.

Tableau II- 1 : Proportion et concentration de chaque polymère dans le biosystème.

biosystème / polymère	1,2 % FV	2 % FV	1,2 % MV	2 % MV
FV	12 g/L	20 g/L		
MV			12 g/L	20 g/L

Fabrication des biosystèmes ensemencés ou non avec des cellules :

Les cellules cultivées en monocouches sont décrochées selon le protocole décrit dans le paragraphe A.I.1.2.

Pour les biosystèmes ensemencés de CSMs, le culot cellulaire est mis en suspension dans des solutions d'Alg 20 g/L et 12g/L à raison de 2.10^6 CSMs/mL de gel.

Les solutions sont déposées goutte à goutte dans un tube de 50 mL contenant une solution de $CaCl_2$ à 100 mM. Cette opération est réalisée à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille (réf. 304622, BD Microlance™, France). Au contact du $CaCl_2$, la solution se polymérise pour former des billes d'environ 2 mm de diamètre [Figure II-1]. Les billes sont alors laissées pendant 15 minutes dans la solution de $CaCl_2$ 100 mM afin d'obtenir une organisation homogène ; puis, elles sont lavées 3 fois dans du NaCl à 0,9% afin d'éliminer le $CaCl_2$ résiduel.

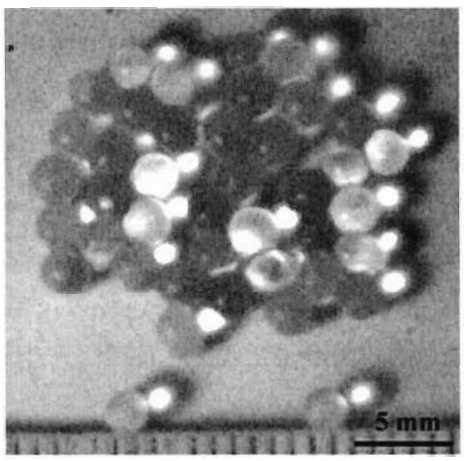


Figure II-1 : Billes d'alginate

Les billes sont ensuite cultivées à 37°C avec 5% CO_2 en présence de milieu de culture complet (N° 1 ou 2) enrichi en $CaCl_2$ 3 mM pendant 21 jours. Le $CaCl_2$ permet de maintenir l'intégrité structurale de gel d'alginate pendant la phase de culture cellulaire. Le milieu de culture est renouvelé 2 fois par semaine.

A.I.4 : Cryoconservation des CSMs

A.I.4.1 : Réactifs et Matériel

- 90% (v/v) de sérum de veau fœtal et 10% (v/v) de DMSO (diméthyl sulfoxyde, réf. D5879, Sigma Aldrich, France). Ce mélange constitue le milieu de congélation.
- Milieu complet N°1, Hank's balanced salts solution (HBSS, réf. H2387, Sigma , France) (cf. paragraphe A.I.1.1).

- Solution de trypsine-EDTA à 0,5% (réf. 25300, Sigma, France) utilisé à 0,25% (v/v dans du tampon HBSS)
- Cryotubes stériles (réf. 22875, Nalgene, France).

A.I.4.2 : Méthodologie

Lorsque les CSMs (passages P0-P1) arrivent à confluence, le tapis cellulaire est lavé avec du tampon HBSS sans calcium ni magnésium. Les cellules sont ensuite décollées par un traitement de 10 minutes avec 2 mL de mélange trypsine-EDTA (37°C, 5% CO_2). L'action de la trypsine est inactivée par addition de 8 mL de milieu complet et un comptage cellulaire est effectué à l'aide d'une cellule de Thoma.

La suspension cellulaire est alors centrifugée à 300g pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans le milieu de congélation afin d'obtenir une concentration de 1.10^6/ml. La suspension cellulaire est fractionnée dans des cryotubes stériles qui sont placés pendant 30 minutes à 4°C, puis pendant 24 heures à -80°C. Les fractions, ainsi préparées, sont immergées et conservées à -180°C dans l'azote liquide.

Pour la décongélation, les fractions cellulaires sont plongées dans un bain-marie à 37°C. Les cellules sont lavées avec du milieu complet N°1 afin d'éliminer le DMSO. Elles sont ensemencées dans des boîtes de culture (10^3 cellules/cm²) et sont cultivées jusqu'à confluence.

A.II. : Isolation de chondrocytes humains

Parallèlement à la culture des CSMs, des chondrocytes issus du cartilage articulaire sont isolés afin de servir de témoin positif.

Ces cellules sont utilisées à P0, c'est-à-dire directement après leur isolation du cartilage afin d'éviter leur dédifférenciation lors de la culture en monocouche.

A.II.1 : Prélèvement du cartilage articulaire

A.II.1.1 Origine du cartilage

Les têtes fémorales humaines sont prélevées lors d'un geste chirurgical réalisé chez des patients ayant subi une pose de prothèse totale de la hanche et ayant donné leur consentement éclairé.

A.II.2. : Obtention des chondrocytes à partir de cartilage humain

A.II.2.1. Réactifs

- Pronase (réf. P6911, Sigma Aldrich, France) reconstituée à 2 mg/mL dans du NaCl 0,9% additionné de 100 U/ml de penicilline/streptomycine et 1µg/ml d'amphotericine B.
- Collagénase B (ref. 1088815, Roche Applied Science, USA) reconstituée à 2mg/mL dans du NaCl 0,9% additionné des 100 U/ml de penicilline/streptomycine et 1µg/ml d'amphotericine B.
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Nut Mix F-12 (réf. 21331, GibcoBRL, France).
- Sérum de veau fœtal (réf. 10108, GibcoBRL, France) utilisé à 10% (v/v dans du DMEM). Il est décomplémenté à 56°C pendant 30 min.
- Glutamine à 29,2 mg/mL (réf. 25030, GibcoBRL, France) utilisé à 1,2% (v/v dans DMEM).
- 100 U/mL de Pénicilline (réf. 15070, GibcoBRL, France)
- 100 µg/mL de Streptomycine (réf. 15710, GibcoBRL, France)
- Amphotéricine B à 250 µg/mL (réf. 15290, GibcoBRL, France) utilisé à 0,1% (v/v dans du DMEM).
- Chlorure de Sodium (NaCl) stérile à 0,9% (Braun, France).

A.II.2.2 : Méthodologie

Le cartilage hyalin des têtes fémorales est découpé en petits morceaux de $1mm^3$ et plongé trois fois dans du NaCl 0,9% additionné d'antibiotiques. Il est ensuite digéré pendant 2 heures à 37°C, 5% CO_2 dans la solution de pronase.

Après centrifugation (300g, 10 minutes), les morceaux de cartilage sont rincés à nouveau avec du NaCl 0,9% puis digérés une nuit à 37°C, 5% CO_2 dans 5 mL de collagénase B. La suspension cellulaire est centrifugée à 300g pendant 10 minutes et le culot est repris avec du milieu complet.

Les chondrocytes ainsi obtenus peuvent alors servir de témoins positifs dans la différenciation des CSMs.

B. Méthodologie Analytique

B.I : Activité métabolique

La mesure de l'activité métabolique des cellules a été réalisée par le test de l'Alamar Blue™.

B.I.1 : Principe

Le test Alamar Blue™ (Biosource, USA) 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 en bonne santé et/ou en prolifération produisent des composés réducteurs tels que FADH2, NADH, NADPH et ont une activité cytochromique préservée contribuant 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 la viabilité cellulaire est donc basée sur le taux d'oxydo/réduction de l'Alamar Blue™ déterminé par la mesure densitométrique à 540 nm (absorbance du composé réduit) et à 630 nm (absorbance du composé oxydé). Compte tenu du recouvrement partiel des spectres d'absorption du composé réduit et du composé oxydé, le pourcentage de réduction est alors déterminé par la correction suivante :

$$\% \text{ de réduction} = \frac{(\varepsilon_{ox})\lambda 2\ A\lambda 1 - (\varepsilon_{ox})\lambda 1\ A\lambda 2}{(\varepsilon_{red})\lambda 1\ A'\lambda 2 - (\varepsilon_{red})\lambda 2\ A'\lambda 1} \times 100$$

Où :

ε_{ox} : coefficient d'extinction molaire de la forme oxydée de l'Alamar Blue™
ε_{red} : coefficient d'extinction molaire de la forme réduite de l'Alamar Blue™
A : Absorbance des puits testés
A' : Absorbance d'un puits contrôle contenant le milieu de culture + l'Alamar Blue™
$\lambda 1$: la longueur d'onde 540 nm
$\lambda 2$: la longueur d'onde 630 nm

B.I.2 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).

B.I.3: Méthodologie

Afin d'éliminer le rouge de phénol présent dans le milieu de culture complet N° 2 (décrit au paragraphe A.I.2), les micromasses sont lavées avec 1ml/puit de DMEM Nut Mix F-12 sans rouge de phénol 3 fois. Puis 500 µl d'une solution d'Alamar Blue™ à 10% sont ajoutés dans chaque puits. Après une incubation de 1h30 à 37°C, la densité optique (D.O.) est calculée en effectuant la différence entre l'absorbance à 570 nm de l'espèce réduite et à 630 nm de l'espèce oxydée, comparée à la différence des témoins négatifs (cf. équation ci-avant). Pour chaque manipulation, trois puits non ensemencés font office de témoin négatif, et trois puits ayant reçus 3.10^5 cellules/micromasse font office d'échantillons. Ces mesures sont effectuées en utilisant un spectrophotomètre (DU 640, Beckman USA). Ce test est réalisé après 1, 7, 14, 21 jours de culture.

B.II : Marquage en immuno-fluorescence

B.II.1 : Principe

B.II.1.1 : Immuno-fluorescence indirecte :

Les récepteurs exprimés à la surface des cellules (marqueurs cellulaires) sont reconnus spécifiquement par un anticorps (Anticorps primaire). Afin de mettre en évidence la formation du complexe récepteur-anticorps primaire, un deuxième anticorps est utilisé (Anticorps

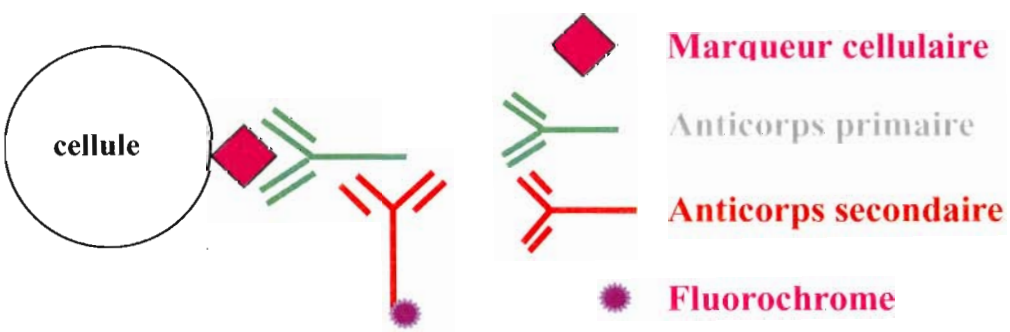


Figure II-2 : Principe de l'immuno-fluorescence indirecte. *Ce principle repose sur l'utilisation d'un anticorps primaire spécifique de l'antigène cellulaire et d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome et dirigé contre l'anticorps primaire.*

secondaire). Ce dernier est couplé à un fluorochrome et est dirigé spécifiquement contre la partie Fc de l'anticorps primaire (Figure II-2).

B.II.1.2 : Immuno-fluorescence directe :

A la différence de l'immuno-fluorescence indirecte, l'anticorps spécifique du marqueur cellulaire est directement couplé à un fluorochrome (Figure II-3).

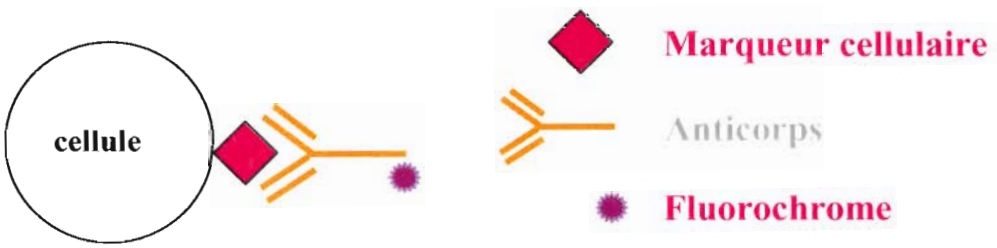


Figure II-3: Principe de l'immuno-fluorescence directe. *Ce principe repose sur l'utilisation d'un anticorps spécifique du marqueur cellulaire et couplé à un fluorochrome.*

B.II.2 : Les anticorps et réactifs

B.II.2.1 : Les anticorps

Nous distinguons deux catégories d'anticorps : ceux permettant de réaliser un immunomarquage direct (Tableau II-2) et ceux permettant un immunomarquage indirect (Tableau II-3).

Tableau II-2 : Caractéristiques et références des anticorps impliqués dans un immunomarquage direct

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Clone	Origine commerciale
Anti-CD34/PE	Humain	IgG1 (Mouse)	581	BD (réf. 555822)
Anti-CD45/FITC	Humain	IgG1 (Mouse)	HI30	BD (réf. 555482)
Anti-CD73/PE	Humain	IgG1 (Mouse)	AD2	BD (réf. 550257)
Control, FITC-Conjugated	Huamin	IgG1 (Mouse)	DAK-GO1	DakoCytomation (réf X0927)
Control, PE-Conjugated	Humain	IgG1 (Mouse)	DAK-GO1	DakoCytomation (réf X0928)

Tableau II-3 : Caractéristiques et références des anticorps primaires et secondaires impliqués dans les immunomarquages indirects.

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Clone	Origine commerciale
Anti-CD90	Humain	IgG2 (Souris)	Thy-1A1	R&D (réf. MAB2067)
Anti-CD105	Humain	IgG1 (Souris)	N1-3A1	Ancell (réf. 122605)
Anti-CD166	Humain	IgG1 (Souris)	3A6	Ancell (réf. 124903)
Anti-IgG-Alexa fluor 488	Souris	Chèvre		Molecular Probes (réf. A-11001)

B.II.2.2 : Réactifs annexes:

- DMEM Nut Mix F-12 sans rouge de phénol (réf. 51200, GibcoBRL, France).
- Albumine de Sérum Bovine (BSA, réf. A-9667, Sigma Aldrich, France) utilisé à 0,4% (p/v dans DMEM). La BSA est utilisée afin d'empêcher toute fixation aspécifique des anticorps. Lorsque la BSA est ajouté au DMEM, cela forme ce que nous appelerons la solution d' immunomarquage.
- Solution de fixation : Paraformaldéhyde (réf. P-6148, Sigma Aldrich, France) : 1% (p/v dans eau distillée).
- Solution de trypsine-EDTA à 0,5% (réf. 25300, Sigma, France) utilisé à 0,25% (v/v dans HBSS)
- Phosphate Buffer Saline (PBS) : NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO4 10mM, KH_2PO4 1,4 mM

B.II.3 : Méthodologie

B.II.3.1 : Caractérisation des CSMs à P3

Plusieurs auteurs décrivent qu'à partir de la mœlle osseuse, il faut 3 passages pour obtenir une population cellulaire composée majoritairement de CSMs. Afin d'être sûr de ne travailler par la suite qu'avec des CSMs, nous avons caractérisé la population de cellules obtenue au troisième passage.

Les procédés d'immunomarquages direct ou indirect se font en conditions saturantes.

Immunomarquage direct :

Cet immunomarquage concerne les récepteurs CD34, CD45 et CD73. A l'issue du 3ème passage, les CSMs sont trypsinées, selon le protocole décrit paragraphe A.I.1.2, et sont réparties à raison de 5.10^5 cellules/tube. Les cellules sont lavées par centrifugation avec 2 mL de PBS (5 min, 300g). Le surnageant est décanté et resuspendu dans 100 µL de solution d'immunomarquage. 5 µL d'anticorps spécifiques sont ajoutés et les cellules sont incubées pendant 20 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière. A l'issue de l'incubation, 2 mL de PBS sont ajoutés dans chaque tube puis une centrifugation est faite afin d'éliminer les anticorps en excès (5 min, 300g). Le culot est alors repris dans 500µL de PBS avant d'être analysé en cytométrie en flux (EPICS XL Coulter ; Beckman-Coulter).

Immunomarquage indirect :

Cet immunomarquage concerne les récepteurs CD105, CD166 et CD90. Tout comme pour le marquage direct, les cellules sont trypsinées. A l'issue de la centrifugation, le culot cellulaire est repris dans 200µL de solution d'immunomarquage. 10µL d'anticorps primaire CD90 (dilution 1/20), 2µL d'anticorps primaire CD105 (dilution 1/100), 1µL d'anticorps primaire CD166 (dilution 1/200) sont déposés dans chaque tube. Les échantillons sont incubés pendant 45 minutes à 4°C puis lavées par centrifugation avec 2 ml de PBS (5 min, 300g). 2µL d'anticorps secondaire sont alors ajoutés au culot cellulaire préalablement resuspendu dans 200µL de solution d'immunomarquage. A nouveau, les échantillons sont incubés pendant 45 minutes, à température ambiante, dans l'obscurité. A l'issue de cette incubation, tout comme pour le protocole d'immunomarquage direct, les cellules sont lavées par centrifugation et le culot est resuspendu dans 500µL de PBS.

Un tube pour le contrôle négatif (cellules non marquées dans du PBS) et un tube pour le contrôle isotypique sont préparés en même temps que les échantillons (cellules incubées avec un anticorps spécifique du contrôle isotypique pour le marquage direct ou avec l'anticorps secondaire pour le marquage indirect). Ces contrôles négatifs et isotypiques permettent, respectivement, de s'affranchir de l'autofluorescence des cellules et du marquage aspécifique.

B.II.3.2 : Suivi du phénotype des CSMs dans les différents modèles de culture

Le suivi du phénotype cellulaire se fait par analyse de l'expression des récepteurs CD90, CD105 et CD166 à la surface des CSMs cultivées en micromasse ou à la surface des

chondrocytes directement issus du cartilage articulaire. Pour les cellules cultivées dans les micromasses, la suspension cellulaire est obtenue après digestion des micromasses avec la collagénase B à 2% en suivant le protocole décrit au paragraphe A.I.2.2

B.III : Etudes Microscopiques

B.III.1 : Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission est utilisée afin de visualiser les changements morphologiques à l'intérieur des micromasses.

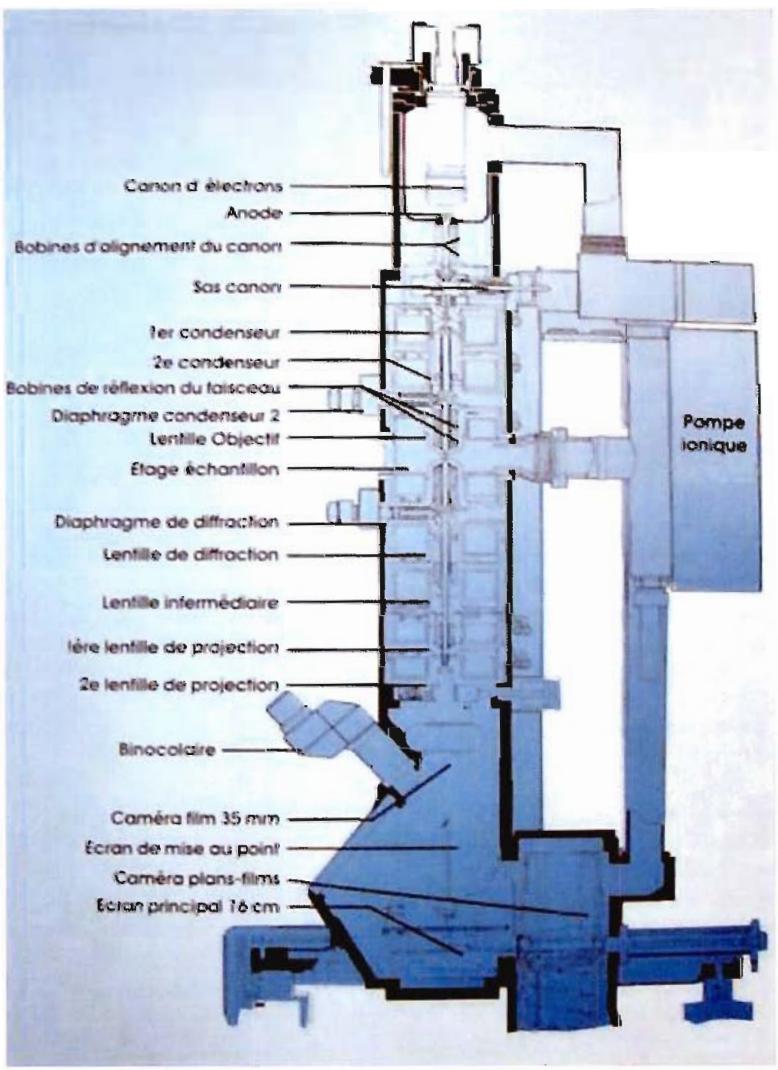


Figure II-4: Shéma d'un microscope électronique à transmission

B.III.1.1 : Principe

Le principe de la microscopie électronique à transmission présente des analogies avec la microscopie optique. Dans un microscope électronique, l'émission thermoélectronique des

électrons est produite par chauffage d'un filament de tungstène (2500°C) ou d'un cristal d'hexaborure de lanthane (1500°C, faisceau électrons plus important et plus cohérent) : la cathode. Les électrons sont ensuite focalisés par le ''wehnelt'' porté à un potentiel négatif et accélérés vers l'anode par le champ électrique existant entre l'anode et le filament (Ht de 80kV à 1000 kV) (Figure II-4).

Puis, ce faisceau est focalisé, grâce à un système de 2 lentilles électromagnétiques, ou condenseurs, vers l'échantillon à examiner. Ces lentilles jouent le même rôle que les lentilles classiques en verre du microscope optique. Ce sont des bobines électromagnétiques qui produisent un champ magnétique lorsqu'elles sont traversées par un courant électrique, de telle manière que ce courant agit sur le faisceau d'électrons pour le faire converger ou diverger. L'échantillon (coupes de 80 nm d'épaisseur environ placées sur une grille en cuivre de 3 mm de diamètre) est placé sur une platine permettant d'orienter la préparation dans différentes directions par rapport au faisceau d'électrons. Une lentille magnétique, appelée objectif, donne une image de l'objet agrandie de 10 à 100 fois. Cette image est de nouveau reprise par une lentille intermédiaire. Enfin, une lentille magnétique, dite de projection, donne une image agrandie de l'image intermédiaire, que l'on observe sur un écran fluorescent (Grandissement max du microscope électronique Philips CM12 : x 530000). Cet écran peut éventuellement être escamoté, pour permettre aux électrons d'impressionner une plaque photographique. Pour favoriser le déplacement des électrons à l'intérieur du microscope, des pompes à vide maintiennent dans l'appareil un vide assez poussé (environ 10-5 mm de mercure).

B.III.1.2 : Réactifs et matériel

- Sodium cacodylate trihydraté (réf. A0013867 Fisher Scientific, France) utilisé comme tampon cacodylate 0,1M pH 7,4 (p/v dans de l'eau distillée)
- Glutaraldéhyde à 25% (réf. R1011 Oxford Instrument, France) utilisé à 2,5% (v/v dans du tampon cacodylate)
- Acide osmique à 2% en solution acqueuse (réf. 1022 Oxford Instrument., France) utilisé à 1% (v/v dans dans le tampon cacodylate)
- Résine : Epon 812 (Neyco, France)
- Propylène oxyde (réf. 149620010 Fisher Scientific, France)
- Bleu Azur II (réf. 9211 MERCK, France)
- Ultramicrotome Ultracut E (Reichert-Jung Vienne Autriche)
- Microscope électronique Philips CM12 (FEI, France)

- Alcool

B.III.1.3: Méthodologie

Après 1, 14 et 21 jours de culture, les micromasses sont fixées dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5%, une nuit à 4°C. Après rinçage dans le tampon cacodylate, les échantillons sont postfixés dans l'acide osmique à 1% dans le tampon cacodylate pendant une heure. Ils sont ensuite lavés dans le tampon, déshydratés par des bains successifs de 5 min dans une série croissante d'alcool (30°, 50° 70°, 80°, 90, 100° trois fois) et 3 bains de 20 min dans le propylène oxyde. Après pré-imprégnation (1 volume de résine/1 volume de propylène oxyde), les micromasses sont inclues dans la résine pure, mise à polymériser à l'étuve à 56 °C pendant 48 heures.

Après sélection des coupes semi-fines (1,5 microns) colorées au bleu Azur II des coupes ultrafines (70-80 nm) sont réalisées sur un ultramicrotome. Colorées à l'acétate d'uranyle à 2 % et au citrate de plomb (colorant de Reynold's), les coupes sont observées au microscope électronique Philips CM12.

B.IV : Cytométrie en flux

Cette technique repose sur la mesure de paramètres physiques (taille, volume, granulosité) et biologiques (mise en évidence de la présence de molécules de surface grâce à un marquage fluorescent) de cellules défilant une à une à grande vitesse devant un faisceau lumineux monochromatique excitateur. Les signaux lumineux émis par les cellules sont recueillis et traités par un système informatique.

B.IV1 : Immunomarquage des molécules d'adhérence qualitativement et quantitativement

Cette technique, basée sur l'immunofluorescence, a permis d'analyser qualitativement et quantitativement le phénotype des CSMs et des chondrocytes tout au long de la culture en monocouche et/ou en micromasses. Les récepteurs étudiés sont : CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 et CD166.

B.IV1.1 : Analyse des échantillons cellulaires en cytomètrie en flux

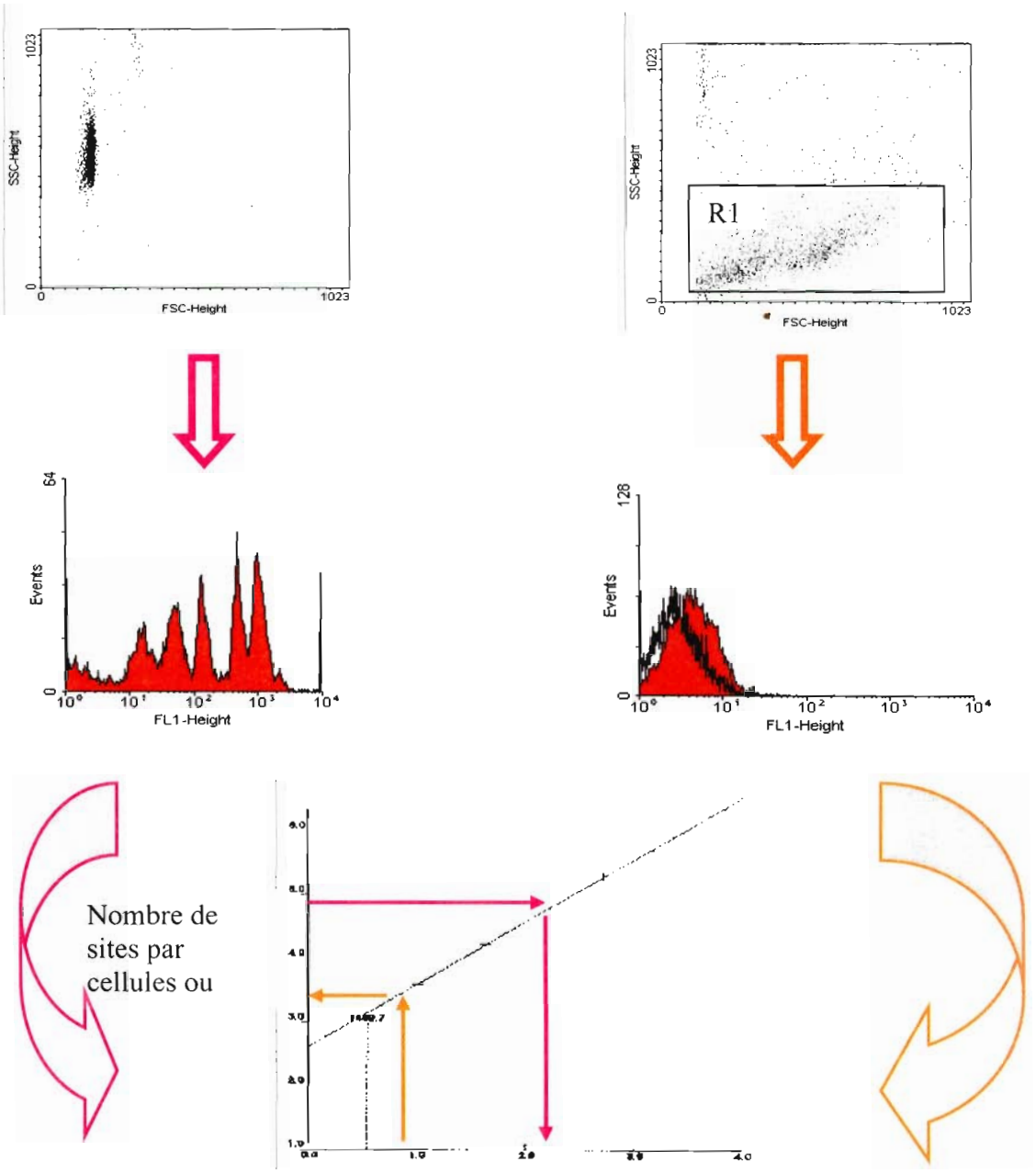


Figure II- 5 : Détermination du nombre de sites antigèniques à la surface celllaire. *La droite d'étalonnage est construite à partir des billes de calibration (Qifikit). Le nombre de sites antigéniques par cellule est déduit de cette droite.*

Les cellules sont analysées sur un cytomètre (EPICS XL Coulter; Beckman-Coulter). Un minimum de 10000 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 (Figure II-5). Une fenêtre prenant en compte uniquement cette population est dessinée afin d'éliminer les débris cellulaires, ou les doublets et triplets de cellules.

Sur l'histogramme de la fluorescence, la tension du photomultiplicateur (PMT) est réglée de manière à ce que les cellules non marquées, ainsi que le contrôle isotypique (cellules incubées en présence d'immunoglobulines non spécifiques) apparaissent négatif, entre 0 et 1 sur l'échelle logarithmique (Figure II-6). 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 analysées à l'aide du logiciel système (Beckman Coulter)

Les résultats obtenus, par cytométrie en flux, sont exprimés soit en pourcentage de cellules positives soit en intensité moyenne de fluorescence (IMF), cette IMF sera pour les récepteurs membranaires corrélés à une densité antigénique.

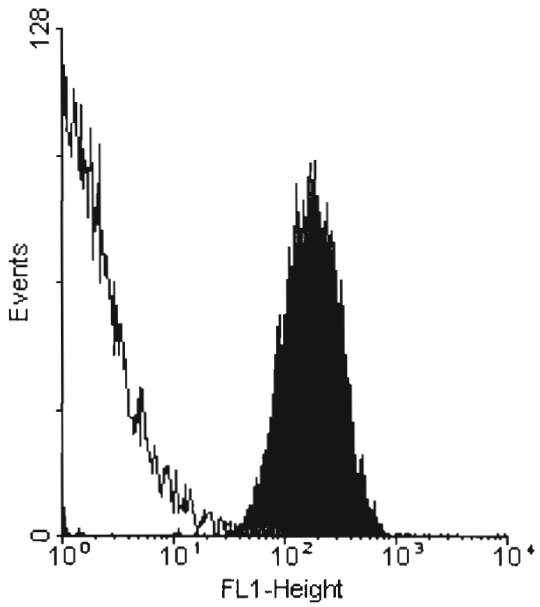


Figure II-6 : Histogrammes de fluorescense. *L'histogramme blanc représente la fluorescence du contrôle isotypique et l'histogramme rouge représente la fluorescence de l'échantillon étudié.*

B.IV.1.2 : Mesure de la densité antigénique des récepteurs CD90, CD105 et CD166

1) Principe

La quantification du nombre de récepteurs exprimés à la surface des cellules est réalisée en reliant l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) au nombre de sites antigéniques par cellule par un étalonnage adapté. Cette équivalence est possible uniquement si la fixation de l'anticorps utilisé est monovalente.

Le calibrant se présente sous forme de billes de latex, 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). (Figure II-5)

2) Intérêt de la quantification

L'analyse des données qualitatives exprimées en IMF manque de standardisation du fait de la variation dans la préparation de l'échantillon, de l'hétérogénéité des appareils et des réactifs proposés par les fournisseurs, des variations dans l'exploitation des résultats.

Par conséquent, l'exploitation des mesures de fluorescence est limitée à la détermination de cellules "positives" ou "négatives" au sein d'une population cellulaire. Le seuil de positivité est arbitrairement fixé à 1 sur l'échelle logarithmique comprenant 4 décades. Les paramètres sont réglés de telle façon que l'auto-fluorescence de la population cellulaire analysée et le contrôle isotypique soient situés inferieur à 1. Il apparaît donc que la positivité de fluorescence d'une population cellulaire est fixée par rapport à l'auto-fluorescence des cellules. Il est à noter que l'auto-fluorescence varie selon chaque type cellulaire. La quantification, en utilisant toujours la même valeur de la tension du photomultiplicateur (PMT) pour l'analyse des cellules, permet d'éviter ces artéfacts de mesure.

3) Marquage des billes de calibration

Le kit de calibration

Le kit Qifikit (réf. K0078, Dako, France) est spécifique des immunomarquages indirects. Il se compose de 5 populations de billes en latex de 10 µm de diamètre. Une droite étalon est réalisée pour chaque type d'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (utilisé pour la quantification des récepteurs à la surface des chondrocytes et CSMs).

Méthodologie

Un tube pour chaque fluorescence utilisée est nécessaire.

100 µL du calibrant Qifikit sont déposés dans un tube ainsi que 10 µL d'anticorps secondaire couplé au fluorochrome. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, les billes de calibration sont lavées (300g, 5 minutes) et suspendues dans 300 µL de PBS.

Les billes sont analysées en même temps que les échantillons cellulaires, dans un délai de 2 heures après la fin de l'immunomarquage.

4) Analyse des billes de calibration

Sur le cytogramme représentant la taille cellulaire en fonction de la granulosité, les valeurs de SSC (Side Scatter) et de FSC (Forward Scatter) sont réglées de façon à bien visualiser les billes de calibration (Figure II-6).

Sur l'histogramme de fluorescence, la tension du PMT est réglée de la même manière pour que les billes de calibration et pour les échantillons cellulaires. Il apparaît ainsi sur l'histogramme de fluorescence plusieurs pics correspondant aux diverses populations de billes de calibration.

5) Construction de la droite d'étalonnage

Une représentation logarithmique est réalisée, reliant en abscisse l'IMF et en ordonnée les valeurs de capacité de fixation des anticorps par bille données par le constructeur (Figure II-6)

L'immuno-marquage étant réalisé en conditions saturantes et la fixation du fragment $F(ab')_2$ 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]. Les valeurs d'IMF peuvent alors être transformées en nombre de sites antigéniques. Pour cela, 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 étalon. La conversion en densité antigénique est réalisée par un logiciel de calibration et de quantification (TallyCAL pour Windows, code S2034).

B.IV.2 : Viabilité cellulaire

B.IV.2.1 : Principe

L'apoptose est un processus réglé qui concerne la mort cellulaire et se produit comme une étape normale du développement. L'apoptose se distingue de la nécrose, ou de la mort accidentelle de 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, exposant de ce fait la PS à l'environnement cellulaire externe. L'anticoagulant humain, annexine V, est une protéine phospholipide-liante et 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.

Le kit VybrantTM Apoptosis contient de l'annexine V recombinante conjuguée au fluorochrome Alexa Fluor® 488. Le kit contient également une solution d'iodure de propidium (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 (figure II- 8).

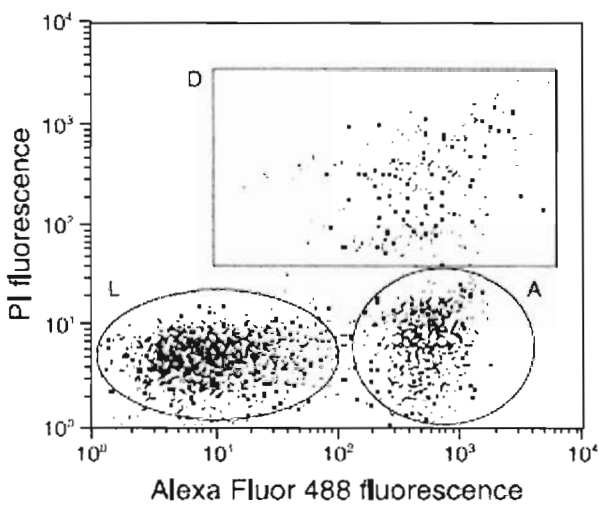


Figure II-7 : Détermination de l'état physiologique des cellules. *(kit Vybrant® Apoptosis Assay). Sur le scattogramme, les cellules non fluorescentes (L) correspondent aux cellules vivantes. Les cellules exprimant une fluorescence verte (A) correspondent aux cellules apoptotiques. Les cellules exprimant une double fluorescence verte et rouge (D) correspondent aux cellules en nécrose.*

B.IV.2.2: Réactifs

- Solution d'annexine V couplée au fluorochrome Alexa Fluor® 488. Cette solution contient 25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4, et 0,1% BSA
- Solution d'iodure de Propidium (IP) à 1 mg/mL (1,5 mM) dans de l'eau déionisée (dH_2O) utilisé à 100 µg/mL (v/v dans tampon annexine-liant 1X)
- Tampon annexine-liant 5X contient 50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12,5 mM $CaCl_2$, pH 7,4, dilué 5 fois (v/v dans l'eau déionisée)

Tous ces produits sont fournis par Molecular Probe, réf. V13241, France.

B.IV.2.3 : Méthodologie

L'analyse des cellules viables, en apoptose ou en nécrose est faite sur les CSMs cultivées en micromasses ou dans les différents hydrogels d'alginate. Pour obtenir les cellules en suspension, les micromasses sont digérées dans une solution de collagènase B à 0,2% pendant 30 min à 37°C. Puis les cellules sont récupérées après centrifugation (5min, 300g). Pour les cellules encapsulées dans les hydrogels d'alginate, 500µL de solution de citrate-EDTA sont versés sur chaque biosystème afin de lyser ce dernier. Les cellules sont ensuite récupérées après centrifugation (5min, 300g).

Les culots cellulaires sont suspendus dans 100µL/tube de tampon annexine-liant 1X. 5 µl d'annexine V couplée au fluorochrome Alexa Fluor® 488 et 1 µL de la solution fonctionnelle de 100µg/mL IP 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 la période d'incubation, 200 µL de tampon d'annexine-liant 1X sont ajoutés et homogénéisés doucement. Les échantillons sont maintenus sur la glace jusqu'à l'analyse en cytomètrie.

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'autofluorescence des cellules.

B.IV.3 : Cycle cellulaire

La cytomètrie 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.

B.IV.3.1 : Principe

Tous les organismes sont constitués de cellules qui se multiplient par division cellulaire. Un adulte humain possède environ 100 000 milliards de cellules et une quantité importante de cellules se divise afin de remplacer celles qui disparaissent. Avant qu'une cellule puisse se diviser, il faut qu'elle augmente sa taille, qu'elle duplique et sépare ses chromosomes avec une distribution exacte entre les 2 cellules filles. Tous ces processus sont coordonnés durant le cycle cellulaire.

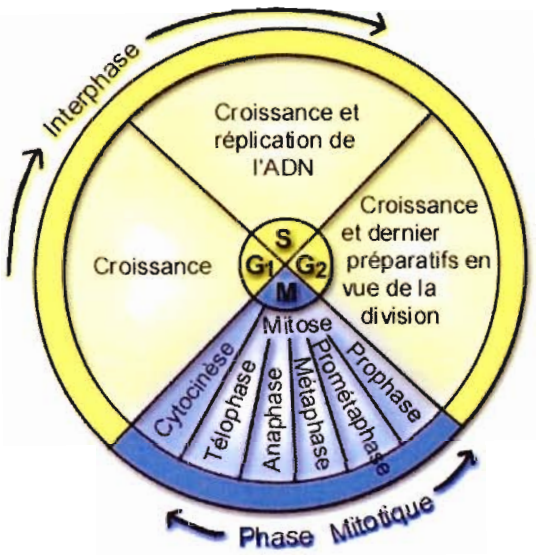


Figure II-8: Différentes phases du cycle cellulaire. *L'interphase contient les phases G1, S et G2. La phase G1 représente la phase de croissance cellulaire. La phase S représente la phase de réplication de l'ADN. La phase G2 prépare les cellules à l'entrée en phase mitotique.*

Le cycle cellulaire se divise en 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. On ne connait pas les mécanismes permettant le passage de la phase G1 à la phase S. 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-réplicative) 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.

La durée du cycle cellulaire varie entre les différents types de cellule. Chez la plupart des cellules de mammifères, cela dure entre 10 et 30 heures. Les cellules en phase G1 ne poursuivent pas toujours le cycle cellulaire. Elles peuvent quitter le cycle cellulaire et entrer en phase d'attente (phase G0).

B.IV.3.4 Analyse des échantillons

Dans cette partie, les méthodes d'analyse des cycles cellulaires par cytomètrie en flux sont basées sur l'émission de la fluorescence des cellules marquées à l'iodure de Propidium. Une population à croissance exponentielle de cellules aura une distribution de son contenu d'ADN montrant une premier pic de cellules G0/G1, une vallée de cellules en phase S, et un deuxième pic contenant des cellules G2/M. Les cellules de la phase G2/M ont deux fois le contenu d'ADN des cellules de la phase G0/G1. 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).

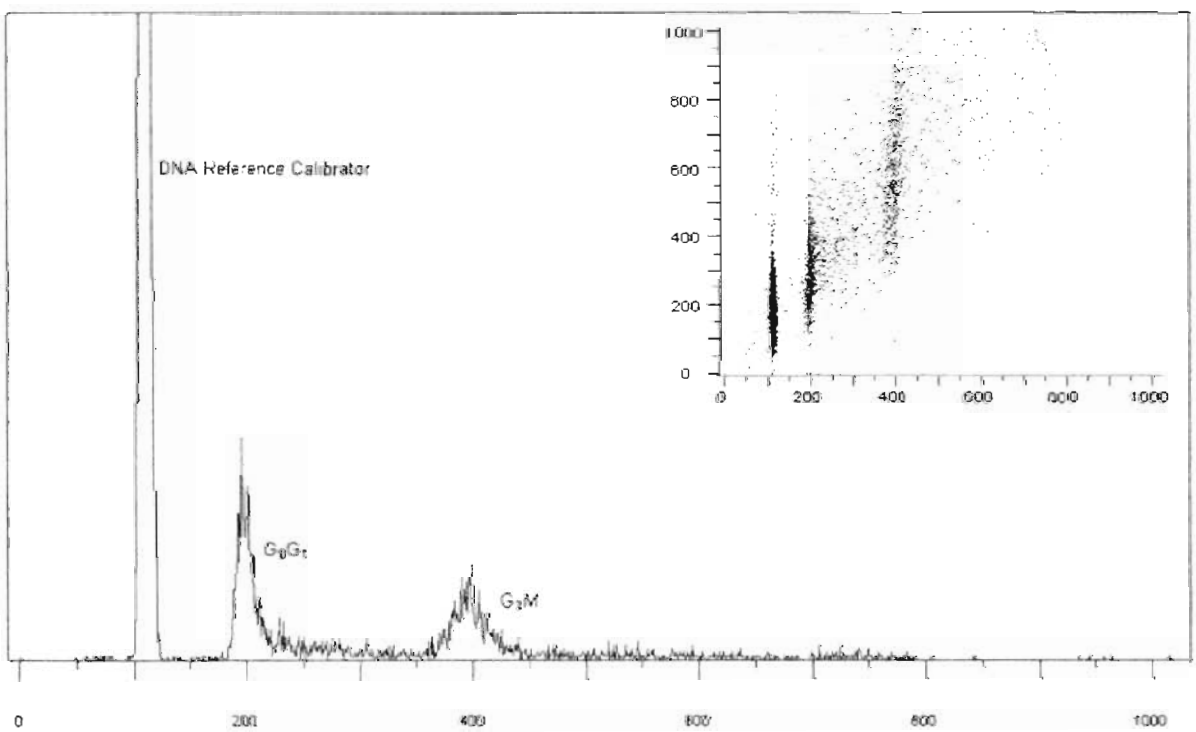


Figure II-9 : Analyse des phases du cycle cellulaire par cytométrie en flux. *Le pic G0/G1 indique une fluorescence caractérisant 2N chromosomes tandis que le pic G2/M indique une fluorescence deux fois plus importante que le pic G0/G1 car les cellules possèdent 4N chromosomes. Les cellules en phase S sont observées entre les 2 pics.*

B.IV.3.2: Réactifs

- Kit DNA Prep Reagent (réf. PN 6607055, Beckman coulter) contenant:
  DNA Prep™ LPR: < 0,1% cyanure de potassium, < 0,1% NaN_3, détergents non ioniques, salin et stabilisateurs.
  DNA Prep™ Stain: 50µg/ml iodure de Propidium (<0.5% iodure de Propidium), RNAse [Type III-A, Bovine Pancrease (4KU/ml)], <0,1% NaN_3, saline and stabilizers.
- DMEM Nut Mix F-12 sans rouge de phénol (réf. 51200, GibcoBRL, France)
- Tube à hémolyse (réf. 2121818, VWR, France)

B.IV.3.3 : Méthodologie

Cette étude est réalisée sur les CSMs cultivées en micromasses mais aussi sur les chondrocytes maintenus dans les différents hydrogels d'alginate. L'obtention des cellules en suspension se fait selon le protocole décrit paragraphe B.III.2.3. Les culots cellulaires sont suspendus dans 50µl de DMEM sans rouge de phénol et fixées en ajoutant 50µl de solution DNA prep LPR. Une agitation est réalisée pendant 30-60 secondes. Les cellules sont ensuite marquées avec l'iodure de propidium en ajoutant 500µl de solution DNA-Prep Stain, puis en agitant pendant 30-60 secondes. Enfin, les cellules sont analysées en cytométrie en flux.

B.V : Etudes moléculaires : Détection des ARNm par RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

B.V.1 : Principe

B.V.1.1 : Technique d'amplification génique ou technique RT-PCR

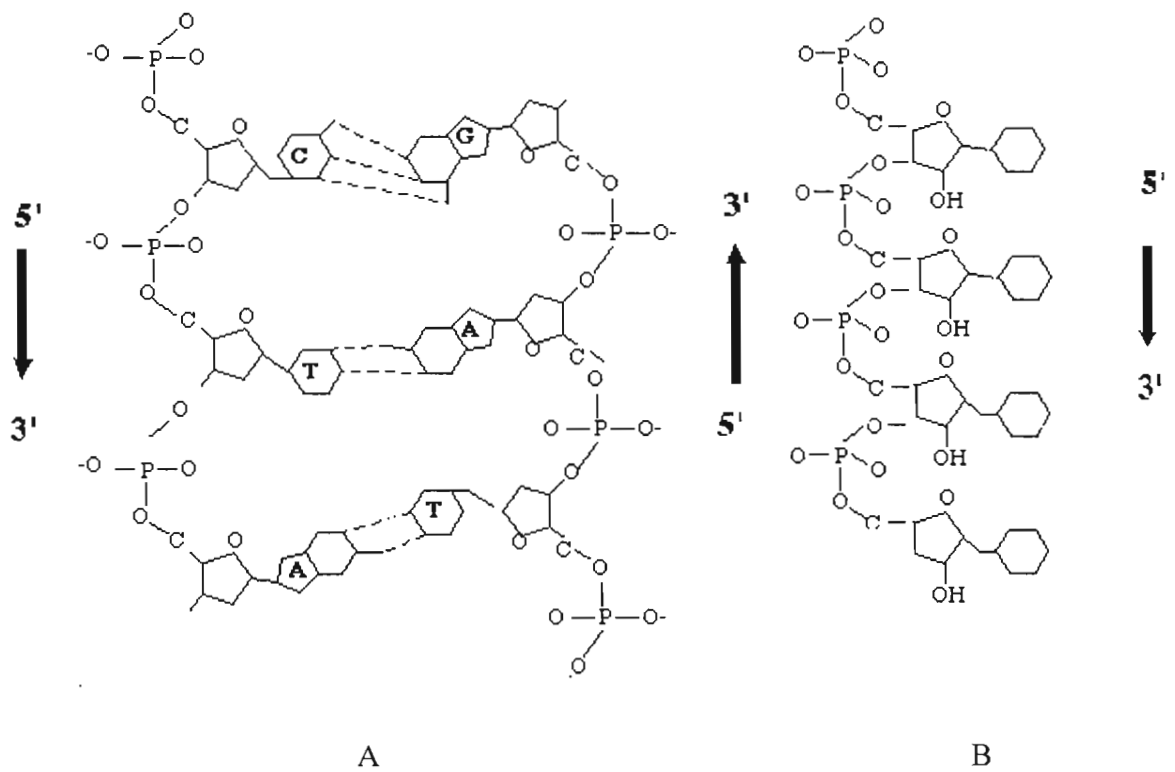
Les informations géniques de toutes cellules sont stockées dans l'ADN et l'ARN (Tableau II- 4)

L'ADN est une polymère linéaire à double brin de nucléotides. (Figure II-10.A)

Tableau II-4. Structure des acides nucléiques

U : Uracile ; A : Adénine ; G : Guanine ; C : Cytosine ; T : Thymine

	Nucléotides		
	Nucléosides		
		Bases	Sucres
ARN	H_3PO_4	U, A, G, C	Ribose
ADN	H_3PO_4	T, A, G, C	Désoxyribose



A B

Figure II-10. Représentation schématique de la structure d'ADN et d'ARN
A : ADN, B : ARN

Une méthode, de plus en plus utilisée, pour estimer le niveau d'expression de l'ARNm (ARN messager) est basée sur le principe d'amplification, par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR), de l'ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est obtenu par transcription inverse de l'ARNm (RT-PCR) qui permet une détermination fiable et reproductible des molécules d'ARNm. C'est-à-dire que, la technique de RT-PCR est donc une étude de l'ARN (expression monocaténaire de l'ADN) par formation d'un ADN complémentaire grâce à la transcriptase inverse, puis à amplification de celui-ci par PCR. La RT-PCR se déroule en deux phases : une première phase correspondant à la copie d'ARN messager en ADNc et une seconde phase correspondant à une réaction PCR classique sur l'ADNc synthétisé.

Dans la première phase, l'ARN messager à étudier est repéré en utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique (amorce 1 qui s'hybride à l'extrémité 3' du seul ARNm auquel on s'intéresse), puis la transcriptase inverse (ou rétrotranscriptase) permet la synthèse du brin complémentaire (sous une forme d'ADNc simple brin). Une seconde amorce oligonucléotidique spécifique (amorce 2) permettra la synthèse du second brin par extension.

L'ADN complémentaire synthétisé servira ensuite de matrice pour une réaction de PCR classique : une amplification d'un segment d'ADN in vitro par la Taq polymérase (enzyme travaillant à haute température) en présence de deux primers spécifiques (amorces) et de nucléotides dans un thermocycleur (Figure II-11).

Cette technique décrite en 1985 (K.MULLIS et al.) permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotidiques complémentaires (de longueur de 20 à 30 nucléotides en général). Ces oligonucléotides serviront à délimiter la portion d'ADN à amplifier. L'ADN polymérase les utilisera comme amorces.

La technique comporte des cycles successifs. Chaque cycle comprend une succession de trois phases:

1) Une phase de dénaturation par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN (92-95°C) (30 secondes-1 minute).

2) Une phase d'hybridation avec les deux amorces spécifiques entre 55-60°C. La première amorce se fixe sur un brin d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire (30 secondes-1 minute).

3) Une phase d'extension par l'ADN polymérase à partir des amorces à 70-72°C (1-2 minutes).

Le principe des cycles de PT-PCR est représenté schématiquement dans cette figure.

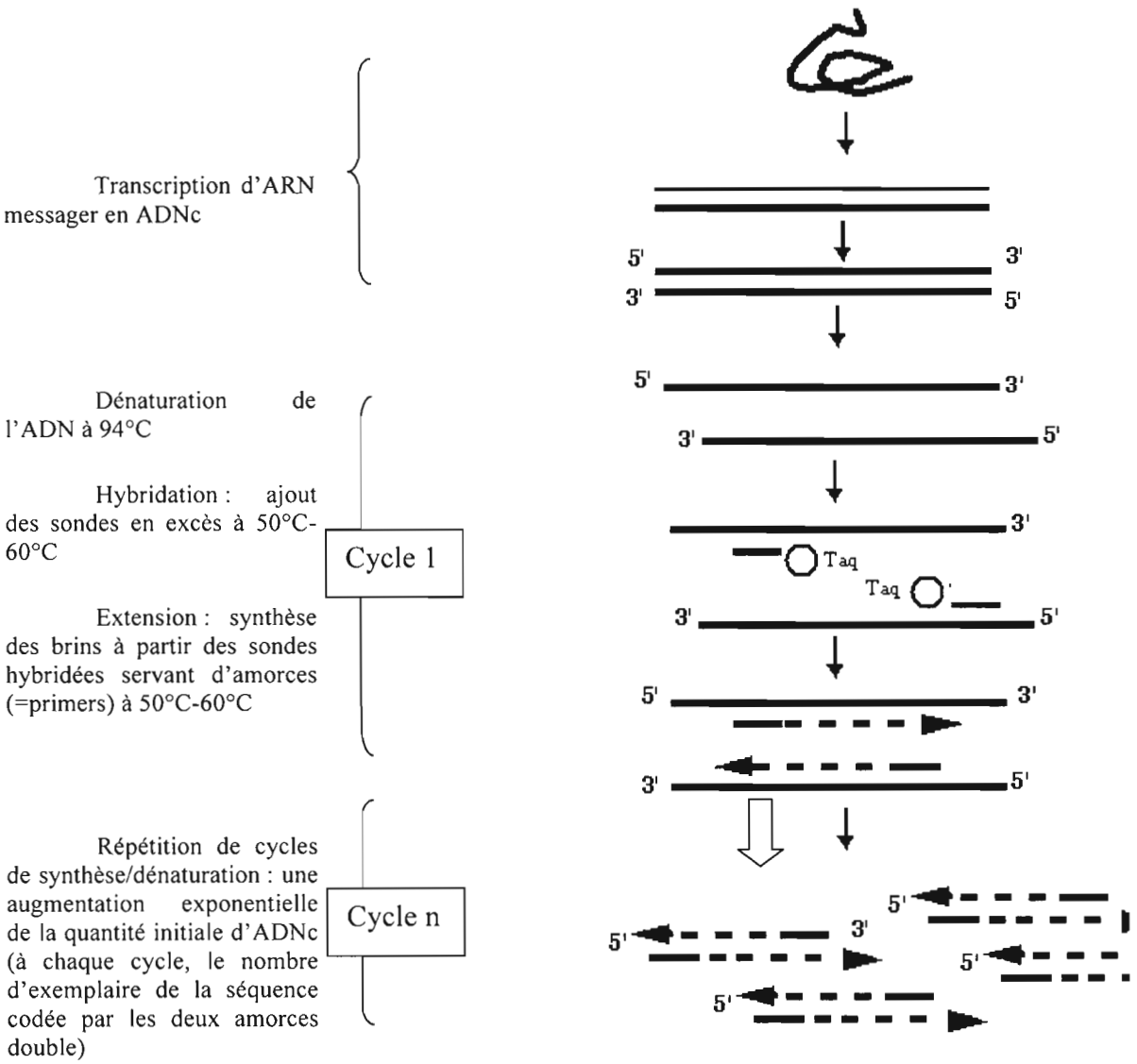


Figure II-11. Représentation schématique d'une réaction de RT-PCR

Le nombre de cycles est généralement compris entre 30 et 40. Cette méthode permet d'amplifier l'ADN compris entre les deux amorces d'un facteur de 105 à 106. Les résultats doivent être optimisés en fonction d'un certain nombre de paramètres: concentration en $MgCl_2$, concentration en amorces, spécificité des amorces etc... Le choix des amorces est particulièrement crucial pour obtenir des résultats satisfaisants (spécificité, taille, paramètres physico-chimiques.....). L'introduction de logiciels spécialisés (Primer Premier 5,0, Oligo

6,57 etc.) et des bases de données nucléotidiques a permis de réaliser des choix plus rationnels.

B.V.1.2 : Migration électrophorétique des fragments d'ADNc et coloration par le bromure d'ethidium.

Les fragments d'ADNc après amplification par PCR peuvent être séparés, par électrophorèse, sur un gel d'agarose. L'électrophorèse des fragments d'ADNc en gel d'agarose permet des séparations jusqu'à 20-25 kb (20000-25000 pb). Le tampon utilisé pour la migration électrophorétique à un pH basique (8,3 dans le cas du tampon appelé TBE = Tris-Borate-EDTA).

La détection des nucléotides par migration se fait grâce au bromure d'ethidium (produit intercalant du DNA: qui se fixe entre les deux chaînes nucléotidiques) qui est incorpore dans le gel et qui devient fluorescent en lumière ultraviolette.

B.V.2 : Extraction des ARN totaux à partir des cellules

L'extraction des ARN totaux à partir des cellules (CSMs ou chondrocytes) est réalisée à partir de la méthode phénol/chloroforme [Chomczynski et Sacchi, 1987]. Pour chaque condition expérimentale, l'extraction est réalisée à partir de 1 à 2 × 105 cellules.

B.V.2.1 : Réactifs et Matières

- TRIzol reagent (réf. 15596-026, Invitrogen , France).
- Phénol-chloroforme-alcool isoamylique (réf. C-2432, Sigma, France)
- Isopropanol (réf.I-0398, Sigma, France)
- Ethanol absolu (réf.32221, Sigma, France) utilisé à 75% (v/v dans l'eau sans nucléase
- Tampon de charge 5X : Tris-HCl 50 mM, pH 8.0,
  glycérol 25% p/v,
  EDTA 5 mM,
  bleu de bromophénol 0.2% p/v,
  Xylène Cyanol FF 0.2% p/v

  (Réf. 161-0767, BIO-RAD, France) utilisé en tampon de charge 1X (v/v dans les échantillons)

- Agarose (réf. H070928, Euromedex, France) utilisé à 2% (g/100ml dans un tampon d'électrophorèse TEB 0.5X)
- Tampon d'électrophorèse TEB 10X : acide borique 0,89 M,
  EDTA 20 mM,
  Tris 0,89 M
  (Réf. 161-0733, BIO-RAD, France) utilisé à un tampon d'électrophorèse TEB 0.5X (v/v dans l'eau distillé)
- Bromure d'éthidium (réf. E-8751, Sigma, France) utilisé à 0,5µg/ml dans de l'eau
- PBS sans RNase

B.V.2.2 : Méthodologie

Protocole d'extraction des ARN totaux

Tout d'abord, les cellules sont lavées avec du PBS sans RNase 3 fois à 4°C. Ces cellules sont ensuite lysées en ajoutant 1mL de Trizol (1mL/10cm^2) à température ambiante pendant 5 à 10 minutes afin de dissocier les complexes nucléoprotéiques. Puis, on place le tout dans un tube Eppendorf. 0,2 mL de phénol-chloroforme-alcool isoamylique sont ajoutés pour 1mL de Trizol, et le tout sera soumis à une agitation forte pendant 15~20 secondes. La suspension est centrifugée à 12000g pendant 15 minutes à 4°C. Puis, on transfère la phase aqueuse dans un second Eppendorf. 0,5 mL d'isopropanol sont ajoutés pour 1 mL de Trizol, puis mélangés énergiquement et laissés au repos 10 minutes à température ambiante. La suspension est centrifugée à 12000g pendant 10 minutes à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot (contenant l'ARN) est lavé dans 1 mL d'éthanol 75% (v/v) et centrifugé à 7500g pendant 10 minutes à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot (contenant l'ARN) est séché pendant 10 minutes. Enfin, l'ARN est dissout dans 30 à 50µL d'eau sans RNase pendant 10 minutes à 55~60°C, puis est mis sur de la glace pour l'étape suivante ou conservé dans un congélateur à -80°C.

Evaluation de la qualité de l'ARN extrait

Détermination de la concentration en ARN totaux : la concentration en ARN est déterminée par la mesure de la densité optique (DO) à 260 nm sur un spectrophotomètre UV. Le contrôle de la pureté en ARN et la contamination en protéine est déterminée par le rapport DO 260 nm/ 280 nm. Ce rapport doit être supérieur à 1,8 pour que la pureté soit suffisante.

795µL d'eau déionisée sont ajoutés dans la cuve en quartz, puis 5µL de solution d'ARN y sont de plus ajoutés, le tout est mélangé plusieurs fois à l'aide d'une pipette. La densité

optique de l'absorbance à 260 nm et à 280 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (DU 640, Beckman USA). La concentration d'ARN est calculée par la formule 'DO_{260} x 6.4 (µg/µL)'. La pureté de l'ARN est mesurée par la valeur de DO_{260}/DO_{280} : 1.8~2.0, la pureté de l'ARN est élevée ; > 2.2, l'ARN est contaminé par du sel ; < 1.6, l'ARN est contaminé par des protéines

Préparation de gel

1,2 g d'agarose sont ajoutés dans 60ml de tampon d'électrophorèse TEB 0,5X, puis le tout est chauffés jusqu'à ce que la solution devienne transparente (environ 30 minutes). Ensuite, on laisse reposer la solution de gel jusqu'à atteindre une température de 60°C. La solution gel est alors transférée dans une boîte et puis un peigne est mis dedans. Après la solution de gel refroidi (environ 30minutes), la peigne est retiré qui forme des puits pour déposer les échantillons 'ARN.

Electrophorèses des ARN

Les ARN sont dénaturés 10 min à 65 °C, puis refroidis 5 minutes dans la glace. Un 5ème de volume de tampon de charge est ajouté aux échantillons d'ARN avant dépôt dans les puits du gel d'agarose à 0,8%. La migration s'effectue à 80 V / h, 45 min dans du tampon d'électrophorèse TEB 0.5X. Après électrophorèse, le gel est coloré au bromure d'éthidium pendant 30 min. puis les ARN sont visualisés par exposition du gel aux rayons UV.

Les ARN ribosomaux sont majoritaires dans les ARN extraits La qualité des ARN ribosomaux reflète celle des ARN. Les ARN ribosomaux sont visualisés sous forme de deux bandes, 28 S (4,6-5,2 kb) et 18 S (1,8-2,0 kb). La première bande (28S) doit être environ deux fois plus intense que la seconde (18S) (Figure II-12).

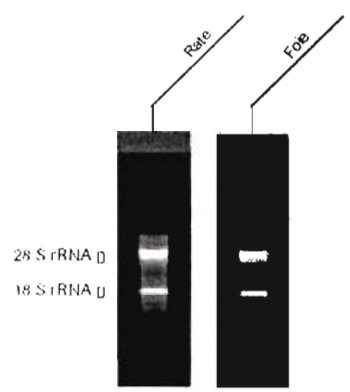


Figure II- 12 : Image d'un gel d'électrophorèses des ARN ribosomaux (ARNr) provenant de cellules du foie ou de la rate. *Les ARNr sont visualisés sous formes de 2 bandes (28S et 18S).* ***[www.roche-applied-science.com/ sis/automated/]***

B.V.3 : Rétrotranscription des ARN extraits

Les ARN sont rétrotranscrits par la méthode des 'oligo dT'. Une amorce désoxyribonucléique 'oligo dT' constituée de 25 à 30 thymidines s'hybride avec la queue polyadénosylée des ARN messagers.

B.V.3.1 : Réactifs

- iScript™ cDNA Synthesis Kit (réf. 170-8891, *BIO-RAD*, France).

Tableau II- 5: Composants de la réaction de rétrotranscription :

Composant	Volume par réaction
iScript Reaction Mix 5x	4µl
iScript Reverse Transcriptase	1µl
eau sans nucléase	Xµl
Gabarit d'ARN (de 100fg à 1µg d'ARN total)	Xµl
Volume total (le mélange complet)	20µl

B.V.3.2 : Méthodologie

Le mélange complet de la réaction est incubé 5 minutes à 25°C, puis 30 minutes à 42°C. Après une incubation de 5 minutes à 85°C, il est maintenu à 4°C. La réaction est exécutée dans un MyCycler™ (Bio-RAD, USA).

Les ADNc peuvent être stockés à -80°C jusqu'à la réalisation de la PCR.

B.V.4: Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

B.V.4.1: Réactifs et amorces

Réactifs

- dNTPs Mix (réf. 18427-013, Invitrogen, France).
- Taq Polymérase (réf. 10966-034, Invitrogen, France)
- Tampon de charge 5X : Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, glycérol 25% p/v, EDTA 5 mM, bleu de bromophénol 0.2% p/v, Xylène Cyanol FF 0.2% p/v (réf., 161-0767, BIO-RAD, France) utilisé à un tampon de charge 1X (v/v dans les échantillons)
- Agarose (réf. H070928, Euromedex, France) utilisé à 2% (g/100ml dans un tampon d'électrophorèse TEB 1X)

- Tampon d'électrophorèse TEB 10X : acide borique 0,89 M, EDTA 20 mM, Tris 0,89 M (réf. 161-0733, BIO-RAD, France) utilisé à un tampon d'électrophorèse TEB 0.5X (v/v dans l'eau distillé)
- Bromure d'éthidium (réf. E-8751, Sigma, France) utilisé à 0,5µg/ml dans l'eau
- Marqueur de taille d'ADN de 100pb (réf. 15628-019, Invitrogen, France)

Tableau II- 6: Ordres des amorces des gènes de collagènes de type I, II, des agrécannes, Sox9 et de la β-actine.

Gène	Amorce	Ordre	Produit prévu (kb)
Collagène type I	Sence	5'-TCCCCAGCCACAAAGAGTCTACA-3'	155
	Antisence	5'-GTGATTGGTGGGATGTCTTCGTC-5'	
Collagène type II	Sence	5'-ACTTGCGTCTACCCCAATCC-3'	383
	Antisence	5'-ACAGTCTTGCCCCACTTACC-3'	
Sox 9	Sence	5'-GAACGCACATCAAGACGGAG-3'	619
	Antisence	5'-TCTCGTTGATTTCGCTGCTC-3'	
Agrécanne	Sence	5'-TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC-3'	350
	Antisence	5'-GGAGGTGGTAATTGCAGGGAACA-3'	
β-actine	Sence	5'-GAAATCGTGCGTGACATTAAG-3'	510
	Antisence	5'CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGA GGGGCC-3'	

Tableau II-7 : Composant de la phase d'amplification. *La phase d'amplification est réalisée dans un mélange final de 50 µL*

Composant	Volume par réaction
Tampon de 10xPCR	5µl
$MgCl_2$ 50mM	1.5µl
dNTPs Mix 10 mM	1µl
amorce de sence 10µM	1µl
amorce de antisence 10µM	1µl
Taq Polymérase	0.4µl
ADNc	2µl
eau de DEPC	38.1µl
Total	50µl

B.V.4.2 : Méthodologie

Protocole de PCR sur le collagène de type II, les agrecannes et β-actines

Après une étape de dénaturation à 95°C pendant 3 minutes, l'amplification jusqu'à saturation de l'ADNc se fait selon 30 cycles dans un MyCycler™ (Bio-RAD, USA). Le schéma d'un cycle est le suivant :

- 40 secondes de dénaturation à 94°C
- 30 secondes d'hybridation des amorces à 55°C
- 45 secondes d'élongation à 72°C

Ce cycle est répété 30 fois, puis les échantillons sont soumis à 10 minutes d'élongation à 72°C.

Protocole de PCR des collagènes de type I

Après une étape de dénaturation à 94°C pendant 9 minutes, l'amplification jusqu'à saturation de l'ADNc se fait selon 30 cycles dans un MyCycler™ (Bio-RAD, USA). Le schéma d'un cycle est le suivant :

- 30 secondes de dénaturation à 94°C
- 30 secondes d'hybridation des amorces à 54°C
- une minute d'élongation à 72°C

Ce cycle est répété 30 fois, puis les échantillons sont soumis à 7 minutes d'élongation à 72°C.

Protocole de PCR de Sox 9

Après une étape de dénaturation à 94°C pendant 3 minutes, l'amplification jusqu'à saturation de l'ADNc se fait selon 30 cycles dans un MyCycler™ (Bio-RAD, USA). Le schéma d'un cycle est le suivant :

- 30 secondes de dénaturation à 94°C
- une minute d'hybridation des amorces à 58°C
- une minute d'élongation à 72°C

Ce cycle est répété 30 fois, puis les échantillons sont soumis à 10 minutes d'élongation à 72°C.

Les ADN peuvent être stockés à -80°C jusqu'à la réalisation de l'électrophorèse.

Préparation de gel

1,2 g d'agarose sont ajoutés dans 60ml de tampon d'électrophorèse TEB 0,5X, puis le tout est chauffé jusqu'à ce que la solution devienne transparente (environ 30 minutes). Ensuite, on laisse reposer la solution de gel jusqu'à atteindre une température de 60°C. La solution gel est alors transférée dans une boîte et un peigne est placé dedans. Lorsque le gel est refroidi (environ 30 minutes), la peigne est retiré formant ainsi des puits pour déposer les échantillons d'ADN.

Electrophorèse sur gel d'agarose et détection des produits d'amplification

8 µL d'échantillon d'ADN sont déposés avec 2 µL de tampon de charge 5X dans les puits du gel d'agarose à 2%. Le marqueur de taille utilisé est une échelle à faible masse d'ADN (Low DNA Mass Ladder). La migration s'effectue à 100V, 90 min dans du tampon d'électrophorèse TEB. Puis le gel est coloré au bromure d'éthidium pendant 30 min. Les bandes correspondantes aux produits d'amplification sont visualisées sous UV (λ 365nm) et photographiées.

C. Analyse statistique

Toutes les données sont présentées en moyenne ± écart-type. Les différences statistiques entre les groupes d'expériences ont été analysées par l'ANOVA à une direction. Un test T a été effectué et les valeurs p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

A. Identification des CSMs humaines en monocouche

Une fois extraites de la moelle osseuse, les cellules sont cultivées en monocouche jusqu'au quatrième passage. Il est ensuite essentiel de contrôler le phénotype de ces cellules selon les protocoles en usage dans les Unités de Thérapie Cellulaire agréées, d'après la législation en vigueur. Ces données sont nécessaires dans la tâche des 'Contrôles Qualités'. Le phénotype des CSMs est déterminé par cytométrie en flux. Cette détermination repose sur la recherche d'expression de marqueurs de surface caractérisant les CSMs (CD90, CD105 et CD73) et par l'absence de marqueurs de surface caractérisant des cellules souches hématopoïétiques (CD34, CD45).

A.I : Caractérisation morphologique

La morphologie des CSMs a été étudiée en microscopie optique à contraste de phase. Les CSMs montrent une forme axiale ou une morphologie semblable aux fibroblastes et peuvent être repiquées plusieurs fois. Après 3 jours de culture, les CSMs humaines ont adhéré à la surface du plastique, et se présentent sous la forme d'une petite population des cellules isolées. Six jours après le repiquage initial, les cellules ressemblent à de longues cellules fibroblastiques et commencent à former des colonies (figure III-1).

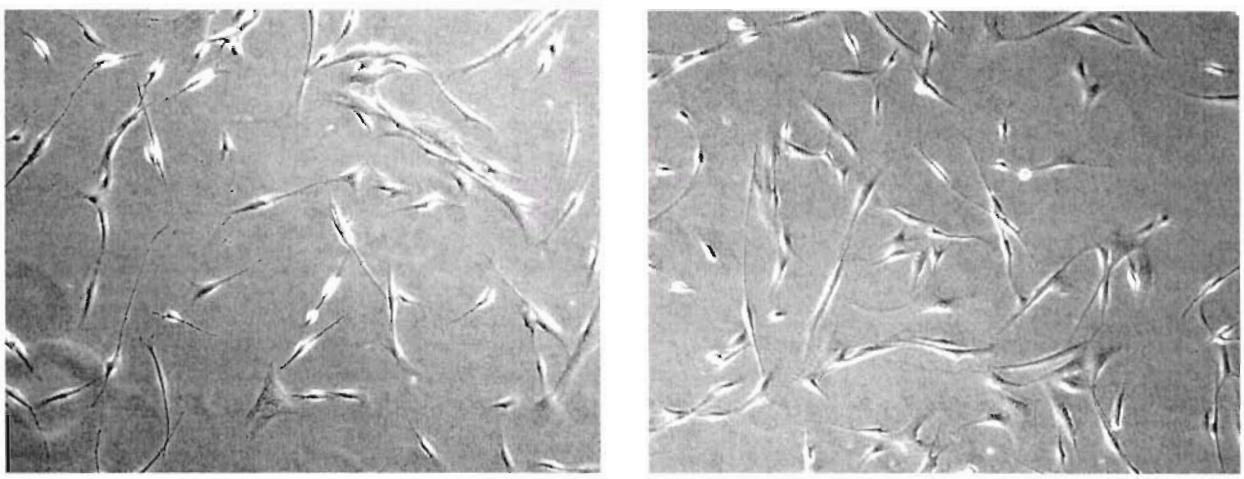


Figure III–1: Image de microscopie optique à contraste de phase de CSMs adhérentes au Passage 1 *(les cellules isolées ont une morphologie semblable aux fibroblastes ou de forme axiale, 10x).*

Or la propriété d'adhésion au plastique n'est pas suffisante pour identifier de manière certaine une population de CSMs purifiées. Nous avons donc eu recours à une méthode plus élégante, qui consiste à analyser le phénotype des cellules à travers les marqueurs de surface propres aux CSMs, par cytométrie de flux. C'est ainsi que nous avons étudié en parallèle

l'expression des molécules CD34, CD45, CD105, CD73, CD90 et CD166 à la surface de nos cellules.

A.II : Caractérisation phénotypique :

Les histogrammes regroupés dans sur figure III-2 montrent le pourcentage de cellules (P3) exprimant les molécules caractérisant soit les CSHs (CD34 / CD45) soit les CSMs (CD105 / CD73 / CD90 / CD166).

Nos résultats montrent que les cellules n'expriment pas les récepteurs CD34 et CD45. En revanche, une forte proportion de cellules exprime les récepteurs $CD105^+$ (100%), $CD73^+$ (), $CD90^+$ (100%) et $CD166^+$ (96.5%).

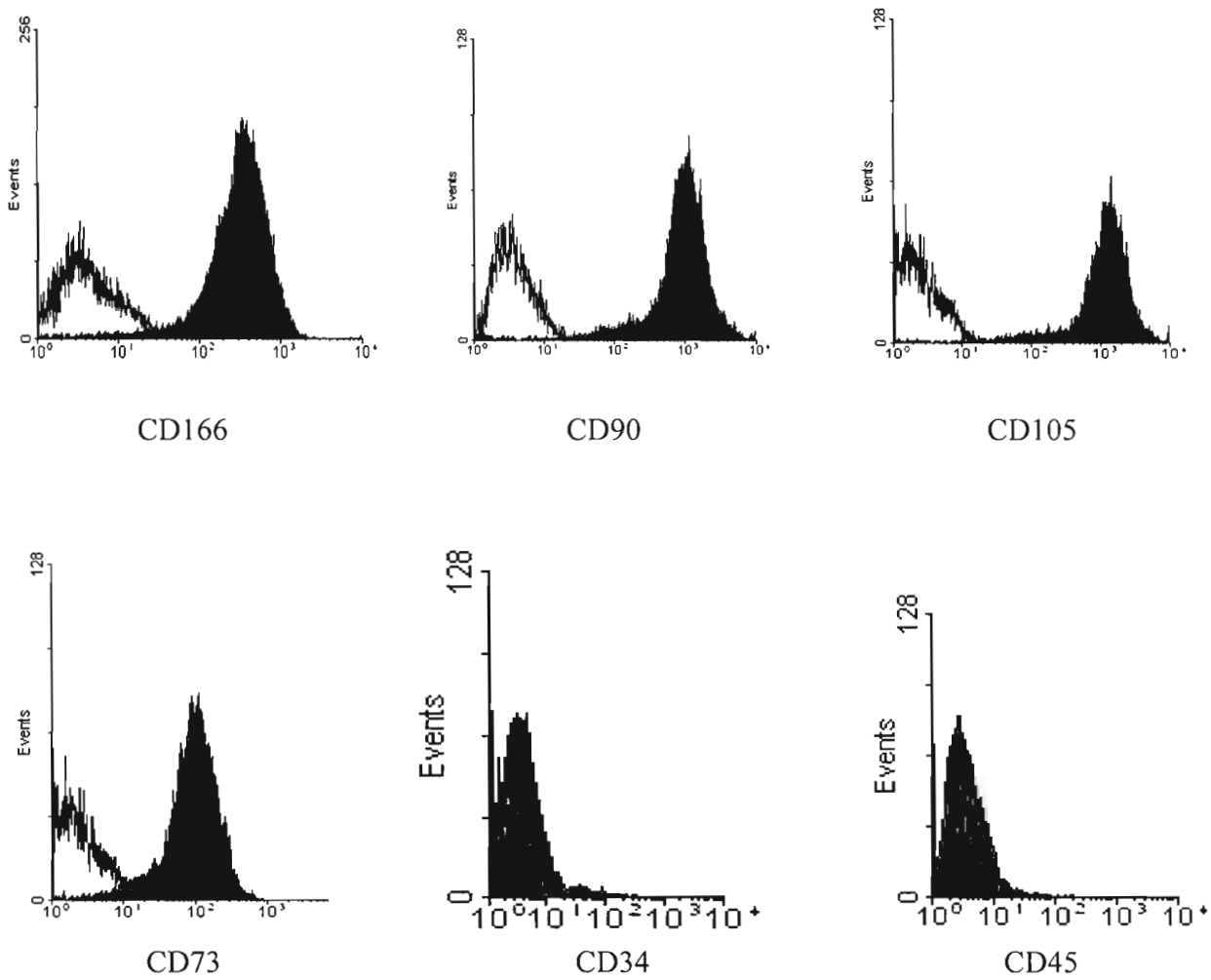


Figure III- 2 : Analyse de l'expression des molécules de surface des CSMs humaines - P3. *Les cellules ont été marquées avec des anticorps monoclonaux spécifiques pour les molécules indiquées dans chaque histogramme de cytométrie en flux. Les régions blanches et noires de chaque histogramme représentent les cellules marquées respectivement avec un anticorps isotypique et avec les anticorps monoclonaux spécifiques (n=10).*

A.III : Discussion :

Les CSMs sont généralement issues de la moelle osseuse par aspiration au niveau de la crête iliaque [Digirolamo CM et al, 1999] mais aussi du tibia ou du fémur [Murphy JM et al, 2002]. Comme les CSMs représentent une faible fraction des cellules mononuclées totales de la moelle, il peut être utile de les isolées afin d'enrichir la culture. Plusieurs techniques sont disponibles comme l'utilisation d'un gradient de densité permettant d'obtenir des densités cellulaires de 1.10^4 cellules/cm² à $0{,}4.10^6$ cellules/cm² [Lodie TA et al, 2002 ; Pittenger MF et al, 1999]. Une autre technique, la plus utilisés, repose sur la mise en culture de l'ensemble des cellules provenant de la moelle osseuse, dans un milieu contenant 10% de sérum [Pittenger MF et al, 1999]. Comme le montre nos résultats, cette technique permet d'obtenir des cellules adhérentes et possédant une morphologie fibroblastique. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Barry FP et al qui montrent que seules les cellules possédant une morphologie fibroblastique et capables d'adhérer au support de culture sont des CSMs [Barry FP et al, 2004]. La culture primaire étant maintenue de 12 à 16 jours, la fraction de cellules non adhérentes et hématopoïétiques est éliminée lors du renouvellement de milieu de culture.

Cependant, ces propriétés d'adhésion au plastique ne sont pas suffisantes pour caractériser les cellules comme étant des CSMs. C'est pourquoi une méthode basée sur l'analyse de marqueurs spécifiques des CSMs ou des cellules hématopoïétiques est indispensable. Nos résultats montrent que les cellules, cultivées en monocouche, possèdent un phénotype $CD34^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD90^+$, $CD105^+$ et $CD166^+$. Il apparaît ainsi que les récepteurs spécifiques des cellules hématopoïétiques (CD34 et CD45) sont absents de la surface des cellules cultivées. En revanche, les cellules expriment les récepteurs CD73, CD90 et CD105. Même si certains de ces marqueurs sont également exprimés à la surface d'autres types cellulaires, comme le CD105 exprimé à la surface de cellules endothéliales [Cheiftz S et al, 1992], ces 3 marqueurs exprimés conjointement permettent d'identifier des CSMs [Alsalameh S et al, 2004]. Enfin, les cellules cultivées expriment également le récepteur CD166. Ce marqueur est décrit pour être présent à la surface de CSMs indifférenciés et pour disparaître lorsque les cellules s'engagent dans la voie ostéogénique [Bruder SP et al, 1992].

L'expression conjointe des récepteurs CD73, CD90, CD105 et CD166 permet de confirmer que les cellules adhérentes cultivées sont bien des CSMs non différenciées.

B. Différenciation des CSMs en modèle 3D – Les micromasses

L'objectif de cette étude est d'induire la différenciation de CSMs humaines pour aboutir à une chondrogénèse. Les cellules sont cultivées dans un système de micromasse, qui représente une culture à haute densité dans un environnement tridimensionnel. Ce système, utilisé pour l'induction et pour l'étude des événements de signalisation impliqués dans la chondrogénèse [H. Nakahara et al, 1991; A.D. Weston et al, 2000], permet d'augmenter les interactions cellule-cellule favorables à la chondrogénèse.

Contrairement à la culture en monocouche et à d'autres systèmes de culture 3D, les micromasses sont très compactes et présentent un très petit espace inter-cellulaire. Il est donc possible que ces conditions aient des effets sur la viabilité et l'activité cellulaire. Mais peu de travaux ont porté sur ces paramètres. Etant entendu que la culture en micromasse génère des conditions métaboliques différentes de ce qui est trouvé dans un système 3D traditionnel (matrice, gel...), il est nécessaire d'évaluer les paramètres métaboliques principaux pour les cellules, tels que la viabilité cellulaire, le cycle cellulaire, les modifications morphologiques, ..., ainsi que la possibilité de synthèse d'une matrice extra cellulaire.

Il est également essentiel de contrôler le phénotype cellulaire des CSMs, c'est pourquoi une étude cinétique du phénotype est réalisée.

Ces travaux ont porté sur une durée de 21 jours, période nécessaire à la synthèse d'une matrice extra cellulaire.

B.I : Viabilité et métabolisme des CSMs :

B.I.1 : Activité métabolique.

L'activité métabolique des CSMs cultivées en micromasses a été évaluée grâce à un dosage biochimique colorimétrique (Alamar Blue®). Ce dosage est basé sur la réduction de ce substrat par les intermédiaires métaboliques (NADPH, le FADH, le FMNH, les cytochromes). C'est un dosage qui présente le double avantage d'être facile d'utilisation et, étant non toxique pour les cellules, peut être utilisé sur des cellules vivantes. Ainsi, l'activité métabolique a été mesurée sur les mêmes micromasses après 1, 7, 14 et 21 jours de culture.

Il apparaît, sur la figure III-3, que l'activité métabolique des CSMs a diminué de manière significative à partir de J1 jusque J14 ($p<0,05$). Puis, à partir de J14 et jusque J21, aucun changement notable n'a été observé ($p>0,05$).

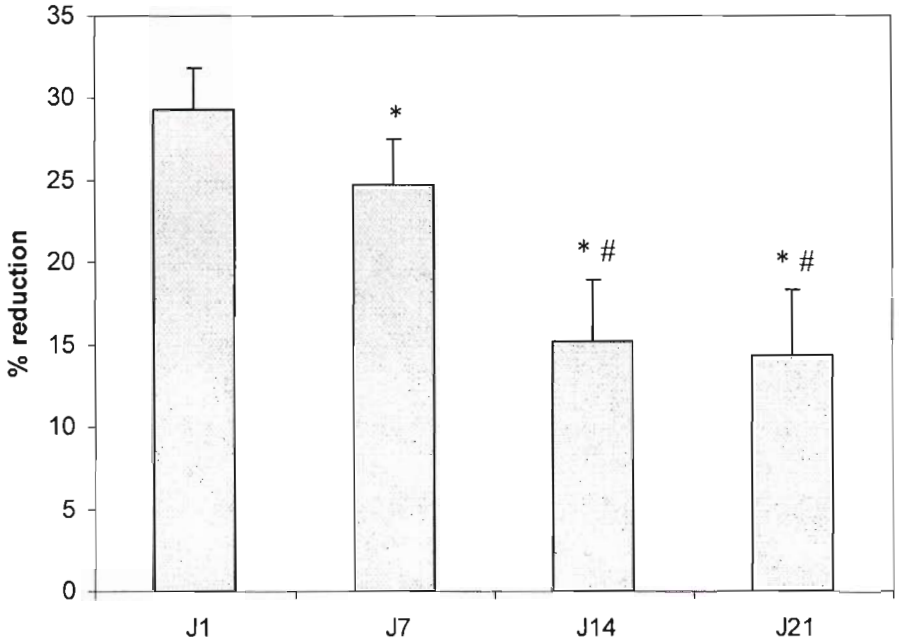


Figure III-3: Influence du temps sur le métabolisme cellulaire dans les micromasses. *Pourcentage de réduction du bleu d'Alamar après 1, 7, 14, et 21 jours de culture des CSMs humaines dans des micromasses. Les résultats sont présentés comme la moyenne± écart-type (N=9). * p<0,05 Jx versus J1, # p<0,05 J14 et J21 versus J7.*

B.I.2 : Viabilité des CSMs humaines en culture de micromasses

Les CSMs sont cultivées en micromasses dans un milieu sans sérum et en présence du facteur de croissance TGF-β1 pendant 21 jours. La viabilité de ces cellules est contrôlée après 0, 1, 7, 14 et 21 jours de culture, par cytométrie en flux. Le kit utilisé contient de l'annexine V couplé au fluorochrome Alexa 488, colorant en vert les cellules en phase apoptotique, et de l'iodure de propidium, colorant en rouge juste les cellules mortes par nécrose. Les cellules vivantes seront quant à elles non fluorescentes.

La figure III-4 représente la proportion de cellules vivantes ou apoptotiques. Il apparaît ainsi qu'au cours des 21 jours de culture en micromasses, plus de 90% des cellules sont vivantes. La proportion de cellules en apoptose tend à augmenter jusqu'à J7. En effet, à J0, les cellules en apoptose représentent 5,8 %, tandis qu'à J7, ces cellules représentent 9,9 %. Au cours de la culture, aucune cellule en nécrose n'est mise en évidence par cette technique.

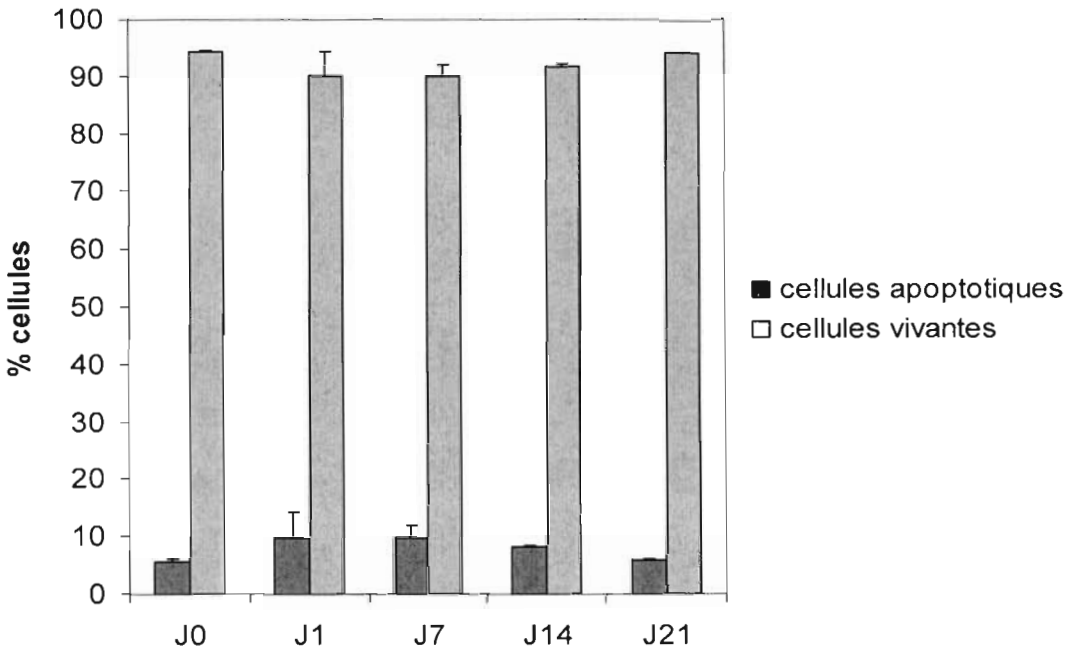


Figure III-4: Influence de la durée de culture sur la viabilité des CSMs humaines en micromasses. *Etude réalisée en cytométrie en flux (test du Vybrant®) sur des cellules qui avaient 1, 7, 14, 21 jours de culture dans des micromasses. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type. N=6.*

B.I.3 : Cycle cellulaire

Pour compléter les résultats précédents, l'étude du cycle cellulaire a été réalisée. En effet, cette approche originale nous permet de connaître l'état métabolique des cellules vis à vis de la prolifération. Cette étude, effectuée également en cytométrie en flux, a permis de connaître 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 respectivement de connaître la proportion de cellules qui prolifèrent et en cours de division. La figure III-5 montre 2 stades dans l'évolution du cycle cellulaire : J1 et entre J7 et J21. En effet, entre J1 et J7, la proportion des cellules en phase G0/G1 a significativement augmentée (respectivement 84,1± 4,3% et 91,8± 2,3%, $p<0,05$). Parallèlement, la proportion de cellules en phase de synthèse d'ADN diminue significativement entre J1 et J7 (respectivement 14,3± 3,9% et 6,3±1,7%, $p<0,05$). En revanche, aucune variation significative de la proportion des cellules en phase de division n'a été observée ($p>0,05$). Par ailleurs, il apparaît sur la figure III-4 qu'à partir de 7 jours de culture en micromasses et jusque 21 jours de culture, plus aucune variation n'est observée.

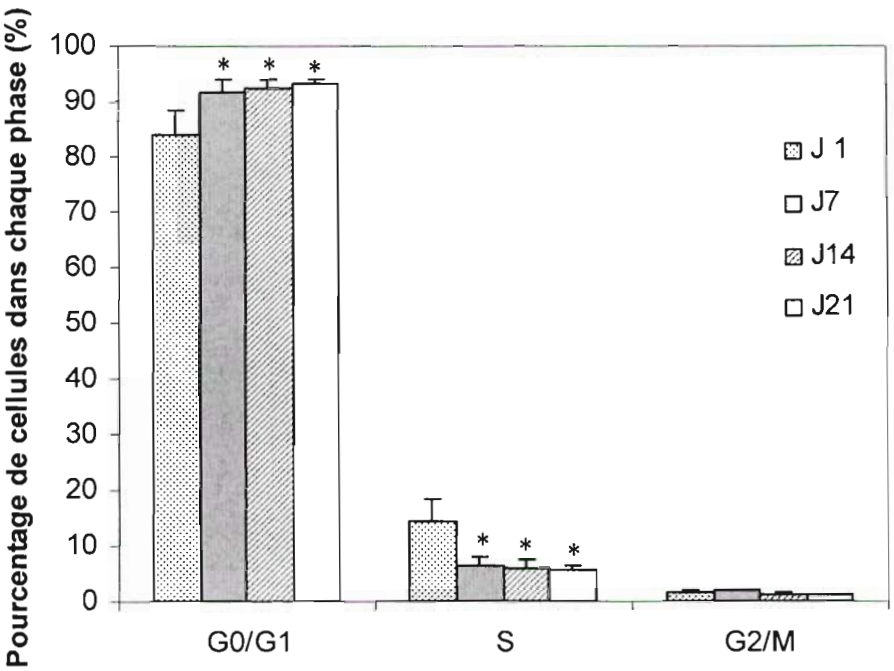


Figure III- 5: Influence du temps sur le cycle cellulaire des CSMs humaines dans un modèle de micromasses. *Etude en cytométrie en flux après marquage des noyaux à l'iodure de propidium. Les résultats sont présentés comme la moyenne± écart-type (N=6).* * $p<0,05$ Jx versus J1. G0/G1 = phase quiescente. S = phase de synthèse d'ADN. G2/M = phase de mitose.*

B.I.4 : Viabilité et métabolisme des CSMs - Commentaires

La culture de CSMs en micromasse est une méthode reconnue pour favoriser la différenciation des CSMs en chondrocytes, en présence d'un milieu de culture adapté [Johnstone B et al, 1998]. D'après nos résultats, il semblerait qu'il y ait une perte cellulaire dès les premiers jours de la culture (augmentation de la mort cellulaire par apoptose dès J1). Cependant, cette mort cellulaire reste inférieure à 10% tout le reste du temps de culture et aucun phénomène de nécrose n'est observé. Nos résultats semblent suggérer que le système de culture en micromasse n'induit pas réellement de souffrance cellulaire sur une longue période de culture. Ces données concernant la souffrance cellulaire sont d'autant plus importantes à prendre en compte, que dans les différentes étapes de la différenciation des CSMs, un des derniers phénotypes cellulaires est celui des chondrocytes hypertrophiques. Ces cellules se caractérisent par l'expression du collagène de type X, de leur sécrétion de phosphatase alcaline et aussi par leur état apoptotique. Bien que des études complémentaires

soient indispensables pour conclure, il semblerait qu'à l'issu des 21 jours de culture, nous ayons une population cellulaire n'ayant pas de phénotype hypertrophique.

Au cours de la culture des CSMs en micromasse, un autre paramètre caractérise les cellules : la tendance à synchroniser leur cycle cellulaire en phase G0/G1 (84% des cellules à J1 et plus de 90% jusqu'au 21ème jours de culture). Cette synchronisation a déjà été décrite dans d'autres systèmes de culture utilisant un milieu appauvri en sérum. La phase G0 est une phase spécifique permettant aux cellules de maintenir leur capacité à entrer de nouveau dans une phase de synthèse d'ADN ou de mitose. En effet, la transition des cellules de la phase G0 à la phase G1 est liée au destin des cellules, tel que la différenciation, la prolifération ou l'apoptose. Après stimulation par un signal mitotique, les cellules souches se déplacent de l'étape G0 à l'étape G1, sinon, les cellules subissent la différenciation ou l'apoptose. De plus, il est possible que la culture à haute densité ait un effet délétère sur la croissance des CSMs provoquant un blocage du cycle cellulaire dans un état de latence.

Ces résultats suggèrent alors que les CSMs en culture dans des micromasses puissent emprunter une voie de différenciation.

B.II: Différenciation des CSMs. Suivi phénotypique

Afin d'évaluer l'état de différenciation des CSMs humaines lorsqu'elles sont cultivées en micromasses dans un milieu de culture sans sérum et en présence du facteur de croissance TGF-β, les niveaux d'expression des récepteurs de surface CD166, CD105 ou encore CD90 ont été analysés qualitativement, au niveau de la population cellulaire et quantitativement, au niveau moléculaire (nombre de sites antigéniques/cellule) par cytométrie en flux.

Ces niveaux d'expression ont été évalués dès la conception des micromasses (J0) et jusqu'à 21 jours de culture.

Pour chaque détermination, et ainsi qu'il l'a été dit plus haut, nous montrerons d'une part le pourcentage de cellules positives pour le facteur de différenciation concerné, et d'autre part, le nombre de site antigénique/cellule calculé après mesure des sites antigéniques présents sur des billes calibrées. Une mesure de ces paramètres sur une population de chondrocytes natifs nous servira de témoin.

B.II.1 : Expression des marqueurs CD 90

La figure III-6 montre que la proportion de cellules exprimant le marqueur CD 90 évolue en 2 phases tout au long de la culture. Tout d'abord, de J0 à J7, où plus de 95% de cellules expriment cette molécule de surface. A partir de J7, cette proportion de cellule diminue significativement jusqu'à J21 (Figure 6-A, $p<0,05$ J21 versus J0). Lorsque les CSMs CD 90^+ sont comparées à une population de chondrocytes, une différence significative est observée, puisque moins de 2% des chondrocytes en P0 expriment ce marqueur.

La figure III-6B représente la capacité liante de l'anti-corps anti-CD 90 et reflète ainsi le nombre de sites CD 90 à la surface des cellules CD 90^+. Il apparaît, à nouveau, une évolution en 2phases : de J0 à J7, puis de J7 à J21. De J0 à J7, le nombre de sites CD 90 diminue significativement à la surface des CSMs, puisqu'il passe respectivement de $8,7.10^5 \pm 2,1.10^5$ à $2,2.10^5 \pm 0,3.10^5$ sites par cellules ($p<0,05$). Puis, à partir de J14, la quantité de récepteurs CD 90 reste stable à la surface des cellules CD 90+ avec en moyenne $1,6.10^5 \pm 0,1.10^5$ sites par cellules. Cette quantité reste néanmoins significativement plus faible qu'à J0 ($p<0,05$).

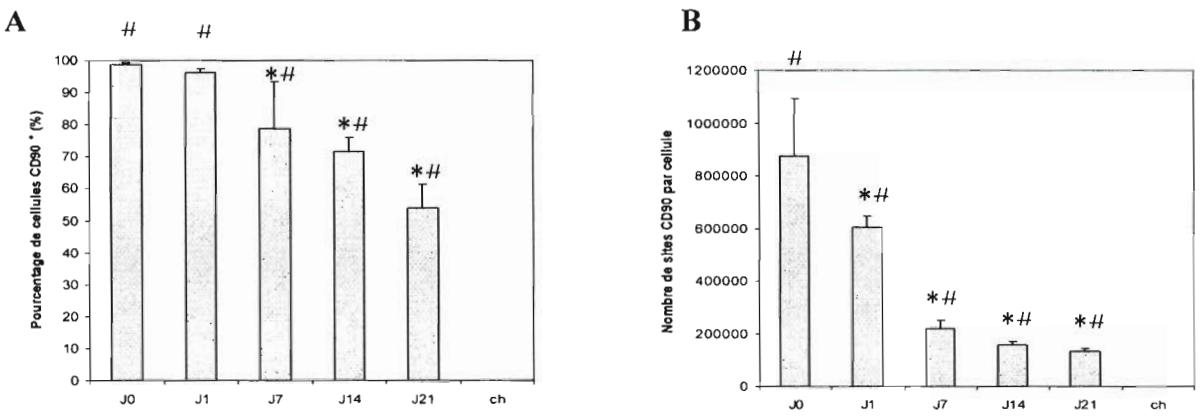


Figure III-6 : Expression des molécules de surface CD90 sur des CSMs humaines cultivées en micromasses. *La figure a représente le pourcentage de cellules positives pour le recepteur CD90. La figure b représente la capacité liante de l'anticorps (CLA) reflétant le nombre de sites par cellule. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type, n=6. ch = Témoin Chondrocyte (sans culture), * p<0,05 Jx versus J0; # p<0,05 CSMs versus ch.*

B.II.2 : Expression des marqueurs CD 166

La figure III-7 représente la proportion de cellules exprimant le marqueur CD 166 à la surface des CSMs et des chondrocytes. De même que pour le marqueur CD 90, une évolution en 2 phases est observée : de J0 à J7, puis de J7 à J21. En effet, alors que la proportion de cellules exprimant le marqueur CD 166 reste supérieure à 90% entre J0 et J7, elle diminue significativement dès J7 et ce jusqu'à J21, pour ne plus représenter que 25% ($p<0,05$). Sur les

cellules CD 166^+, la densité des récepteurs diminue significativement entre J0 et J7 ($p<0,05$) puis est stable de J7 à J21.

Lorsqu'on compare la proportion de cellules $CD166^+$ dans une population de CSMs cultivées en micromasse et dans une population de chondrocytes natifs, il apparaît une différence significative tout au long de la culture puisque moins de 2% de chondrocytes expriment ce récepteur.

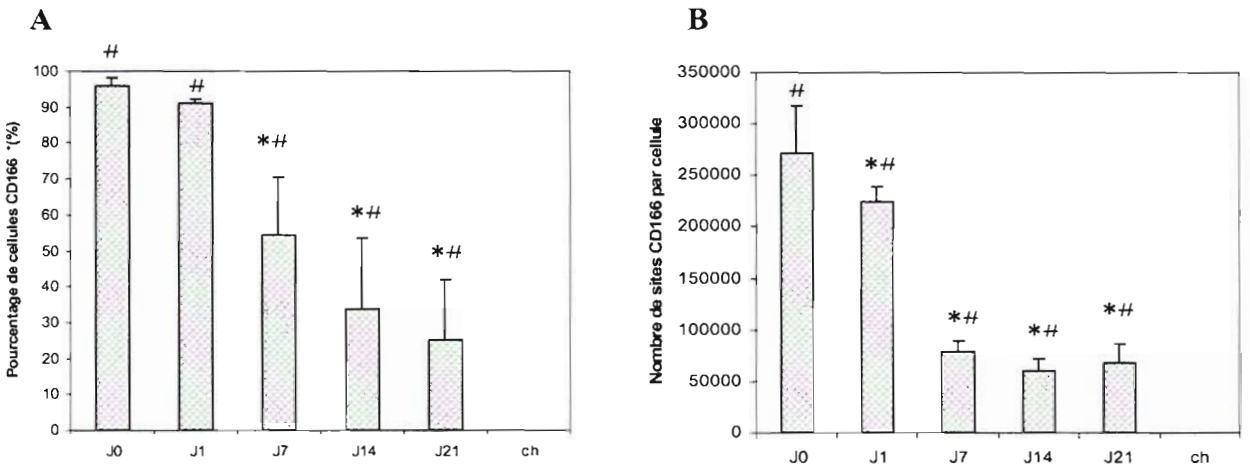


Figure III-7 : Expression des molécules de surface CD166 sur des CSMs humaines cultivées en micromasses. *La figure A représente le pourcentage de cellules positives pour le recepteur CD166. La figure B représente la capacité liante de l'anticorps (CLA) reflétant le nombre de sites par cellule. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type, n=6. ch = Témoin chondrocyte (sans culture), * p<0,05 Jx versus J0 ; # p<0,05 CSMs versus ch.*

B.II.2 : Expression des marqueurs CD 105

La figure III-8A montre que la proportion de cellules $CD105^+$ dans les micromasses a diminué de manière significative dès J1 (J1 vs J7, $p<0,05$). De J14 à J21, il n'y a plus d'évolution significative, cette baisse s'étant maintenue. De même, au cours de la culture, le nombre de sites CD105 exprimés par les cellules $CD105^+$ a diminué dès J7 ($p<0,05$) pour rester constant par la suite jusque J21 avec en moyenne $6,1x10^4 \pm 0,67x10^4$ sites par cellules (Figure III-8B), suivant ainsi l'évolution du pourcentage de cellules positives.

De plus, le nombre de sites antigéniques mesuré en fin de culture et proche du nombre de sites antigéniques présent sur les chondrocytes natifs.

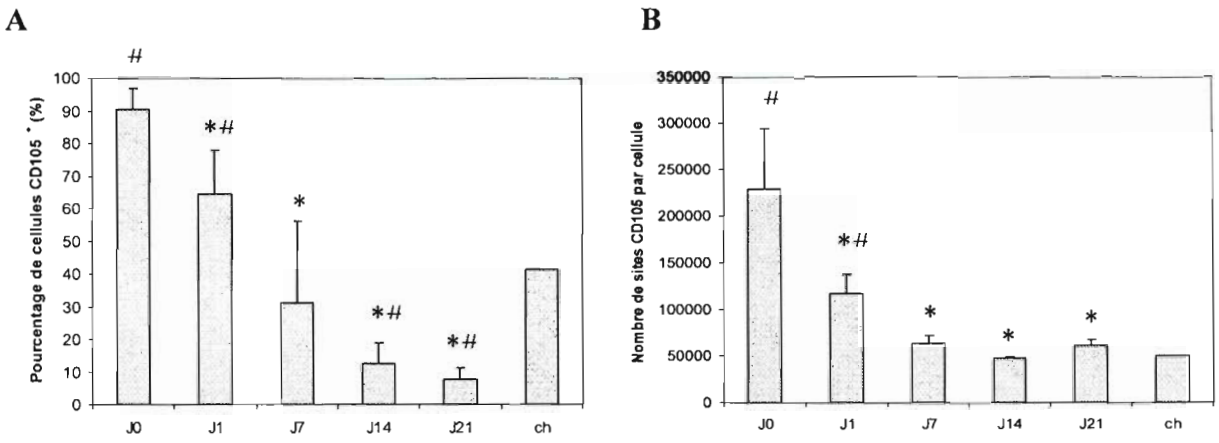


Figure III-8 : Expression des molécules de surface CD105 sur des CSMs humaines cultivées en micromasses. *La figure a représente le pourcentage de cellules positives pour le recepteur CD105. La figure b représente la capacité liante de l'anticorps (CLA) reflétant le nombre de sites par cellule. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type, n=6. ch = Témoin Chondrocyte (sans culture), * p<0,05 Jx versus J0 ; # p<0,05 CSMs versus ch.*

B.II.4. Discussion

Les récepteurs CD90, CD105 et CD166 sont décrits par plusieurs auteurs pour caractériser des MSCs indifférentiés et capables de s'engager dans une différenciation chondrocytaire [Mjumdar MK et al, 2000 ; Alsalameh S et al, 2004 ; Pittenger et al, 1999].
En revanche, aucune étude n'a été réalisée sur le suivi de ce phénotype aucourd de cette étape de différenciation, lorsque les CSMs sont cultivés dans les micromasses. D'après nos résultats, il apparaît que le modèle de culture en micromasse induit une double régulation des marqueurs CD90, CD105 et CD166.

En effet, nous avons mis en évidence l'existence d'une régulation au niveau de la population (variation de la population de cellules positives pour un marqueur) mais aussi une régulation au niveau moléculaire (variation du nombre de sites antigéniques). De plus, cette double régulation évolue, quels que soient les marqueurs, en deux phases : de J0 à J7 et de J7 à J21.

Dans les premiers jours de la culture en micromasse, les populations de cellules CD90+, CD105+ et CD166+ diminuent, puis, dès J7 cette évolution stagne. Il semblerait que, lors de la première semaine de culture, les CSMs perdent progressivement leur caractère indifférencié pour probablement s'engager dans une voie de maturation. En revanche, cette progression n'évolue plus au delà du septième jour de culture.

Lorsqu'on analyse le phénotype de chondrocytes « natifs », il apparaît que nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Diaz-Romero J et al [Diaz-Romero J et al, 2005]

La comparaison de ce phénotype chondrocytaire avec celui obtenu sur les MSCs cultivées en micromasse montre que le mode de culture tend à induire une expression qualitative et quantitative des récepteurs CD90, CD105 et CD166 proches de celle observée à la surface des chondrocytes natifs.

Il semble donc, d'après nos résultats, que le modèle en micromasse favorise une différenciation rapide des MSCs vers une lignée cellulaire qui peut être chondrocytaire. Cependant, une étude plus approfondie est nécessaire, notamment en se concentrant sur la production de marqueurs matriciels spécifiques du chondrocyte.

B.III: Analyse de la MEC synthétisée par les CSMs au cours de leur différenciation.

La MEC synthétisée par les cellules cultivées en micromasses a été analysée qualitativement par microscopie électronique. Une analyse plus précoce de la MEC a également été étudiée à l'échelle moléculaire.

B.III.1 : Observation ultrastructurelle de la MEC par microsopie électronique.

Nous avons examiné les changements ultrastructurels, par microscopie électronique à transmission, au jour 1, 14, et 21 de la culture. A J1, des jonctions de complexes ont été observées sur la surface luminale des CSMs et sont composées d'adhérents maculaires (indiqués par les flèches) (Figure III-9). A J1, les CSMs humaines contiennent des organelles bien développées, y compris des mitochondries, du réticule endoplasmique, un Appareil de Golgi, et de grandes quantités de ribosomes libres. Des gouttelettes lipidiques sont également observées dans le cytoplasme (Figure III-10A et D).



Figure III-9: Images de microscopie électronique à transmission de CSMs humaines en micromasses (J1). *Les jonctions cellulaires (flèches).*

Les cellules cultivées en micromasses pendant 1 jour se sont groupées sans former d'espaces intercellulaires visibles (Figure III-10A et D).

Au jour 14 (Figure III-10B et E) et au jour 21 (Figure III-10C et F), les cellules contiennent plus de gouttelettes lipidiques qu'au jour 1. Comme le montre la figure III, l'espace intercellulaire dans les micromasses a augmenté tout au long de la période de culture. D'abondants espaces intercellulaires et des fibrilles de collagène sont observés dans la région péricellulaire des micromasses cultivées au jour 14 et au jour 21. Ainsi, pour ces deux derniers jours, la microscopie électronique à transmission a identifié un réseau abondant de fibrilles minces dans la matrice extracellulaire (indiqués par les flèches). Aucun changement de la forme des cellules n'est observé.

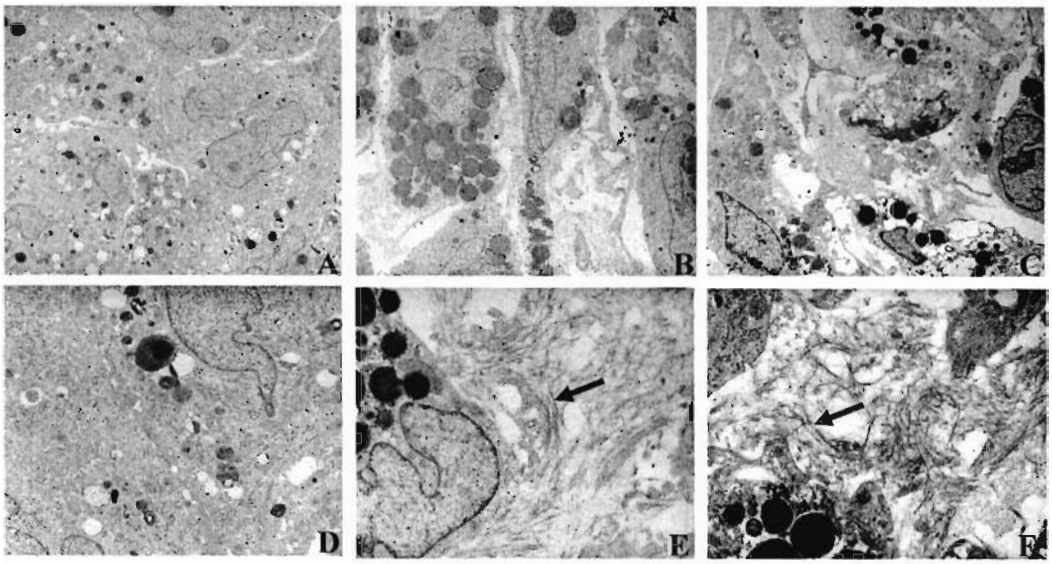


Figure III -10: Images de microscopie électronique à transmission de CSMs humaines en micromasses. *Les Figures III sont des micromasses cultivées avec du TGF-β1 à J1, J14 et J21 (Figures III-10 A, B et C3x1000, figures III-10 D, E et F 8x1000). A J1, les CSMs humaines contiennent des organites bien développées, y compris de grandes quantités de mitochondries, du réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, et de grandes quantités de ribosomes libres (Figure III-10 A et D). A J14 (Figure III-10B et E) et à J21 (Figure III-10C et F), les cellules ont contenu plus de gouttelettes lipidiques qu'au jour 1. L'espace intercellulaire dans les micromasses a augmenté tout au long de la période de culture, de J1 à J21. En conséquence, à l'intérieur de ces espaces intercellulaires, un plus grand taux de fibrilles de collagène (flèches) est apparu au cours du temps.*

B.III.2 : Analyse par RT-PCR de l'expression des collagènes de type I, II, des et Sox9 Agrécannes

L'analyse par RT-PCR montre que l'expression de l'ARMm du collagène II était absente des cellules en micromasses pendant les 21 jours d'induction chondrogénique. En revanche, l'expression du collagène de type I est clairement discernable et reste inchangée tout au long de la culture en micromasses ou de la période de 21 jours de la culture d'induction chondrogénique. Le niveau d'expression des agrécannes, faible dans les cultures maintenant les micromasses, augmente rapidement à J1 puis diminue à J7 pour être ensuite maintenu jusqu'à J21 (Figure III-11).

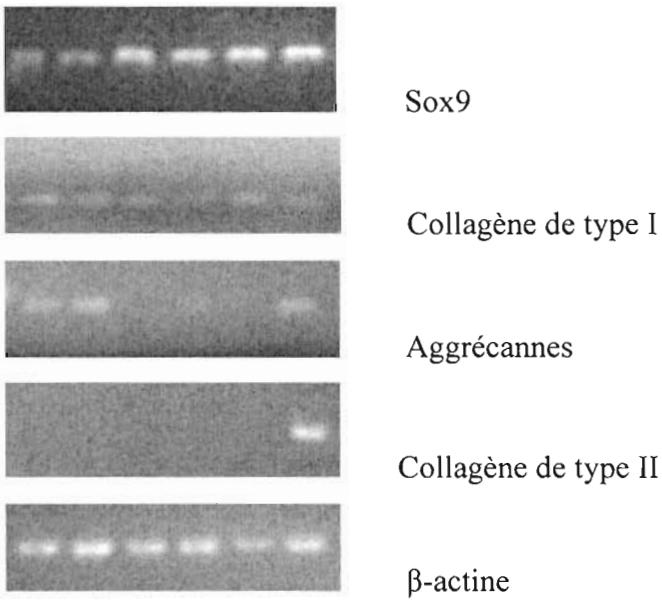


Figure III-11 : Expression des ARNm du collagène de type I, II et Sox 9 et des agrécannes dans les micromasses après culture avec du TGF-β1. *Analyse par RT-PCR. Témoin: des cellules souches mésenchymateuses humaines de moelle osseuse ont été cultivées sans TGF- β1. Chondrocytes: des chondrocytes humains ont été cultivés en monocouche en P1. Aucune expression de collagène de type II n'a été observée, contrairement au collagène de type I. L'expression d'agrécanne a considérablement augmenté dans les micromasses du jour 1, puis a diminué jusqu'à J21. La β-actine a servi de controle interne.*

B.III.3 : Analyse de la MEC synthétisé par les CSMs au cours de leur différenciation - Commentaires

Au cours de la chondrogénèse, de nombreux évènements tant morphologiques que moléculaires se produisent. Notre étude se propose d'analyser ces évènements lorsque les CSMs sont cultivées dans les systèmes de micromasse, pendant 21 jours.

L'observation en microscopie électronique a montré que les CSMs, de morphologie fibroblastique, possédaient de nombreuses organites dans leur cytoplasme. De plus, entre des cellules cultivées en monocouche et des cellules cultivées en micromasse, il apparaît des changements morphologiques tels que des agrégations des cellules les unes aux autres *via* de nombreux complexes de jonction. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Ichinose S. et al. [Ichinose S et al, 2005]. Ces auteurs décrivent, en plus de ces changements morphologiques, une répartition hétérogène des cellules au sein de la micromasse. Ainsi, à J7, les cellules, d'apparence fibroblastique, se situeraient dans la zone superficielle de la micromasse tandis que les cellules apoptotiques seraient dans une zone intermédiaire. Quant à

la zone profonde, des cellules, possédant une morphologie proche des chondrocytes, seraient observées. Puis, à J14 et J21, les zones intermédiaires et superficielles tendraient à disparaître.

Par ailleurs, nous observons qu'à J1, l'espace intercellulaire est absent de la micromasse. Puis, plus le temps de culture augmente, plus cet espace devient important et il apparaît une matrice extracellulaire néo-synthétisée avec présence de fibrilles pouvant être des fibres de collagène. Ces évènements observés *in vitro* semblent se rapprocher de ceux observés *in vivo* durant le développement du squelette. En effet, celui-ci est initier par la migration de CSMs dans des sites destinés à devenir des os [Summerbel D. et al, 1972]. Ces CSMs entament alors une étape de condensation puis de différenciation afin de former, *in fine*, une structure cartilagineuse [Goldring MB et al, 2006]. Dans notre système de culture, les CSMs forment une structure 3D favorisant les interactions cellule-cellule.

Au cours de la phase de condensation, un des premiers événements nucléaires capable d'amorcer la synthèse de la matrice extracellulaire est l'expression du facteur de transcription Sox9 [Sekiya I et al, 2000]. Au cours de la phase de condensation, un des premiers événements nucléaires capable d'amorcer la synthèse de la matrice extracellulaire est l'expression du facteur de transcription Sox9 [Sekiya I et al, 2000]. Dans notre modèle de micromasse, il apparaît que ce gène est exprimé dès les premiers jours de la culture. Il semblerait donc que ce facteur de transcription soit important dans la chondrogénèse. Par ailleurs, conjointement à l'expression de Sox9, nous avons montré que les CSMs synthétisaient des agrécannes et du collagène de type I. En revanche, le collagène de type II, marqueur de différenciation chondrocytaire, n'a pas été détecté dans ce modèle de culture. D'après Goldring MB et al, lorsque le facteur de transcription Sox9 et le collagène de type I sont exprimés en même temps, c'est que les CSMs sont dans la première phase de différenciation : la phase de condensation. De plus, lorsque Sox9 est exprimé en même temps que les agrécannes, cela signifie que les CSMs entament leur phase de différenciation chondrocytaire [Figures I-14 et I-15, Goldring MB et al, 2006]. Cependant, au cours de cette étape, nous aurions dû détecter du collagène de type II.

D'après nos résultats, il semblerait que les CSMs soient capables de s'organiser en un tissu « primitif » présentant un embryon de matrice extracellulaire. En effet, au cours de la première semaine de culture, des marqueurs caractérisant la phase de condensation (Sox9, collagène de type I) et quelques marqueurs de la phase de différenciation chondrocytaire (Sox9 et agrécannes) sont identifiés.

B.IV Discussion Générale

Nous avons montré, dans cette partie de nos travaux, que les CSMs cultivées, *in vitro*, dans un système en micromasse, pouvaient se diriger vers un phénomène de différenciation. En effet, ce modèle 3D ne provoque pas de souffrance cellulaire et induit une synchronisation du cycle cellulaire en phase G0/G1. Cette phase est décrite pour favoriser la différenciation des cellules au dépend de la prolifération cellulaire. Nos résultats montrent effectivement qu'au cours de la culture, la prolifération des cellules diminue tandis que la proportion de cellules en phase G0/G1 augmente.

Par ailleurs, nous avons montré que le modèle en micromasse favorisait la perte du phénotype indifférencié des CSMs puisque la proportion de cellules $CD166^+$, $CD105^+$, et $CD90^+$ diminuait très rapidement dans les premiers jours de la culture. De plus, il semblerait que cette régulation soit qualitative mais également quantitative puisque le nombre de site pour un marqueur diminue à la surface de la cellule lorsque la proportion de cellules positives pour ce marqueur diminue.

Enfin, il apparaît, après analyse microscopique et études moléculaires, que les contacts cellule-cellule sont importants dans la différenciation des CSMs puisqu'en absence d'espace intercellulaire (de J0 à J7), les cellules synthétisent des facteurs de transcription leur permettant d'entrer dans la phase de condensation et de débuter la phase de différenciation chondrocytaire (expression de Sox9). Beier F a également décrit le facteur de transcription Sox9 comme un signal agissant sur le gène p21. Ce dernier est connu pour être un signal anti-mitotique, c'est-à-dire bloquant le cycle cellulaire en phase de quiescence (G0/G1) afin de permettre aux cellules de se différencier [Beier F, 2005].

Cependant, l'absence de collagène de type II nous empêche de conclure qu'à J21, les CSMs se sont bien différenciées en chondrocytes. Il semblerait plutôt que l'on ait obtenu des chondroprogéniteurs.

Un bilan de nos résultats peut être repris sur la figure III-12 et permet de comprendre comment les CSMs se différencient dans le modèle 3D de micromasse.

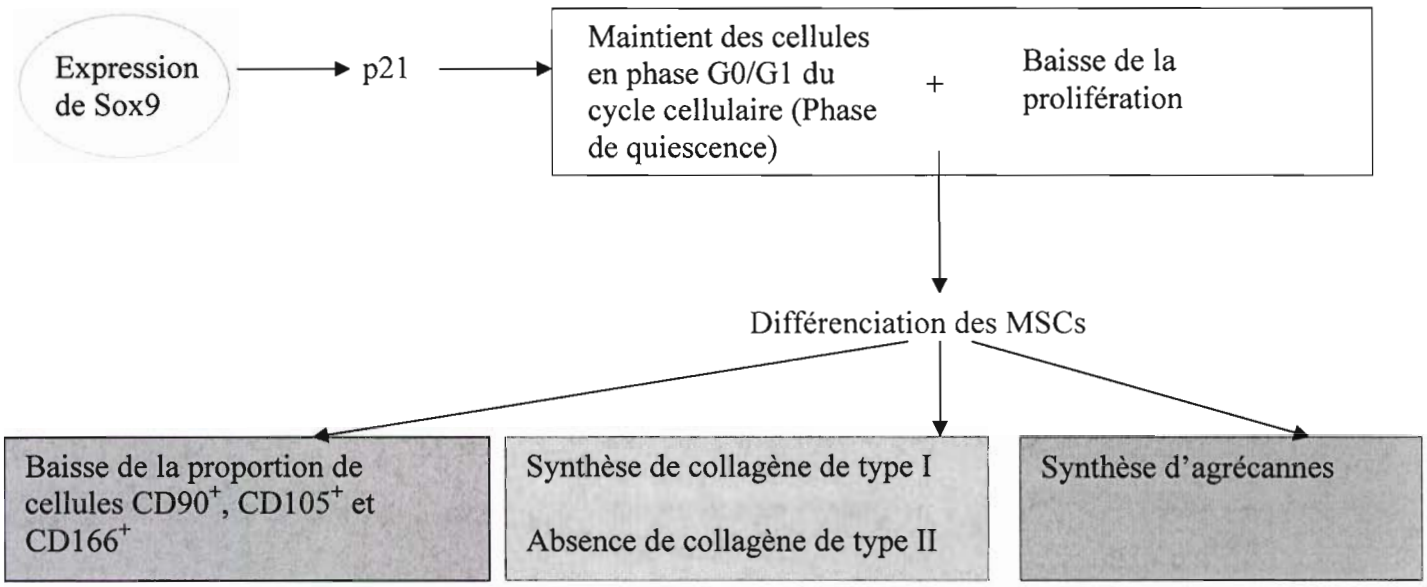


Figure III-12 : Bilan des résultats obtenus dans le modèle de culture 3D en micromasse

Bien que les micromasses semblent amorcer la chondrogénèse, ce modèle de culture 3 ne peuvent pas être utilisées tel quel en ingénierie tissulaire puisque ce ne sont pas des biomatériaux implantables directement dans le site lésé. De plus, l'évolution de la différenciation semble être rapide lors de la première semaine de culture puis tend à évoluer plus lentement par la suite. Ceci peut devenir un problème puisque l'idéal serait d'obtenir une différenciation cellulaire rapide (environ 21 jours) ainsi qu'une matrice cartilagineuse néosynthétisée et fonctionnelle dans ce laps de temps.

Nous avons donc poursuivi nos travaux en émettant l'hypothèse suivante :

> Puisque après 7 jours de culture, nous avons amorcé une différenciation des CSMs, nous allons les transférer, dès amorce du phénomène, dans une matrice 3D reconnue comme étant un biomatériau potentiel en ingénierie tissulaire du cartilage : les hydrogels d'alginate. Cependant, bien que ces hydrogels soient couramment utilisés, in vitro, avec des cellules humaines ou avec des cellules provenant d'autres espèces animales, il existe une grande disparité dans les conditions d'utilisation dans la littérature (viscosité utilisée, pourcentage d'alginate, concentration cellulaire,...).

Nous nous attacherons donc, dans un premier temps, à définir les conditions d'utilisation optimales de ces hydrogels pour la chondrogénèse des CSMs humaines.

C. Optimisation des conditions de culture de l'alginate sur des CSMs humaines

Ainsi qu'il l'a déjà été dit, un support à trois dimensions (3-D) est exigé pour les chondrocytes articulaires pour maintenir leur phénotype différencié *in vitro* ou pour les CSMs afin de subir la chondrogénèse [Lemare F et al, 1998]. La culture en gel d'alginate est une culture 3D dans laquelle les cellules ajoutées à une solution d'alginate sont en suspension et distribuées de façon homogène. La porosité de l'hydrogel est telle que la diffusion de grandes molécules est possible [Guo JF et al, 1989], tandis que la migration passive des cellules ne l'est pas. Il a été montré que les chondrocytes articulaires d'adulte inclus dans un gel d'alginate produisent *de novo* une matrice riche en collagène et en protéoglycannes [Lindenhayn K et al, 1999], même 8 mois après l'encapsulation [Hauselmann HJ et al, 1994]. Les constructions de gel d'alginate de calcium contenant des chondrocytes ont pu produire du cartilage après implantation dans des poches sous-cutanées de souris 'nudes' [Paige KT et al 1996]. Ces résultats suggèrent que les gels d'alginate de calcium soient un système approprié pour l'encapsulation et la transplantation de chondrocytes. Par ailleurs, plusieurs études ont montré une différenciation chondrogénique des CSMs humaines en culture d'alginate traduite par la synthèse d'une matrice extracellulaire, tel que le collagène de type II [Park Y et al, 2005; Hsiao-Li Ma et al, 2003; Kavalkovich KW et al, 2003].

Cependant, de nombreuses conditions de culture d'alginate ont été employées dans ces études tant pour la viscosité du gel (faible viscosité et moyenne viscosité) que pour les concentrations de la solution d'alginate (1,2% ou 2%).

Dans cette étude, nous avons contrôlé la viabilité et l'état de prolifération *via* le cycle cellulaire de CSMs humaines cultivées dans différentes conditions de culture d'alginate afin de choisir la condition optimale de culture d'alginate pour les CSMs humaines.

C.I.: Suivi de la viabilité des cellules souches mésenchymateuses humaines dans différentes conditions de culture d'alginate

Les CSMs humaines ont été cultivées sous 4 conditions physico-chimiques différentes : alginate de faible viscosité à 1,2% (1,2%FV), de faible viscosité à 2% (2%FV), de moyenne viscosité à 1,2% (1,2%MV) et de moyenne viscosité à 2% (2%MV) avec un milieu sans sérum et en présence de TGF-β1 (10ng/ml) pendant 21 jours. La viabilité cellulaire a été étudiée en cytométrie en flux par le kit d'analyse de Vybrant™.

Ainsi que nous l'avons déjà montré, cette méthode nous permet d'avoir une approche précise de l'état dans lequel se trouvent les cellules, et notamment s'il existe une initiation de l'apoptose au sein de la population étudiée, ce qui peut s'avérer important pour la suite de nos travaux. En effet, s'il révélait l'existence d'une population apoptotique importante, ce système de culture devrait être abandonné puisque délétère pour les cellules et en aucun cas nous ne pourrions poursuivre les cultures à long terme, indispensables à la synthèse d'un néo-tissu.

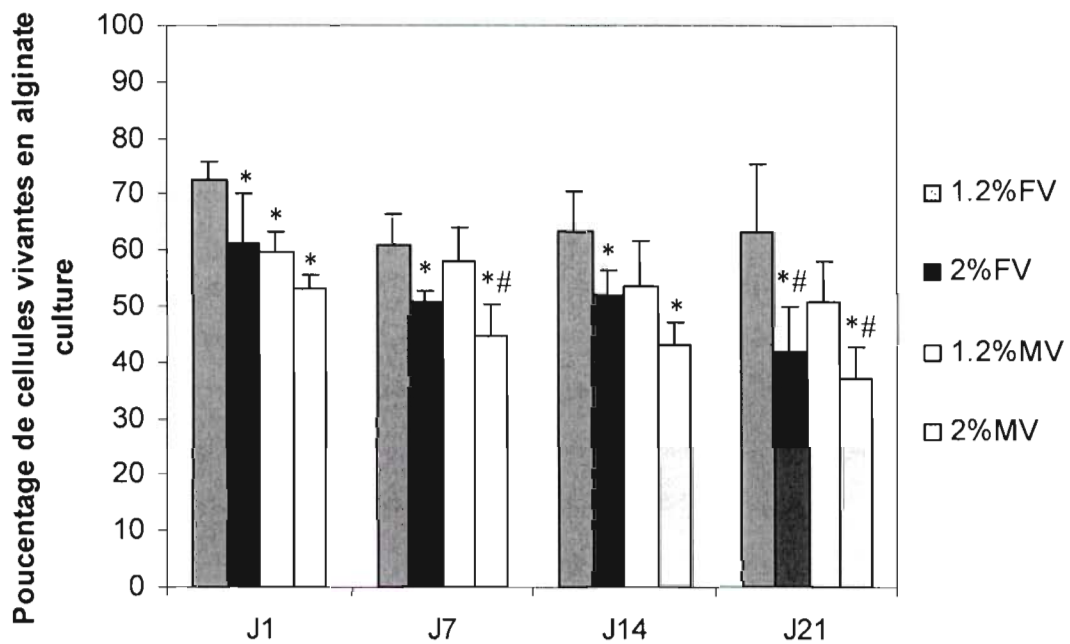


Figure III-13 : Influence des caractéristiques des hydrogels sur la viabilité des CSMs humaines. *Les CSMs humaines ont été cultivées dans un milieu sans sérum, en présence de TGF-β1, et dans 4 conditions d'alginate pendant 21 jours. Les cellules restantes étaient nécrose, et aucune apoptose n'a été observée, même au jour 21. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type (n=6). * versus 1,2%FV, p<0,05; # versus 1,2%MV, p<0,05.*

Sur la figure III-12 sont rassemblés le pourcentage de cellules vivantes en fonction des conditions de culture. Nous notons en premier lieu qu'aucun signal d'apoptose significatif n'a été observé, même au jour 21 (Figure III -13).

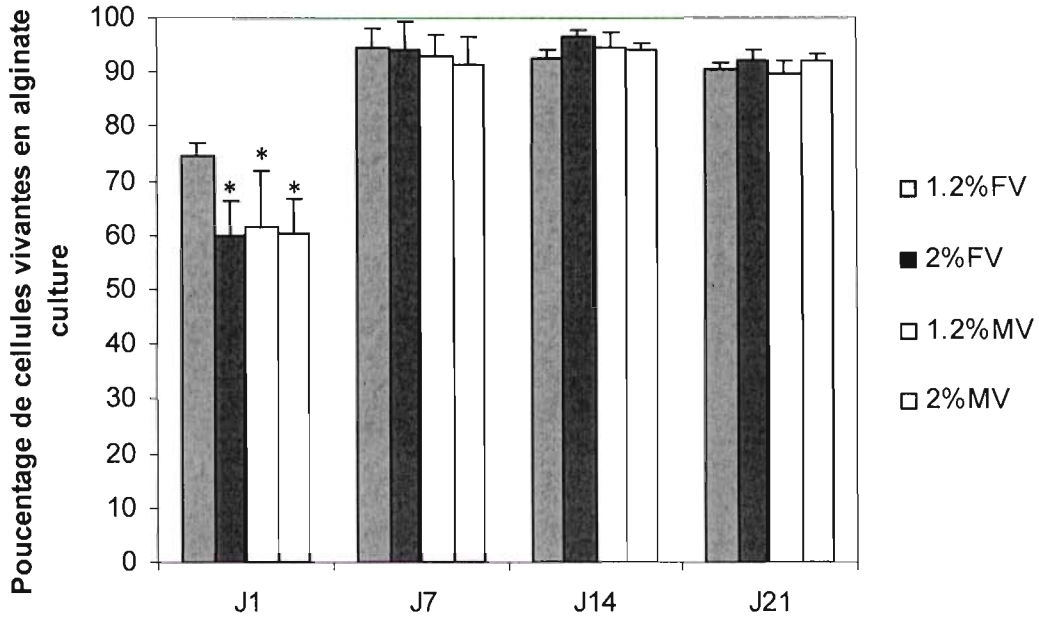


Figure III-14 : Influence des caractéristiques des hydrogels et de la présence de sérum sur la viabilité cellulaire. *Les CSMs humaines ont été cultivées avec du DMEM-LG 10% FBS dans 4 conditions d'alginate pendant 21 jours. Les cellules restantes étaient nécrotiques, et aucun taux d'apoptose n'a été observé, même au jour 21. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type (n=6). * différentes conditions versus 1,2% FV, p<0,05.*

En revanche, il existe un fort pourcentage de cellules nécrotiques (25 % à 55 % à J1). En effet, nous avons observé que les conditions de viscosité et de pourcentage ont un effet sur la viabilité des CSMs humaines. La viabilité n'est que de 74 % au maximum, indiquant que le processus d'encapsulation a endommagé les cellules. Les variations dans viabilité cellulaire évoluent de manière semblable quelques soient les conditions de culture : le pourcentage de cellules vivantes a baissé significativement de J1 à J21. Cependant l'effet des 4 conditions d'alginate sur la viabilité des CSMs humaines est très différent à chaque point temporel.

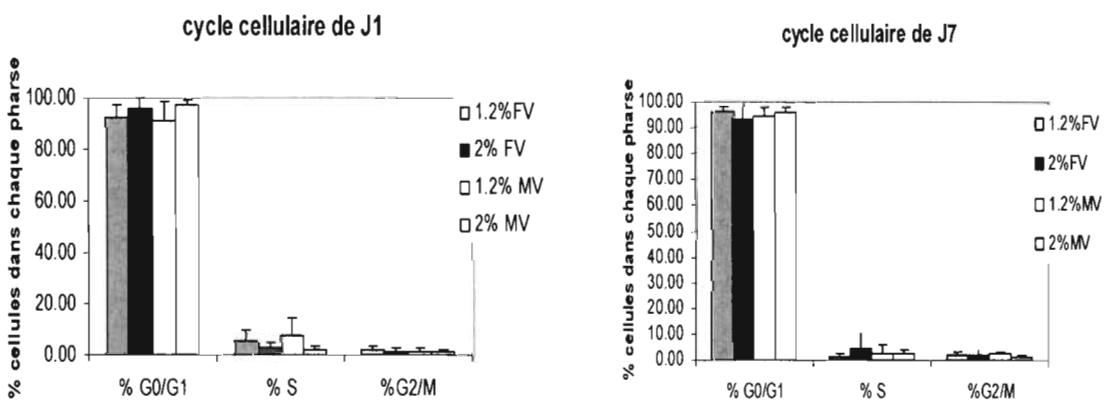
Au jour 1, le pourcentage de cellules vivantes dans l'alginate 1,2 % FV est significativement plus élevé que pour les 3 autres conditions. Au jour 7, le pourcentage de cellules vivantes pour 1,2 % MV est significativement plus élevé que pour 2 % MV et identique à J14. Le pourcentage de cellules vivantes obtenues pour 1,2 % FV est significativement plus élevé que pour 2 % FV et 2 % MV. A J21, le pourcentage de cellules vivantes obtenues pour 1,2 % FV est significativement plus élevé que dans les autres conditions et le pourcentage de cellules mortes en 1,2 % MV est significativement plus élevé que pour 2 % FV et 2 % MV.

Les résultats montrent que la basse viscosité et la basse concentration en alginate ont peu d'effet sur la viabilité des CSMs humaines. Toutefois, l'effet 'viabilité faible' observé pour ces expérimentations est vraisemblablement du à l'absence de sérum qui contient l'essentiel des facteurs de croissance, de protéines, ... nécessaire à la prolifération et au maintient de la viabilité cellulaire. De plus, le retrait du sérum est une technique utilisée dans la synchronisation des cellules en phase de quiescence. Les conditions de cultures ne sont donc pas optimales pour assurer dans ce cas une viabilité optimale dans un biomatériau.

Nous avons donc observé la viabilité des CSMs humaines cultivées avec du DMEM-LG 10 % FBS dans les mêmes conditions pour analyser l'effet de la présence de sérum. De même que pour la culture en milieu sans sérum en présence de TGF-β1, la viabilité cellulaire est faible à J1 (74 % dans le meilleur des cas pour 1,2 % FV). Ceci peut s'expliquer par le fait que les cellules subissent une étape de 'trypsination' et un changement de milieu important. Elles ont besoin d'un temps d'adaptation. En effet, le pourcentage de cellules vivantes a augmenté de manière significative au jour 7, dépassant les 90 % quelques soient les conditions du milieu, et cela jusqu'à J21. Il apparait donc que le sérum ait un effet positif sur la culture en gel d'alginate et soit nécessaire au bon 'démarrage' des cellules dans les biomatériaux.

C.II : Cycle cellulaire des cellules souches mésenchymateuses humaines dans 4 conditions de gels d'alginates

Afin de compléter cette étude, nous avons analysé le cycle cellulaire des cellules incorporées dans ces hydrogels. Nous avons tenu compte non seulement du pourcentage et de la viscosité des hydrogels, mais également de la présence ou non de sérum dans le milieu. Les résultats sont présentés conjointement sur les figures 15 et 16.



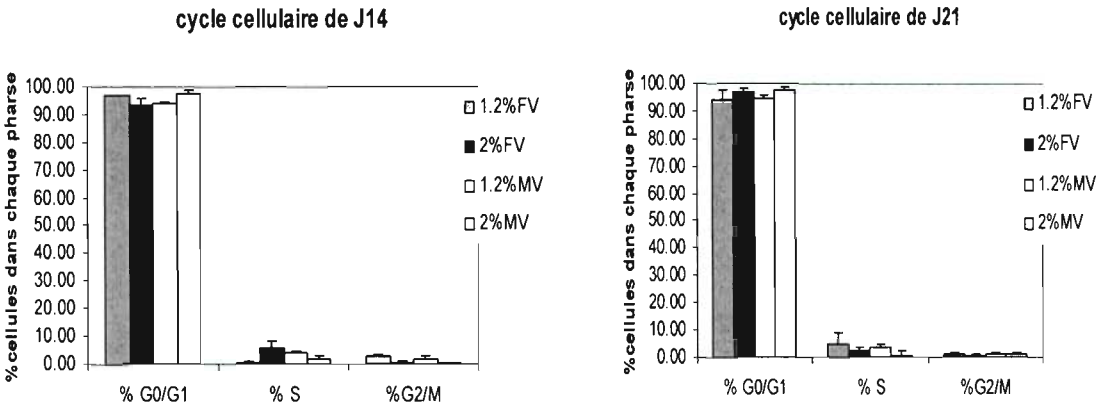


Figure III-15 : Analyse par cytométrie en flux du cycle cellulaire des CSMs humaines en culture en alginate sans sérum mais avec TGF-β1 (10ng/ml). *Après culture pendant 1, 7, 14 et 21 jours, les cellules ont été isolées des biomatériaux marqués à noyaux à l'iodure de propidium. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne± écart-type (n=6).*

Quelles que soient les conditions de culture, en absence de sérum, nous avons montré que le pourcentage de cellules en phase G0/G1 est supérieur à 90% et le pourcentage de cellules en phases S et (G2+M) est inférieur à 10% pendant toute la période de culture. Les phases du cycle cellulaire (S, G0/G1 et G2/M) n'ont pas changé de manière significative du jour 1 au jour 21. Ces résultats suggèrent que la prolifération des cellules est faible (tableaux III.1, III.2 et III.3), confirmant les résultats obtenus d'après l'étude de la viabilité cellulaire.

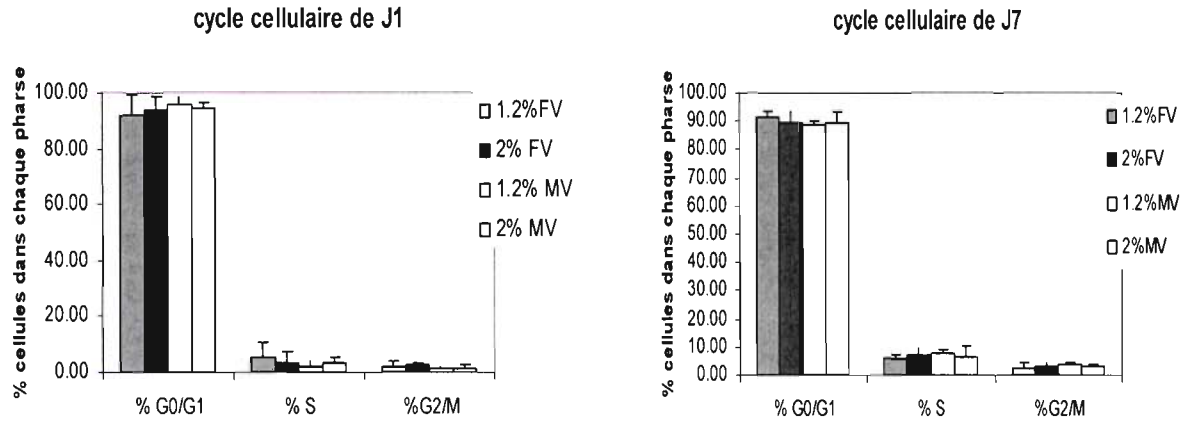


Figure III-16 : Analyse par cytométrie en flux du cycle cellulaire des CSMs humaines en culture en alginate avec sérum. *Après culture pendant 1 et 7 jours, les cellules ont été isolées des biomatériaux marqués à noyaux à l'iodure de propidium. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne± écart-type (n=6).*

En revanche, en présence de sérum, il apparaît que la phase S augmente de manière significative après 7 jours de culture. Ce résultat traduit une reprise des métabolismes

impliqués dans la prolifération cellulaire, notamment la synthèse d'ADN et de même confirment ce qui a été observé plus haut.

Tableau III-1 : Influence des conditions de culture absence ou non de sérum sur le cycle cellulaire. En absence de sérum, les cellules sont cultivées avec 10ng/ml de TGF-β1. Tableau a = phase G0/G1, Tableau b = phaseS, Tableau c = phase G2/M.

Tablaue a

Phase G0 G1	J1		J7		J14		J21	
Sérum	-	+	-	+	-	+	-	+
Micromasses	92±1	ND	96±0.1	ND	97±0.3	ND	99±0.4	ND
1,2 % FV	92±5	92±7	96±2	91±2	97±0.5	ND	94±4	ND
2 % FV	96±4	94±5	93±6	90±4	93±2	ND	97±2	ND
1,2 % MV	91±8	96±2	95±3	89±1	94±1	ND	95±1	ND
2 % MV	97±2	95±2	96±2	90±4	98±1	ND	99±1	ND

Tableau b

Phase S	J1		J7		J14		J21	
Sérum	-	+	-	+	-	+	-	+
Micromasses	5.3±1.1	ND	2.2±0.4	ND	0.8±0.2	ND	0.7±0.2	ND
1,2 % FV	5.8±3.6	5.6±5.5	1.5±0.8	**5.7±1.6***	0.5±0.8	ND	4.7±4.1	ND
2 % FV	2.5±2.1	3.5±3.8	4.6±5.8	**6.9±3.1***	5.9±2.2	ND	2.4±1.4	ND
1,2 % MV	7.7±6.9	2.2±2.0	2.8±3.1	**7.7±1.4***	4 .1±0.9	ND	3.8±0.9	ND
2 % MV	1.9±1.9	3.6±2.1	2.6±1.5	**6.9±3.7***	1.9±0.8	ND	0.9±1.5	ND

Tableau C

Phase G2+M	J1		J7		J14		J21	
Sérum	-	+	-	+	-	+	-	+
Micromasses	2.2±0 .1	ND	1.7±0.2	ND	1.6±0.4	ND	0.5±0.2	ND
1,2 % FV	2.0±1.4	2.2±1.8	2.3±1.3	2.9±1.7	2.8±0.5	ND	1.2±0.5	ND
2 % FV	1.4±1.7	2.4±1.2	2.3±1.4	3 .5±0.9	0.7±0.4	ND	0.8±0.3	ND
1,2 % MV	1.6±0.8	1.6±0.6	2.4±1.1	3.6±0.7	1.8±0.9	ND	1.3±0.6	ND
2 % MV	1.1±1.1	1.6±0.8	1.6±0.6	3.4±0.5	0.3±0.4	ND	1.4±0.5	ND

$p<0,05$ sérum+ versus sérum - ; ND = Non déterminé

C.III : Comparaison des modèles de culture – Discussion

Nous avons comparé les différents modèles de culture que nous avons utilisé (micromasses, gels d'alginates), du point de vue du cycle cellulaire, donc du point de vue métabolisme et prolifération. Il apparaît, sur le tableau III1, que les seules conditions

permettant d'influer sur la synthèse d'ADN, et donc sur la prolifération, soient l'apport de sérum (augmentation significative de la phase S, quelques soient les caractéristiques des gels d'alginates).

Par ailleurs, il semble que le passage en gel d'alginate soit délétère pour les cellules. En effet, aucune perte cellulaire significative n'est notée dans le cas de la culture en micromasses.

En Revanche, l'incorporation de cellules en gel d'alginate fait chuter la viabilité de 95% à 75 %, voire moins.

Il apparaît donc souhaitable de prévoir une période 'd'assimilation' des cellules (24h à 48h) dans les gels d'alginates en ajoutant 10 % de SVF dans les premiers jours de la formation du biomatériau. Cependant, il n'est pas souhaitable d'utiliser ce pourcentage de sérum pour une culture au long cours, puisqu'il est connu que la présence de sérum peut inhiber ou ralentir la synthèse matricielle et l'action des facteurs de croissance impliqués dans ce processus, tel le TGF-β. Or notre objectif étant la reconstruction d'un néo-tissu, nous devons privilégier les voies de synthèse matricielle, tout en maintenant les activités métaboliques vitales.

Il semble toutefois que d'après l'ensemble de ces expériences, la meilleure condition de culture soit l'hydrogel à faible viscosité 1,2 %. Les études doivent néanmoins se poursuivre par les tests de différents milieux chondrogéniques, les présents résultats ne représentant qu'une mise au point, peut être répétitive, mais nécessaire.

CHAPITRE IV

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les CSMs sont des cellules multipotentes qui peuvent se différencier, entre autres, en cellules osseuses, cartilagineuses, adipeuses, musculaires ou stromales. La différenciation des CSMs en chondrocytes suit plusieurs étapes dont l'étape initiale est une phase de condensation des cellules. Au cours de cette étape, les interactions cellule-cellule et cellule-matrice ont un rôle primordial puisqu'elles favorisent l'adhésion cellulaire mais aussi les modifications du cytosquelette. D'autres facteurs peuvent stimuler cette étape. C'est le cas des facteurs de croissance appartenant à la famille des TGF-β et en particulier le TGF–β1 ou encore certaines BMP dont le rôle est de stimuler la synthèse de la matrice extracellulaire. En retour, de cette stimulation, l'expression des molécules d'adhérence serait sur régulée augmentant ainsi les interactions cellule-matrice.

En ingénierie tissulaire du cartilage, les CSMs sont de plus en plus utilisées puisqu'elles offrent la possibilité d'être amplifiées tout en maintenant leur état indifférencié. Leur intérêt repose également sur leur potentialité chondro-inductrices. Ainsi, pour favoriser, *in vitro*, la différenciation des CSMs en chondrocytes, des structures 3D et/ou des facteurs solubles spécifiques de la chondrogénèse sont utilisés.

L'objectif de ce travail est donc d'optimiser la différenciation des CSMs dans des modèles de culture 3D. Pour cela, deux types de modèles sont utilisés :

- ✓ Un modèle en micromasse, connu pour favoriser les interactions cellule-cellule
- ✓ Un modèle en hydrogel d'alginate. Ce polysaccharide est décrit par de nombreux auteurs comme étant un biomatériau potentiellement utilisable en ingénierie tissulaire du cartilage. Différentes conditions sont testées en faisant varier la concentration de l'alginate (1,2% et 2%) mais aussi sa viscosité (faible et moyenne viscosité). Ainsi l'influence de quatre hydrogels d'alginate sur la différenciation des CSMs est évaluée.

Dans un premier temps, l'identification et la caractérisation phénotypique des cellules sont effectuées avant toute culture en modèle 3D. Ce travail s'inscrit dans une étape du contrôle qualité lors de l'utilisation des CSMs en ingénierie tissulaire. En effet, la moelle osseuse contient non seulement les CSMs mais aussi des cellules hématopoïétiques. Il est donc indispensable de s'assurer que les cellules étudiées soient bien des CSMs et non des cellules hématopoïétiques. Cette sélection cellulaire repose tout d'abord sur la propriété d'adhésion des CSMs et sur la morphologie des cellules cultivées. Nos résultats montrent que les cellules adhérentes ont une morphologie fibroblastique. A partir du deuxième passage, une analyse des marqueurs phénotypiques caractérisant les deux populations est effectuée. Ainsi,

il apparaît que les cellules n'expriment pas les molécules d'adhérence CD34 ou CD45, spécifiques des cellules hématopoïétiques. En revanche, les cellules sont $CD166^+$, $CD105^+$, $CD90^+$ et $CD73^+$, caractérisant des cellules indifférenciées et mésenchymateuses.

Les cellules, issues de la moelle osseuse humaine, et cultivées en monocouche pendant 2 passages sont des cellules indifférenciées et mésenchymateuses.

Dans un second temps, les cellules identifiées comme étant des CSMs sont cultivées dans un modèle en micromasse en présence d'un milieu de culture optimisé pour la chondrogénèse (présence de TGF-β). Il est montré, tout d'abord, que, dans ce modèle, aucune souffrance cellulaire n'est observée puisque les CSMs restent viables tout au long des 21 jours de culture. Cependant, à partir du $7^{ème}$ jour, ces cellules deviennent quiescentes, se divisent moins et possèdent une activité métabolique qui diminue. Ceci pourrait être en faveur d'une différenciation cellulaire.

L'analyse des marqueurs phénotypiques CD166, CD105 et CD90 montre que la culture en micromasse induit une perte du phénotype indifférencié et mésenchymateux des cellules. Cette régulation négative des différents marqueurs se traduit à deux niveaux : au niveau de la population avec une baisse de la proportion des cellules exprimant ces molécules ; mais aussi au niveau moléculaire puisqu'à la surface des cellules continuant à exprimer ces molécules, le nombre de ces dernières diminue significativement.

Comme peu d'étude a été réalisée sur les variations ultrastructurelles se produisant au cours de la culture des CSMs dans des micromasses, nous avons observé ces structures 3D au microscope électronique à transmission. Il apparaît ainsi que dès le premier jour de culture, les cellules se lient aux complexes jonctionnels favorisant ainsi les interactions cellule-cellule. De plus, l'espace intercellulaire augmente tout au long de la culture laissant la place à la matrice extracellulaire néosynthétisée. Cette matrice se compose, entre autres, de fibres de collagènes et d'agrécannes.

Ces trois niveaux d'études (viabilité, phénotype, synthèse matricielle) montrent que le modèle de culture en micromasse induit une différenciation des CSMs vers un phénotype qui pourrait être chondrocytaire.

Dans la troisième partie de ce travail, la viabilité des CSMs est évaluée lors de la culture dans les différents hydrogels d'alginate (1,2% FV, 2% FV, 1,2% MV et 2% MV). LE choix des ce différents hydrogels repose essentiellement sur le bilan des études consacrées à la culture des CSMs dans les hydrogels d'alginate. En effet, plusieurs auteurs travaillent

indifféremment avec des hydrogels à 1,2% FV, 2% FV, 1,2% MV ou 2% MV sans aucune justification sur le choix des concentration ou viscosité. Par ailleurs, dans ce travail, les cellules sont cultivées en présence ou non de sérum et en présence ou non de TGF-β1. Nos résultats montrent que, comme pour les micromasses, les cellules cultivées avec du TFG-β1 entrent rapidement dans un état de latence. En revanche, la présence de sérum dans le milieu de culture favorise la division cellulaire, quels que soient les hydrogels.

La comparaison des différents hydrogels entre eux montre que les cellules cultivées dans de l'alginate à 1,2% FV ont une viabilité et un taux de synthèse d'ADN supérieur aux autres hydrogels. Ce biomatériau semblerait être le plus adapté à la culture des CSMs. **Cependant, compte tenu des difficultés rencontrées pour réaliser la gélification du polymère lorsqu'il est utilisé à 1,2%, la concentration optimale d'alginate pour la prolifération et la viabilité des CSMs semble être à 2%.**

L'ensemble de ce travail a permis d'identifier plusieurs modèles de culture pour la différenciation de CSMs. Cependant, l'utilisation des CSMs en ingénierie tissulaire du cartilage nécessite l'utilisation d'un biomatériau. Ainsi, au vu des résultats obtenus, il pourrait être recommandé de favoriser les contacts cellule-cellule mais aussi la perte du phénotype mésenchymateux dans un modèle de culture en micromasse pendant les premiers jours de culture puis de favoriser la prolifération et la synthèse matricielle dans un biomatériau de type alginate. Pour confirmer cette hypothèse, une étude va être réalisée en utilisant les micromasses comme modèle de culture pendant une semaine puis les cellules seront retirées des micromasses pour être ensuite encapsulées dans des hydrogels d'alginate à 2%. Ainsi, les mêmes paramètres que ceux utilisés pour caractériser les modèles en micromasse seront évalués (Figure IV-1)

Par ailleurs, ce travail donne lieu à plusieurs travaux complémentaires permettant :

- ✓ l'analyse de l'influence des différents hydrogels sur la synthèse matricielle, en particulier la synthèse des collagènes de type II, des PGs et des petits PGs
- ✓ d'identifier l'influence d'autres facteurs de croissance tel que les BMP-2 sur la chondrogénèse puisqu'il est décrit comme pouvant également agir sur le gène p21 [Beier F, 2005] (Figure IV-1)
- ✓ de connaître la réponse des cellules lorsqu'elles sont soumises à des contraintes mécaniques conjointement ou non aux facteurs solubles (Figure IV-1).

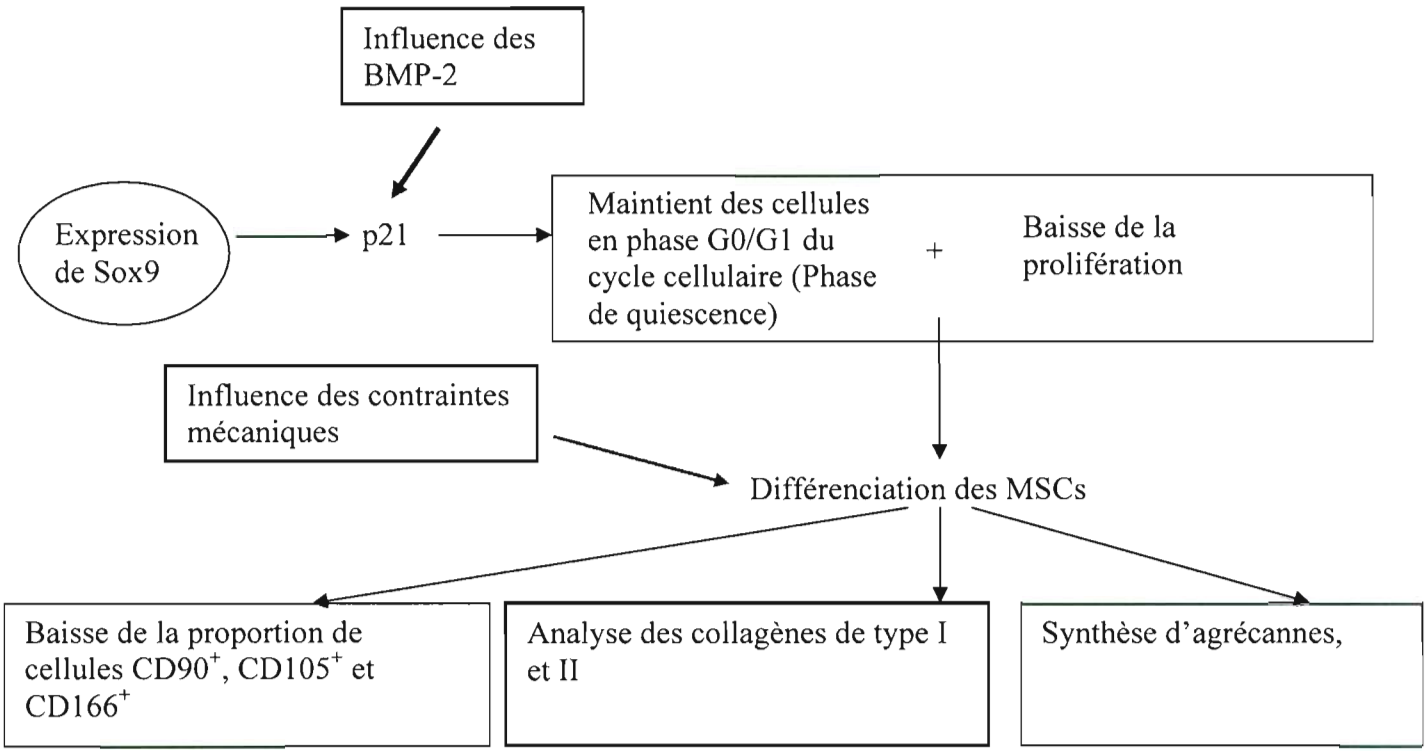


Figure IV-1 : Travaux en perspectives issus de notre étude

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Afoke NY, Byers PD, Hutton WC. Contact pressures in the human hip joint. J Bone Joint Surg Br. 1987; 69: 536-541.

Altman RD and Moskowitz R. Intraarticular sodium hyaluronate (Hyalgan) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee: a randomised clinical trial. Hyalgan Study Group J Rheumatol. 1998; 25 : 2203-2212.

Anderer U, Libera J. *In vitro* engineering of human autogenous cartilage. J Bone Miner Res 2002; 17:1420–1429.

Angele P, Yoo JU, Smith C, Mansour J, Jepsen KJ, Nerlich M, Johnstone B. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated *in vitro*. Journal of Orthopaedic Research. 2003; 21 : 451–457.

Arcucci A, Alaia V, Montagnani S, Pontarelli G, Retta SF, Tarone G, Gionti E. Altered expression of integrins in RSV-transformed chick epiphyseal chondrocytes. Biochimie. 2003; 85 : 483–492.

Arinzeh TL., Peter SJ., Archambault M.P., van den B.C., Gordon S., Kraus K., Smith A., Kadiyala S., Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defe ct. J Bone Joint Surg Am. 2003; 85-A: 1927-1935.

Atala, A. Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocyte-alginate suspension. J. Urol. 1994; 152: 641–643

Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. Biomaterials. 2004 ; 16 : 3211-3222.

Aydelotte MB, Kuettner KE. Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. Connect Tissue Res. 1988; 18: 205–222.

Bachrach NM, Valhmu WB, Stazzone E, Ratcliffe A, Lai WM, Mow VC. Changes in proteoglycan synthesis of chondrocytes in articular cartilage are associated with the time-dependent changes in their mechanical environment. J Biomech. 1995; 28:1561–1569.

Balazs EA and Denlinger JL. Viscosupplementation: a new concept in the treatment ofosteoarthritis. J Rheumatol Suppl. 1993; 39 : 3-9

Barbara NP, Wrana JL and Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth. 1999; 274(2): 584-594.

Barry F, Boynton R, Murphy M, Haynesworth S, Zaia J. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2001; 289: 519–524.

Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999; 265: 134–139.

Barry FP. Mesenchymal stem cell therapy in joint disease, Novartis Found. Symp; 2003; 249: 86-96.

Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. Blood. 1994; 84: 2554-2565.

Behrens J. Cross-regulation of the Wnt signalling pathway: a role of MAP kinases. J Cell Sci. 2000 ; Pt 6 : 911-9.

Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell 1982; 30: 215–24.

Biddulph DM, Dozier MM, Capehart AA. Inhibition of prostaglandin synthesis reduces cyclic AMP levels and inhibits chondrogenesis in cultured chick limb mesenchyme. Methods Cell Sci 2000;22:9–16.

Brighton CT, Yamaguchi T, Hunt RM, Jimenez SA. Articular cartilage preservation and storage. III. Quantitative zonal analysis of cytoplasmic components of stored versus *in vivo* articular cartilage chondrocytes. Clin Orthop. 1990; 250: 277-290.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, and Peterson L. 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, Ohlsson C, and Peterson L. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. Clin Orthop. 1996; 326 : 270-283.

Brittberg M, Peterson L, Sjogren-Jansson E, Tallheden T, Lindahl A. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. J Bone Joint Surg Am. 2003; 85 : 109–115.

Brittberg M, Sjogren-Jansson E, Lindahl A, and Peterson L. Influence of fibrin sealant (Tisseel) on osteochondral defect repair in the rabbit knee. Biomaterials. 1997; 18: 235-242.

Brown DM, Chung SH, Lantieri LA, Sampath TK, Hodge JC, Kania NM, Vannier MW and Khouri RK. Osteochondral allografts with an intramedullary muscle flap in rabbits. Clin Orthop. 1997; 334: 282-290.

Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. Bone. 1997; 21: 225–235.

Bruder SP, Ricalton NS, Boynton, RE, Connolly, TJ, Jaiswal N, Zaia J, Barry FP. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. Journal of Bone and Mineral Research. 1998; 13: 655– 663.

Buckwalter JA, Mow VC, and Ratcliffe A. Restoration of Injured or Degenerated Articular Cartilage. J Am Acad Orthop Surg. 1994; 2: 192-201.

Buckwalter JA, Rosenberg LC. Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. Electron Microsc Rev. 1998; 1 : 87-112.

Burger EH, Klein-Nulend J, Veldhuijzen JP. Modulation of osteogenesis in fetal bone rudiments by mechanical stress *in vitro*. J Biomech. 1991; 24(Suppl 1) : 101–109.

Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Hunziker EB. Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. J Cell Sci. 1995; 108 : 1497–1508.

Byth KF, Conroy LA, Howlett S, Smith AJ, May J, Alexander DR, Holmes N. CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation. J Exp Med. 1996 ; 4 :1707-1718.

Capdevila J, Johnson RL. Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning. Dev Biol. 1998; 197 : 205–217.

Caterson EJ, Li WJ, Nesti LJ, Albert T, Danielson K, Tuan RS. Polymer/alginate amalgam for cartilage-tissue engineering. Ann N Y Acad Sci. 2002 ; 961 : 134-138.

Caterson EJ, Nesti LJ, Li WJ, Danielson KG, Albert TJ, Vaccaro AR, Tuan RS: Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells seeded in polylactide/alginate amalgam. J Biomed Mater Res. 2001; 57 : 394-403.

Chamberlain JR, Schwarze U, Wang PR, Hirata RK, Hankenson KD, Pace JM, Underwood RA, Song KM, Sussman M, Byers PH, Russell DW. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. Science. 2004; 303 : 1198-1201.

Chandrasekhar S, Harvey AK. Induction of interleukin-1 receptors on chondrocytes by fibroblast growth factor: a possible mechanism for modulation of interleukin-1 activity. J Cell Physiol. 1989; 138 : 236-246.

Chang SCN, Rowley JA, Tobias G, Genes NG, Roy AK, Mooney DJ, Vacanti CA, Bonassar LJ. Injection molding of chondrocye/alginate constructs in the shape of facial implants. J Biomed Mater Res. 2001; 55 : 503–511.

Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, Demarquay C. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. J. Gene Med. 2003; 5 : 1028-1038.

Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. The Journal of Biological Chemistry. 1992; 267 : 19027–19030.

Chevalier X. Le cartilage articulaire normal de l'adulte. Cahiers d'enseignement de la sofcot. 1996 ; 57 : 55-61

Chu CR, Dounchis JS, Yoshioka M, Sah RL, Coutts RD, and Amiel D. Osteochondral repair using perichondrial cells. A 1-year study in rabbits. Clin Orthop. 1997; 340: 220-229.

Coulombel L. Cellules souches tissulaires adultes: seing is not being. Medecine/Sciences. 2003; 19 : 683-694.

Cremer MA, Ye XJ, Terato K, Griffiths MM, Watson WC, Kang AH. Immunity to type IX collagen in rodents: a study of type IX collagen for autoimmune and arthritogenic activities. Clin Exp Immunol. 1998; 112 : 375-382.

Crevensten G., Walsh AJ, Ananthakrishnan D, Page P, Wahba G.M, Lotz JC, Berven S, Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. Ann Biomed Eng. 2004; 32 : 430-434.

D'ippolito G, Diabira S, Howard GA, et al. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. J. Cell Sci. 2004; 117: 2971–2981.

D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard, GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. Journal of Bone and Mineral Research. 1999; 14: 1115–1122.

De Bari C, Dell'Accio F, and Luyten FP. Failure of *in vitro*–differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage *in vivo*, Arthritis Rheum. 2004; 1 : 142–150.

De Palma A, Mckeever C, Subin S. Process of repair of articular cartilage demonstrated by histology and autoradiography with tritiated thymidine. Clin Orthop Relat Res. 1966; 48: 229-242.

DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. Osteoarthritis Cartilage. 2000 ; 8:309–334.

Deng Y, Guo X, Yuan Q, Li S. Efficiency of adenoviral vector mediated CTLA4Ig gene delivery into mesenchymal stem cells. Chin Med J (Engl). 2003; 116 : 1649-1654.

Denker AE, Haas AR, Nicoll SB, Tuan RS. Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. Differentiation. 1999; 64 : 67–76.

Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smadindependent pathways in TGF-beta family signalling. Nature. 2003; 425 : 577–584.

Di Nino DL, Long F, Linsenmayer TF. Regulation of endochondral cartilage growth in the developing avian limb: cooperative involvement of perichondrium and periosteum. Dev Biol. 2001; 240 : 433–442.

Diaz-Romero J, Gaillard JP, Grogan SP, Nesic D, Trub T, Mainil-Varlet P. Immunophenotypic Analysis of Human Articular Chondrocytes: Changes in Surface Markers Associated With Cell Expansion in Monolayer Culture. J. Cell Physiology. 2005; 202 : 731–742.

Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol. 1999; 107 : 275–281.

Doss MX, Koehler CI, Gissel C, Hescheler J, Sachinidis A. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. J. Cell. Mol. Med. 2004; 8 : 465-473.

Dragoo JL, Samimi B, Zhu M, Hame SL, Thomas BJ, Lieberman JR, Hedrick MH, Benhaim P. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. J Bone Joint Surg Br. 2003 ; 5 : 740-747.

Draper JS, Smith K, et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 2004; 22(1) : 53-54.

Drew E, Huettner CS, Tenen DG, McNagny KM. CD34 expression by mast cells: of mice and men. Blood. 2005. 5 : 1885-1887.

D'Souza AL, Masuda K, Otten LM, Nishida Y, Knudson W, Thonar EJ. 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, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell. 1997; 89 : 747–754.

Eames BF, de la Fuente L, Helms JA. 2003. Molecular ontogeny of the skeleton. Birth Defects Res C Embryo Today 69:93–101.
Edelstein-Keshet L, Ermentrout GB. Contact response of cells can mediate morphogenetic pattern formation. Differentiation. 1990; 45 : 147–159.

Elder SH, Kumura JH, Soslowsky LJ, Lavagnino M, Goldstein SA. Effect of compressive loading on chondrocyte differentiation in agarose cultures of chick limb-bud cells. J Orthop Res. 2000; 18 : 78–86.

Elder SH. Conditioned medium of mechanically compressed chick limb bud cells promotes chondrocyte differentiation. J Orthop Sci. 2002; 7 : 538–543.

Ellison BE, Carter DR, Smith RL. Effects of variable duration intermittent hydrostatic pressure on cartilage glycosaminoglycan synthesis. Trans Orthop Res Soc. 1994; 19 : 486.

Engkvist O, and Johansson SH. Perichondrial arthroplasty. A clinical study in twenty-six patients. Scand J Plast Reconstr Surg. 1980; 14: 71-87.

Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2002 ; 2 : 763-769.

Farquhar T, Xia Y, Mann K, Bertram J, Burton-Wurster N, Jelinski L, et al. Swelling and fibronectin accumulation in articular cartilage explants after cyclical impact. J Orthop Res. 1996; 14 : 417–423.

Farquharson C, Berry JL, Mawer EB et al. Ascorbic acidinduced chondrocyte terminal differentiation: the role of the extracellular matrix and 1,25-dihydroxyvitamin D. Eur J Cell Biol. 1998; 76 : 110–118.

Felschow D, McVeigh ML, Hoehn GT. The adpater protein CrkL associates with CD34. Blood. 2001; 97 : 3768-3775.

Ficat RP, Ficat C, Gedeon P, and Toussaint JB. Spongialization: a new treatment for diseased patellae. Clin Orthop. 1979; 144: 74-83.

First NL, Thomson J. From cows stem therapies? Nat Biothechnol. 1998; 16 : 620-621.

Fischer L, Boland G,Tuan RS. Wnt signaling during BMP-2 stimulation of mesenchymal chondrogenesis. J Cell Biochem. 2002; 84 : 816–831.

Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F and Vittur F. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. Biomaterials. 2000; 21: 795-801.

Frame MC, Fincham VJ, Carragher NO, Wyke JA. V-Src's hold over actin and cell adhesions. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002; 3 : 233–245.

Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanual J, Mikos AG, Langer R: Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. J Biomed Mater Res. 1993; 27 : 11-23.

Galmiche MC, Koteliansky VE, Herve P, Charbord P. Stromal cells from human long term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle diffentiation pathway. Blood. 1993; 82 : 66-76.

Glowacki J, Trepman E, Folkman J. Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. Proc Soc Exp Biol Med. 1983; 172 : 93–98.

Goa KL and Benfield P. Hyaluronic acid. A review of ils pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and ifs therapelltic potential in joint disease and wOllnd healing. Drugs. 1994; 47 : 536-566.

Goldring MB, Kaneyuki Tsuchimochi, and Kosei Ijiri. The Control of Chondrogenesis. Journal of Cellular Biochemistry. 2006; 97:33–44.

Goldsborough MD, Tilkins ML, Price PJ et al. Serum-free culture of murine embryonic stem (ES) cells. Focus 1998;20: 8-12.

Gougos A, Letarte M. Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line. J. Immunol. 1988; 141 : 1934–1940. (A)

Gougos A, Letarte M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. J. Immunol. 1988; 141 : 1925–1933. (B)

Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. J Biomed Mater Res. 1997; 34 : 211-220.

Grande DA, Pitman ML, Peterson L, Menche D, and Klein M. The repair of experimentally produced defects in rabbit articulaI' cartilage by autologous chondrocyte transplantation, J Orthop Res. 1989; 7: 208-218.

Grande DA, Singh IJ, and Pugh J. Healing of experimentally produced les ions in articular cartilage following chondrocyte transplantation. Anat Rec. 1987; 18 : 142-148.

Griffith LG, Naughton G. Tissue Engineering. Current Challenges and Expanding Opportunities. Science. 2002; 295 : 1009-1014.

Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, et al. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004; 127 : 1293-1300.

Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. Blood. 1994; 84 : 4164-4173.

Guerrero-Esteo M, Lastres P, Letamendia A, Perez-Alvarez MJ, Langa C, Lopez LA, Fabra A, et al. Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. Eur. J. Cell Biol. 1999; 78 : 614–623.

Haas AR, Tuan RS. Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function. Differentiation. 1999; 64 : 77–89.

Hadler NM, Napier MA. Structure of hyaluronic acid in synovial fluid and its influence on the movement of solutes. Semin Arthritis Rheum. 1977; 2 :141-152.

Hall AC, Urban JPG, Gehl KA. The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage. J Orthop Res. 1991; 9 : 1–10.

Hall BK, Miyake T. 2000. All for one and one for all: Condensations and the initiation of skeletal development. Bioessays 22:138–147.

Han F, Ishiguro N, Ito T, Sakai T, and Iwata, H. Effects of sodium hyaluronate on experimental osteoarthritis in rabbit knee joints. Nagoya J Med Sci. 1999; 62 : 115-126.

Hangody L, Kish G, Karpati Z, Szerb I, and Udvarhelyi I. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report, Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 1997; 5: 262-267.

Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi L, Szigeti L, and Bely M. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. Orthopedies. 1998; 21: 751-756.

Hansbrough JF, Boyce ST, Cooper ML, Foreman TJ. Burn wound closure with cultured autologous keratinocytes and fibroblasts attached to a collagen-glycosaminoglycan substrate. JAMA. 1989; 262 : 2125–2130.

Hardingham T, Venn G. Repair of the articular cartilage after exposure to interleukin-1. Rev Prat. 1996 ; 19S : S37-S41.

Hardingham TE, Muir H. The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. Biochim Biophys Acta. 1972; 279 : 401-405.

Harmand MF, Thomasset M, Rouais F, Ducassou D. In vitro stimulation of articular chondrocyte differentiated function by 1,25-dihydroxycholecalciferol or 24R, 25-dihydroxycholecalciferol. J Cell Physiol. 1984 ; 3 : 359-365.

Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. J Cell Sci. 1994; 107 : 17–27.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. Bone. 1992; 13 : 69-80.

Hendrickson D, Nixon A, Grande D, Todhunter R, Minor R, Erb H, and Lust G. ChondrocytesJibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. J Orthop Res. 1994; 12 : 485-497.

Heng BC, Cao T, Tong GQ, Ng SC. Potential utility of cell-permeable transcription factors to direct stem cell differentiation. Stem Cells Dev. 2004 ; 5 : 460-462.

Hering TM. Regulation of chondrocyte gene expression. Front Biosci. 1999; 4 : 743-761.

Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, et al. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. Clin Chem. 2002; 48 : 1819–1827.

Hoffman LM, Kulyk WM. Alcohol promotes in vitro chondrogenesis in embryonic facial mesenchyme. Int J Dev Biol. 1999; 43 : 167–174.

Hoffmann A, Czichos S, Kaps C et al. The T-box transcription factor Brachyury mediates cartilage development in mesenchymal stem cell line C3H10T1/2. J Cell Sci. 2002; 115 : 769–781.

Holm S, Maroudas A, Urban JP, Selstam G, Nachemson A. Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism. Connect Tissue Res. 1981; 8 : 101-119.

Homminga GN, van der Linden TJ, Terwindt-Rouwenhorst EA, and Drukker J. Repair of articulaI' defects by perichondrial grafts. Experiments in the rabbit. Acta Orthop Scand. 1989; 60: 326-329.

Honda M et al. Cartilage formation by cultured chondrocytes in a new scaffold made of poly(L-lactide-epsilon-caprolactone) sponge. J. Oral Maxillofac. Surg. 2000; 58 : 767-775.

Horton W, Balakir R, Prect P et al. Association between an aggrecan polymorphic allele and bilateral hand osteoarthritis in elderly white men: data from the Baltimore longitudinal study of aging. Arthritis Rheum. 1996; 39 : 168-841.

Huang W, Lu N, Eberspaecher H, De Crombrugghe B. A new long form of c-Maf cooperates with Sox9 to activate the type II collagen gene. J Biol Chem. 2002 ; 277 : 50668–50675.

Hunziker EB. Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable. Osteoarthritis Cartilage. 1999; 7: 15-28

Hwang WS, Lee BC, Lee CK, Kang SK. Human embryonic stem cells and therapeutic cloning. J Vet Sci. 2005 ; 2 : 87-96.

Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G, Griffiths E, Krawczyk C, Richardson CD, Aitken K, Iscove N, Koretzky G, Johnson P, Liu P, Rothstein DM, Penninger JM. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. Nature. 2001. 6818 : 349-354.

Ishikawa K, Ueyama Y, Mano T, Koyama T, Suzuki K, Matsumura T. Self-setting barrier membrane for guided tissue regeneration method: initial evaluation of alginate membrane made with sodium alginate and calcium chloride aqueous solutions. J Biomed Mater Res. 1999; 47 : 111–115.

Itay S, Abramoviei A and Nevo Z. Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. Clin Orthop. 1987; 220 : 284-303.

Jakob M, Demarteau O, Schafer D, Hintermann B, Dick W, Heberer M, Martin I. Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation *in vitro*. J Cell Biochem. 2001; 81 : 368–377.

Jeanloz RW. Methyl derivatives of 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(beta-D-glucopyranosyluronic acid)-D-glucose (hyalobiouronic acid) from methylated hyaluronic acid. Carbohydr Res. 1982 ; 99:51-58.

Jinquan T, Quan S, Jacobi HH, Jing C, Millner A, Jensen B, Madsen HO, Ryder LP, Svejgaard A, Malling HJ, Skov PS, Poulsen LK. CXC chemokine receptor 3 expression on CD34 (+) hematopoietic progenitors from human cord blood induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: chemotaxis and adhesion induced by its ligands, interferon gamma-inducible protein 10 and monokine induced by interferon gamma. Blood. 2000; 4:1230-1238.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI et al. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp Cell Res. 1998; 238 : 265–272.

Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, McGonagle D. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. Arthritis Rheum. 2004 ; 3 : 817-827.

Jordan M, Otterness IG, Ng R, Gessner A, Rollinghoff M, Beuscher HU. Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist. J Immunol. 1995; 154 : 4081-4090.

Ju W, Hoffmann A, Verschueren K, Tylzanowski P, Kaps C, Gross G, Huylebroeck D. The bone morphogenetic protein 2 signaling mediator Smad1 participates predominantly in osteogenic and not in chondrogenic differentiation in mesenchymal progenitors C3H10T1/2. J Bone Miner Res. 2000; 15 : 1889–1899.

Kasahara K, Sanai Y. Functional roles of glycosphingolipids in signal transduction via lipid rafts. Glycoconj J. 2000; 17 : 153–162.

Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF. 1,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. J. Bone Min. Res. 1993; 8 : 1453–1458.

Kato Y, Iwamoto M,Koike T et al. Effect of vanadate on cartilage-matrix proteoglycan synthesis in rabbit costal chondrocyte cultures. J Cell Biol. 1987;104 : 311–319.

Kawabe N and Yoshinao M. The repair offull-thickness articular cartilage defects. Immune responses to reparative tissue formed by allogeneic growth plate chondrocyte implants. Clin Orthop. 1991; 268 : 279-293.

Kawasaki K, Ochi M, Uchio Y, Adachi N, Matsusaki M. Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. J Cell Physiol. 1999; 179 : 142-148.

Kelberine F, and Frank A. Arthroscopie treatment of osteochondrallesions of the talar dome: a retrospective study of 48 cases. Arthroscopy. 1999; 15: 77-84.

Kim YJ, Grodzinsky AJ, Plaas AH. Compression of cartilage results in differential effects on biosynthetic pathways for aggregan, link protein, and hyaluronan. Arch Biochem Biophys. 1996; 328 : 331–340.

Kim YJ, Sah RL, Grodzinsky AJ, Plaas AH, Sandy JD. Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: physical stimuli. Arch Biochem Biophys. 1994; 311 : 1–12.

Kishihara K, Penninger J, Wallace VA, Kundig TM, Kawai K, Wakeham A, Timms E, Pfeffer K, Ohashi PS, Thomas ML. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. Cell. 1993 ; 1 :143-156.

Knudson W, Loeser RF. CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. Cell. Mol. Life Sci. 2002; 59 : 36–44.

Knowltow RG, Kaltenzein PI, Moskowitz RW et al. Genetic linkage of a polymorphism in the type II collagen gene to primary osteoarthritis associated with chondrodysplasia. N Engl J Med. 1990; 32 : 526-530.

Kosher RA,Walker KH. The effect of prostaglandins on in vitro limb cartilage differentiation. Exp Cell Res. 1983; 145 : 145–153.

Kramer J, Hegert C, et al. Embryonic stem cellderived chondrogenic differentiation *in vitro*: Activation by BMP-2 and BMP-4. Mech Dev. 2000; 92 : 193–205.

Kuettner KE, Aydelotte MB, Thonar EJ. Articular cartilage matrix and structure: a minireview. J Rheumatol Suppl. 1991 ; 27 : 46-48.

Kulyk WM, Hoffman LM. Ethanol exposure stimulates cartilage differentiation by embryonic limb mesenchyme cells. Exp Cell Res. 1996 ; 223 : 290–300.

Kulyk WM, Reichert C. Staurosporine, a protein kinase inhibitor, stimulates cartilage differentiation by embryonic facial mesenchyme. J Craniofac Genet Dev Biol. 1992; 12 : 90–97.
Kulyk WM. Promotion of embryonic limb cartilage differentiation in vitro by staurosporine, a protein kinase C inhibitor. Dev Biol. 1991; 146 : 38–48.

Kuznetsov SA, Mankani MH, Robey PG. Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. Transplantation 2000;70:1780–1787.

Larsen NE, Lombard KM, Parent EG, Balazs EA. Effect of hylan on cartilage and chondrocyte cultures. J Orthop Res. 1992; 10 : 23-32.

Laurent TC, and Fraser JR. Hyaluronan. Faseb J. 1992; 6 : 2397-2404.

Lee JE, Kim KE, Kwon IC, Ahn HJ, Lee S-H, Cho H, et al. Effects of controlled-released TGF-β1 from chitosan micropheres on chondrocytes cultured in an collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold. Biomaterials. 2004; 25 : 4163–4173.

Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrugghe B. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. Osteoarthritis Cartilage. 2001; 9(Suppl A) : S69–S75.

Lefebvre V, Li P, de Crombrugghe 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.

Lequesne M, Menkes CJ. Les facteurs de l'arthrose. In: Atlas de l'arthrose, ed. Negma Laboratoires. Toussus-Le-Noble. 1995; 9-11.

Li WJ, Danielson KG, Alexander PG et al. Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly (epsilon-caprolactone) scaffolds. J Biomed Mater Res. 2003; 67 : 1105-1114.

Liechty KW, Mackenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after *in utero* transplantation in sheep. Nat. Med. 2000; 6 : 1282-1286.

Lindahl A, Brittberg M, Peterson L. Cartilage repair with chondrocytes: clinical and cellular aspects. Novartis Found Symp. 2003; 249 : 175–186.

Lindenhayn K, Perka C, Spitzer R, Heilmann H, Pommerening K, Mennicke J, Sittinger M. 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.

Lippiello L, Kaye C, Neumata T, Mankin HJ. *In vitro* metabolic response of articular cartilage segments to low levels of hydrostatic pressure. Conn Tiss Res. 1985; 13 : 99–107.

Lohmander LS, Lark MW, Sandy JD. Mechanisms of degradation of argecanes in osteoarthritic cartilage. Rev Prat. 1996 ; 6S : S11-S14.

Loughin J, Irven C, Fergusson C, Skyes B, Sibling pair analysis shows no linkage of generalized osteoarthritis to the loci encoding type II collagen, cartilage link protein or cartilage matrix protein. Br J Rheumatoi. 1994; 33 : 103-106.

Luria EA, Panasyuk AF, Friedenstein AY. Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. Transfusion. 1971; 11 : 345–349.

Lyons KM, Delot E. BMPs in Development. In: Handbook of cell signaling USA: Elsevier Science. 2003; 2 : 833–837.

Ma HL, Hung SC, Lin SY, Chen YL, Lo WH. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. J Biomed Mater Res A. 2003; 64 : 273-281.

Ma PX, Schloo B, Mooney D, Langer R. Development of biomechanical properties and morphogenesis of *in vitro* tissue engineered cartilage. J. Biomed. Mater. Res. 1995; 29 : 1587–1595.

Mackay AM, Beck SC, Murphy JM et al. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. Tissue Eng. 1998; 4 : 415–428.

Madry H, Padera R, Seidel J et al. Gene transfer of a human insulin-like growth factor I cDNA enhances tissue engineering of cartilage. Hum Gene Ther. 2002; 13 : 1621–1630.

Mahomed MN, Beaver RJ, and Gross AE. The long-term success of fresh, small fragment osteochondral allografts used for intraarticular post-traumatic defects in the knee joint. Orthopedies. 1992; 15: 1191-1199.

Mainard D and Netter P. Possibilité de reparation des lesions ostéochondrales. Cahiers d'enseignement de la Sofcot. 1997 ; 57 : 76-94.

Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. J Cell Physiol. 2000 ; 1 : 98-106.

Majumdar MK, Wang E, Morris EA. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. J Cell Physiol. 2001; 189 : 275–284.

Malfait AM, Verbruggen G, Veys EM, Lambert J, De Ridder L, Cornelissen M. Comparative and combined effects of interleukin 6, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha on proteoglycan metabolism of human articular chondrocytes cultured in agarose. J Rheumatol. 1994; 21 : 314-320.

Mallein-Gerin F, van der Rest M. La culture de chondrocytes : outil d'analyse de la différenciation et de l'organisation moléculaire du cartilage. Médecine Science. 1996; 12 : 1087-1096.

Mankin HJ, Johnson ME, Lippiello L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules. J Bone Joint Surg Am. 1981; 63 : 131-139.

Mankin HJ. Mitosis in articular cartilage of immature rabbits. A histologic, stathmokinetic (colchicine) and autoradiographic study. Clin Orthop. 1964; 34 : 170-183.

Maraudas A, Mizrahi J, Katz EP, Wachtel EJ, Soudry M. Physiochemical properties and functionnal behaviour of normal and osteoarthritic human cartilage. In: Kuettner K, Schleyerbach R, Hascall VC, Articular Cartilage Biochemistry. Third Edition. New York, Raven Press. 1986.

Marcelino J, McDevitt CA. Attachment of articular cartilage chondrocytes to the tissue form of type VI collagen. Biochim Biophys Acta. 1995; 1249 : 180-188.

Mareaeei M, Kon E, Zaffagnini S, and Visani A. Use of autologous grafts for reconstruction of osteochondral defects of the knee. Orthopedies. 1999; 22: 595-600

Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, van der Veen SW, Hollander AP, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JAN. Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. Biomaterials. 2002 ; 23 : 1511–1517.

Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA. Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined *in vivo* with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM). Biomaterials. 2000; 21 : 571-580.

Maroudas A, Bannon C. Measurement of swelling pressure in cartilage and comparison with the osmotic pressure of constituent proteoglycans.Biorheology. 1981; 18 : 619-632.

Maroudas A. Physico-chemical properties of articular cartilage. In: Freeman MAR. Adult articular cartilage. ed. London : Pitman Medical. 1979; 215-290.

Martin I, Suetterlin R, Baschong W, Heberer M, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. J. Cell. Biochem. 2001; 83 : 121–128.

Mathieu P. L'Interleukine 1: son rôle, son dosage, ses difficultés d'approche dans l'arthrose. Résultats d'une étude "pilote" avec la diacerhéine (ART 50) dans la gonarthrose. Rev Prat. 1999; S13 : S15-S18.

Menche DS, Frenkel SR, Blair B, Watnik NF, Toolan BC, Yaghoubian RS, and Pitman MI. A comparison of abrasion burr arthroplasty and subchondral drilling in the treatment of full-thickness cartilage lesions in the rabbit. Arthroscopy. 1996; 12 : 280-286.

Menche DS, Vangsness CT, Jr Pitman M Gross AE and Peterson L. The treatment of isolated articular cartilage les ions in the young individual. Instr Course Lect. 1998; 47 : 505-515.

Mian M, Beghe F, Mian E. Collagen as a pharmacological approach in wound healing. Int J Tissue React. 1992; 14: 9.

Mikhailov AT, Gorgolyuk NA. Concanavalin A induces neural tissue and cartilage in amphibian early gastrula ectoderm. Cell Differ. 1988; 22 : 145–154.

Minas T and Nehrer S. Current Concepts in the treatment of articular cartilage defects. Orthopaedics. 1997; 20: 525-538.

Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. Exp Biol Med. 2001; 6 : 507-520.

Miyamoto M, Ito H, Mukai S et al. Simultaneous stimulation of EP2 and EP4 is essential to the effect of prostaglandin E2 in chondrocyte differentiation. Osteoarthritis Cartilage. 2003; 11 : 644–652.

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.

Muir H, Hardingham T. Cartilage matrix biochemistry. Textbook of rheumatic disease (Jt, S, Ed), Livingstone, Edinbourg, Churchill. 1986; 177-198.

Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2002; 46 : 704-713.

Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI. *In vitro* differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells, Exp Cell Res. 1991; 8 : 492-503.

Nakamura K, Shirai T, Morishita S, Uchida S, Saeki-Miura K, Makishima F. p38 mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells. Exp Cell Res. 1999 ; 250 : 351-363.

Naito Y, Lowenstein JM. 5'-Nucleotidase from rat heart. Biochemistry. 1981 ; 18 : 5188-5194

Nehrer S, Spector M and Minas T. Histologie analysis of tissue after failed cartilage repair procedures. Clin Orthop. 1999; 365 : 149-162.

Nemoto O, Yamada H, Kikuchi T, Shinmei M, Obata K, Sato H, Seiki M, Shimmei M. Suppression of matrix metalloproteinase-3 synthesis by interleukin-4 in human articular chondrocytes. J Rheumatol. 1997; 24 : 1774-1779.

Nettles DL, Elder SH, Gilbert JA. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. Tissue Eng. 2002; 8 : 1009–1016.

Newman AP. Articular cartilage repair. Am J Sports Med. 1998; 26: 309-323.

Ngwa GA, Maini PK. Spatio-temporal patterns in a mechanical model for mesenchymal morphogenesis. J Math Biol. 1995; 33 : 489– 520.

Nietfeld JJ, Wilbrink B, Helle M, van Roy JL, den Otter W, Swaak AJ, Huber-Bruning O. Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage. Arthritis Rheum. 1990; 33 : 1695-1701.

Noguchi T, Oka M, Fujino M, Neo M, and Yamamuro T. Repair of osteochondral defects with grafts of cultured chondrocytes. Comparison of allografts and isografts, Clin Orthop. 1994; 302 : 251-258

Noth U, Tuli R, Osyczka AM, Danielson KG, Tuan RS. In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cells. Tissue Eng. 2002 ; 1 : 131-144.

Oberlender SA, Tuan RS. Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. Cell Adhes Commun. 1994 ; 6 : 521-537.

Oberlender SA, Tuan RS. Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. Development. 1994 ; 1 : 177-187.

Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells. 2001; 19 : 193–204.

Odriscoll SW, and Salter RB. The induction ofneochondrogenesis infree intra-articular periosteal autografts under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. J Bone Joint Surg [Am], 1984; 66: 12481257.

Ohta S, Muramatsu H, Senda T et al. Midkine is expressed during repari of bone fracture and promotes chongrogenesis. J Bone Miner Re. 1999; 14 : 1132–1144.

Oloyede A, Broom ND. A physical model for the time-dependent deformation of articular cartilage. Connect Tissue Res. 1993 ; 4 : 251-261.

Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. Annu Rev Cell Dev Biol. 2000; 16 : 191–220.

Oreffo RO, Bord S, Triffitt JT. Skeletal progenitor cells and ageing human populations. Clinical Science. 1998; 94 : 549–555.

Palmoski MP, Brandt KD. Effects of static and cyclic compressive loading on articular cartilage plugs *in vitro*. Arthritis Rheum. 1984; 27 : 675–681.

Park JK, Chang HN. Microencapsulation of microbial cells. Biotechnol Adv. 2000; 18 : 303–319.

Parker WL, Goldring MB, Philip A. Endoglin is expressed on human chondrocytes and forms a heteromeric complex with betaglycan in a ligand and type II TGF-beta receptor independent manner. J Bone Miner Res. 2003; 18 : 289–302.

Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, and Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee, Clin Orthop. 2000; 374 : 212-234.

Peyron J, Stanescu V. Cartilage articulaire normal de l'adulte. Anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. Encycl Med Chir (Paris) Appareil locomoteur. 1994; 14 : 3-10.

Pitman ML, Menche D, Song EK, Ben-Yishay A, Gilbert D, and Grande DA. The use of adhesives in chondrocyte transplantation surgery: in-vivo studies. Bull Hosp Jt Dis Orthop Inst. 1989 ; 49 : 213-220.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999; 284 : 143-147.

Pizette S, Niswander L. BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: Formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. Dev Biol. 2000; 219 : 237–249.

Ponticiello MS, Schinagl RM, Kadiyala S, Barry FP. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. J Biomed Mater Res. 2000 ; 2 : 246-255.

Poole CA. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. J Anat. 1997; 191 : 1-13.

Prockop DJ. Marrow stromas cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science. 1997; 276 : 71-74.

Radice M, Brun P, Cortivo R, Scapinelli R, Battaliard C, Abatangelo G. Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors. J Biomed Mater Res. 2000 ; 2 : 101-109.

Rédini F. Structure and regulation of articular cartilage proteoglycan expression. Pathol Biol. 2001; 49 : 364-375.

Revillion-Carette F, Desbiens X, Meunier L et al. Chondrogenesis in mouse limb buds in vitro: effects of dibutyryl cyclic AMP treatment. Differentiation. 1986; 33 : 121–129.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. Blood. 2001; 98 : 2615–2625.

Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, et al. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. J. Bone Miner. Res. 1996; 11 : 312–324.

Risbud M, Ringe J, Bhonde R, Sittinger M. *In vitro* expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: implications for engineering cartilage tissue. Cell Transplant. 2001; 10 : 755–763.

Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. Miner Electrolyte Metab. 1998; 2-3 : 111-119.

Roche S et al. Native and DPPA crosslinked collagen sponges seeded with fetal bovine epiphyseal chondrocytes used for cartilage tissue engineering. Biomaterials. 2001; 22 : 9–18.

Rodriguez A et al. Characteristics of cartilage engineered from human pediatric auricular cartilage. Plast. Reconstr. Surg. 1999; 103 : 1111–1119.

Rosier, RN and O'Keefe, RJ. Hyaluronic acid therapy. Instr Course Lect. 2000; 49 : 495-502.

Rudnicki JA, Brown AM. Inhibition of chondrogenesis by Wnt gene expression in vivo and in vitro. Dev Biol. 1997 ; 1 :104-118.

Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. Arthritis Rheum. 2005; 52 : 2521-2529.

Sams AE, and Nixon AJ. Chondrocyte-laden collagen scaffolds for resurfacing extensive articular cartilage defects. Osteoarthritis Cartilage. 1995; 3: 47-59

Sassetti C, Van Zante A, Rosen SD. Identification of endoglycan, a member of the CD34/podocalyxin family of sialomucins. J Biol Chem. 2000; 275 : 9001-9010.

Seligman GM, George E, Yablon L, Nutik G., and Cruess RL. Transplantation ofwhole knee joints in the dog. Clin Orthop. 1972; 87: 332-344.

Seradge H, Kutz JA, Kleinert HE, Lister GD, Wolff TW, and Atasoy E. Perichondrial resurfacing arthroplasty in the hand. J Hand Surg[Am]. 1984; 9: 880-886.

Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am. 1993; 75: 532-553

Shen V, Rifas L, Kohler G et al. Fetal rat chondrocytes sequentially elaborate separate growth- and differentiationpromoting peptides during their development in vitro. Endocrinology 1985;116:920–925.

Shimizu-Sato S, Huq E, Tepperman JM et al. A lightswitchable gene promoter system. Nat Biotechno.l 2002; 20: 1041–1044.

Shingu M, Isayama T, Yasutake C, Naono T, Nobunaga M, Tomari K, Horie K, Goto Y. Role of oxygen radicals and IL-6 in IL-1-dependent cartilage matrix degradation. Inflammation. 1994; 18 : 613-623.
Siebler T, Robson H, Shalet SM et al. Dexamethasone inhibits and thyroid hormone promotes differentiation of mouse chondrogenic ATDC5 cells. Bone. 2002; 31 : 457– 464.

Siegel DL. Selecting antibodies to cell-surface antigens using magnetic sorting techniques. Methods Mol Biol. 2002; 17 8: 219–226.

Silacci P, Dayer JM, Desgeorges A, Peter R, Manueddu C, Guerne PA. Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 expression in synoviocytes and chondrocytes, and block IL-1-induced collagenolytic activity. J Biol Chem. 1998; 273 : 13625-13629.

Silverman RP, Passaretti D, Huang W, Randolph MA, Yaremchuk MJ. Injectable tissueengineered cartilage using a fibrin glue polymer. Plast. Reconstr. Surg. 1999; 103 : 1809–1818.

Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. Biomaterials. 1994; 15 : 451-456.

Slagboom PE, Bijkers C, Meulrenbelt I et al. Population based association of the col2A1 gene locus with radiological osteoarthritis. Arthritis Rheum. 1996; 39 : S168-S840.

Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Croumbrugghe B, Lefebvre V. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. Dev Cell. 2001. 1 : 277–290.

Stein BE, and Rosenwasser MP. Treatment of a traumatic osteochondral defect in the thumb carpometacarpal joint with a periosteal autograji. J Hand Surg [Am]. 1999 ; 24 : 1225-1230.

Stock UA, Vacanti JP. Tissue Engineering : Current State and Prospects. Annu Rev Med. 2001; 52 : 443-451.

Stockwell RA. The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. J Anat. 1971; 109 : 411-421.

Sugaya K. Potential use of stem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases, Int. Rev. Cytol. 2003; 228 : 1-30.

Suh JK, Baek GH, Aroen A, Malin CM, Niyibizi C, Evans CH, et al. Intermittent sub-ambient interstitial hydrostatic pressure as a potential mechanical stimulator for chondrocyte metabolism. Osteoarth Cartil. 1999; 7 : 71–80.

Sui Y, Clarke T, Khillan JS. Limb bud progenitor cells induce differentiation of pluripotent embryonic stem cells into chondrogenic lineage. Differentiation. 2003; 71 : 578– 585.

Summers KL, O'Donnell JL, Hoy MS, Peart M, Dekker J, Rothwell A, Hart DN. 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.

Szirrmai JA, Van Boven-de T, Tyssons KE, Gardell S. Microchemical analysis of glycoaminoglycans, collagens, total protein and water in histological layers of nasal septum cartilage. Biochem. Biophys. Acta. 1967; 136 : 331-350.

Tada J, Omine M, Suda T, Yamaguchi N. A common signaling pathway via Syk and Lyn tyrosine kinases generated from capping of the sialomucins CD34 and CD43 in immature hematopoietic cells. Blood. 1999; 93 : 3723-3735.

Tagil M, Aspenberg P. Cartilage induction by controlled mechanical stimulation *in vivo*. J Orthop Res. 1999;17 : 200–204.

Takahashi I, Nuckolls GH, Takahashi K, Tanaka O, Semba I, Dashner R, et al. Compressive force promotes sox9, type II collagen and aggregan and inhibits IL-1b expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells. J Cell Sci. 1998; 111 : 2067–2076.

Terada N, Hamazaki T, Oka M et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. Nature. 2002; 4 : 542–545.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, et al. Science. 1998; 282 : 1145-1147.

Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. Hematol. J. 2003; 4 : 92-96.

Trivedi N, Keegan M, Steil GM, Hollister-Lock J, Hasenkamp WM, Colton CK, Bonner-Weir S, Weir GC. Islets in alginate macrobeads reverse diabetes despite minimal acute insulin secretory responses. Transplantation. 2001; 71 : 203–211.

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.

Tsonis PA. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates chondrogenesis of the chick limb bud mesenchymal cells. Dev Biol. 1991; 143 :130–134.

Tsuchiya H, Kitoh H, Sugiura F et al. Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun 2003; 301:338–343.

Tuan RS. Biology of developmental and regenerative skeletogenesis. Clin Orthop Relat Res. 2004; 427(Suppl) : S105– S117.

Tufan AC, Tuan RS. Wnt regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin-related functions. FASEB J. 2001 ; 8 : 1436-1438.

Tufan AC, Daumer KM, DeLise AM, Tuan RS. AP-1 transcription factor complex is a target of signals from both WnT-7a and N-cadherin-dependent cell-cell adhesion complex during the regulation of limb mesenchymal chondrogenesis. Exp Cell Res. 2002 ; 2 : 197-203.

Tuli R, Li WJ, Tuan RS. Current state of cartilage tissue engineering. Arthritis Res Ther. 2003; 5 : 235–238.

Tuli R, Tuli S, Nandi S et al. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and wnt signaling cross-talk. J Biol Chem. 2003; 278 : 41227-41236.

Vachon A, McIlwraith CW, Trotter GW, Norrdin RW, and Powers BE. Neochondrogenesis in free intra-articular, periosteal, and perichondrial autografts in horses. Am J Vet Res. 1989; 50: 1787-1794.

Van der Kraan PM, Vitters EL, van den Berg WB. Inhibition of proteoglycan synthesis by transforming growth factor beta in anatomically intact articular cartilage of murine patellae. Ann Rheum Dis. 1992; 51 : 643-647.

Van Kampen GPJ, Veldhuijzen JP, Kuijer R, van de Stadt RJ, Schipper CA. Cartilage response to mechanical force in highdensity chondrocyte cultures. Arthritis Rheum. 1985; 28 : 419–424.

Van Kempen LC, Nelissen JM, Degen WG, et al. Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction. J Biol Chem. 2001; 276 : 25783–25790.

Van Lent PL, Blom AB, van der Kraan P et al. Crucial role of synovial lining macrophages in the promotion of transforming growth factor beta-mediated osteophyte formation. Arthritis Rheum 2004; 50 : 103–111.

Van Osch GJ, van der Veen SW, Buma P, Verwoerd-Verhoef HL. Effect of transforming growth factor-beta on proteoglycan synthesis by chondrocytes in relation to differentiation stage and the presence of pericellular matrix. Matrix Biol. 1998; 17 : 413-424.

Van Roon JA, van Roy JL, Gmelig-Meyling FH, Lafeber FP, Bijlsma JW. Prevention and reversal of cartilage degradation in rheumatoid arthritis by interleukin-10 and interleukin-4. Arthritis Rheum. 1996; 39 : 829-835.

Verschure PJ, Van Noorden CJ, Van Marle J, Van den Berg WB. Articular cartilage destruction in experimental inflammatory arthritis : insulin-like growth factor-1 regulation of proteoglycan metabolism in chondrocytes. Histochem J. 1996; 28 : 835-857.

Vignon E, Mazières B. Le chondrocyte du cartilage adulte normal. In: Simon L et Loyau G. L'arthrose : perspectives et réalités. Ed. Masson. 1987; 21-31.

Vignon E. Le cartilage. In : Atlas de l'arthrose, ed. Negma Laboratoires. Toussus-Le-Noble; 1995 : 11-23.

Vivien D, Galera P, Lebrun E, Loyau G, Pujol JP. Differential effects of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor on the cell cycle of cultured rabbit articular chondrocytes. J Cell Physiol. 1990; 143 : 534-545.

Vogelin E, Jones NF, Lieberman JR, Baker JM, Tsingotjidou AS, Brekke JH. Prefabrication of bone by use of a vascularized periosteal flap and bone morphogenetic protein. Plastic Reconstr Surg. 2002; 109 : 190–198.

Von Bubnoff A, Cho KW. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: Pathway or network? Dev Biol. 2001; 239 : 1–14.

Wakita R, Izumi T, Itoman M. Thyroid hormone-induced chondrocyte terminal differentiation in rat femur organ culture. Cell Tissue Res. 1998; 293 : 357–364.

Waller EK, Olweus J, Lund-Johansen F, Huang S, Nguyen M, Guo GR, Terstappen L. The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. Blood. 1995 ; 9:2422-2435.

Wang W, Kirsch T. Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization. J Cell Biol. 2002; 157 : 1061-1069.

Wang WG, Lou SQ, Ju XD et al. In vitro chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells in monolayer culture: activation by transfection with TGFbeta2. Tissue Cell. 2003; 35 : 69–77.

Watanabe H, de Caestecker MP, Yamada Y. Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor-beta-induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells. J Biol Chem. 2001 ; 276 : 14466-14473.

Weissman B, Cashman DC, Santiago R. Concerted action of beta-glucuronidase and beta-acetylglucosaminidase on hyaluronodextrins. Connect Tissue Res. 1975; 3 : 7-15.

Weston AD, Rosen V, Chandraratna RA, Underhill TM, Regulation of skeletal progenitor differentiation by the BMP and retinoid signaling pathways, J Cell Biol. 2000; 148: 679–690.

Widelitz RB, Jiang TX, Murray BA et al. Adhesion molecules in skeletogenesis, II: neural cell adhesion molecules mediate precartilaginous mesenchymal condensations and enhance chondrogenesis. J Cell Physiol. 1993; 156 : 399– 411.

Wong M, Tuan RS. Nuserum, a synthetic serum replacement, supports chondrogenesis of embryonic chick limb bud mesenchymal cells in micromass culture. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1993; 29A : 917–922.

Wong M,Tuan RS. Interactive cellular modulation of chondrogenic differentiation in vitro by subpopulations of chick embryonic calvarial cells. Dev Biol. 1995;167 : 130–147.

Wozney JM. Bone morphogenetic proteins. Prog Growth Factor Res. 1989; 1 : 267–280.

Wu SF, Suzuki Y, Tanihara M, Ohnishi K, Endo K, Nishimura Y. Repair of facial nerve with alginate sponge without suturing: an experimental study in cats. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg. 2002; 36 : 135–140.

Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, et al. The chondrogenic potential of human bonemarrow- derived mesenchymal progenitor cells. J Bone Joint Surg [Am]. 1998; 80 : 1745–1757.

Yoon BS, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM. Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. Proc Natl Acad Sci USA . 2005; 102 : 5062–5067.

Biorheology 00 (2006) 1–8
IOS Press

Evaluation of hMSC cell cycle, viability and differentiation in micromass culture

Jing-Wei Yang [a,b,1], Natalia de Isla [a,1], Céline Huselstein [a], Marie-Nathalie Sarda-Kolopp [c], Na Li [a], Yin-Ping Li [a,b], Ou-Yang Jing-Ping [b], Jean-François Stoltz [a] and Assia Eljaafari [a,*]

[a] *Group Mechanics and Cell and Tissue Engineering, LEMTA UMR CNRS 7563 Faculty of Medicine, UHP Nancy 1, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

[b] *Department of pathophysiology, Medical College of Wuhan University, Wuhan 430071, China*

[c] *Immunology Laboratory, Faculty of Medicine, UHP Nancy 1, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

Abstract. Mesenchymal stem cells (MSCs) have the potential to differentiate into distinct mesenchymal tissue cells. They are easy to expand while maintaining their undifferentiated state, which suggests that these cells could be an attractive cell source for tissue engineering of cartilage. *In vitro* high density micromass culture has been widely used for chondrogenesis induction. Our objective was to investigate human MSCs cell cycle, viability and differentiation in these conditions. Therefore, to induce human MSCs chondrogenesis, micromasses were cultured in the presence of transforming growth factor-β1 in serum free medium for 21 days. Cell cycle, cell viability and cell phenotype were analyzed by flow cytometry. From day 0 to 7, the G0/G1 phase increased, whereas the S phase decreased gradually, but cell cycle phases (S, G0/G1 and G2/M) did not significantly change after day 7. Less than 10% of cells were apoptotic, but no necrosis was observed, even at day 21. We observed a decrease in CD90 and CD105 expression, from day 0 to 21. In conclusion, our results demonstrate a good viability of human MSCs in micromass culture during the whole period of culture. Moreover, micromass culture allowed human MSCs to be synchronized at the G0/G1 phase, while their phenotype suggested some degree of differentiation.

Keywords: Mesenchymal stem cell, TGF-β1, viability, cell cycle, differentiation

1. Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) have the potential to differentiate into distinct mesenchymal tissue cells, such as osteoblasts, adipocytes, chondrocytes, myoblasts and early neural progenitor cells. They are easy to expand in culture while maintaining their undifferentiated state, which suggests that these cells could be an attractive cell source for cartilage tissue engineering approaches. A number of studies has shown that bone marrow (BM) stroma-drived mesenchymal stem cells (MSCs) represent a promising candidate cell type for cartilage tissue engineering, instead of primary chondrocytes which are difficult to culture and expand [1,7].

Human MSCs can be characterized by the expression of several cell surface antigens. However, their cell surface phenotype borrows features of endothelial, epithelial, and muscle cells and do not express any specific antigen. Therefore, the combination of several monoclonal antibodies is classically used

[1] Both authors contributed equally to this work.

* Address for correspondence: Dr. Assia Eljaafari, Group Mechanics and Cell and Tissue Engineering, LEMTA UMR CNRS 7563, Faculty of Medicine, UHP Nancy 1, Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33 6 25 84 40 92; E-mail: Eljaafari@aol.com.

0006-355X/06/$17.00 © 2006 – IOS Press and the authors. All rights reserved

in an effort to characterize and isolate human MSCs. For instance, antibodies specific to Stro-1, SH2, SH3, Thy-1, VCAM and LFA-3 can be used to positively label MSC, whereas antibodies specific to hematopoietic stem cells, such as, CD45 and CD34, can be used as negative markers [5]. A recent study has shown that when human articular chondrocytes (HACs) dedifferentiate in monolayer expansion, they express CD105 and CD90 at similar levels than undifferentiated MSCs, and acquire the ability to differentiate towards various mesenchymal lineages. This suggests that modification in the expression of CD105 and CD90 may be relevant to evaluate differentiation of MSCs into chondrocytes [3].

Precartilage condensation is induced in *vivo* by a process that involves upregulation of fibronectin. MSCs accumulate in regions of increased cell–matrix interactions and initiate chondrogenesis in *vivo*. *In vitro* high density micromass culture is an assay system which mimics the first step of MSC condensation, moreover the changes in extracellular matrix composition which occur in this culture system parallel those seen in *vivo*, making this a good model to study the early steps of chondrogenesis. Therefore, micromass culture has been widely used for chondrogenesis induction and also for investigating factors and signaling events involved in chondrogenesis [8,12]. In contrast to monolayer culture and other three-dimensional culture systems in biomaterial, micromasses are very compact with very little interspace among cells. Thus, it is possible that these conditions have some effects on cell viability and activity. But few studies have investigated this possibility. Moreover, the effect of micromass culture treatment on human MSCs cell cycle has not been resolved.

Most studies on chondrogenic differentiation of human MSCs have described synthesis of aggrecan, and other components of cartilage extra-cellular matrix, such as type II collagen, link protein, fibromodulin, cartilage oligomeric matrix protein, decorin, and chondroadherin [6,10]. In our study, we were interested in monitoring viability and cell cycle of human MSCs in micromass culture, during differentiation of human MSCs into chondrocytes. Moreover, we also studied the changes in CD105 and CD90 surface markers in micromass culture during chondrogenesis, in the presence of TGF-β1.

2. Methods

2.1. Isolation and cultures of human MSCs

To isolate human MSCs, bone marrow was harvested from normal adult donors after informed consent. Human MSCs were cultured in complete culture medium (alpha minimal essential medium, (α-MEM, Gibco); 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco); 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 1 μg/ml amphotericin B (Gibco)) in 25-cm^2 flask at 37°C with 5% CO_2. Culture medium was changed every 3 to 4 days. Adherent cells were further expanded in 75 cm^2 flasks. When cells grew to 80% confluence, they were harvested with 0.25% trypsin and 1 mM EDTA for 5 minutes at 37°C, and subcultured in complete culture medium. After the fourth subculture, chondrogenesis was induced in micromass cultures.

2.2. Human MSCs identification

Cells in culture were detached using 0.25% trypsin-EDTA, stained with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE)-conjugated antibodies against CD90, CD73, CD105, CD45 and CD34 (monoclonal antibodies, BD), washed and analyzed using flow cytometry.

2.3. Micromass culture and chondrogenesis induction

Human MSCs were trypsinized, counted, tested for viability by trypan blue exclusion, and resuspended in culture medium at a density of 2.0×10^7 viable cells/ml. Micromasses were obtained by pipetting 15 μl droplets of cell suspension in the center of each well in a 24-well plastic cell culture plate [2]. The plates were placed in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. Cells were allowed to attach to plastic for 3 hours, and then they were flooded carefully with 1 ml of medium. Micromasses were cultured in a serum free medium (DMEM/F12, Gibco) containing 10 ng/ml transforming growth factor-β1, 0.1 mM L-ascorbic acid, 1 mM sodium pyruvate, 10^{-7} M dexamethasone, 0.5 mg/ml BSA, 4.7 μg/ml linoleic acid, 40 μg/ml L-proline and 1% ITS (Sigma). Medium changes were carried out twice a week up to 21 days. When appropriate, cells in micromass were isolated using 2% collagenase B (Roche) at 37°C for 30 minutes and then were used for the experiments.

2.4. Cell viability assay

Cells issued from micromass cultures were stained with the Vybrant™ Apoptosis Assay Kit #2 (Molecular Probes). Briefly, 2×10^5 cells were resuspended in 100 μl of 1× annexin-binding buffer. 5 μl of Alexa Fluor 488-annexin V, 1 μl of the 100 μg/ml PI were added to each cell suspension and incubated at room temperature for 15 minutes. After the incubation period, 400 μl of 1× annexin-binding buffer was added. Samples were mixed gently and kept on ice, and as soon as possible the stained cells were analyzed by flow cytometry (EPICS XL Coulter; Beckman-Coulter).

2.5. Cell cycle assay

Cells issued from micromass cultures were stained with the Coulter DNA-Prep Reagents Kit (Beckman Coulter). Cells were resuspended in 50 μl of DMEM W/O phenol red (Gibco), and 50 μl DNA-Prep LPR was added. Samples were agitated for 30–60 seconds. Then cells were stained with DNA-Prep stain and agitated for 30–60 seconds. Cells were kept at 4°C until analyzed stained cells by flow cytometry (EPICS XL Coulter; Beckman-Coulter). Data analysis was performed with Dean and Jett model Multi Cycle AV (Phoenix Flow System, San Diego, USA).

2.6. Phenotypic analysis

After harvesting the cells and preparing a single cell suspension (2×10^5 cells per 200 μl DMEM W/O phenol red (Gibco) supplemented with 0.4% bovine serum albumin (BSA; Sigma)), cells were stained at 4°C for 45 minutes with CD105 (monoclonal antibody; Ancell), and CD90 (monoclonal antibody, R&D). Cells were then washed 3 times in DMEM W/O phenol red and cell pellets were resuspended in DMEM W/O phenol red supplemented with 0.4% BSA, cells were stained at room temperature for 45 minutes with Alexa-488 (Molecular Probes) in the dark. Cells were then washed 3 times in DMEM W/O phenol red and cell pellets were resuspended in 4% PBS-paraformaldehyde. Cells were kept at 4°C before analysis by flow cytometry (EPICS XL Coulter; Beckman-Coulter).

For each surface marker, percentage of positive cells and the level of marker expression were calculated. The level of marker expression was calculated as the difference between geometric mean fluorescence intensity (MFI) of sample cells and that of isotype control. Quantitative expression of number of CD105 and CD90 per cell was daily calculated by using Qifikit® beads (Becton Dickinson).

3. Results

3.1. Cell viability

High density human MSCs were pipetted into micromass and then differentiated in serum-free medium in the presence of TGF-β1. Cell viability was detected by Vybrant™ Apoptosis Assay Kit #2. With this assay, apoptotic cells show green fluorescence, dead cells show red and green fluorescence, and live cells show little or no fluorescence. The cell viability assay indicated that among the cells obtained from micromasses, less than 10% cells were apoptotic, throughout the whole period of cultures. No significant necrosis was observed, even at day 21 (Fig. 1).

3.2. Cell cycle

The cell cycle transition from the G0/G1 phase to the S phase indicated cell proliferation. Flow cytometry analysis of propidium iodide-stained cells in micromass demonstrated that the percentage of cells in the G0/G1 phase increased from 84.1% at day 1 to 91.8% at day 7. In contrast, the percentage of cells in the S phase decreased from 14.3% at day 1 to 6.3% at day 7 (Fig. 2). However, cell cycle phases (S, G0/G1 and G2/M) did not significantly change after day 7, until day 21 (Fig. 2). These results suggest that proliferation of cells in micromasses decreased during the first week, and then was maintained until day 21.

3.3. Phenotypic analysis of cell surface markers

For phenotypic characterization of human MSCs, cell surface phenotypic analysis was performed and cells were analyzed using different cell surface markers. Phenotypic characterization of human MSCs showed, as expected, that human MSCs were positive for CD90, CD73 and CD105, but negative for CD45 and CD34 (Fig. 3).

In order to assess the differentiation status of human MSCs in micromass culture with TGF-β1, the levels of expression of CD105 and CD90 were measured by flow cytometry at different time points. Our results showed that the percentage of CD105 positive cells significantly decreased from day 1 to day 7, and did not change significantly after day 7. Starting from day 1, the percentage of CD90 positive cells continuously decreased until day 21. Moreover the quantitative expression of CD105 and CD90

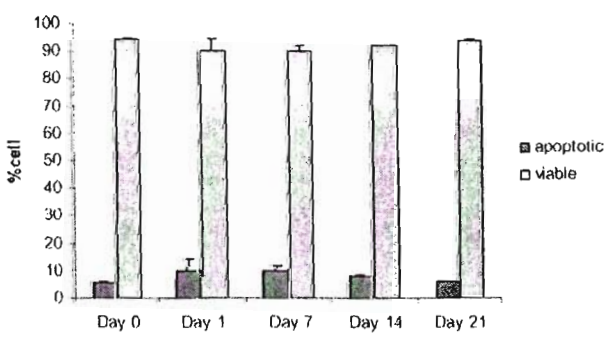


Fig. 1. Cell viability of human MSCs was analyzed by flow cytometry during the whole period of micromass culture. Among the cells, and throughout cultures, less than 10% of cells were apoptotic. The remaining cells were viable, and no necrosis was observed, even at day 21. Results are means ± SD of 3 different experiments.

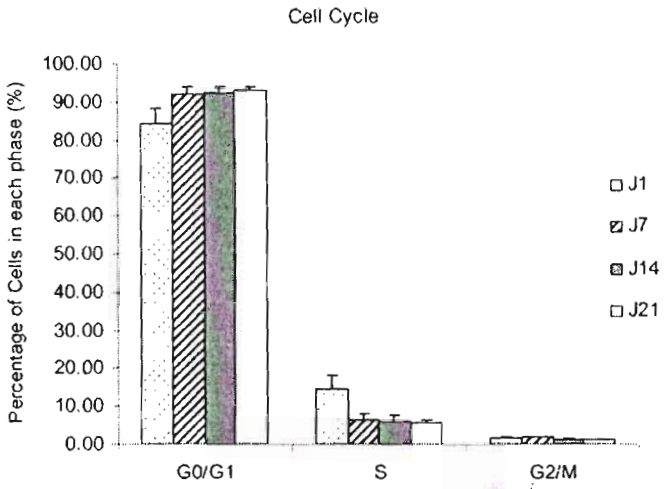


Fig. 2. Cell cycle analyse of human MSCs in micromass culture. The percentage of cells in each phase of the cell cycle was analyzed by flow cytometry. Results are means ± SD of 3 different experiments. The percentage of cells in the G0/G1 phase increased from day 1 to day 7. In contrast, the percentage of cells in the S phase decreased. However, cell cycle phases (S, G0/G1 and G2/M) didn't change significantly after day 7 till day 21.

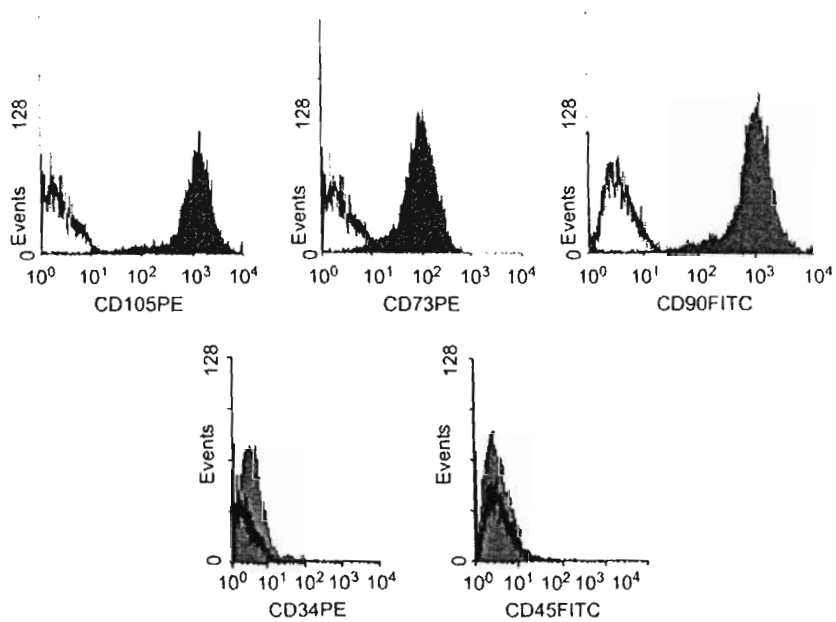


Fig. 3. Flow cytometric analyses of adhesion molecule surface expression of human MSCs. Cells were labelled with monoclonal antibodies specific for molecules indicated in each flow cytometric histogram. FACSort using Cell-Quest software analyzed labeled cells. Open and filles areas in each histogram represent cells labeled with isotype-matched Ig and specific monoclonal antibodies, respectively. The profiles are representative of human MSCs labeled from at least 10 donors.

SCD-UHP - NANCY BIBLIOTHÈQUE MÉDECINE

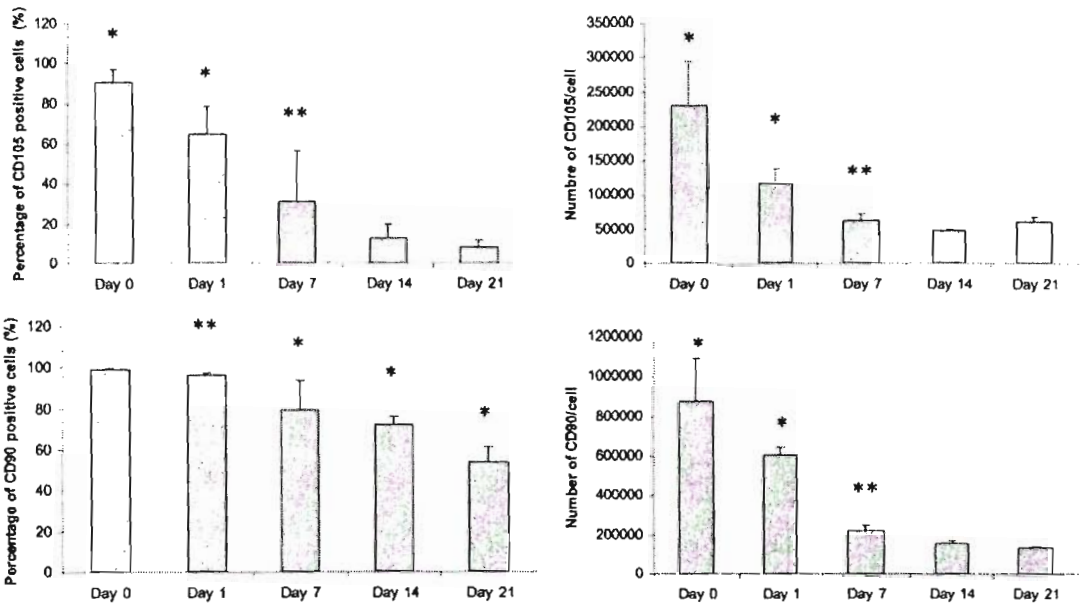


Fig. 4. Expression of CD105 and CD90 of human MSCs in micromass culture. The percentage of positive cells and the quantitative expression of number of CD105 and CD90 per cell at each time of culture were analyzed by flow cytometry. Results are presented as the mean ± SD of 3 different experiments. The groups marked with * were compared with the other groups, $p < 0.05$; The groups marked with ** were compared with the groups marked *, $p < 0.05$.

decreased significantly from day 1 to day 7, but did not change significantly after day 7. Thus these results strongly suggest a certain degree of human MSCs differentiation (Fig. 4).

4. Discussion

MSCs are multi-potential cells that can differentiate into bone, cartilage, fat, muscle, bone marrow stroma, and other tissue types when induced by the appropriate biological approach *in vitro*. Chondrogenesis of embryonic mesenchymal stem cells follows several steps beginning with a mesenchymal cell condensation phase during which mesenchymal cells aggregate at high density in the pre-cartilage core. Cell–cell interaction mediated by N-cadherin is an important regulator of this critical cellular condensation step, which precedes the appearance of chondrocytes that produce cartilage-specific extracellular matrix proteins, such as type II collagen and sulfated proteoglycan. In our study to induce chondrogenic differentiation, MSCs were cultured at high density in a three-dimensional environment, in order to enhance cell–cell interactions favorable for chondrogenesis, similar to embryonic mesenchymal cells that undergo chondrogenesis.

The G0 phase is a specific stem-cell phase that allows them to retain their ability to engraft when they reenter the cell cycle secondary of a stimulus [13]. The transition of cells from G0 phase into G1 phase is related to cell fate, such as differentiation, proliferation or apoptosis. Following stimulation with mitotic signal, stem cells move from the G0 to the G1 stage, otherwise, cells undergo differentiation or apoptosis. In our study, cell cycle results showed that the percentage of G0/G1 cell increased from Day 1 to Day 7, and was maintained at 90% until day 21. Analysis of the cell cycle showed that cell

proliferation was very low during the whole period of culture. There are two possible explanations for this low cell proliferation. First, high density culture may have a deleterious effect on the growth of human MSCs, and induce apoptosis or necrosis. Second, a large percentage of human MSCs in the G0 phase is in a quiescent state, in which cells demonstrate weak metabolism. Our results showed that viability of mesenchymal stem cells in micromass culture was maintained during the whole period of culture, and less than 10% of cells were apoptotic with no appearance of necrosis. Therefore, these results suggest that human MSCs in micromass culture were in a quiescent state with low level of proliferation in the presence of TGF-β1.

Endoglin/CD105, an accessory receptor of the transforming growth factor-β (TGF-β) receptor complex, has been recently found on chondrocytes. Members of the TGF-β superfamily are mediators of cell proliferation and differentiation and play regulatory roles in cartilage and bone formation [9,4]. CD90/Thy-1 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored glycoprotein previously reported on a minority of chondrocytes in normal articular cartilage [11]. However, the biological role of CD90 remains enigmatic. A recent study showed that the expression of CD105 and CD90 is upregulated in chondrocyte monolayer culture, and that this upregulation is correlated with the dedifferentiation of chondrocyte towards various mesenchymal lineages. In contrast, endoglin/CD105 and CD90/Thy-1 are lost when MSC differentiation is activated. In our study we analyzed the coexpression of CD105 and CD90 to evaluate human MSCs differentiation status. Results showed that the decrease in CD90 and CD105 expression started as soon as day 1, and gradually decreased up to day 21, assessing thus the differentiation of human MSCs. In conclusion, our results demonstrate a good viability of human MSCs in micromass culture during the whole period of culture. Moreover, human MSCs remained in a resting state while their phenotype suggested to us some degree of differentiation.

References

[1] F.P. Barry and J.M. Murphy, Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization, *Review, Int. J. Biochemistry Cell. Biology* **36** (2004), 568–584.

[2] C. De Bari, F. Dell'Accio and F.P. Luyten, Failure of *in vitro*–differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage *in vivo*. *Arthritis & Rheumatism* **1** (2004), 142–150.

[3] J. Diaz-Romero, J.P. Gaillard, S.P. Grogan, D. Nesic, T. Trub and P. Mainil-Varlet, Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: Changes in surface markers associated with cell expansion in monolayer culture, *J. Cell Physiology* **202** (2005), 731–742

[4] M. Jakob, O. Demarteau, D. Schafer, B. Hintermann, W. Dick, M. Heberer and I. Martin, Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation *in vitro*, *J. Cell. Biochem.* **81**(2) (2001), 368–377.

[5] E.A. Jones, S.E. Kinsey, A English, R.A. Jones, L. Straszynski, D.M. Meredith, A.F. Markham, J. Andrew, P. Emery and D. McGonagle, Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells, *Arthritis & Rheumatism* **12** (2002), 3349–3360.

[6] K.W. Kavalkovich, R.E. Boynton, J.M. Murphy and F. Barry, Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells within an alginate layer culture system, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **9** (2002), 457–466.

[7] J.J. Minguell, A. Erices and P. Conget, Mesenchymal stem cells, *Exp. Biol. Med.* **6** (2001), 507–520.

[8] H. Nakahara, J.E. Dennis, S.P. Bruder, S.E. Haynesworth, D.P. Lennon and A.I. Caplan, *In vitro* differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells, *Exp. Cell Res.* **8** (1991), 492–503.

[9] W.L. Parker, M.B. Goldring and A. Philip, Endoglin is expressed on human chondrocytes and forms a heteromeric complex with betaglycan in a ligand and type II TGFbeta receptor independent manner, *J. Bone Miner. Res.* **2** (2003), 289–302.

[10] I. Sekiya, J.T. Vuoristo, B.L. Larson and D.J. Prockop, *In vitro* cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis, *PNAS* **99** (2002), 4397–4402.

[11] K.L. Summers, J.L. O'Donnell, M.S. Hoy, M. Peart, J. Dekker, A. Rothwell and D.N. Hart, Monocyte-macrophage antigen expression on chondrocytes, *J. Rheumatol.* **7** (1995), 1326–1334.

[12] A.D. Weston, V. Rosen, R.A. Chandraratna and T.M. Underhill, Regulation of skeletal progenitor differentiation by the BMP and retinoid signaling pathways, *J. Cell Biol.* **148** (2000), 679–690.
[13] I. Wilmut, A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind and K.H.S. Campbell, Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature* **385** (1997), 810–813.

Nom : **Mademoiselle YANG**

Prénom : **Jingwei**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en **BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT**

Spécialité : **BIOINGÉNIERIE**

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N° 1224

Nancy, le 12 septembre 2006

Le Président de l'Université

Jean-Pierre FINANCE

RESUME

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la reconstruction d'un tissu cartilagineux à partir de cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMs).

Une fois les cellules identifiées comme étant des cellules souches mésenchymateuses et non des cellules souches hématopoïétiques ($CD34^-/CD45^-/CD105^+/CD166^+/CD90^+/CD73^+$), nous avons placé ces CSMs dans un concept de culture 3D, les micromasses, et nous avons contrôlé leur phénotype en fonction du temps de culture, par des mesures en cytométrie en flux. Les marqueurs mésenchymateux classiques (CD105, CD166 et CD90) ont ainsi été suivis pendant 21 jours. Après avoir initié la différenciation des CSMs par ce type de culture 3D et l'ajout d'un milieu approprié (TGF-β1 à 10ng/ml), nous avons effectué une étude cinétique de la modification de leur phénotype, ainsi qu'un contrôle de leurs activités métaboliques et de prolifération. En effet, nous avons pu observer la diminution des marqueurs phénotypiques propres aux CSMs et l'apparition d'une matrice extracellulaire. De plus, nous avons mis en évidence une baisse de leur activité de prolifération par l'étude du cycle cellulaire.

Nous avons, dans la seconde partie de nos travaux, défini les conditions de culture dans un biomatériau pouvant être utilisé dans les travaux d'ingénierie tissulaire du cartilage (i.e. gel d'alginate). Différentes viscosités et concentrations du biomatériau ont été testées et les paramètres de toxicité cellulaire et de prolifération cellulaire ont été déterminés. Nous avons ainsi pu définir les conditions d'études qui seront appliquées à l'avenir pour les tests en ingénierie tissulaire du cartilage, notamment pour les travaux sous l'effet de contraintes mécaniques.

Mot clé : cellules souches mésenchymateuses, différenciation, modèles de culture 3D, ingénierie tissulaire du cartilage

ABSTRACT

In this study, we were interested in the reconstruction of cartilage tissue based on human mesenchymal stem cells (hMSCs). These cells were characterized by phenotype analysis ($CD 34^-/CD45^-/CD105^+/CD166^+/CD90^+/CD73^+$), then they were pipetted in 3D culture, micromass. We analyzed the typical mesenchymal markers (CD105, CD166 and CD90) by flow cytometry along 21 days of culture. The differentiation of hMSCs was induced in micromass cultures with a serum-free medium containing TGF-β1 (10ng/ml). We investigated the modification of cell phenotype, analyzed metabolic activity and proliferation. Our experimental results showed a decrease of hMSCs phenotype markers and appearance of extracellular matrix. Furthermore, the analysis of cell cycle revealed a decrease of proliferation activity.

We have also defined, in the second part of our study, the culture conditions of a biomaterial (alginate gel) used in cartilage tissue engineering. Different viscosities and concentrations of the biomaterial were monitored. Cell toxicity and cell proliferation were determined. These results allowed us to define the experimental condition that will be used in future cartilage tissue engineering study, namely in the effect of mechanical compression.

Key words : mesenchymal stem cell, differentiation, 3D culture model, cartilage tissue engineering

---

Spécialité : Bioingénierie

Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire

Equipe LEMTA-UMR 7563, CNRS/INPL/UHP et UFR 111 Bioingénierie

Faculté de médecine de Nancy, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex