



**HAL**  
open science

## Bioingénierie du cartilage et arthrose expérimentale

Laurent Galois

► **To cite this version:**

Laurent Galois. Bioingénierie du cartilage et arthrose expérimentale. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2003. Français. NNT : 2003NAN11315 . tel-01748360

**HAL Id: tel-01748360**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748360v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

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

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

**UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I - 2003  
FACULTE DE MEDECINE**

*ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTE ET ENVIRONNEMENT »*

13 JAN. 2004



**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le

**18 décembre 2003**

Pour obtenir le grade de

***DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I***

*Discipline : Bioingénierie*

Par

***Laurent GALOIS***

**BIOINGENIERIE DU CARTILAGE ET ARTHROSE  
EXPERIMENTALE**

**JURY**

**Rapporteurs**

M. Charles BAQUEY  
M. Philippe HERNIGOU

Directeur de Recherche  
Professeur

**Examineurs**

M. Pierre GILLET  
M. Didier MAINARD  
M. Daniel HERBAGE

Professeur, Directeur de Thèse  
Professeur, Co-Directeur de Thèse  
Directeur de Recherche

Le travail présenté dans cette thèse a été effectué au sein de l'équipe "Imagerie et Biomatériaux Articulaires, Ingénierie Tissulaire" de l'UMR 7561 CNRS-UHP « Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires » Faculté de Médecine (Nancy I).

Je remercie Monsieur le Professeur Patrick **NETTER**, Directeur de l'UMR, pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire et son soutien tout au long de ma thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Pierre **GILLET** pour son aide précieuse, son soutien, sa disponibilité et son encadrement tout au long de ces années.

J'exprime ma profonde gratitude et mon profond respect à Monsieur le Professeur Didier **MAINARD** pour la confiance qu'il m'accorde et le soutien qu'il m'apporte depuis près de 10 ans. Je le remercie pour la rigueur de son encadrement dans les activités de soins, d'enseignement et de recherche ainsi que pour ses nombreux conseils.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Daniel **HERBAGE** pour son hospitalité au sein de l'unité « Cartilage et Biomatériaux » qu'il dirige à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines de Lyon. L'année passée dans son unité dans le cadre de la mobilité hospitalo-universitaire a été très enrichissante sur le plan scientifique et sur le plan humain.

Je remercie également toute son équipe en particulier Madame le Docteur Anne-Marie **FREYRIA** pour sa gentillesse et sa disponibilité, Marie-Claire **RONZIERE** pour ses nombreux conseils et Monsieur le Docteur Frédéric **MALLEIN-GERIN** pour sa rigueur scientifique.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Messieurs Charles **BAQUEY** et Philippe **HERNIGOU** d'avoir accepté de juger ce travail. Leurs travaux font autorité dans leurs domaines respectifs et leur jugement sur ce travail sera particulièrement apprécié.

Je remercie tout particulièrement Stéphanie **ETIENNE** pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses nombreux conseils ainsi qu'Astrid **WATRIN-PINZANO** pour son aide précieuse dans la rédaction et la mise en forme de ce travail.

Je remercie également Christel **COURNIL** et Laurent **GROSSIN** pour leur collaboration quotidienne et leur sympathie ainsi que l'ensemble de l'équipe de l'UMR 7561.

Je remercie Madame le Docteur Elisabeth **PAYAN** pour ses conseils, Madame le Professeur Edith **DELLACHERIE** et Monsieur le Docteur Patrick **HUBERT** pour leur collaboration.

Je remercie mes collègues et amis Régis **TRAVERSARI**, Frédéric **PFEFFER** et Damien **GIRARD** pour leur collaboration quotidienne dans le service.

Je remercie enfin l'**Association des Chefs de Service du Centre Hospitalier Universitaire de Nancy** pour son soutien logistique au cours de mon stage effectué à Lyon.

*A mes parents, qui m'ont donné le goût du travail, pour leur soutien et leur amour*

*à Katie, pour son amour et sa patience*

*à mes enfants Pierre et Emilie, qu'ils me pardonnent mes absences*

*Je dédie cette thèse. Qu'ils voient en ce travail une récompense de leur soutien et de leur amour.*

## **Travaux publiés**

## **Publications dans des revues internationales à comité de lecture**

**Moderate impact exercise is associated with a decrease severity of experimental rat OA.**  
L. GALOIS, S. ETIENNE, L. GROSSIN, C. COURNIL, A. PINZANO, P. NETTER, D. MAINARD, P. GILLET.  
*Rheumatology (Oxford)* 2003, 42, 692-3.

**Cartilage repair: surgical techniques and tissue engineering using polysaccharide- and collagen-based biomaterials.**  
L. GALOIS, AM. FREYRIA, L. GROSSIN, P. HUBERT, D. MAINARD, D. HERBAGE, JF. STOLTZ, P. NETTER, E. DELLACHERIE, E. PAYAN.  
*Biorheology (sous presse)*

**Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats.**  
L. GALOIS, S. ETIENNE, L. GROSSIN, A. WATRIN-PINZANO, C. COURNIL-HENRIONNET, D. LOEUILLE, P. NETTER, D. MAINARD, P. GILLET.  
*Osteoarthritis and Cartilage (soumis)*

## **Communications affichées avec actes publiés**

**Moderate impact exercise is associated with a decrease severity of experimental rat OA.**  
L. GALOIS, S. ETIENNE, L. GROSSIN, C. COURNIL, A. PINZANO, P. NETTER, D. MAINARD, P. GILLET.  
*Arthritis and Rheumatism* 2002, 46(9 suppl), S33-677.

**Effet chondroprotecteur d'une activité physique modérée lors du modèle d'arthrose expérimentale induite par section du ligament croisé antérieur chez le rat**  
L. GALOIS, S. ETIENNE, L. GROSSIN, C. COURNIL, P. NETTER, D. MAINARD, P. GILLET.  
*Rev Chir Orthop* 2002, 88, (6 suppl), Résumé n°63.

## **Communications orales**

**Cultures de chondrocytes en gel de collagène. Application à la bioingénierie du cartilage.**  
L. GALOIS, S. HUTASSE, M.C. RONZIERE, D. HERBAGE, A.M. FREYRIA. 8èmes Journées Internationales des Biomateriaux de l'I.E.B.M. Nancy, 26-27 septembre 2002.

**Cultures de chondrocytes en gel de collagène. Application à la bioingénierie du cartilage.**  
L. GALOIS, S. HUTASSE, M.C. RONZIERE, D. HERBAGE, A.M. FREYRIA. Réunion du GESTO. Cannes, 18-19 octobre 2002.

**Effet chondroprotecteur d'une activité physique modérée lors du modèle d'arthrose expérimentale induite par section du ligament croisé antérieur chez le rat**  
L. GALOIS, S. ETIENNE, L. GROSSIN, C. COURNIL, P. NETTER, D. MAINARD, P. GILLET. 77<sup>ème</sup> réunion annuelle de la SOFCOT. Paris, 12-15 novembre 2002.

**Fabrication d'un néocartilage in vitro par la culture en 3 dimensions de chondrocytes au sein de gels de collagène.**

**L. GALOIS, S. HUTASSE, M.C. RONZIERE, D. MAINARD, D. HERBAGE, A.M. FREYRIA.** 78<sup>ème</sup> réunion annuelle de la SOFCOT. *Paris, 10-14 novembre 2003.*

## **Ouvrage**

**Cultures de chondrocytes en gel de collagène. Application à la bioingénierie du cartilage.**

**L. GALOIS, S. HUTASSE, M.C. RONZIERE, D. HERBAGE, A.M. FREYRIA**

**Actualités en Biomatériaux, Sous la Direction de D. Mainard, Volume VII, Editions Romillat, Paris (sous presse).**

## **Liste des abréviations**

ACI : Autologous chondrocyte implantation  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
AINS : Anti-inflammatoire non-stéroïdien  
ARN : Acide ribonucléique  
ATP : Adénosine triphosphate  
BET : Bromure d'éthidium  
BMP : Bone morphogenic protein  
BSA : Albumine sérique bovine  
BT : Bleu de toluidine  
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité  
CNAM : Caisse nationale d'assurance maladie  
Col : Collagène  
COMP : Cartilage oligomeric matrix protein  
Cox-1 : Cyclo-oxygénase 1  
Cox-2 : Cyclo-oxygénase 2  
DAB : Diaminobenzidine  
DMMB : Diméthylméthylène blue  
DPPA : Diphenylphosphorylazide  
DTT : Dithiothreitol  
FGF: Fibroblast growth factor  
GAGs : Glycosaminoglycannes  
HA : Acide hyaluronique  
HES : Hématoxyline éosine safran  
Hsp : Protéine de choc thermique  
ICE : Interleukine-1 beta converting enzyme  
ICRS : International Cartilage Repair Society  
IGF : Insulin growth factor  
IKDC : International knee documentation committee  
IL-1 : Interleukine-1  
iNOS : Nitric oxide synthase inductible  
IRM : Imagerie par résonance magnétique  
LCA : Ligament croisé antérieur  
MEC : Matrice extracellulaire  
MG 132 : Proteasome inhibitor carbobenzoxyl-leucinyll-leucinyll-leucinal  
MIA: Mono-iodoacetate  
MMP : Matrix metalloprotease  
NO : Monoxyde d'azote  
OA : Arthrose  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
PBS : Phosphate buffer saline  
PCR : Polymerase chain reaction  
PGA : Acide polyglycolique  
PGE2 : Prostaglandine E2  
PLA : Acide polylactique  
PLa : Phospholipase A  
PNC : Protéines non collagéniques  
PTHrP : Parathyroid hormone related protein  
RDO : Rapide decalcifiant osseux  
RNase : Ribonucléase  
RS : Rouge Sirius

RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction

SFA : Société française d'arthroscopie

TGF $\beta$  : Tumor growth factor bêta

TLCA : Transection du ligament croisé antérieur

TNF $\alpha$  : Tumor necrosis factor alpha

WOMAC : Western Ontario and McMasters University Osteoarthritis Index

# **Table des matières**

<b>I- INTRODUCTION</b> .....	<b>13</b>
<b>II- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>18</b>
<b>A- LE CARTILAGE</b> .....	<b>19</b>
A.1- Le cartilage articulaire.....	19
A.1.1- Composition biochimique du cartilage.....	19
A.1.1.1- Les chondrocytes.....	19
A.1.1.2- La matrice extracellulaire.....	20
A.1.2- Aspect morphologique.....	24
A.2- Le fibrocartilage.....	25
A.3- Le cartilage élastique.....	25
A.4- Physiologie du cartilage.....	26
A.4.1- Métabolisme chondrocytaire.....	26
A.4.2- Nutrition.....	27
A.4.3- Mécanique.....	28
A.4.4- Les contraintes de glissement.....	29
A.5- Le liquide synovial.....	30
A.6- La membrane synoviale.....	30
<b>B- L'ARTHROSE</b> .....	<b>32</b>
B.1- Définition.....	32
B.2- Diagnostic positif.....	32
B.3- Physiopathologie de l'arthrose.....	34
B.4- L'apoptose chondrocytaire dans l'arthrose.....	35
B.4.1- Définition de l'apoptose.....	35
B.4.2- Apoptose et arthrose.....	37
B.5- Les protéines de choc thermique.....	38
B.5.1- Généralités.....	38
B.5.2- La protéine Hsp70.....	39
B.5.3- Hsp70 et apoptose.....	40
B.6- MG 132 et induction d'Hsp 70.....	40
B.6.1- Définition.....	40
B.6.2- Inhibiteurs du protéasome, apoptose et induction d'Hsp.....	40
B.7- Exercice et arthrose.....	41
B.8- Thérapie génique et arthrose.....	43
B.9- Indications thérapeutiques actuelles.....	45
<b>C- TRAITEMENTS DES LESIONS ARTHROSQUES DIFFUSES</b> .....	<b>46</b>
C.1- Antalgiques.....	46
C.2- Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	46
C.3- Injections intra-articulaires de corticostéroïdes.....	47
C.4- Traitements symptomatiques d'effet retardé ou prolongé.....	47
C.5- La viscosupplémentation.....	47
C.6- La rééducation.....	50
<b>D- TRAITEMENTS DES LESIONS LOCALISEES</b> .....	<b>52</b>
D.1- Evaluation des lésions cartilagineuses.....	52
D.2- Techniques chirurgicales.....	55
D.2.1- Techniques dépourvues d'effet biologique spécifique.....	56
D.2.2- Techniques avec action biologique spécifique.....	58
D.2.2.1- Les autogreffes ostéocondrales en mosaïque.....	58
D.2.2.2- Les autogreffes de périchondre et de périoste.....	59
D.2.2.3- Les allogreffes cartilagineuses.....	60
D.3- Ingénierie cellulaire et tissulaire.....	60
D.3.1- Culture de chondrocytes autologues.....	60
D.3.2- Ingénierie tissulaire.....	62
D.4- Indications chirurgicales actuelles.....	66
<b>E- LES MODELES D'ARTHROSE EXPERIMENTALE</b> .....	<b>68</b>

E.1- Le modèle structural .....	70
E.2- Le modèle mécanique.....	71
<b>III- TRAVAUX REALISES .....</b>	<b>73</b>
<b>A- MODELE D'ARTHOSE EXPERIMENTALE PAR SECTION DU LIGAMENT CROISE ANTERIEUR : CARACTERISATION ET INFLUENCE DE L'EXERCICE PHYSIQUE ...</b>	<b>74</b>
A.1-Section du ligament croisé antérieur et exercice calibré .....	75
A.1.1- Objectifs .....	75
A.1.2- Matériels et méthodes.....	76
A.1.2.1- Animaux .....	76
A.1.2.2- Section du ligament croisé antérieur.....	76
A.1.2.3- Effort calibré.....	77
A.1.2.4- Histologie .....	78
A.1.2.5- Immunohistochimie .....	80
A.1.3- Résultats .....	81
A.1.3.1- Caractérisation du modèle de section du ligament croisé antérieur.....	81
A.1.3.2- Influence de l'exercice physique .....	85
A.1.4- Discussion .....	90
A.1.5- Conclusion .....	92
<b>B-INGENIERIE TISSULAIRE, BIOMATERIAUX ET LESIONS DU CARTILAGE.....</b>	<b>93</b>
B.1- Influence de l'injection intra-articulaire de MG 132 .....	94
B.1.1- Objectifs .....	94
B.1.2- Matériels et méthodes.....	94
B.1.3- Résultats .....	95
B.1.3.1- Optimisation de l'induction d'Hsp70 par le MG132 .....	95
B.1.3.2- Evaluation histologique du potentiel protecteur du MG132 sur le modèle de section du LCA .....	95
B.1.4- Discussion.....	98
B.1.5- Conclusion.....	99
B.2- Influence de l'injection intra-articulaire de hyaluronate de sodium dans le modèle de section du LCA .....	99
B.2.1- Objectifs .....	99
B.2.2- Matériels et méthodes.....	99
B.2.3- Résultats .....	100
B.2.4- Discussion.....	103
B.3- Synthèse <i>in vitro</i> d'un néo-cartilage par ingénierie tissulaire en vue de réparation de lésions ostéochondrales localisées.....	107
B.3.1- Objectifs .....	107
B.3.2- Matériels et Méthodes .....	107
B.3.2.1- Extraction des chondrocytes primaires .....	107
B.3.2.2- Les gels de collagène .....	108
B.3.2.3- Techniques de cultures cellulaires .....	108
B.3.2.4- Etude de la prolifération cellulaire dans les gels de collagène.....	109
B.3.2.5- Etude de la synthèse de matrice extra cellulaire dans les gels de collagène .....	109
B.3.3- Résultats .....	113
B.3.3.1- RT-PCR .....	113
B.3.3.2- Prolifération .....	113
B.3.3.3- Synthèse des GAG .....	114
B.3.3.4- Histologie.....	114
B.3.3.5- Immunohistochimie .....	115
B.3.4- Discussion.....	116
B.3.5- Conclusion .....	117
<b>IV- DISCUSSION .....</b>	<b>119</b>
<b>V- CONCLUSIONS et PERSPECTIVES .....</b>	<b>123</b>
<b>VI- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>125</b>

## **I- INTRODUCTION**

Défi de ce début de siècle, la réparation des lésions du cartilage a pour objectif de retarder ou d'éviter l'apparition de l'arthrose dont le traitement est aléatoire et problématique chez le sujet jeune. En effet, les capacités de réparation spontanée du cartilage sont faibles du fait de son caractère avasculaire et du potentiel de division très limité des chondrocytes. Le tissu de réparation obtenu est un fibrocartilage qui ne possède pas les capacités de résistance du cartilage originel et qui tend à se dégrader à court terme. Ainsi cette réparation inadéquate chez un sujet jeune fait le lit d'une arthrose plus ou moins rapide. Il apparaît donc nécessaire de stimuler, de guider la réparation du cartilage. Cependant, la prise en charge thérapeutique de ces lésions ne peut pas être univoque. En effet, les lésions diffuses dégénératives et les lésions localisées le plus souvent d'origine traumatique ne répondent pas aux mêmes mécanismes et ne peuvent donc pas être traitées à l'identique.

Nous avons développé dans une première approche un modèle d'arthrose expérimentale par section du ligament croisé antérieur chez le rat, inspiré de celui développé chez le chien [Pond-Nuki, 1973]. Ce modèle mécanique permet de reproduire les lésions observées en clinique et il est plus proche de la physiologie que le modèle structural par injection intra-articulaire de produits nocifs. Après avoir caractérisé ce modèle sur le plan histologique et immunohistochimique (§ A.1.3.1), nous avons étudié l'influence d'un certain nombre de paramètres : effort calibré, injection intra-articulaire d'un inhibiteur de protéasome et injection intra-articulaire de hyaluronate.

Les activités physiques et sportives ont pris dans notre société une place particulièrement importante au cours des dernières années. Il est de bon ton de leur attribuer toutes les vertus : bénéfice cardio-vasculaire, maintien du capital osseux, bien-être psychologique... Cependant, on est en droit de s'interroger sur les rapports entre l'activité physique et le cartilage articulaire. L'influence de l'activité physique dans le développement de l'arthrose est encore débattu dans la littérature. L'un de nos objectifs était de mieux appréhender les mécanismes mis en jeu lors de l'exercice physique sur le cartilage articulaire, et en particulier les phénomènes apoptotiques et l'expression des protéines de choc thermique.

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est une notion induite par Kerr en 1972. Physiologiquement, l'apoptose intervient dans l'homéostasie du cartilage. Des travaux récents, résumés dans la première partie de ce travail, ont démontré l'implication des

phénomènes apoptotiques dans la genèse et la progression des lésions cartilagineuses de la maladie arthrosique. Ainsi, les chondrocytes peuvent entrer dans un processus apoptotique suite à différents stimuli. De nombreuses études ont mis en évidence une corrélation entre les effets protecteurs des protéines de stress et la suppression de l'apoptose. En effet, il est démontré un effet anti-apoptotique d'une surexpression d'Hsp70 dans les cellules soumises à un stress thermique ou physique. Au contraire, une régulation négative d'Hsp70 est capable d'induire un processus d'apoptose. L'action anti-apoptotique d'Hsp70 se situe à différents niveaux moléculaires et certaines études ont rapporté un effet en aval et en amont de la mitochondrie (activation de la cascade des caspases). Nous nous sommes donc particulièrement intéressés à cette protéine Hsp 70 et à ses propriétés chondroprotectrices et anti-apoptotiques.

Nous avons ensuite étudié l'influence de l'injection intra-articulaire d'un inhibiteur du protéasome, le MG132, sur ce modèle. Le MG132 appartient à une famille d'inhibiteurs réversibles du protéasome 20S. Ces molécules agissent en inhibant la dégradation des protéines *via* la voie de l'ubiquitine et du protéasome. De récentes études ont mis en évidence une induction des protéines de stress thermique suite à une inhibition du protéasome dans différents types cellulaires. En effet, c'est l'accumulation de protéines endommagées ou normalement dégradées par le protéasome, qui déclenche la réponse de stress thermique. De plus, l'inhibition du protéasome pourrait prolonger la demi-vie des Hsps constitutives en inhibant ou en réduisant leur dégradation. Des études conduites au laboratoire sur le modèle pharmacologique au mono-iodoacétate (MIA) ont confirmé l'intérêt du MG132 pour moduler l'expression d'Hsp70 par le chondrocyte. Ces travaux nous ont permis de comprendre et d'expliquer en partie, par l'intermédiaire de la protéine Hsp70, les mécanismes mis en jeu lors de l'exercice physique sur les lésions cartilagineuses induites par la section du LCA.

Enfin, nous avons étudié l'intérêt de la viscosupplémentation sur ce modèle. La viscosupplémentation qui consiste en l'injection intra-articulaire d'acide hyaluronique a connu un réel essor au cours de ces dernières années dans le traitement de l'arthrose débutante en particulier au genou. La gonarthrose est une localisation commune souvent symptomatique. Les symptômes principaux sont la douleur et la gêne fonctionnelle. Parmi les traitements médicaux, les traitements locaux connaissent un regain d'intérêt. Il est en effet séduisant de traiter localement une articulation douloureuse, ce qui constitue une alternative aux anti-inflammatoires et antalgiques généraux. La viscosité du liquide articulaire est due

principalement à la présence d'acide hyaluronique. Les premières injections intra-articulaires ont été effectuées en 1966 chez des chevaux de course atteints d'arthropathies post-traumatiques et ont permis la reprise d'un entraînement normal. Les premières utilisations cliniques sont dues à Rydell, Peyron et Balasz au début des années 70, au genou, avec de bons résultats sur la symptomatologie clinique. Depuis une dizaine d'années, les études cliniques se sont multipliées. En revanche, peu d'études expérimentales ont été conduites sur un modèle d'arthrose par section du LCA et les études publiées se limitent le plus souvent à une simple étude histologique. Nous avons testé 3 types d'acides hyaluroniques, différant par leur poids moléculaire et leur caractère réticulé ou non, et pratiqué une étude histologique incluant des examens morphologiques et des études immunohistochimiques.

Dans une seconde approche, nous nous sommes intéressés au traitement des lésions localisées du cartilage. Ces lésions le plus souvent post-traumatiques atteignent le sujet jeune et aboutissent en l'absence de traitement à des lésions en miroir et à des lésions dégénératives précoces. De nombreuses techniques chirurgicales ont été décrites pour tenter de réparer ces lésions avec plus ou moins de succès (forages, abrasions, microfracture, greffe ostéochondrale en mosaïque...). Brittberg *et al* [1994] ont développé au début des années 90 une technique novatrice utilisant les outils de l'ingénierie cellulaire. Cette technique a connu un vif succès à travers le monde malgré un coût élevé et des résultats mitigés. Les 2 principaux inconvénients de cette technique sont la fuite cellulaire, d'une part et le contrôle du phénotype chondrocytaire, d'autre part. En effet, la culture cellulaire en monocouche nécessaire à la multiplication cellulaire conduit à une dédifférenciation progressive des chondrocytes. Aucune étude n'a réellement démontré la redifférenciation *in situ* des cellules après leur réinjection au sein de la lésion. C'est pourquoi, un certain nombre d'équipes ont proposé la culture de cellules dans des systèmes à 3 dimensions permettant la conservation du phénotype. De nombreuses matrices ont été utilisées avec plus ou moins de succès (polysaccharidiques, protéiques, mixtes...). Nous avons pu développer au sein du laboratoire « Cartilage et Biomatériaux » dirigé par D. Herbage à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines de Lyon, la culture de chondrocytes au sein de matrices de collagène sous forme de gels afin de produire *in vitro* la synthèse d'un néocartilage. Les collagènes sont largement utilisés depuis 20 ans dans le domaine biomédical et plus récemment en ingénierie tissulaire. Néanmoins, peu d'études à ce jour rapportent l'utilisation du collagène sous forme de gel pour la culture des chondrocytes et l'évolution du phénotype chondrocytaire dans ce système n'a jamais été étudiée. Nous avons pu ainsi démontrer la faisabilité et la reproductibilité de cette

technique qui a permis l'obtention *in vitro* d'un tissu présentant les caractéristiques biochimiques et histologiques du cartilage hyalin.

## **II- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **A- LE CARTILAGE**

### **A.1- Le cartilage articulaire**

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif dont l'aspect translucide lui a fait donner le nom de «hyalin». Il ne comporte aucun vaisseau artériel, veineux ou lymphatique et aucune fibre de terminaison nerveuse [Peyron, 1994 ; Hamerman, 1989]. Sa fonction est double : assurer le glissement des extrémités osseuses et permettre l'amortissement et la transmission des charges. Le cartilage articulaire se présente comme un tissu ferme, élastique, légèrement dépressible, à la surface lisse à l'œil nu, brillante, blanc bleuté chez le sujet jeune et blanc jaunâtre chez le sujet âgé. Dans une même articulation le cartilage est plus épais dans les zones qui supportent les plus fortes charges. Il est dépourvu de toute capacité de régénération et se nourrit par imbibition dans le liquide articulaire. La pression hydrostatique qu'il subit joue un rôle vital dans sa nutrition [Peyron, 1994].

#### ***A.1.1- Composition biochimique du cartilage***

Le cartilage hyalin est composé de chondrocytes situés au sein d'une matrice extracellulaire principalement composée d'eau (60 à 80%), et de macromolécules (20 à 40%). Les fibres de collagène représentent environ 50% du poids sec, les glycoprotéines 15 à 20% du poids sec, et les protéoglycannes, dont la concentration varie en fonction de la profondeur et des régions anatomiques, 30 à 35% du poids sec [Buckwalter, 1988].

##### **A.1.1.1- Les chondrocytes**

Le chondrocyte est le seul type cellulaire rencontré dans le cartilage articulaire. L'ensemble des chondrocytes n'occupe que le dixième du volume total. De plus, cette densité cellulaire varie en fonction de la profondeur du cartilage [Stockwell, 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 qui décroît à partir de 20 ans chez l'homme. Les chondrocytes sont riches en lysosomes, en mitochondries et en vacuoles de glycogène. 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, 1986]. En plus, il doit

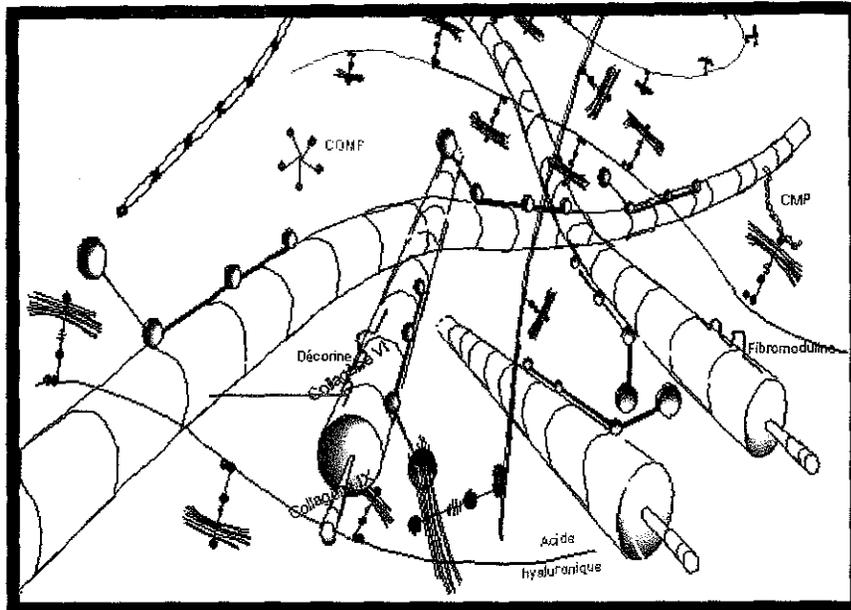
consommer une quantité importante de glucose qu'il convertit en glucosamine pour réaliser la synthèse des protéoglycannes [Chevalier, 1996]. Il est important de souligner que les chondrocytes sont non seulement capables de produire la matrice extracellulaire mais également les enzymes capables de la détruire: dans des cas pathologiques, il peut aussi produire des cytokines pro-inflammatoires provoquant la destruction du cartilage par augmentation de la synthèse et de l'activité des métalloprotéinases [Shlopov, 1997], de hyaluronidases [Flannery, 1998] et d'une ou des agrécannase(s).

Les chondrocytes sont séparés de la matrice extracellulaire par un espace péricellulaire. 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 protéoglycannes et les collagènes présents, comme par exemple le collagène de type VI [Marcelino, 1995] sont utilisés pour réaliser l'ancrage des chondrocytes à la matrice par l'intermédiaire de protéines membranaires. L'anchorine est une protéine d'attachement qui interagit avec le collagène de type II [Mollenhauer, 1984]. Des protéoglycannes insérés dans la membrane plasmique des chondrocytes, peuvent aussi servir de lien entre la cellule et la matrice extracellulaire. Ces protéoglycannes sont composés d'un sulfate d'héparane et d'une protéine axiale appartenant à la famille des syndécannes [Bernfield, 1992] ou des glypicannes.

Une particularité des chondrocytes est que leur métabolisme est en permanence influencé par les conditions physico-chimiques qui règnent dans cet espace péricellulaire (mécanotransduction). Ainsi, l'application cyclique de forces sur des fragments de cartilage retentit sur le pH qui règne dans cet espace mais également sur la forme des chondrocytes. Il en résulte une modification des microfilaments d'actine du cytosquelette qui peut induire ou modifier l'expression de certains gènes. Il existe donc un lien direct entre les conditions physiques et physico-chimiques qui règnent autour du chondrocyte et son activation métabolique [Sommarin, 1989].

#### **A.1.1.2- La matrice extracellulaire**

Les composants majeurs de la matrice extracellulaire (MEC) du cartilage (Figure 1) sont l'eau (65-80% du poids humide du tissu), le collagène (10-30% du poids humide) et les protéoglycannes (5-10% du poids humide) [Kuettner, 1991].



*Figure 1 : Matrice extracellulaire du cartilage (d'après Mallein-Gérin, 1995)*

Les grands protéoglycannes sont de grosses molécules formées par la liaison d'agrécanes sur une longue molécule d'acide hyaluronique. Ils assurent l'attraction de l'eau. Les petits protéoglycannes (décorine, biglycane et fibromoduline) jouent un rôle important dans la formation et l'association entre les fibres. Le collagène de type II, homotrimère formé de trois chaînes  $\alpha 1$  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, fibronectine, ténascine) interviennent également dans l'assemblage de la matrice et l'homéostasie du cartilage.

### L'eau

Le cartilage possède un contingent hydrique très important, de 80 % du poids total [Buckwalter, 1988] 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

Vingt-sept types de collagènes ont été identifiés à ce jour, à classer entre collagènes fibrillaires et non fibrillaires, dont 8 présents au niveau du cartilage en proportions très variables.

- Le collagène de type II, homotrimère composé de trois chaînes  $\alpha 1(\text{II})$ , 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.
- Les collagènes de type IX et XI correspondent à 3 et 10% selon l'origine du cartilage (espèce et nature de l'articulation) et l'âge [Cremer, 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, 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 [Peyron, 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, 1998]. Ces molécules confèrent au cartilage sa rigidité.

### Les protéoglycannes

Ils représentent 5 à 10% du poids humide du cartilage. Ce sont des macromolécules formées d'une protéine porteuse sur laquelle se fixent des chaînes de glycosaminoglycannes (kératanes sulfates, chondroïtines sulfates) et des sucres (oligosaccharides). Ces protéoglycannes sont amarrées par une protéine de jonction sur une chaîne polypeptidique linéaire [Peyron, 1994 ; Hardingham, 1972]. Le cartilage contient plusieurs classes de protéoglycannes : les grandes protéoglycannes appelées agrégannes qui forment des agrégats en s'associant par des liaisons non covalentes à l'acide hyaluronique constituant ainsi la masse principale des protéoglycannes, de grandes protéoglycannes non associées à l'acide hyaluronique, des petites protéoglycannes (la décorine, le biglycane et la fibromoduline), des protéoglycannes associées à la membrane des chondrocytes ou faisant partie de la membrane et enfin des fragments de grandes protéoglycannes [Peyron, 1994]. Le caractère hydrophile de ces molécules permet une augmentation de volume du cartilage toutefois limitée par le maillage des fibres de collagène. Les protéoglycannes chargées 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.

#### *Le hyaluronate*

Sa structure est connue depuis les travaux de Weissman [1975] et Jeanloz [1982]. Il s'agit d'un polysaccharide composé d'un enchaînement linéaire non ramifié de motifs disaccharidiques constitués d'acide  $\beta$ -D-glucuronique lié en 1 $\rightarrow$ 3 à la N-acétyl- $\beta$ -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 $\rightarrow$ 4. Le polysaccharide est formé de 10000 à 12000 unités disaccharidiques. Le hyaluronate joue un rôle structural important au niveau de la MEC. Les protéoglycannes se fixent à cette chaîne de hyaluronate par l'intermédiaire d'une protéine de liaison. Par ailleurs, il influence de nombreuses fonctions cellulaires comme la migration, l'adhésion et la prolifération. Il interviendrait également dans la rétention des protéoglycannes au niveau de la MEC.

#### *Les protéines non collagéniques (PNC)*

Les protéines non collagéniques du cartilage ont été moins étudiées que les collagènes. Elles jouent pourtant 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 intervient dans les liaisons Col II-chondrocytes
- la chondrocalcine qui joue un rôle dans la minéralisation
- la thrombospondine qui contient des domaines de liaison avec les GAGs et qui joue un rôle dans l'adhérence cellulaire via la fixation aux séquences RGD (arginine-glycine-acide aspartique)
- la fibronectine qui se lie au collagène et aux protéoglycannes
- la COMP (*cartilage oligo matrix protein*) qui a valeur de marqueur du renouvellement et de la dégénération de la matrice extracellulaire
- la ténascine qui joue un rôle au cours de l'embryogénèse

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 côté 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 importante 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.1.2- Aspect morphologique***

Le cartilage articulaire est constitué de 4 couches histologiques de la surface vers la profondeur [Buckwalter, 1988 ; Peterfy, 1996 ; Waldschmidt, 1997] (Figure 2).

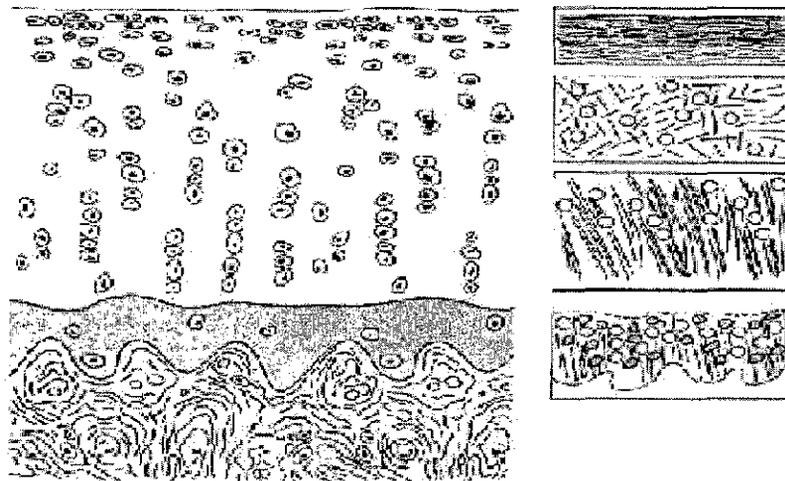
La couche superficielle ou tangentielle (zone 1) est composée de fines fibres de collagène dont le grand axe est parallèle à la surface articulaire. Elle agit comme un maillage à la surface du cartilage. Elle représente 2 à 3 % de l'épaisseur totale du cartilage. Elle renferme quelques chondrocytes aplatis en forme d'ellipse [Buckwalter, 1998] et disposés horizontalement. Elle est très riche en collagène et pauvre en protéoglycannes [Buckwalter, 1998].

La zone intermédiaire ou couche transitionnelle (zone 2) représente 5% de l'épaisseur du cartilage. Elle possède des fibres de collagène plus épaisses, d'orientation plus aléatoire mais tendant à se verticaliser dans la profondeur de cette couche (arcades de Benninghoff). Les chondrocytes sont plus sphériques [Modl, 1991]. Les cellules arrondies ou ovalaires sont disposées au hasard, les fibres de collagène s'infléchissent en forme d'arc.

La couche radiale (zone 3) renferme des fibres de collagène de type II d'orientation perpendiculaire à la surface articulaire. Elle est par ailleurs, la région la plus pauvre en eau et la plus riche en protéoglycannes [Buckwalter, 1998]. Elle représente 90% de l'épaisseur du cartilage et renferme des chondrocytes abondants et ronds avec un aspect prolifératif dans la partie supérieure de cette couche [Peyron, 1994 ; Trattinig, 1997]. Ces chondrocytes ont tendance à s'empiler verticalement en colonnes par rapport à la surface du cartilage [Buckwalter, 1998].

La zone la plus profonde ou couche calcifiée (zone 4) sert de zone d'ancrage aux fibres de collagène sur l'os. Elle contient des fibres de collagène de type X. La jonction entre la zone non calcifiée et la zone calcifiée est nettement visible en histologie et correspond à la «tidemark» ou front de minéralisation. Les chondrocytes ont un aspect de mort apparente [Trattnig, 1997]. Cette couche est caractérisée par la présence de cristaux d'hydroxyapatite et d'amas calciques au contact des fibres de collagène.

La jonction entre le cartilage calcifié et l'os sous-chondral est très irrégulière. Cette ligne de jonction a une résistance considérable. Elle est perforée par de rares vaisseaux venant des cavités de la moelle osseuse sous jacente.



*Figure 2 : Représentation schématique de la forme des chondrocytes et de l'orientation des fibres de collagène dans les différentes couches du cartilage articulaire*

## **A.2- Le fibrocartilage**

Le fibrocartilage est structurellement un intermédiaire entre un tissu conjonctif classique et un cartilage hyalin. Il est très riche en fibres de collagène. Ces fibres permettent une bonne résistance aux tractions et aux compressions: il constitue les disques intervertébraux et les zones d'insertion des tendons.

## **A.3- 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.

## **A.4- Physiologie du cartilage**

### ***A.4.1- Métabolisme chondrocytaire***

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. 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 physico-chimiques. 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 (TGFβ) 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.

Par opposition, les cytokines (en particulier l'interleukine-1 (IL-1)) et le Tumor Necrosis Factor alpha (TNFα) stimulent la dégradation du cartilage. Ce sont des cytokines proinflammatoires qui stimulent la synthèse de prostaglandines E2 et de monoxyde d'azote (NO). L'IL-1 intervient de façon prépondérante dans les mécanismes de destruction du cartilage. L'IL-1 stimule la synthèse de collagénases et de protéases par le chondrocyte et le synoviocyte. L'agrécannase, la stromélysine et la collagénase sont les principales métalloprotéases. L'agrécannase est l'enzyme principale de dégradation de l'agrécanne. Elle est exprimée dans le cartilage normal, elle coupe surtout au niveau du domaine G1 à proximité de l'acide hyaluronique. La stromélysine coupe l'agrécanne à plusieurs endroits le long de la protéine porteuse. La stromélysine en association avec la plasmine activent la procollagénase en collagénase qui dégrade le collagène de type II. La prostromélysine est transformée en stromélysine par la plasmine (elle-même issue de l'activation du plasminogène par le *plasminogen activator* sous l'influence de l'IL-1) et active à son tour la procollagénase ou dégrade directement les protéoglycannes et le collagène II, IX ou XI. Les cathepsines sont des enzymes intracellulaires qui complètent la dégradation des protéines après phagocytose des fragments libérés par les métalloprotéases. L'IL-1 inhibe par ailleurs les activités synthétiques du chondrocyte et donc la synthèse de la MEC.

Le cartilage est un amortisseur biologique. Ses propriétés dépendent de sa teneur en eau qui représente 75% du poids. Cette hydratation est due à la propriété osmotique des protéoglycannes. Cette pression augmente avec le degré de compression du tissu. Les fibres de collagène assurent le maintien sur place des protéoglycannes. Elles sont mises en tension par le gonflement des protéoglycannes ce qui assure la rigidité et la résistance du cartilage.

La structure et la composition du cartilage sont adaptées à ses deux fonctions essentielles : transmission des charges et glissement des surfaces articulaires. La transmission des charges avec effet d'amortissement est liée à la nature de la matrice extracellulaire très hydrophile et au réseau collagénique. La viscoélasticité du cartilage est en partie liée aux déplacements de l'eau sous l'effet des pressions du cartilage vers l'espace articulaire et inversement. Le glissement des surfaces articulaires avec un coefficient de friction très bas et une usure minime dépend de l'état de surface et de la composition du liquide synovial. La nutrition du cartilage est liée à ses propriétés mécaniques et se fait surtout chez l'adulte par l'intermédiaire du liquide synovial. Les propriétés du cartilage se modifient avec l'âge. Le collagène se fragilise. Les protéoglycannes sont moins hydrophiles, les chondrocytes moins nombreux et moins actifs. L'involution observée est cependant différente de celle du cartilage arthrosique.

#### ***A.4.2- 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. 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.

Les substances chargées positivement diffusent plus facilement que celles chargées négativement du fait des charges négatives des protéoglycannes. Les anions comme  $\text{Na}^+$  et

$\text{Ca}^{2+}$  se fixent sur ces derniers et retiennent une grande quantité d'eau, eau qui confère au cartilage une grande partie de ses propriétés en particulier mécaniques.

### **A.4.3- Mécanique**

Le tissu cartilagineux vit 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. L'articulation dans le mouvement supporte des contraintes parfois très élevées (16 à 70  $\text{kg/cm}^2$ ). Les différentes structures articulaires (os, cartilage, système tendino-musculaire) permettent de les atténuer. Ainsi parlait J. Arlet à ce sujet en ces termes : « la membrane synoviale secrète le liquide synovial, le liquide synovial nourrit le cartilage, le cartilage protège l'os, l'os protège le cartilage, les ligaments orientent le mouvement, les muscles produisent le mouvement, le mouvement est nécessaire à la vie de l'os et de l'articulation ». 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 protéoglycannes, 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 protéoglycannes et un rapprochement des charges anioniques ( $\text{SO}_4\text{-COO}$ ) 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 protéoglycannes.

- 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'arthrose.

#### ***A.4.4- Les contraintes de glissement***

Le rôle du cartilage d'un point de vue biomécanique est double : amortissement des pressions par ses couches profondes, glissement par ses couches superficielles.

Les forces de frottement entre 2 surfaces s'expriment par un coefficient de friction qui peut se définir comme le rapport entre la force de frottement parallèle à la surface et la force de placage perpendiculaire. L'interposition d'un liquide agissant comme lubrifiant va diminuer les forces de frottement et donc l'usure. Au niveau des diarthroses, ce coefficient de friction est très bas (0,002) classiquement inférieur à celui d'un patin sur la glace.

Ces caractéristiques sont liées au cartilage articulaire et à la présence du liquide synovial dont la viscosité se modifie en fonction de la cinématique articulaire. Par opposition à un liquide newtonien (viscosité constante), le liquide synovial est non-newtonien (sa viscosité diminue avec la vitesse).

L'acide hyaluronique est le principal constituant du liquide articulaire. C'est un polymère linéaire de haut poids moléculaire (2 à 3 MDa) fait de séquences disaccharidiques fortement hydratées. Il est le support rhéologique du liquide synovial. Le passage d'un comportement visqueux (mouvement lent) à un comportement élastique (mouvement rapide) est une des caractéristiques de l'acide hyaluronique. D'autres éléments interviennent également dans le phénomène de lubrification (hyaluronidase, lubricine...).

### **A.5- Le liquide synovial**

Il s'agit d'un lubrifiant articulaire qui est également liquide nourricier du cartilage. C'est un liquide incolore, transparent et filant sécrété par la membrane synoviale tapissant la face interne de la capsule articulaire. Ce liquide lubrifie les surfaces articulaires et facilite le glissement de celles-ci au cours du mouvement [Buckwalter, 1997]. L'acide hyaluronique en est le constituant essentiel et lui confère ses principales propriétés. C'est un polysaccharide linéaire formé de 10000 à 12000 doublets d'acide glycuronique et N-acétylglucosamine, fortement hydraté et replié en une pelote statistique déformable d'environ 0,5 µm de diamètre. L'acide hyaluronique est responsable des propriétés rhéologiques remarquables du liquide synovial associant viscosité et élasticité. Ainsi, le coefficient de friction, très faible, assure un fonctionnement harmonieux de l'articulation.

### **A.6- La membrane synoviale**

La membrane synoviale tapisse les cavités articulaires, les bourses séreuses et les gaines tendineuses. Elle assure la trophicité du cartilage articulaire et la sécrétion du liquide synovial. Elle est composée essentiellement de fibres élastiques et de tissu adipeux. Elle apparaît macroscopiquement comme une membrane fine, lisse, de couleur jaune pâle, au travers de laquelle on distingue des vaisseaux de petit calibre et le tissu fibreux de la capsule. Elle constitue une barrière de filtration et de défense et se compose de 2 couches :

- la couche profonde qui fusionne avec la capsule. Elle renferme de nombreux vaisseaux, du tissu fibreux, des adipocytes, des fibroblastes, des lymphocytes et des macrophages.

- la couche superficielle en bordure composée d'une ou deux assises cellulaires (les synoviocytes). Les synoviocytes sont de 3 types [Fitzgerald, 1995] : Les synoviocytes de type A (de type macrophagique) qui dérivent des cellules souches sanguines mononuclées, les synoviocytes de type B (de type fibroblastique) riches en ergastoplasme granuleux et en prolongements dendritiques, qui assurent la synthèse des constituants du liquide synovial (hyaluronate, lubricine entre autres) et d'un certain nombre d'enzymes. Et enfin, les synoviocytes de type « dendritique » qui représentent moins de 1% du total des cellules et dont le rôle est mal connu [Gadher, 1987]. Il semble que ces cellules dendritiques soient capables de stimuler ou d'inhiber la réponse immunitaire en fonction du niveau d'expression des molécules de classe I et II du CMH et des cytokines. Elles peuvent également jouer un rôle important dans le transfert de gène. Ainsi, Kim [2001] a mis en évidence une inhibition de l'arthrite au niveau controlatéral *via* une modification *in vivo* de cellules dendritiques par une injection de vecteur contenant des gènes immunomodulateurs.

La membrane synoviale a quatre fonctions principales :

- 1) Elle synthétise l'acide hyaluronique *via* les synoviocytes de type B.
- 2) Elle représente une membrane d'échange et de filtration entre le liquide synovial et le sang. Les protéines de haut poids moléculaire telles que les immunoglobulines ne passent pas la barrière synoviale. En revanche, celles de petit poids moléculaire (albumine, transferrine), les médicaments et certains produits de contraste diffusent à travers cette membrane.
- 3) Sa troisième fonction dite de résorption (macrophagique) provoque une inflammation synoviale réactionnelle.
- 4) Enfin, par son innervation importante, elle participe activement aux phénomènes douloureux au cours de l'arthrose et des maladies inflammatoires.

## **B- L'ARTHROSE**

### **B.1- Définition**

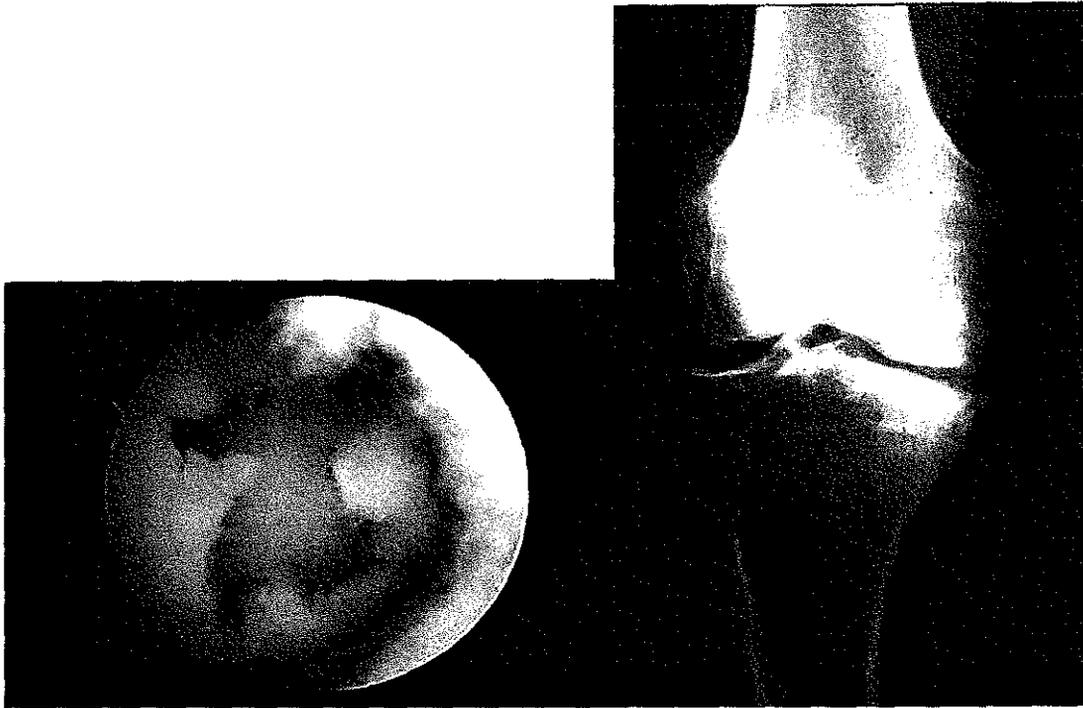
Selon l'OMS, l'arthrose est la résultante de phénomènes dégénératifs mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage. L'arthrose se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques et biomécaniques des chondrocytes et de la MEC aboutissant à un ramollissement, des fissurations et une disparition du cartilage articulaire ainsi qu'à une sclérose de l'os sous-chondral avec production d'ostéophytes et de géodes. Les facteurs étiologiques sont multiples : obésité et/ou excès d'utilisation [Lieveuse, 2002], traumatismes [Baker, 2002], troubles métaboliques [Sturmer, 2001], génétiques [Thumboo, 2002], hormonaux [Von Muhlen, 2002]...

Bien qu'elle soit de très loin la plus fréquente des affections rhumatismales, affectant des millions de personnes en France, l'arthrose est restée très longtemps négligée du fait de l'absence de thérapeutique véritablement efficace. Les progrès de l'arthroplastie ont permis d'améliorer considérablement la fonction articulaire et la qualité de vie de ces patients. On estime à l'heure actuelle que 100.000 prothèses de hanche et 40.000 prothèses de genou sont implantées chaque année en France. Aujourd'hui, l'arthrose est en pleine révolution grâce aux progrès de la biologie, des techniques d'évaluation et à l'individualisation de cibles thérapeutiques potentielles. Si la cause de la dysrégulation du chondrocyte arthrosique est encore inconnue, l'individualisation des médiateurs biologiques synthétisés par ce dernier, permet de développer autant de nouvelles cibles thérapeutiques.

### **B.2- Diagnostic positif**

Le diagnostic de l'arthrose repose sur la radiographie simple. Dès que les lésions anatomiques de l'arthrose sont évoluées, elles sont aisément identifiées par la radiographie qui montre un pincement de l'interligne articulaire, les ostéophytes, la condensation osseuse sous-chondrale et les géodes. L'utilisation d'incidences particulières facilite la détection du pincement articulaire (clichés en Schuss pour le genou, faux profil pour la hanche).

L'arthroscopie (Figure 3) et l'IRM sont plus sensibles que la radiographie simple (Figure 4) mais sont en règle inutiles.



*Figure 3 (à gauche) : Arthroscopie du genou. Volumineuse lésion du condyle médial avec exposition osseuse.  
Figure 4 (à droite) : Gonarthrose évoluée sur une radiographie de face. Noter le pincement fémoro-tibial médial avec ostéocondensation et ostéophytose.*

L'examen clinique doit rester simple. Il se limite à la recherche d'une raideur articulaire et surtout un déficit d'extension, un épanchement ou encore une déformation (*varus* ou *valgus*). Le degré de l'impotence fonctionnelle est apprécié par les indices algofonctionnels validés comme les indices de Lequesne [1997] et le WOMAC [Bellamy, 1988]. Il n'existe pas aujourd'hui de facteurs prédictifs précis et sensibles de la progression de l'arthrose. On l'évalue donc cliniquement (retentissement fonctionnel) et radiologiquement avec l'étude de la progression du pincement articulaire.

Des marqueurs sensibles permettant de faciliter le diagnostic de l'arthrose et de son évolutivité sont recherchés. Ainsi divers marqueurs du cartilage (divers épitopes des protéoglycannes, COMP, épitopes de la dégradation du collagène) de l'os (phosphatase alcaline, ostéocalcine, cross-links du collagène) et de la synoviale (acide hyaluronique) sont évalués mais leur pertinence reste à démontrer.

### **B.3- Physiopathologie de l'arthrose**

Si le *primum movens* de l'arthrose n'est pas clairement établi, le rôle des facteurs mécaniques apparaît essentiel, alors que celui de l'inflammation s'avère moins important que dans les rhumatismes inflammatoires.

Les modifications du cartilage sont fonction de l'équilibre entre la teneur en glycosaminoglycannes et en collagène de type II. Les altérations du cartilage, dues au vieillissement se traduisent par une augmentation transitoire de la synthèse de protéoglycannes lors des stades très précoces de l'arthrose puis d'une diminution de la concentration en protéoglycannes, une augmentation de la teneur en eau [Brandt, 1988] et une diminution de la réponse métabolique des chondrocytes à la stimulation mécanique. Les premières lésions macroscopiques de l'arthrose sont caractérisées par un aspect fibrillaire superficiel qui s'étend progressivement vers la profondeur. La surface du cartilage devient ensuite irrégulière avec apparition de fissures qui vont atteindre l'os sous-chondral. Quand les fissures s'accroissent, des fragments de cartilage sont libérés dans l'articulation et l'épaisseur du cartilage diminue [Buckwalter, 1998 ; Freemont, 1996]. Ce sont les lésions mises en évidence en arthroscopie.

En histologie, la première anomalie observée quand apparaît l'aspect fibrillaire (ou peut être même avant), est une augmentation de la concentration en eau du cartilage dont l'origine est inconnue. Elle implique une rupture ou une désorganisation du réseau collagénique, la couche superficielle augmentant sa perméabilité [Buckwalter, 1998] et autorisant la pénétration de l'eau attirée par les protéoglycannes hydrophiles. L'orientation des fibres de collagène proches de la surface disparaît et l'espace entre les fibres s'accroît, aboutissant à une diminution de la résistance du cartilage responsable de fissures [Brandt, 1988 ; Buckwalter, 1998]. Il existe parallèlement une prolifération des chondrocytes qui augmentent leur activité anabolique et catabolique [Buckwalter, 1998]. La production de macromolécules augmente. Il s'agit d'un phénomène réactionnel de réparation du cartilage. Les protéoglycannes nouvellement synthétisés sont le siège de modifications de leurs glycosaminoglycannes avec une plus grande proportion de kératanes sulfates aux dépens des chondroïtines sulfates [Buckwalter, 1988]. Dans un premier temps, l'équilibre entre production des protéines matricielles et enzymes de dégradation (MMP) est maintenu. Parallèlement, le chondrocyte arthrosique libère des cytokines proinflammatoires, IL-1, TNF $\alpha$  et monoxyde d'azote (NO) qui stimulent la production de métalloprotéinases. Mais l'activité d'anabolisme et la

prolifération des chondrocytes vont diminuer aboutissant à la destruction progressive du cartilage [Buckwalter, 1998]. Le chondrocyte s'épuise et la synthèse des composants matriciels diminue tandis que la production d'enzymes de dégradation est maintenue. Un déséquilibre s'installe alors au profit du catabolisme. La libération de médiateurs inflammatoires s'accroît (phospholipase A2, prostaglandines, IL-1, TNF $\alpha$ ...). La destruction du tissu implique un excès de dégradation sur la synthèse. Ce déséquilibre implique la mort par apoptose des chondrocytes sous l'action délétère de certains médiateurs comme l'IL-1 ou le NO.

L'os sous-chondral est un acteur important dans l'altération du cartilage. Dans l'arthrose, il existe une augmentation du remodelage osseux en faveur de l'ostéoformation, médié par des cytokines synthétisées par les ostéoblastes immédiatement adjacents au cartilage. L'effet de ces cytokines est inconnu mais pourrait jouer un rôle non négligeable dans les altérations du cartilage. Toutes ces modifications conduisent à plus ou moins long terme à des modifications de l'os sous-chondral [Freemont, 1996].

Des phénomènes semblables sont observés au cours de rhumatismes inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, liés à la prolifération synoviale responsable d'érosions et induisant les chondrocytes à produire des médiateurs solubles aboutissant à une chondrolyse. De même, au cours des arthrites septiques, les leucocytes synthétisent des protéases responsables d'altérations de la surface cartilagineuse.

## **B.4- L'apoptose chondrocytaire dans l'arthrose**

### ***B.4.1- Définition de l'apoptose***

Le terme d'apoptose a été introduit dans le vocabulaire biologique et médical en 1972 par Kerr et signifie en grec « chute » des pétales ou des feuilles. Ce terme désigne une forme de mort cellulaire particulière, au cours de laquelle surviennent de profonds remaniements structuraux et fonctionnels diamétralement opposés à ceux de la nécrose. L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée qui intervient dans les processus physiologiques comme l'homéostasie et le renouvellement cellulaire.

La mort cellulaire est donc un terme général qui présente deux composantes bien caractérisées et différentes sur le plan morphologique et biochimique, la nécrose et l'apoptose (Tableau 1).

**Tableau 1 : Critères morphologiques et biochimiques permettant de différencier l'apoptose de la nécrose**

Apoptose	Nécrose
<b>Critères morphologiques</b>	<b>Critères morphologiques</b>
Cellule isolée	Groupe cellulaire
Intégrité de la membrane cytoplasmique	Lyse de la membrane cytoplasmique
Diminution de la taille cellulaire	Gonflement cellulaire
Lysosomes intacts	Eclatement des lysosomes
Chromatine compactée homogène	Chromatine hétérogène
Absence de réponse inflammatoire	Réponse inflammatoire
<b>Critères biochimiques</b>	<b>Critères biochimiques</b>
Stimuli physiologiques	Cause non physiologique
Processus régulé	Perte de l'homéostasie
Consommation d'énergie	Absence de consommation d'énergie
Transcription génique	Absence de transcription génique
Synthèse de macromolécules	Absence de synthèse protéique
Fragmentation régulière de l'ADN	Fragmentation irrégulière de l'ADN

Shématiquement, l'apoptose peut être divisée en 3 phases : initiation par déclenchement du signal apoptotique, contrôle et exécution. La première phase correspond aux stimuli (biologique, physique, chimique) qui induisent l'apoptose. Ils agissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires de la superfamille des récepteurs au TNF et des caspases, protéases à cystéine intra-cellulaire (2-8-9-10). La deuxième phase dépend de la mitochondrie, qui soumise à des perturbations de son potentiel de membrane, sécrète des protéines apoptotiques comme le cytochrome C. La troisième phase fait intervenir des caspases effectrices (3-6-7) à l'origine d'évènements nucléaires.

La première évidence du rôle primordial des protéases à cystéine, appelées plus tard caspases (cysteinyll aspartate-specific proteinases) dans l'étape d'exécution d'un signal de mort provient de l'identification puis du clonage du gène pro-apoptotique *ced-3* chez *C. elegans* [Yuan, 1993] dont le premier homologue identifié chez les mammifères a été ICE [*interleukin-1-β converting enzyme*], plus tard rebaptisé caspase 1. On connaît actuellement 14 caspases différentes. Ces enzymes reconnaissent puis clivent des chaînes polypeptidiques au niveau d'un résidu aspartique de la partie carboxy-terminale. Toutes les caspases

possèdent, en position amino-terminale, un pro-domaine dont la taille variable est à l'origine d'un mode d'activation particulier qui a permis une classification supplémentaire de ces enzymes. Les caspases à long pro-domaine dites caspases d'amont ou initiatrices : il s'agit des caspases 1, 2, 4, 8, 9 et 10. Les caspases 3, 6, 7 et 14 possèdent quant à elles un pro-domaine plus court (10-40 résidus) et sont dites caspases d'aval. Leur activation conduit au clivage de diverses protéines substrats à l'origine de la plupart des évènements biochimiques, structuraux ou morphologiques de l'apoptose.

L'activation en cascade des caspases permet une amplification d'un signal. La protéine Caspase 3 joue un rôle majeur dans cette cascade [Porter, 1999]. Deux grandes voies d'activation ont été identifiées : la voie déclenchée par des protéines relarguées par des mitochondries endommagées (voie intrinsèque mitochondriale) et la voie déclenchée au niveau de la membrane cytoplasmique par l'activation des récepteurs membranaires (voie extrinsèque des récepteurs membranaires). Pour chacune des 2 voies moléculaires décrites qui conduisent à la mort de la cellule, les mécanismes d'intégration des signaux s'établissent au niveau d'un complexe multiprotéique. C'est en agissant au niveau de la formation et/ou de l'activité de ce dernier que la plupart des modulateurs de la mort cellulaire exercent leur action.

#### ***B.4.2- Apoptose et arthrose***

Le rôle de l'apoptose dans le tissu cartilagineux au cours de l'arthrose et des maladies inflammatoires fait l'objet d'un regain d'intérêt. La perte cellulaire dans l'arthrose résulterait d'un excès d'apoptose chondrocytaire. En effet, l'augmentation du nombre de chondrocytes dégénératifs au cours de l'arthrose est connue de longue date [Weiss et Mirow, 1972]. Plus récemment, Blanco et al [1998] ont mis en évidence une proportion accrue de chondrocytes en apoptose (51%) dans le cartilage humain arthrosique par rapport au cartilage sain (11%). Hashimoto et al [1998] aboutissent aux mêmes conclusions avec des chiffres respectivement de 22% et 5%. L'importance du phénomène semble corrélée à l'âge des sujets. L'apoptose se déroule dans les zones superficielles et moyennes du cartilage où prédominent les lésions cartilagineuses. Néanmoins, l'apoptose est également décrite dans la couche profonde [Kouri, 1997].

L'apoptose du chondrocyte semble également liée aux rapports entre la cellule et la matrice [Frisch et Francis, 1994]. Hashimoto et al [1998] ont émis l'hypothèse que la formation des

corps apoptotiques favorise l'installation de calcifications matricielles. En effet, les corps apoptotiques possèdent une activité phosphatase alcaline, pyrophospho-hydrolase et de précipitation de calcium. L'absence de cellules phagocytaires dans le cartilage aboutit à l'accumulation de ces corps apoptotiques, générateurs de calcifications. Ces calcifications aggraveraient les lésions cartilagineuses existantes et pérenniseraient le dysfonctionnement chondrocytaire. En effet, les altérations de la matrice perturbent les signaux de survie cellulaire [Meredith, 1993]. L'apoptose est également induite par le NO. Ainsi, lors du modèle d'arthrose par section du LCA chez le lapin, la production intra-articulaire de NO est accrue par rapport aux témoins. Le taux d'apoptose chondrocytaire est également plus élevé chez les mêmes lapins arthrosiques. La perte des signaux de survie matriciels provoqués par la dégradation de la MEC sensibiliserait le chondrocyte à l'apoptose en réponse à certains stimuli comme les cytokines ou le NO [Hashimoto, 1998]. Le NO est impliqué dans l'inhibition de la néosynthèse des macromolécules de la MEC du cartilage, dans l'induction de l'activité des MMP et la réduction de la synthèse du récepteur antagoniste de l'IL1. Ainsi, une inhibition de iNOS (NO synthase inductible) est suggérée comme bénéfique pour réduire les lésions ostéo-articulaires dans un modèle d'arthrose expérimentale chez le chien [Pelletier, 1998]. Le NO provoque également une induction de l'expression de la cyclooxygénase 2 (Cox2) et donc une synthèse augmentée de prostaglandine E2 (PGE2). Le rôle des PGE2 sur l'induction de l'arthrose chondrocytaire reste discuté mais l'utilisation d'un inhibiteur sélectif à la fois de la 5-lipoxygénase et de la Cox2 permet de diminuer la progression des lésions arthrosiques suite à une section du LCA chez le chien, en diminuant l'apoptose et l'expression de Cox2 et de iNOS [Boileau, 2002]. Enfin, les cytokines pro-inflammatoires intervenant dans la dégradation du cartilage, comme l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  interviennent également dans le processus apoptotique.

## **B.5- Les protéines de choc thermique**

### ***B.5.1- Généralités***

Les protéines de choc thermique ou heat shock protein (Hsp) ou protéines de stress forment une famille de protéines remarquablement conservées au cours de l'évolution. Elles jouent un rôle essentiel dans la vie cellulaire et surtout en cas de stress d'origine chimique, physique ou métabolique [Polla, 1998]. Les protéines ont été classées en fonction de leur poids moléculaire. Certaines d'entre elles (Hsp 90, 70, 65 ou 27) agissent comme des protéines

chaperonnes c'est-à-dire qu'elles vont lier les peptides ou protéines en cours de synthèse ou à fort risque d'agrégation et vont ainsi permettre leur repliement correct et leur translocation dans les compartiments subcellulaires appropriés. Elles participent à l'élimination des protéines anormales et se lient à certaines protéines dénaturées afin de rétablir leurs fonctions [Ciocca, 1993 ; Kiang, 1998 ; Feder, 1999].

*Tableau 2 : Principales protéines de choc thermique*

<b>Protéine</b>	<b>Actions</b>
Hsp 10	Tolérance à l'ischémie. En association avec Hsp60.
Hsp20 et 27	Résistance aux médicaments de chimiothérapie, à H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , aux UV, au TNF. Tolérance à l'ischémie, à l'hyperthermie, stimulation de l'agrégation des protéines nucléaires. Contrôle de la polymérisation de l'actine, chaperonne et protège de la cytotoxicité.
Crystalline	Tolérance à l'hyperthermie et à l'ischémie. Résistance à H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et au TNF.
Hsp 47	Chaperon des collagènes
Hsp 60	Tolérance à l'hyperthermie et à l'ischémie. Chaperon des protéines en général.
Hsp 65	Réduction tumorale
Hsp 70	<b>Tolérance à l'hyperthermie, à l'ischémie et à l'hypoxie. Résistance à l'endotoxine, à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aux UV, à l'apoptose. Protège contre la cytotoxicité. Récupération de la contractilité et réduction de l'infarctus cardiaque après ischémie.</b>
Hsp 72	Résistance à l'apoptose, à l'hypoxie. Chaperon moléculaire.
Hsp 90	Tolérance à l'hyperthermie et à l'ischémie, à l'apoptose, fonction de récepteur glucocorticoïdes
Hsp 100/110	Tolérance à l'hyperthermie. Reprise de la division cellulaire après choc thermique.

### ***B.5.2- La protéine Hsp70***

Elle est plus particulièrement impliquée dans les phénomènes de protection cellulaire en stabilisant les protéines intracellulaires contre une inactivation par la chaleur. Le rôle de la famille Hsp70 est basé sur la capacité de ces protéines à interagir avec des protéines ou

peptides [Georgopoulos, 1993]. L'activité chaperonne de la famille Hsp70 est contrôlée par une série de réactions cycliques, de fixation, d'hydrolyse et d'échanges de nucléotides. Ce type de réaction permet l'association puis la dissociation entre Hsp70 et ses cibles polypeptidiques [Rudiger, 1997]. Il existe une corrélation positive entre l'activité chaperonne d'Hsp70 dans les cellules et leur viabilité dans un contexte d'ischémie, puisque la chute d'ATP intracellulaire est capable d'induire l'expression d'Hsp70, atténuant la protéotoxicité de la déplétion en ATP [Kabakov, 2002].

### ***B.5.3- Hsp70 et apoptose***

Les données récentes de la littérature ont montré l'implication de la protéine de stress Hsp 70 dans le processus de mort cellulaire programmée, apoptose [Beere, 2001 ; Park, 2000 ; Mosser, 2000]. Ainsi, une inhibition ou une diminution du taux de synthèse de cette protéine facilite l'entrée des cellules cancéreuses en apoptose [Ravagnan, 2001]. L'exercice augmente la synthèse de ces protéines que ce soit au niveau du muscle strié ou du muscle cardiaque [Samelman, 2000]. Concernant le cartilage, ces protéines de stress semblent jouer un rôle important puisqu'une augmentation du taux de production d'Hsp70 a été observée dans le cartilage soumis à des contraintes mécaniques ou à différents stress [Kaarniranta, 1998].

## **B.6- MG 132 et induction d'Hsp 70**

### ***B.6.1- Définition***

Le MG 132 est un inhibiteur du protéasome. Le protéasome constitue le site de dégradation de la plupart des protéines dans les cellules eucaryotes [Tanaka, 1995]. Il est présent à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Il est responsable également de la dégradation des protéines anormales au sein de la cellule et de la grande quantité des protéines à longue durée de vie [Rock, 1994].

### ***B.6.2- Inhibiteurs du protéasome, apoptose et induction d'Hsp***

Récemment, il a été identifié une famille d'inhibiteurs réversibles et irréversibles du protéasome. Un des groupes de ces inhibiteurs sont les peptides aldéhydes (carboboxy-leucinyl-leucinyl-leucinal (MG132, C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>)), inhibiteurs réversibles capables de se fixer sur le site actif du protéasome et d'inhiber le clivage des substrats. Le rôle précis des

inhibiteurs du protéasome dans la régulation de l'apoptose reste indéterminé. Il semblerait que ce processus soit dépendant du type cellulaire et du cycle cellulaire. Ainsi, il semblerait que les inhibiteurs du protéasome aient une action anti-apoptotique dans les cellules très différenciées ou qui se renouvellent peu, comme les chondrocytes et au contraire un effet pro-apoptotique dans les cellules à renouvellement rapide [Stefanelli, 1998 ; Chandra, 1998].

De récentes études ont également mis en évidence une induction des protéines de choc thermique suite à une inhibition du protéasome dans différents types cellulaires et en particulier les cellules cancéreuses ou les fibroblastes embryonnaires de souris [Ashok, 2001]. L'effet chondro-protecteur du transfert de gène codant pour Hsp70 par électroporation sur un modèle d'arthrose au MIA a été démontrée récemment chez le rat [Grossin et Cournil, 2003]. L'efficacité d'induction d'Hsp70 par le MG132 a été montrée récemment [Cournil, 2003]. L'utilisation du MG132 en intra-articulaire pourrait donc prévenir l'apparition ou l'aggravation des lésions d'arthrose.

## **B.7- Exercice et arthrose**

La pratique du sport s'est largement répandue au cours des dernières années étayée par ses potentiels bienfaits psychiques et physiques (bénéfice cardio-vasculaire, bien-être ...). Néanmoins, il est légitime de se demander quelles peuvent être les conséquences à moyen terme de cette activité sportive sur le cartilage articulaire. De nombreuses études ont été publiées à ce sujet [Konradsen, 1990 ; Clatworthy, 1999 ; Cheng, 2000 ; Clyman, 2001 ; Lane, 1993-1996-1998-1999 ; Lesquene, 1997] mais de nombreux biais limitent leur méta-analyse (sexe et âge différents, types et intensités d'activité sportives variables...). Il faut donc interpréter et comparer ces études avec une grande prudence. Pour la gonarthrose qui nous intéresse plus particulièrement dans ce travail de thèse, les principales études sont issues de la cohorte Framingham [McAlindon, 1999]. Cette étude portant sur des sujets âgés en moyenne de 70 ans, mesurait le niveau d'activité en heures par jour. Cinq activités étaient explorées : la marche, la montée des escaliers, la position assise, le sommeil et une appréciation semi-quantitative du niveau d'activités par le sujet (faible, modéré, intense). Les conclusions de cette étude sont qu'une activité modérée ou faible ne semble pas avoir d'incidence sur l'apparition d'une gonarthrose contrairement à une activité physique intense (> 4 heures par jour) qui est arthrogène. Une autre étude de la cohorte Framingham [Hannan, 1993] en revanche ne retrouvait pas d'augmentation du risque de gonarthrose avec

l'augmentation des activités physiques. Ces résultats d'études menées dans la population générale ne permettent donc pas de se faire une idée précise de la relation entre activités physique et arthrose. D'autres études, chez des sportifs cette fois ont donc été réalisées. Le suivi de cohortes de sportifs a montré que certains sports augmentent le risque d'arthrose (gonarthrose du footballeur et du tennisman, coxarthrose du coureur de fond, de la danseuse, du rugbyman, du footballeur et arthrose de cheville de la danseuse). Cependant, ceci a été observé dans des populations de sportifs de haut niveau ou professionnels [Cooper, 1999 ; Lequesne, 1989 ; Roos, 1994 ; Spector, 1996]. Le rôle du niveau atteint et du temps d'exposition à une activité sportive dans l'apparition d'une arthrose a été évalué. Une étude a comparé une population d'ex-sportives professionnelles (joueuses de tennis, coureuses de fond) à la cohorte Chingford [Spector, 1996]. Ainsi, les professionnelles ont un risque relatif de développer une arthrose de hanche ou de genou de 2 à 3 fois supérieur. En revanche, si les compare les professionnelles à un groupe de sportives amateurs, il n'y a plus de différences. La durée d'exposition dans le temps serait donc un facteur plus important d'apparition d'une arthrose que la fréquence des entraînements. Roos et al [1994] ont évalué la prévalence de la gonarthrose radiologique dans 3 populations : footballeurs professionnels, footballeurs amateurs, non footballeurs. La prévalence respective est de 15,5%, 4,2% et 1,6%. Il apparaît donc que le niveau d'activité sportive est également un facteur qui influence l'apparition de l'arthrose [Cheng, 2000 ; Vingard, 1998]. Le sport loisir n'est pas un facteur de risque d'arthrose des membres inférieurs dans la plupart des études [Panush, 1989 ; Konradsen, 1990 ; Lane, 1993 ; Felson, 1998]. L'activité physique modérée diminuerait au contraire la vitesse d'évolution de l'arthrose [Manninen, 2001] et donc l'échéance de la chirurgie prothétique. Une activité physique modérée est d'ailleurs préconisée chez certains patients porteurs d'arthrose afin de diminuer les phénomènes douloureux et améliorer l'autonomie des patients [Deyle, 2000 ; Ranou, 2001].

Un élément important à prendre en compte, également, est le facteur traumatique. En effet, les activités sportives de compétition ou de loisir peuvent conduire à des traumatismes ostéo-articulaires qui vont faire le lit de l'arthrose. C'est le cas en particulier des ruptures du ligament croisé antérieur, fréquentes dans certains sports (football, tennis, ski...) qui vont conduire à une usure prématurée du cartilage [Fetto, 1980 ; Barrack, 1990 ; Clatworthy, 1999]. L'association d'une telle rupture avec une lésion méniscale va majorer celle-ci. Une adaptation de l'activité sportive dans ces cas doit être envisagée. Une réparation chirurgicale

ligamentaire sera proposée chez le sujet jeune afin de prévenir la survenue d'une gonarthrose précoce [Johnson, 1992].

## **B.8- Thérapie génique et arthrose**

Pour pallier le manque d'efficacité des thérapeutiques classiques de l'arthrose, les techniques de transfert de gène ont été proposées afin d'obtenir l'expression d'un certain nombre de gènes d'intérêt. L'avantage de cette technique étant de pouvoir délivrer les protéines spécifiques de façon prolongée. De nombreuses stratégies thérapeutiques en matière de transfert de gène ont été développées et continuent à être explorées à l'heure actuelle. En matière d'arthrose, la thérapie génique locale est préférée à la thérapie génique systémique. Deux techniques principales sont disponibles : le transfert de gène *ex vivo* et le transfert de gène *in vivo*. La première de ces techniques a été largement étudiée expérimentalement chez le lapin et le rongeur en utilisant les synoviocytes comme lignée cellulaire avec des vecteurs viraux [Kim, 2002 ; Mosca, 2000 ; Makarov, 1996]. La synoviale est prélevée chirurgicalement afin d'extraire les synoviocytes qui sont mis en culture et infectés par le vecteur contenant le gène d'intérêt. Ces cellules modifiées sont ensuite réintroduites dans l'articulation à traiter. Les résultats obtenus avec la protéine antagoniste des récepteurs à l'IL1 se sont montrés encourageants [Frisbie, 2000 ; Evans, 1996]. Cette technique *ex vivo* évite l'introduction directe de particules virales dans l'articulation et permet de vérifier la spécificité des cellules génétiquement modifiées et de s'assurer que les manipulations génétiques n'ont pas engendré de modifications phénotypiques des cellules transfectées, toutes les manipulations génétiques étant effectuées à l'extérieur de l'individu. Historiquement, ces techniques de transfert de gène *ex vivo* ont été développées pour le traitement du cancer [Rochlitz, 2000], du Sida [Poeschla, 1996] ou encore de la polyarthrite rhumatoïde [Pap, 2002]. Elles ont fait preuve de leur efficacité et de leur sécurité. Le problème principal de ces techniques est la lourdeur du protocole (temps de manipulation et coût élevé) qui rend leur utilisation difficile en clinique. C'est une des raisons pour lesquelles la technique de transfert de gène *in vivo* a été développée. Le vecteur est directement introduit dans l'articulation concernée contournant ainsi les écueils précédents. En revanche, le contrôle du vecteur doit être particulièrement rigoureux pour éviter les effets indésirables et en particulier la dissémination. Ces techniques, particulièrement en vogue depuis ces dernières années, sont amenées à se développer encore davantage afin être optimisées [Romano, 1998]. Les cibles potentielles utilisables pour le traitement de l'arthrose sont la

synoviale, le cartilage et l'os. Néanmoins, à ce jour, on ne dispose pas d'arguments scientifiques suffisants pour déterminer le meilleur gène utilisable dans le traitement de l'arthrose. La production de médiateurs anti-inflammatoires ou protecteurs vis à vis de l'inflammation est l'élément déterminant dans la stratégie thérapeutique. Néanmoins, les cibles potentielles sont multiples et les pistes à explorer nombreuses [Fernandes, 2000]. Ainsi, les voies de recherche concernent : les inhibiteurs de cytokines pro-inflammatoires (IL-1Ra, ICE, TNF-sR [Zhang, 2000] ...), les cytokines anti-inflammatoires (IL 4 [Woods, 2001], IL-10 et 13), les inhibiteurs de métalloprotéases (TIMP 1-2), les inhibiteurs de l'apoptose, les facteurs de croissance (TGF $\beta$  [Song, 1998], IGF, BMP 2-7...). Parmi ces voies novatrices, le transfert de gènes avec l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1 RA) est d'une importance toute particulière [Gouze, 2003]. Cette stratégie s'appuie sur des résultats suggérant que l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) joue un rôle pivot dans les stades précoces et tardifs de l'arthrose, cette cytokine étant produite par les synoviocytes et les chondrocytes. Alors que les synoviocytes, qui sont des cellules en division, peuvent être transduits *in vivo* avec une grande efficacité avec des vecteurs viraux notamment, la transduction des chondrocytes articulaires est un problème majeur du transfert de gènes dans l'arthrose. Les chondrocytes sont des cellules quiescentes non mitotiques, situées au sein d'un réseau de collagènes et protéoglycanes, ce qui explique les difficultés techniques des transferts de gène.

Pour pallier les principaux écueils liés à l'utilisation des vecteurs viraux (stimulation de la réponse immunitaire, dissémination dans les tissus avoisinants, risques de recombinaisons) des systèmes non viraux ont été développés : lipoplexe, méthodes physiques... Parmi ces méthodes, l'électroporation, une approche *in vivo* directe, semble intéressante car elle permet de véhiculer un transgène dans l'articulation tout en limitant la diffusion de l'information génétique aux autres tissus. Le transfert de gène par électroporation [Grossin, 2003] consiste à introduire un gène rapporteur dans l'articulation et à appliquer des impulsions électriques externes afin de transférer ce gène dans le chondrocyte. Cette méthode est facile à réaliser et parfaitement reproductible, rapide avec de bons rendements et surtout non toxique. Une étude récente réalisée chez l'homme a d'ailleurs rapporté une bonne tolérance de la sensation électrique provoquée par les impulsions électriques *via* des électrodes non invasives [Zhang, 2002]. L'électroporation n'altère pas ou peu la structure biologique de la cellule ciblée ni son fonctionnement biologique. Cette technique offre donc une alternative aux vecteurs viraux qui peuvent présenter certains inconvénients. La perméabilisation réversible de la membrane cellulaire soumise à un champ électrique permet d'introduire toutes sortes de molécules dans la cellule. Elle offre donc des perspectives intéressantes mais des études complémentaires

s'imposent afin de préciser d'une part sa place parmi les différentes techniques existantes et d'autre part de vérifier sa parfaite innocuité avant son utilisation en clinique.

Les stratégies thérapeutiques sont donc multiples et offrent des perspectives encourageantes pour les malades souffrant d'arthrose dans les décennies à venir.

## **B.9- Indications thérapeutiques actuelles**

Les thérapeutiques mises en œuvre doivent donc permettre de réduire la douleur et de conserver ou de restaurer un confort de vie optimal. Pour cela, il existe non pas un mais des traitements. Mais aucun de ces traitements ne permet de restaurer un cartilage articulaire normal.

Il faut distinguer le traitement des lésions arthrosiques diffuses de celui des lésions chondrales ou ostéochondrales localisées.

Les lésions diffuses relèvent pleinement du traitement médical, antalgiques et AINS, injections intra-articulaires de corticoïdes, chondroprotecteurs et plus récemment injections intra-articulaires de hyaluronate.

Les lésions localisées en revanche (exemple type : lésion ostéochondrale post-traumatique du sujet jeune) ne relèvent pas ou peu des traitements médicaux mais des traitements chirurgicaux classiques et à l'avenir de l'ingénierie tissulaire qui a toute sa place dans le traitement de ces lésions [Ochi, 2002].

## **C- TRAITEMENTS DES LESIONS ARTHROSIQUES DIFFUSES**

Le traitement des lésions arthrosiques diffuses est essentiellement médical, médicamenteux et rééducatif

### **C.1- Antalgiques**

Les traitements antalgiques visent principalement à diminuer la douleur sans action sur l'évolution naturelle de l'arthrose. On distingue les antalgiques simples non morphiniques qui agissent sur la composante nociceptive et les antalgiques morphiniques qui agissent sur les voies de conduction et d'intégration du signal douloureux au niveau du système nerveux central.

Les antalgiques simples comme le paracétamol représentent le traitement de première ligne. Ils auraient une efficacité similaire à celle des AINS dans le traitement symptomatique de l'arthrose [March, 1994] avec un rapport bénéfice-risque supérieur à celui des AINS.

### **C.2- Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

Les AINS sont largement utilisés dans le traitement de l'arthrose. Ce sont des inhibiteurs de Cox-1 et/ou Cox-2. Ces enzymes catalysent la conversion de l'acide arachidonique en endopéroxydes, les précurseurs des prostaglandines. Ces prostaglandines contribuent activement à l'inflammation [Vane, 1998].

Shématiquement, Cox-1 intervient dans la synthèse des prostaglandines nécessaires à l'homéostasie digestive, vasculaire et rénale. Cox-2 participe à la production de PGE2 sur les sites inflammatoires. L'inhibition non sélective des Cox outre son action anti-inflammatoire aboutit à des effets indésirables gastriques, vasculaires et/ou rénaux. Les inhibiteurs sélectifs de Cox-2 permettraient, en revanche, une action ciblée sur les PGE2 sans effet indésirable sur la muqueuse gastrique en particulier [Davies, 2001 ; Sundry, 2001].

Néanmoins, les résultats de l'utilisation des AINS dans l'arthrose sont contrastés. Certaines études montrent un effet bénéfique des AINS qui stimuleraient la synthèse des constituants de la matrice et diminueraient leur dégradation [Ghosh, 1993]. D'autres en revanche montrent un effet délétère des AINS. La chondroneutralité des AINS est donc encore discutée.

### **C.3- Injections intra-articulaires de corticostéroïdes**

Ces infiltrations sont proposées dans les poussées inflammatoires et en cas d'échec du traitement anti-inflammatoire *per os*. Les formes cristallines des corticoïdes constituent une administration à libération prolongée permettant un effet antalgique de plusieurs semaines [Derendorf, 1986]. Les études expérimentales chez les animaux montrent des résultats divergents avec les corticoïdes injectés en intra-articulaire [Williams, 1985 ; Pelletier, 1989]. Il semblerait néanmoins que l'effet sur le cartilage en clinique ne soit pas délétère si les injections sont espacées de 6 mois et que leur nombre n'excède pas 3 [Brandt, 1996]. Une étude récente [Raynauld, 2003] confirme l'innocuité de la corticothérapie intra-articulaire à moyen terme (recul de 2 ans) pour le cartilage articulaire.

### **C.4- Traitements symptomatiques d'effet retardé ou prolongé**

Les anti-arthrosiques d'effet retardé et prolongé ont pour but de diminuer la prise d'AINS et/ou d'antalgiques. Plusieurs produits sont disponibles sur le marché : la chondroïtine sulfate [los Reyes, 2000], la diacerhéine [Moldovan, 2000] et les insaponifiables de soja et d'avocats [Maheu, 1998]. Ils sont habituellement bien tolérés en dehors de troubles digestifs (diacerhéine). Leur efficacité n'apparaît qu'après 6 à 8 semaines de traitement avec un effet rémanant 2 mois après l'arrêt. Certains d'entre eux revendiquent par ailleurs un effet structuro-modulateur.

### **C.5- La viscosupplémentation**

Le hyaluronate de sodium est un polysaccharide de haut poids moléculaire présent physiologiquement en grande quantité dans l'articulation. Il se trouve d'une part sous forme de sel de sodium dans le liquide synovial et d'autre part il représente l'un des constituants essentiels de la matrice extracellulaire du cartilage. Il sert de squelette aux agrégats de protéoglycannes et stabilise le réseau collagénique. Il joue le rôle de lubrifiant, participe à la bonne trophicité du cartilage et lui permet d'assurer sa fonction d'amortisseur de chocs. Dans l'articulation arthrosique, le hyaluronate de sodium est moins concentré que dans l'articulation normale (moyenne 0,8-2mg/ml au lieu de  $3\pm 0,5$  normalement) et son poids moléculaire est réduit (0,5-4 Mda au lieu de 4-5 Mda) de sorte que son rôle physiologique est altéré. L'ensemble de ces éléments conduisent au concept de viscosupplémentation (Figure 5), c'est à dire l'injection intra-articulaire de hyaluronate de sodium de haut poids.



*Figure 5 : Viscosupplémentation par injection intra-articulaire de hyaluronate de sodium dans le genou*

Cette supplémentation permettrait de limiter les frottements dus aux articulations détériorées. Il a probablement un mécanisme d'action beaucoup plus complexe qu'un simple lubrifiant, il est possible qu'il ait un effet biochimique direct [Iwata, 1993]. Dans des modèles expérimentaux, il a été montré que l'acide hyaluronique pénétrait dans le cartilage articulaire défectueux et le protégeait des protéolyses ultérieures [Smith MM, 1987]. Cependant, ni les études expérimentales [Ghosh, 1995 ; Smith GN, 1998] ni les études cliniques [Frizziero 1998, Peyron 1993] ne s'accordent sur la place d'un tel traitement dans l'arthrose. Il semble que l'action chondroprotectrice de l'AH dépende de la taille et/ou de la structure de la molécule [Shimizu, 1998].

L'application de ce concept en clinique dans le traitement des gonarthroses ou coxarthroses symptomatiques s'est développé de façon significative ces dernières années. L'objectif de ce traitement est triple : maintenir l'espace endo-articulaire, réduire la douleur et maintenir ou rétablir la mobilité de l'articulation. Trois injections intra-articulaires à une semaine d'intervalle sont habituellement recommandées. Ce traitement est réalisé de façon ambulatoire comme les infiltrations de corticoïdes. De nombreux produits sont actuellement disponibles sur le marché (Tableau 3).

Les premières utilisations de hyaluronate de sodium dans l'arthrose reviennent à Rydell et Balazs [1971]. Plusieurs études conduites depuis les années 70 ont montré des effets bénéfiques dans le traitement de la gonarthrose [Dougados, 1993 ; Huskisson, 1999 ; Altman, 1998 ; Frizziero, 1998] sur la douleur et la fonction articulaire. Cette efficacité s'amplifie au décours du traitement avec un effet rémanent prolongé de 6 mois à un an. Son efficacité diffère de celle des infiltrations de corticoïdes, par un délai d'action plus retardé dans le temps

(2 à 4 semaines), mais également plus prolongé puisque l'effet est maintenu jusqu'à 6 mois ou 1 an selon les études. L'association des infiltrations de cortisone et des injections d'acide hyaluronique semble intéressante pour avoir un effet rapide et prolongé.

Les injections intra-articulaires de hyaluronate de sodium (Tableau 3) ont également été proposées pour d'autres articulations comme la hanche [Brocq, 2002] ou l'articulation temporo-mandibulaire [Bertolami, 1995 ; Gu, 1998 ; Guarda-Nardani, 2002] avec des résultats superposables.

Des études expérimentales ont également montré que le hyaluronate pouvait prévenir l'apparition des lésions cartilagineuses et protéger l'os sous-chondral de certaines contraintes mécaniques excessives comme la méniscectomie [Ghosh, 1995 ; Armstrong, 1994 ; Wigren, 1975] ou la section du LCA [Abatangelo, 1989 ; Schiavinato, 1989].

Tableau 3 : Caractéristiques des principaux produits de viscosupplémentation disponibles sur le marché.

Nom produit	Laboratoire fabricant	Laboratoire distributeur	Présentation (seringues)	Hyaluronate de sodium			Viscosité dynamique (Pa.s)			Indications
				Concentration	Origine	PM(kDa)	0,01s-1	1s-1	100s-1	
<b>Synvisc (CE0483)</b>	Biomatrix (USA)	Genzyme (France)	3x2ml	0,8% hylane A+B	Crête de coq	6000 réticulé	600	45	0,75	genou
<b>Viscorneal ortho</b>	Cornéal (France)	Cornéal (France)	1x2ml 3x2ml	1%	Crête de coq	6000		40	1,2	Genou Articulations synoviales
<b>Orthovisc (CE0120)</b>	Anika (USA)	Zimmer (France)	1x2ml	1,5%	Crête de coq	1000	35	20	1,5	Articulations synoviales
<b>Supartz (CE0123)</b>	Seikagaku Corp (Japon)	Smith Nephew (France)	1x2,5ml 3x2,5ml 5x2,5ml	1%	Crête de coq	>500	2	2	0,6	Genou
<b>Hyalgan</b>	Fidia (Italie)	Bioiberica (Espagne)	1x2ml	1%	Crête de coq	500-730	2	2	0,6	Genou Autres articulations synoviales
<b>Sinovial (CE0499)</b>	Genévrier (France)	Genévrier (France)	3x2ml	0,8%	Bio fermentation	800-1200	0,64	0,64	0,3	Genou Autres articulations synoviales
<b>Ostenil (CE0123)</b>	Chemedica Allemagne	TRB Chemedica France	1x2ml 3x2ml 5x2ml	1%	Bio fermentation	1000-2000	0,5	0,5	0,3	Genou Autres articulations synoviales
<b>Adant (CE0318)</b>	Tedec-Meji (Espagne)	Fornet (France)	1x2,5ml 5x2,5ml	1%	Bio fermentation		2,2	2,2	0,6	Genou Epaule
<b>Suplasyn (CE0473)</b>	Bioniche Teo (Irlande)	Chiesi (France)	1x2ml 3x2ml 5x2ml	1%	Bio fermentation	>40	0,5	0,5	0,3	Articulations synoviales
<b>Arthrum H (CE0120)</b>	LCA (France)	LCA (France)	1x2ml 3x2ml	2%	Bio fermentation	2000	150	60	3	Genou Autres articulations synoviales

### C.6- La rééducation

Elle joue un rôle important dans la prise en charge du patient arthrosique. L'effet bénéfique de l'activité physique sur la qualité de vie des malades atteints d'arthrose est une notion récente. L'intérêt d'un exercice adapté chez les patients arthrosiques a été souligné dans une revue

systematique en 1999 analysant 11 études randomisées comparant thérapie physique et placebo [Van baar, 1999]. Les conclusions de cette méta-analyse suggèrent qu'il existe un effet faible à modéré sur la douleur et un effet modéré à important sur la satisfaction globale du patient. L'activité physique modérée permet donc d'améliorer la fonction articulaire et donc le maintien d'une autonomie prolongée. Une étude récente de Maninnen [2001] a ainsi montré qu'une activité physique modérée permettait de diminuer le taux d'arthroplastie de genou. De même, Penninx a montré que l'exercice quotidien chez le sujet de plus de 60 ans arthrosique permettait d'améliorer la qualité de vie (déplacements au domicile, gestes de la vie courante). Les exercices isotoniques permettraient de diminuer la douleur alors que les exercices isocinétiques amélioreraient surtout la vitesse de marche [Huang, 2003] chez les patients souffrant de gonarthrose. Les exercices et la mobilisation passive continue semblent donc avoir une efficacité thérapeutique. La prise en charge de l'arthrose des membres paraît donc bénéficier de la rééducation. Toutefois, les protocoles doivent être évalués dans des études contrôlées car les études fondamentales et cliniques ne permettent pas aujourd'hui de proposer pour une articulation donnée, des protocoles précis de rééducation dans un but de chondromodulation. L'utilisation de la mobilisation passive est une voie de recherche prometteuse tant en terme d'efficacité clinique que de compréhension de la relation biomécanique-trophicité du cartilage chez l'Homme.

## **D- TRAITEMENTS DES LESIONS LOCALISEES**

Le traitement des lésions ostéochondrales localisées comporte les techniques chirurgicales d'une part et l'ingénierie cellulaire et tissulaire d'autre part.

Nous éliminerons de cette présentation le traitement des lésions cartilagineuses en miroir qui rentre dans le cadre de celui de l'arthrose, pour n'envisager que celui des pertes de substance chondrale ou ostéochondrale (post-traumatiques ou sur ostéochondrite) focalisées sur une surface cartilagineuse portante. La réparation des lésions du cartilage a pour objectif de retarder ou d'éviter l'apparition de l'arthrose dont le traitement est aléatoire et problématique chez le sujet jeune. En effet si l'arthroplastie a révolutionné le statut fonctionnel des sujets âgés, elle pose des problèmes chez le sujet jeune et actif car activités intenses et longévité des implants ne font généralement pas bon ménage. Pour réparer durablement ces lésions cartilagineuses, il est nécessaire d'évaluer parfaitement la taille, la profondeur et la localisation des pertes de substances, de réintégrer la surface à traiter dans son contexte articulaire c'est à dire en prenant en compte les conditions biomécaniques locales en terme de contrainte, d'axe et de stabilité et de connaître les techniques de réparation actuellement disponibles qui ont fait la preuve de leur efficacité à court et moyen terme.

### **D.1- Evaluation des lésions cartilagineuses**

Il s'agit d'une évaluation à la fois fonctionnelle et morphologique (Figure 6) que l'on retrouve dans la fiche de l'International Cartilage Repair Society (ICRS) pour le genou, modifiée et adaptée au dôme astragalien pour la cheville, les traitements locaux des lésions chondrales au niveau des autres articulations (hanche, coude et épaule) étant plus anecdotiques et non encore validés.

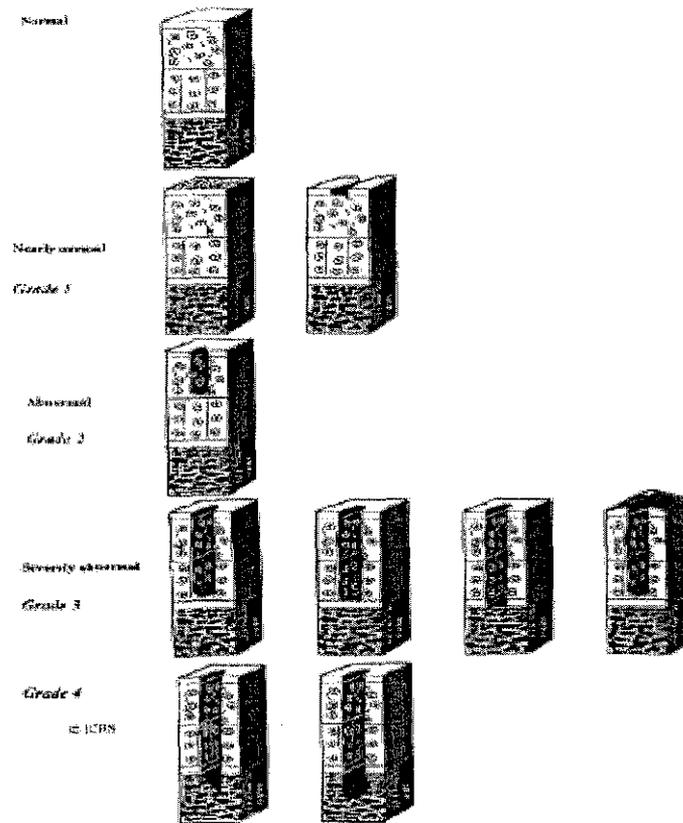


Figure 6. Classification morphologique des lésions cartilagineuses traumatiques selon l'ICRS.

Une classification identique a été également proposée pour les ostéochondrites disséquantes (Figure 7).

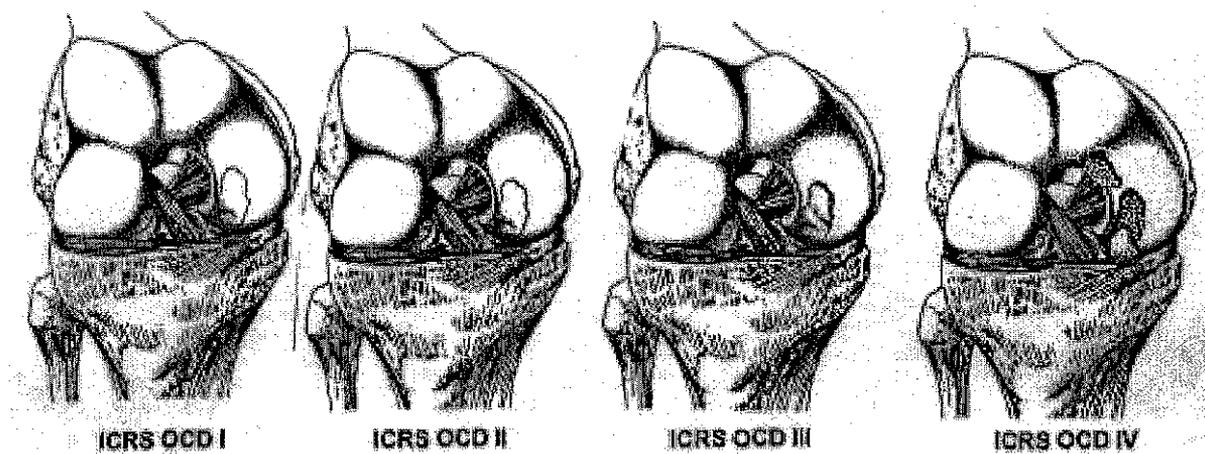


Figure 7 : Classification de l'ICRS pour les ostéochondrites disséquantes

L'évaluation fonctionnelle porte classiquement sur la douleur, la mobilité et la marche pour le membre inférieur (la douleur, la mobilité et la force de préhension ou de soulèvement pour le membre supérieur). Cette évaluation chiffrée est relative par rapport au côté opposé supposé sain intéressant par exemple:

- a. échelle visuelle analogique de la douleur
- b. évaluation subjective du genou lésé en % par rapport au genou sain
- c. niveau d'activité du patient avant l'accident, avant et après le traitement
- d. état fonctionnel subjectif (normal, presque normal, limité, très limité) avant l'accident, avant et après le traitement
- e. amplitudes articulaires pour la cheville
- f. items de la fiche IKDC pour le genou ....etc

Cette évaluation permet à la fois de quantifier la gêne fonctionnelle préopératoire et d'évaluer le résultat post-opératoire.

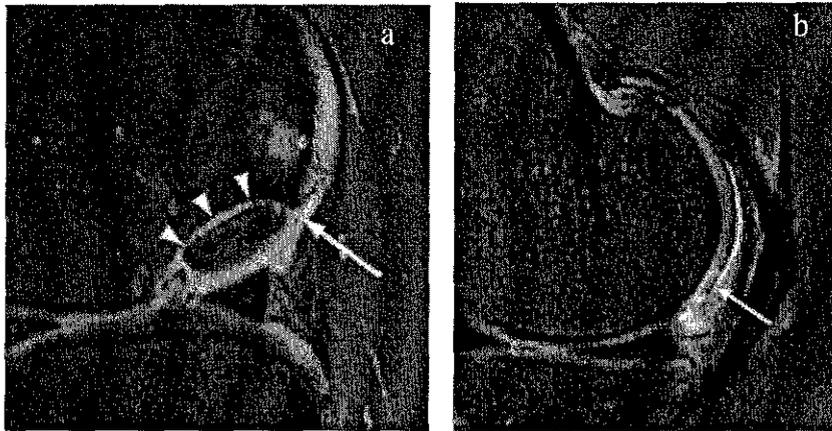
L'appréciation morphologique de la lésion pré-opératoire est radiologique, reposant peu sur les radiographies simples qui ne sont parlantes qu'en cas d'atteinte de l'os sous-chondral, mais surtout sur l'arthroscanner et l'IRM.

L'arthroscanner est performant pour réaliser une cartographie lésionnelle (images en addition), et particulièrement intéressant selon Daenen pour explorer les lésions de grade III en coupes millimétriques jointives mais aussi pour identifier les méplats des stades II ou les fissures. Ses inconvénients majeurs sont son caractère invasif et l'irradiation qui rend son utilisation discutable dans le suivi répété pour apprécier l'évolution de ces lésions.

L'IRM est plus complexe. On peut obtenir des images de qualités de la part des radiologues qui bénéficient d'appareils performants, ou en utilisant des incidences et des séquences adaptées, et qui ont été motivés par une demande d'examen bien orientée de la part des prescripteurs. Si le diagnostic topographique et lésionnel est aisé pour les lésions chirurgicalement réparables c'est à dire de grade III et IV ou les ostéochondrites (Figure 8a), cela est plus difficile pour les stades I et II, bien que facilité par la présence d'un éventuel épanchement articulaire (Figure 8b). Par contre, l'évolution des machines pourra permettre dans un proche avenir d'effectuer de manière fiable et reproductible le suivi de l'intégration des greffes ostéochondrales, et d'apprécier l'épaisseur et le volume du cartilage.

Enfin, cette évaluation peut être arthroscopique notamment dans le cadre des greffes de chondrocytes où cela représente le premier des 2 temps de la technique (prélèvement de cartilage en vue de sa mise en culture).

La connaissance de la profondeur de la lésion est intéressante car l'espoir d'une stabilisation ou d'une pseudo-cicatrisation en dépendent.



*Figure 8 : IRM du genou. Ostéochondrite disséquante du condyle fémoral. La lésion est parfaitement visible (8a). Lésion cartilagineuse superficielle du condyle fémoral. La lésion est moins évidente à visualiser et c'est l'épanchement articulaire qui facilite le diagnostic (8b).*

L'étude du terrain est fondamentale car l'évolution spontanée de la lésion et le résultat d'une éventuelle réparation chirurgicale en dépendront.

Il faut apprécier :

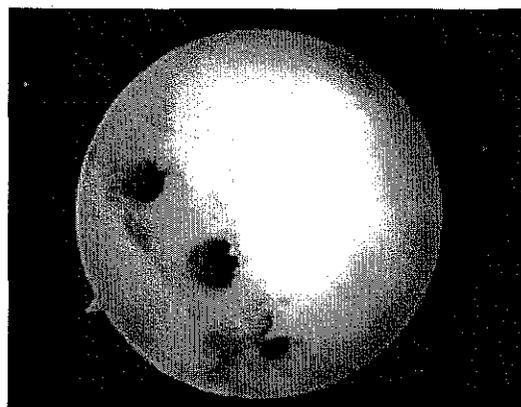
- Le poids, les activités physiques sportives et professionnelles actuelles et souhaitées du patient, et naturellement le morphotype du membre qui peut être mécaniquement favorable ou défavorable selon la localisation de la lésion (par exemple un genu valgum peut être favorable en cas de lésion du condyle interne).
- La stabilité articulaire doit être appréciée cliniquement mais aussi radiologiquement avec la présence ou non d'une instabilité car celle-ci représente un facteur connu de dégradation cartilagineuse.
- L'âge est également un facteur limitant, arbitrairement fixé à 50 ans mais corroboré par les résultats des techniques de réparation qui sont moins bons au-delà de cet âge.

## **D.2- Techniques chirurgicales**

Il faut distinguer les techniques dites à effet biologique spécifique (visant à reproduire un cartilage hyalin) et celles dépourvues d'effet biologique spécifique (par stimulation des cellules de la moelle osseuse visant à synthétiser un tissu fibrocartilagineux).

### ***D.2.1- Techniques dépourvues d'effet biologique spécifique***

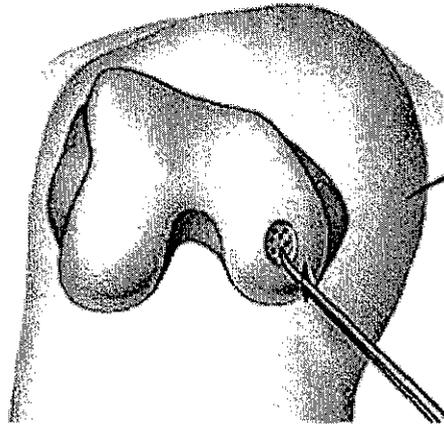
Pour réparer le cartilage, il est possible de stimuler l'os sous-chondral, par perforation, microfracture ou par abrasion ce qui permet une réparation temporaire du cartilage par la formation d'un fibrocartilage n'apportant cependant pas toutes les propriétés mécaniques du tissu original [Buckwalter, 1994]. En exposant l'os sous-chondral, une détérioration des vaisseaux sanguins de ce tissu est provoquée. Ceci provoque la formation d'un caillot de fibrine et le recrutement de cellules mésenchymateuses provenant de la moelle osseuse. Ces cellules prolifèrent et se différencient en cellules dont la morphologie est de type chondrocytaire. L'aspect macroscopique de ce tissu est semblable à celui du cartilage normal mais sa composition en collagènes et en protéoglycannes diffère. Même s'il comporte un pourcentage non négligeable de collagène de type II, ce fibrocartilage ne peut résister efficacement aux contraintes mécaniques et va se dégrader en quelques mois ou années. Cette technique permet donc une réduction temporaire des symptômes dans le cas d'un défaut articulaire localisé mais un certain nombre d'échecs ont été rapportés (de l'ordre de 30-40 %), dus principalement à l'âge et pouvant aboutir à une augmentation des symptômes [Bert, 1993]. Ces techniques de stimulation locale en vue d'une réparation par du fibrocartilage sont utilisées depuis les travaux de Pridie [1959] qui développa la technique de forage (Figure 9) de l'os sous-chondral au niveau de la lésion afin de stimuler les cellules souches de la moelle osseuse sous-jacente et de combler la perte de substance par des cellules mésenchymateuses qui vont donner en profondeur de l'os et en superficie un fibrocartilage.



*Figure 9 : Technique de forage selon Pridie.*

Nous citerons également, selon le degré d'agressivité, les chondroplasties abrasives, les débridements et les micro fractures de Steadman [2001, 2002] et Gill [2000]. Parmi ces techniques, nous retiendrons surtout la technique des microfractures (microfracturing) (Figure

10) mise au point par Steadman. Il s'agit d'une technique conduite sous arthroscopie, avec du matériel simple et peu coûteux, comprenant un premier temps de débridement qui respecte la couche sous-chondrale, qui élimine la couche cartilagineuse lésée et qui avive les berges. Le deuxième temps est la réalisation de perforations au poinçon tous les 2 à 3 mm sur une profondeur de 2 à 4 mm de manière à soulever des fragments ostéochondraux sans l'action délétère thermique de la broche ou de la mèche utilisée dans les perforations de Pridie.



*Figure 10 : Technique de la microfracture. Débridement de la lésion cartilagineuse jusqu'à la zone calcifiée sans atteindre la lame sous-chondrale et poinçonnage*

Les suites post-opératoires paraissent très importantes aux auteurs avec une mise en décharge complète de 6 à 8 semaines associée à une mobilisation passive continue, une reprise du sport au 4ème mois. Par contre, pour les traitements des surfaces fémoro-patellaires, la mise en charge en extension est autorisée, la flexion limitée à 30°.

Les avantages de cette technique sont sa simplicité, son faible coût, sa faible morbidité et le fait qu'elle ne coupe pas les ponts aux autres techniques de régénération. En outre, certaines localisations sont accessibles à cette technique comme le pilon tibial ou le plateau tibial, alors qu'elles ne le sont pas pour les techniques de greffe.

Ses inconvénients tiennent avant tout au type de tissu qu'elle génère (fibrocartilage) et aux contre-indications relatives car sources de moins bons résultats : âge de plus de 40 ans, pincement radiologique pré-opératoire, étendue lésionnelle de plus de 4 cm<sup>2</sup>, lésions chroniques de plus de 12 semaines.

Steadman a rapporté en 1998 sur 435 cas consécutifs porteurs de lésions stades IV d'Outerbridge un taux de 75 % de bons résultats sur la douleur. Son élève Thomas Gill rapporte 86 % de reprise du sport dans une série personnelle de 103 patients de moins de 35 ans, pour des lésions de 2.5 cm<sup>2</sup> en moyenne et avec un recul moyen de 6 ans donc des

résultats assez stables dans le temps. En outre des contrôles arthroscopiques ont été réalisés montrant une surface normale dans 50 % des cas.

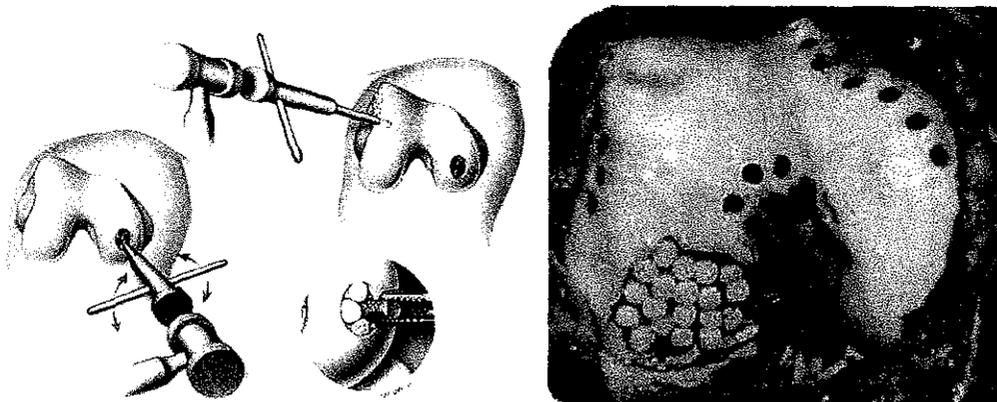
Néanmoins, ces techniques ne permettent pas l'obtention d'un cartilage hyalin et sont donc vouées à court ou moyen terme à l'échec.

### ***D.2.2- Techniques avec action biologique spécifique***

Ces techniques en vue d'un remplacement par du cartilage " hyalin " reposent sur l'implantation *in situ* de tissu mature pouvant s'intégrer (mosaicoplastie), de tissu chondrogénique capable de se différencier (périoste ou périchondre), sur les allotransplantations et sur les techniques d'ingénierie cellulaire (culture de chondrocytes).

#### **D.2.2.1- Les autogreffes ostéochondrales en mosaïque**

Les autogreffes ostéochondrales en mosaïque (mosaicoplastie) ont pour principe de combler la perte de substance à l'aide de greffons cylindriques ostéochondraux de diamètre variable (2.7 mm à 10mm de diamètre selon les ancillaires), pris au dépens des zones articulaires non portantes du genou (berges trochléennes et pourtour de l'échancrure) (Figure 11). Décrite pour la première fois en 1993 par Matusue, elle a été largement étudiée, utilisée puis promue par L. Hangody [1998] puis par Bobic [1999] et Jakob [2002].



*Figure 11 : Technique de la « mosaicoplastie ». Comblement d'une lésion ostéochondrale du condyle fémoral par des autogreffes ostéochondrales multiples prélevées en zone non portante*

Actuellement, la validation technique intéresse le genou axé, stable ou stabilisé en zone portante (condyles, trochlée, rotule), le dôme astragalien pour lequel l'implantation nécessite le plus souvent une ostéotomie de malléole. La greffe de cartilage hyalin doit combler au moins 80% de la surface du défaut cartilagineux, les espaces inter-plots seront comblés par

une repousse de fibrocartilage. La mise en place sous arthroscopie est difficile et ne peut être appliquée raisonnablement qu'aux lésions de moins de 1 cm<sup>2</sup> ; au-delà, l'arthrotomie s'impose. La mise en décharge avec mobilisation précoce est réalisée pendant les 6 premières semaines post-opératoires avec un retour au sport vers 6 mois.

Les avantages proviennent de la simplicité de la technique opératoire réalisée en un temps, l'apport de tissu cartilagineux autologue vivant, de son faible coût, de sa faible morbidité sur le site de prélèvement (3% de syndrome douloureux résiduel sur la série de 600 cas de Hangody) et de ses bons résultats (85% de patients satisfaits).

Les inconvénients sont en fait la limitation de ses indications aux lésions inférieures à 1.5 cm<sup>2</sup> sur l'astragale et inférieures à 3 cm<sup>2</sup> sur le condyle du fait du risque de morbidité sur le site donneur, et aux lésions très profondes (supérieure à 1 cm) du fait du risques de fractures ou d'instabilité des greffes (greffon " flottant ").

Cette technique présente les mêmes inconvénients que la formation d'un fibrocartilage. En effet, la jonction entre le transplant et le cartilage restant est imparfaite avec une congruence du comblement difficile à obtenir. De ce fait, il peut rester une zone de fibrocartilage pouvant évoluer vers arthrose à court ou moyen terme. Les critères de succès de ce type de greffe sont l'âge (inférieur à 50 ans), une lésion limitée à un seul compartiment de l'articulation et dont la surface est inférieure à 4 cm<sup>2</sup> (condyle) ou 1,5 cm<sup>2</sup> (astragale).

#### **D.2.2.2- Les autogreffes de périchondre et de périoste**

Les greffes périostées sont utilisées depuis les travaux de O'Driscoll [1986]. Le " cambium layer " couche profonde du périoste est riche en cellule progénitrices chondrales et osseuses et en facteurs de croissance.

Le principe est de placer un lambeau libre inversé de périoste sur la perte de substance cartilagineuse qui a été préalablement avivée et micro-fracturée.

Les avantages sont la simplicité de la technique qui ne coupe pas les ponts à une autre technique et la possibilité d'obtenir du cartilage hyalin ou « hyaline like ». Néanmoins, les résultats sont très contradictoires et les séries trop peu nombreuses pour conclure. Les inconvénients sont les dégradations secondaires en relation avec la diminution du taux des cellules progénitrices avec l'âge et l'ossification à moyen terme (production de collagène type X).

Une technique utilisant le périchondre a été développée par Homminga [1990]. Celle-ci donne des résultats médiocres avec seulement 40% de patients satisfaits et avec la présence de calcifications dans la zone greffée dans 53% des cas.

La greffe de tissus non cartilagineux apporte à la fois des cellules et une matrice extracellulaire. Ces greffes sont généralement réalisées avec du tissu autologue provenant de zones non portantes (périoste, périchondre) [O'Driscoll- Hommiga]. Les observations cliniques des greffes de périchondre montrent de meilleurs résultats avec des patients jeunes que des personnes plus âgées [Seradge, 1984]. Il paraît donc plus difficile de faire produire du cartilage avec une surface articulaire fonctionnelle par des chondrocytes ou des cellules souches mésenchymateuses provenant de patients âgés.

### **D.2.2.3- Les allogreffes cartilagineuses**

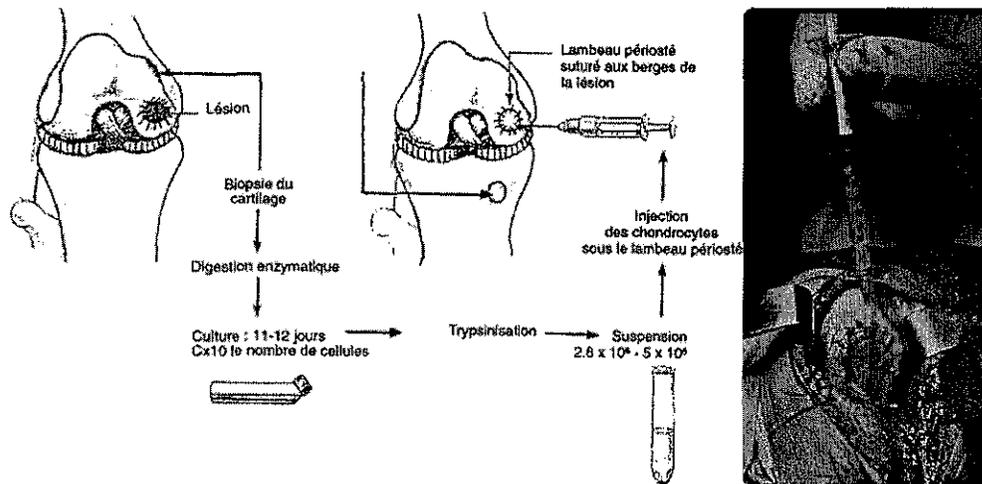
Les allogreffes cartilagineuses ont montré des résultats encourageants [Aubin, 2001; Convery, 1991] mais leurs inconvénients potentiels, faible viabilité cellulaire, difficulté d'intégration du greffon et surtout le risque de transmission virale sont un facteur limitant à leur utilisation à l'heure actuelle. Ces techniques non utilisées en France ont montré des résultats encourageants dans certains pays comme la Belgique, les Etats-Unis ou l'Espagne.

## **D.3- Ingénierie cellulaire et tissulaire**

### ***D.3.1- Culture de chondrocytes autologues***

Récemment de nombreuses équipes ont orienté leurs travaux vers la transplantation de chondrocytes en raison du succès obtenu par une procédure de prélèvement et d'implantation de chondrocytes autologues (ACI). Les greffes de chondrocytes autologues ont été mises au point par l'équipe suédoise de Göteborg de Lars Peterson et Matts Brittberg [1994]. Ce procédé original a pour principe de prélever chez le patient sous endoscopie du cartilage sain en zone non portante (200mg), puis de l'adresser dans un laboratoire de culture cellulaire agréé pour y subir une mise en culture après l'avoir débarrassé de sa matrice. Après 3 semaines, la culture est prête, conditionnée dans de petits flacons contenant 12 millions de cellule (viabilité > à 80%) (Figure 12). L'implantation se fait par arthrotomie. Un patch de périoste est positionné puis suturé de manière étanche au pourtour de la perte de substance, la culture étant injecté sous ce patch après vérification de l'étanchéité. Après quelques heures

d'immobilisation stricte, la mobilisation activo-passive est demandée, sans appui pendant 6 semaines, un retour au sport se faisant entre 6 et 12 mois.



*Figure 12 : Technique de Brittberg en 3 temps (prélèvement de cartilage en zone non portante, multiplication cellulaire et réinjection dans la lésion sous couvert d'un lambeau périosté)*

L'étude de Peterson [2000] effectuée sur une période de 2 à 9 ans, recensant 101 patients (jeunes et sans arthrose), présente de très bons, voire d'excellents résultats. Aujourd'hui, l'ACI semble la technique la plus performante pour améliorer la mobilité et la qualité de vie du patient et est commercialisée par des sociétés comme Genzyme® aux Etats-Unis et Codon® et Verigen® en Allemagne.

Les avantages de la technique tiennent dans les résultats fonctionnels obtenus (88 % de résultats satisfaisants) et dans la production de cartilage « hyaline-like ». Les surfaces greffées sont supérieures à celles des mosaïcoplasties avec l'obtention de cartilage hyalin-like dans 80 % des cas sur les biopsies. Les tests d'indentation sont proches de ceux du cartilage sain de proximité.

Les inconvénients tiennent au coût de cette greffe et à la lourdeur de sa mise en œuvre (sécurité, traçabilité, ingénierie cellulaire...) avec l'existence d'un nombre très réduit de laboratoires agréés capables de produire une culture viable et sécurisée pour l'instant. En outre, il n'y a pas de prise en charge actuellement de la culture par la CNAM, un essai clinique sous l'égide de la SFA est en cours en vue de la validation de ce procédé.

Les problèmes posés par cette technique (fuite cellulaire élevée, coût élevé, ...) ainsi que les questions soulevées (phénotype des chondrocytes implantés) ont conduit de nombreuses équipes à développer de nouvelles techniques utilisant des matrices en 3 dimensions permettant un maintien du phénotype et une répartition homogène des cellules (chapitre ingénierie tissulaire). L'objectif de ces techniques étant de créer un néocartilage *in vitro* en utilisant ces biomatériaux hybrides [Frenkel, 1999] pour combler une perte de substance ostéochondrale.

### D.3.2- Ingénierie tissulaire

Les techniques précédentes de culture de chondrocytes ont donc leurs limites (fuite cellulaire, problème lié au maintien du phénotype chondrocytaire notamment) pour une utilisation clinique en vue d'une implantation. Pour pallier ces inconvénients, il a été envisagé de réaliser des cultures de chondrocytes dans des biomatériaux en 3D (Figure 13) ayant déjà des propriétés mécaniques et biologiques proches de celles du tissu cartilagineux. Cette approche est déjà utilisée pour la réalisation de peaux reconstruites autologues et pour d'autres tissus.

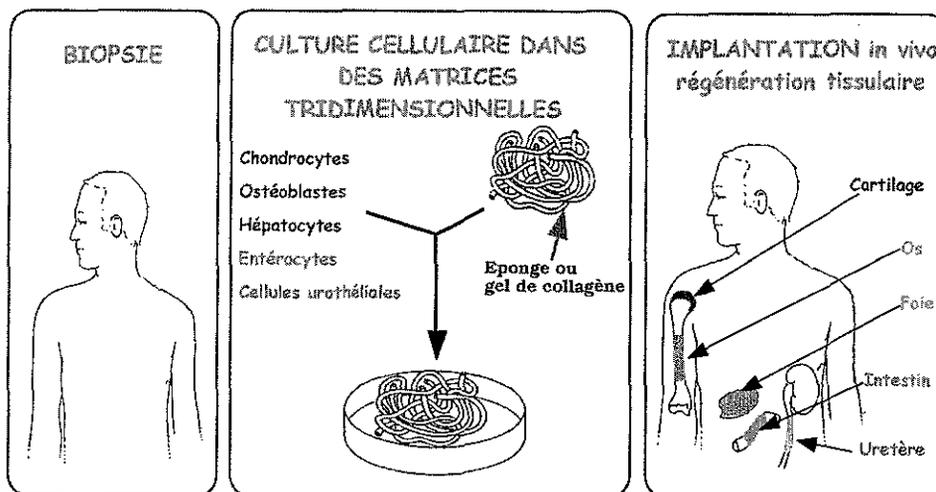


Figure 13 : Principes de réparation tissulaire par culture cellulaire en 3D.

Les biomatériaux constituent un modèle de culture *in vitro* et une solution pour la réparation du cartilage. Les supports tridimensionnels sont en effet de bons candidats pour la réparation du cartilage car ils peuvent servir de système de transport des cellules dans les lésions cartilagineuses : ils ont la possibilité de recouvrir des surfaces étendues et permettent de mieux promouvoir la multiplication des chondrocytes et la synthèse d'une matrice de type cartilagineux que les autres systèmes de culture. En effet, il se produit une reconnaissance du

matériau par les cellules qui adaptent leur métabolisme. Ces supports doivent néanmoins répondre à un cahier des charges strict. Le biomatériau doit être parfaitement biocompatible (interactions cellules-biomatériau) et biodégradable (remodelage). Sa porosité doit être suffisante afin de permettre la colonisation cellulaire. Par ailleurs, il doit permettre les phénomènes d'adhésion (attachement cellulaire) et de biointégration (interaction tissu de réparation-tissu natif). Enfin, son volume, sa taille, son élasticité doivent être adaptés aux exigences requises par la nature du comblement. Les recherches sur la production d'un néo-cartilage comportent deux aspects complémentaires : d'une part, un aspect fondamental qui apporte des connaissances sur les mécanismes de différenciation des chondrocytes et permet la mise au point des techniques de contrôle du phénotype des chondrocytes et d'autre part, un aspect appliqué afin de développer des matrices cartilagineuses implantables chez l'homme. Ces approches sont développées par de nombreux laboratoires en utilisant divers biomatériaux comme support de culture. Elles concernent aussi bien la culture *in vitro* que l'implantation chez l'animal (chien, lapin, cheval...) afin d'étudier le comportement et le devenir à plus ou moins long terme des matrices artificielles préparées. L'implantation humaine réalisée récemment par une équipe Japonaise [Ochi, 2002] renforce cette approche. Néanmoins, elle doit être réalisée avec de nombreuses précautions aussi bien dans l'élaboration du néo-cartilage, qu'aux niveaux de la biosécurité et de la bioéthique. On distingue 3 grandes catégories de matrices : les matrices synthétiques, les matrices de nature protéique et les matrices de nature polysaccharidique.

Les matrices synthétiques sont préparées avec des polymères comme les polyesters ou les polyéthylènes à haute densité. Parmi elles, les matrices en acide polylactique (PLA) et en acide polyglycolique (PGA) ou l'association des 2 (PLA-PGA), sont des matrices biorésorbables utilisables pour la culture de chondrocytes. Ces composés sont utilisés depuis fort longtemps comme composant de fils de suture chirurgicale. Des études *in vitro* et expérimentales avec ces composés ont été pratiquées et ces polymères constituent des modèles intéressants pour la culture de chondrocytes [Vacanti, 1994 ; Puelacher, 1994 ; Freed, 1993]. Néanmoins, leur application biomédicale est limitée par le caractère acide de leur produit de dégradation [Kim, 1998 ; Cao, 1998] susceptible de produire des réactions inflammatoires.

Les matrices de nature biologique sont les collagènes, la fibrine, ou la gélatine (collagène dénaturé).

Parmi ces matrices naturelles, les collagènes sont d'excellents biomatériaux en raison de leurs propriétés mécaniques et de leur préparation sous différentes formes (gel, film, fils, éponges) [Rault, 1996]. En effet, le collagène est une substance de choix pour la réalisation de ces biomatériaux car cette protéine possède une bonne résistance mécanique, une biocompatibilité et une biodégradabilité contrôlables et elle joue un rôle favorable dans le développement cellulaire. Le collagène de type I est principalement utilisé pour la fabrication des biomatériaux. En effet, il est peu immunogène et cette antigénicité peut être réduite par réticulation thermique ou chimique ou par élimination des télépeptides par une digestion avec la pepsine. Malgré tout, des anticorps contre le collagène de type I ont été détectés chez des patients traités avec du collagène de derme bovin [McCoy, 1985]. Cette réaction dépend de l'espèce d'origine du collagène ainsi que du site d'implantation [Klopper, 1986]. Par contre, l'existence d'une corrélation entre les implants de collagène de type I bovin et des maladies auto-immunes n'a pas été démontrée à ce jour [Aragona, 1998]. Pour le cartilage, le collagène de type II pourrait être un bien meilleur biomatériau. En effet, il a été démontré qu'il induit une stimulation de la prolifération des chondrocytes et un maintien du phénotype [Nehrer, 1997]. Cette action se fait *via* l'activation de cytokines qui sont inhibées par le collagène de type I [Qi, 1998]. Cependant, le collagène de type II a été décrit comme responsable de maladies auto-immunes et ne peut donc pas être utilisé comme biomatériau implantable [Miyata, 1992].

Le collagène de type I est biodégradé par des collagénases sous sa forme native ou par des gélatinases sous sa forme dénaturée. Pouvoir faire varier la vitesse de dégradation du collagène de l'implant est un paramètre important permettant le contrôle de la durée de vie du biomatériau. La dégradation des biomatériaux à base de collagène est modulable par des traitements physiques ou chimiques. La déshydratation thermique permet d'éliminer l'eau liée aux molécules de collagènes. Ceci permet de créer des ponts entre des acides aminés de différentes chaînes. Ainsi, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la sérine, la thréonine, l'arginine et lysine sont pontés par estérification ou par formation de liaisons amides. Pour cela, les biomatériaux de collagène sont soumis à un traitement thermique sous vide (généralement 110°C) pendant une durée pouvant atteindre plusieurs jours [Weadock, 1984]. L'utilisation d'agents bifonctionnels permet de ponter les groupements amines et des résidus lysines ou hydroxylysines. Les aldéhydes sont les agents les plus fréquemment utilisés mais ils présentent une cytotoxicité attribuée à deux éléments distincts: (1) les résidus n'ayant pas réagi; (2) la formation de polymères relargables. Le glutaraldéhyde provoque, par exemple, un

arrêt de la prolifération de fibroblastes en culture (inhibition de 99 % de l'incorporation de 3H-thymidine). *In vivo*, 60 % du fixateur est relargué dans l'organisme [Speer, 1980].

Une autre approche est la réticulation par formation de liaisons peptidiques entre des groupements carboxyliques activés et des groupements amines d'une autre chaîne polypeptidique [Weadock, 1984]. Suivant une approche similaire, Petite *et al.* [1990, 1994] ont utilisé l'hydrazine et le diphénylphosphorylazide (DPPA) pour l'activation des groupements carboxyliques avec la formation intermédiaire de groupements acétyl acides. Des éponges de collagènes réticulées avec le DPPA se sont montrées d'excellents supports à la culture *in vitro* de chondrocytes avec la synthèse d'une matrice cartilagineuse avec sérum [Roche, 2001] ou sans sérum avec ascorbate [Ronziere, 2003]. De même, le gel de collagène se montre un support favorable à la culture de chondrocytes et à la synthèse d'une matrice cartilagineuse [Galois, 2003]. L'implantation humaine de ces gels de collagène vient d'ailleurs d'être publiée récemment par une équipe Japonaise [Ochi, 2002] avec des résultats très encourageants. Ces résultats prometteurs doivent nous encourager à poursuivre le développement et l'amélioration de ces matrices collagéniques.

Enfin, les matrices de nature polysaccharidique comportent l'agarose, l'alginate, le chitosan, le hyaluronate. Ces matériaux possèdent de nombreux sites d'attachement aux cellules et sont biologiquement actifs (chimiotactisme) [Postlethwaite, 1978]. Ils constituent donc d'excellents supports de culture mais sont plus ou moins bien tolérés par l'organisme receveur. Tous ces matériaux posent de multiples problèmes pour leur production à grande échelle: variabilité inter-lots due aux impuretés et à l'espèce dont ils sont issus, coût élevé de préparation et de purification, risque de contamination biologique.

Les polysaccharides constituent un modèle privilégié pour la culture tridimensionnelle de chondrocytes. L'alginate de calcium et le hyaluronate de sodium sont à l'heure actuelle particulièrement étudiés *in vitro* [Miralles, 2001] et *in vivo* [Dausse, 2003] et semblent être des biomatériaux particulièrement intéressants. Cependant, l'expérimentation *in vivo* de ces polymères est encore limitée du fait des problèmes de tolérance (réaction macrophagique,...) qu'ils sont susceptibles d'engendrer.

L'amélioration de ces matrices [Hunziker, 2002] passe par l'utilisation appropriée d'un certain nombre de facteurs de croissance (IGF, TGF $\beta$ ,...), par la stimulation mécanique (agitation) ou physique (ultra-sons) de la culture ou encore par l'adjonction d'autres biomatériaux comme l'acide hyaluronique.

## **D.4- Indications chirurgicales actuelles**

Elles peuvent être schématisées ainsi au regard des résultats de la littérature:

1- Le traitement chirurgical local des lésions du cartilage doit être limité aux lésions symptomatiques et profondes de stade III ou IV de l'ICRS

2- Compte tenu de la diminution des cellules chondroprogénitrices avec l'âge, il n'est pas recommandé de traiter les patients de plus de 50 ans

3- L'articulation lésée doit être stable ou stabilisée dans le même temps opératoire, elle doit être axée ou désaxée favorablement (valgus pour le condyle interne par exemple)

4- En dehors d'essai clinique, ce traitement doit se faire sur des sites validés (condyle, rotule et dôme astragalien) et avec des techniques évaluées

5- En ce qui concerne le genou :

a. Les lésions inférieures à 1 cm<sup>2</sup> peuvent relever idéalement de la mosaïcoplastie sous arthroscopie

b. Entre 1 et 3 cm<sup>2</sup>, elles peuvent relever, soit d'une mosaïcoplastie à ciel ouvert, soit d'un microfracturing sous arthroscopie en particulier si le sujet est très sportif

c. Au delà de 3 cm<sup>2</sup>, la technique de choix est la culture de chondrocytes autologues

d. Les lésions très profondes, en particulier les ostéochondrites, ou les échecs des mosaïcplasties ou des forages qui ont détruit l'os sous-chondral doivent relever d'une greffe de chondrocytes. L'autre alternative est une greffe spongieuse première qui précède de quelques mois une nouvelle réparation

e. Les lésions de la rotule ont un moins bon pronostic probablement en raison des contraintes en cisaillement et du sous-sol osseux réduit ; elles peuvent bénéficier de la technique du lambeau périosté ou du microfracturing

6- En ce qui concerne le dôme astragalien :

- a. En dehors des rares lésions antéro-externes faciles d'accès traitées par avivement-greffe spongieuse ou microfracturing réalisés par une voie d'abord antérieure, les abords des lésions du dôme doivent utiliser une ostéotomie malléolaire, y compris sur la partie externe
- b. La congruence est plus facilement restituée avec la mosaïcoplastie, technique de base dans cette localisation alors que l'utilisation de la greffe de culture de chondrocytes n'est pas encore validée et techniquement difficile à réaliser en ce site
- c. Le site donneur est le genou homolatéral avec un taux de morbidité (syndrome rotulien douloureux) très faible au delà de la première année
- d. Les indications idéales sont les lésions de moins de 1.5 cm<sup>2</sup>, les lésions plus importantes sont de traitement aléatoire et peuvent relever de microfracturing avec ou sans greffe spongieuse

## **E- LES MODELES D'ARTHROSE EXPERIMENTALE**

Les modèles expérimentaux [Brandt, 2002] ont largement été utilisés pour étudier les phases précoces de l'arthrose, la progression de la maladie ainsi que pour évaluer l'efficacité de nouvelles thérapeutiques [Jouzeau, 2000]. En effet, l'étiologie de l'arthrose reste mal connue même si des facteurs constitutionnels et environnementaux comme les facteurs génétiques, endocriniens ou métaboliques ainsi que les contraintes mécaniques anormales et les traumatismes sont impliqués [Hamerman, 1989]. L'arthrose n'est pas qu'une maladie du cartilage mais de l'ensemble de l'articulation : os sous-chondral, synoviale, ménisques et appareil musculo-ligamentaire. Il s'agit donc d'une pathologie complexe faisant intervenir des facteurs biologiques, biochimiques complexes qui ne peuvent être reproduits par des systèmes cellulaires simplifiés. La difficulté d'obtenir du cartilage humain à un stade précoce de la maladie arthrosique pour des raisons éthiques évidentes mais aussi diagnostiques, ainsi que l'impossibilité de suivre ces lésions dans le temps, rend ces modèles animaux indispensables à l'étude des mécanismes à l'origine des lésions arthrosiques et à la compréhension de leur progression.

Dès 1974, Bentley définissait le cahier des charges d'un modèle d'arthrose expérimentale idéal :

Lésions précoces et mécanisme initiateur comparables à ceux observés dans l'arthrose humaine :

- Début des lésions par une déplétion matricielle avec progression vers la fissuration, la fibrillation et l'érosion
- Progression des lésions vers une sclérose de l'os sous-chondral, une ostéophytose, et une inflammation synoviale
- Modifications reproductibles
- Altérations dépistables sur animal vivant
- Absence d'effets de voisinage sur les autres composants articulaires
- Absence d'effet systémique
- Méthode utilisable sur plusieurs articulations et sur plusieurs espèces

Cependant ce modèle « idéal » n'existe pas et d'ailleurs la diversité des formes cliniques de l'arthrose ne peut être reproduite par un seul modèle, c'est pourquoi de nombreux modèles

ont été utilisés dans la littérature que l'on peut classer en 2 groupes principaux : les arthroses spontanées et les arthroses induites.

Les premières traduisent une prédisposition génétique et ont été décrites notamment chez le singe Rhésus, le cobaye Hartley et la souris C57Bl/6, BALB/c, STR/IN et STR/ORT [Jouzeau, 2000].

Les secondes, dites arthroses induites peuvent être de 2 types, mécaniques ou structurales.

On peut individualiser 4 groupes d'arthroses **mécaniques** selon le facteur étiologique impliqué.

- Instabilité ligamentaire (genou) : section du ligament croisé antérieur [Pond, 1973 ; Vignon, 1987], du ligament collatéral médial [Shoji, 1978] ou de plusieurs ligaments [Hulth, 1970], injection intra-articulaire de collagénase bactérienne [van der Kraan, 1990]
- Désaxation : ostéotomie de valgisation du tibia [Reimann, 1973]
- Incongruence : résection méniscale [Moskowitz, 1973], luxation de rotule [Bennet, 1937]
- Modifications de pression : soit en excès, hyperpression élastique [Gritzka, 1973], permanente [Salter, 1960] ou contusion [Mazières, 1987], soit en diminution par immobilisation [Thaxter, 1965].

Les arthroses **structurales** peuvent être consécutives :

- A un traumatisme : fracture articulaire [Haldeman, 1938], abrasion du cartilage [Gédéon, 1978]
- A une action enzymatique : injection intra-articulaire de papaïne [Murray, 1964] ou de fragment de fibronectine [Homandberg, 1993]
- A une induction enzymatique : injection intra-articulaire de vitamine A [Boni, 1969]
- A une modification du métabolisme chondrocytaire : injection intra-articulaire de MIA [Kalbhen, 1977 ; Guingamp, 1997], de corticostéroïdes [Salter, 1967]
- A une ischémie : destruction de la vascularisation rotulienne [Zahir, 1972], oblitération vasculaire [Rutishauser, 1966]

Le facteur mécanique peut être de plusieurs types : instabilité ligamentaire, contraintes biomécaniques anormales consécutives à une instabilité articulaire (désaxation, exérèse méniscale) ou répartition anormale des charges (immobilisation, surcharge...). Les arthroses structurales sont dues à l'action d'agents chimiques ou enzymatiques intra-articulaires (papaïne, mono-iodoacétate...). La pertinence physiopathologique de ce second groupe est plus que discutable, la constitution des lésions par leur rapidité et leur gravité étant assez éloignée des phénomènes observés en clinique.

Le choix de l'espèce animale, aussi important soit-il, est dicté le plus souvent par des considérations pratiques. L'utilisation de petits animaux (rat, souris, lapin) permet de répondre à certaines contingences éthiques (anthropomorphisme) pharmacologiques (posologie des médicaments administrés) et financières (taille, coût, stabulation des animaux). La durée de vie relativement courte des petits rongeurs permet, en outre, l'obtention de lésions arthrosiques dans un délai assez court dans le modèle mécanique : 60 jours pour le lapin [Christensen, 1983 ; Vignon, 1987-1991 ; Kuo, 1994 ; Kaab, 2000] et 30 pour la souris [Takasu, 1992].

Au total, on dispose actuellement d'un certain nombre de modèles qui permettent :

- D'évaluer le rôle d'un facteur supposé délétère pour l'articulation
- De reconnaître les différentes lésions anatomiques, histologiques et biochimiques
- De juger de la progression de la maladie
- De contrôler les paramètres d'environnement (nourriture, activité)
- D'étudier la tolérance de médicaments
- Et aussi de tester un certain nombre de biomatériaux de substitution du cartilage

## **E.1- Le modèle structural**

L'arthrose est induite par l'injection intra-articulaire de produits nocifs. Les lésions sont généralement d'apparition rapide et sévères. L'induction peut être enzymatique (injections intra-articulaire de papaïne, de collagénases bactérienne...) ou secondaire à une perturbation plus ou moins réversible du métabolisme chondrocytaire (injection intra-articulaire de vitamine A, de mono-iodoacétate...). La pertinence physiopathologique de ce modèle reste discutée. De plus, ces arthroses induites peuvent avoir des mécanismes initiateurs supplémentaires comme l'inflammation ou la cytotoxicité.

## **E.2- Le modèle mécanique**

Les modèles les plus utilisés sont basés sur la laxité ligamentaire du genou et ont été pratiqués sur le chien et le lapin. Le modèle de référence est sans aucun doute celui de la section du ligament croisé antérieur (LCA) chez le chien [Pond and Nuki, 1973] sur lequel plusieurs modèles d'arthrose ont été développés. Le plus utilisé est celui de la section percutanée du LCA [Johnson, 1986] au niveau du genou de chien. Pour des investigateurs expérimentés cette technique est reproductible et donne des informations très utiles [Myers, 1990]. Au niveau de ce modèle, on peut observer les changements cellulaires caractéristiques, les modifications de surface avec fibrillations et érosions, la déplétion en protéoglycannes ainsi que les altérations osseuses et dans la membrane synoviale [Pelletier, 1990 ; Brandt, 1991]. Ces changements sont par ailleurs superposables aux anomalies constatées en clinique après section du LCA ou lors de l'arthrose primaire du genou [Hardingham, 1990].

Pour autant, un certain nombre de limites à ce modèle demeurent: la sévérité des lésions arthrosiques varie selon les auteurs et les protocoles. Par ailleurs, la section du LCA par arthrotomie ou percutanée sous arthroscopie entraîne des variations dans les résultats [Adams, 1990].

L'autre animal particulièrement utilisé pour ce modèle de section du LCA est le lapin. En effet, la section du LCA chez le lapin entraîne des lésions arthrosiques superposables à celles observées chez le chien. De plus, pour des raisons de coût évident, cet animal est particulièrement adapté pour des séries avec effectif élevé. Les lésions apparaissent dans un délai de 6 à 24 semaines après la section du LCA. Elles consistent en des fibrillations, un appauvrissement en protéoglycannes, puis en des érosions et en la constitution d'ostéophytes [Sommerlath, 1993 ; Vignon, 1987 ; Yoshimi, 1994 ; Yoshioka, 1996]. A 8-12 semaines, des érosions sont localisées sur le condyle fémoral médial et latéral.

L'utilisation du rat comme modèle de section est plus récente [Stoop, 2001]. L'apparition des lésions cartilagineuses est plus rapide (14 jours contre 2 mois chez le chien). Les modifications incluent des fibrillations de surface, une hypocellularité et un œdème des chondrocytes prenant un aspect hypertrophique (mais sans marquage de type X) rappelant celles observées en clinique. Par ailleurs, une altération du collagène de type II est mise en évidence dans les zones de fibrillation.

Les limites de tels modèles sont la taille des animaux : ils ne doivent pas être trop petits pour que la quantité de cartilage disponible soit suffisante pour les différentes investigations notamment radiologiques (IRM, Scanner), ni trop gros pour que la maintenance et le coût ne soit pas trop élevés. Par ailleurs, l'extrapolation à l'homme reste hasardeuse avec ces modèles qui ne permettent pas d'expliquer les dissociations anatomo-cliniques constatées chez l'homme.

### **III- TRAVAUX REALISES**

A- MODELE D'ARTHOSE EXPERIMENTALE PAR SECTION DU  
LIGAMENT CROISE ANTERIEUR : CARACTERISATION ET  
INFLUENCE DE L'EXERCICE PHYSIQUE

## **A.1-Section du ligament croisé antérieur et exercice calibré**

### ***A.1.1- Objectifs***

De nombreux modèles d'arthrose ont été développés pour tenter de caractériser les premières phases de l'arthrose, étudier sa progression et évaluer de nouvelles thérapeutiques [van den Berg, 2001]. Les modèles expérimentaux décrits dans la littérature sont multiples [Jouzeau, 2000]. L'influence de la section du LCA a été initialement étudiée chez le chien [Pond-Nuki, 1973 ; Marshall, 1996 ; Brandt, 1991] et le lapin [Shapiro, 1980 ; Vignon, 1986] et plus récemment chez le rat [Stoop, 2001]. Il existe dans ce modèle une augmentation de l'apoptose chondrocytaire, comme cela a été démontré chez le chien [Boileau, 2002] et le lapin [Hashimoto, 1998]. Nos résultats préliminaires suggèrent que des phénomènes d'apoptose chondrocytaire caspase-dépendant s'observent également dans le modèle de section du LCA chez le rat et qu'une activité physique modérée diminue l'importance des lésions cartilagineuses ainsi que les phénomènes apoptotiques sur ce modèle [Galois, 2003]. Les caspases appartiennent à une famille de protéases jouant un rôle essentiel dans le déroulement de l'apoptose [Schultz, 2003]. Parmi cette cascade enzymatique, la caspase 3 joue un rôle essentiel dans l'irréversibilité du processus apoptotique et son expression reflète donc parfaitement l'existence du phénomène apoptotique [Pelletier, 2000 ; Grogan, 2002] et ce, de façon plus spécifique que la technique de détection par Tunnel [Grasl-Kraupp, 1995]. Par ailleurs, les protéines de choc thermique (Hsp) qui exercent un effet protecteur vis à vis de l'apoptose, font l'objet d'une attention particulière quant à leurs potentialités anti-apoptotiques sur le chondrocyte [Parcellier, 2003 ; Terauchi, 2003]. Une étude récente a démontré le rôle exercé par Hsp70 dans les phénomènes d'adaptation du chondrocyte aux contraintes biomécaniques [Kaarniranta, 2001].

Les objectifs de notre étude étaient donc d'apprécier après avoir caractérisé notre modèle, les conséquences d'une activité physique calibrée sur le plan histologique et immunohistochimique dans le modèle de section du LCA chez le rat. Nous avons donc étudié dans un premier temps les conséquences de différents exercices calibrés sur l'évolution naturelle de l'arthrose et dans un second temps, le taux d'expression d'Hsp70 et de la caspase 3 lors de ce modèle.

## **A.1.2- Matériels et méthodes**

### **A.1.2.1- Animaux**

Ce travail a été effectué chez le rat Wistar mâle (Iffa Credo 150-175 g) maintenu dans une animalerie thermorégulée (24°C±1°C) dont l'air est renouvelé et dans laquelle des cycles diurnes (6H-18H) et nocturnes (18H-6H) alternent régulièrement. Les rats ont accès à une nourriture standardisée et à de l'eau à volonté. Un monitoring continu (activité et température corporelle) a été réalisé par télémétrie [Gegout-Pottie, 1999]. Les expérimentations ont débuté après une période d'acclimatation de 5 jours. Une pesée bi-hebdomadaire des rats a été effectuée durant toute la durée de l'étude. Trois groupes ont été constitués : un groupe de rats avec section du LCA (S), un groupe de rats avec ouverture articulaire sans section du LCA (NS) et un groupe non opéré (T) et ce pour les différents intervalles de temps.

### **A.1.2.2- Section du ligament croisé antérieur**

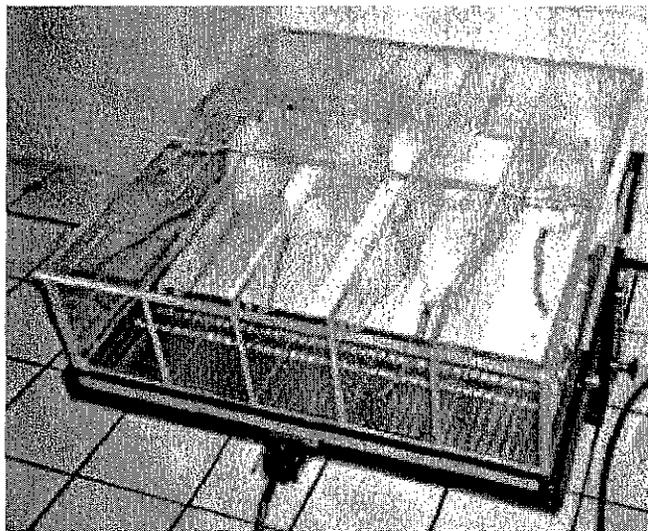
Les rats sont opérés par le même opérateur selon un protocole standardisé. Seul le genou droit est opéré, le genou gauche servant de contrôle. L'absence de tiroir antérieur est vérifiée en pré-opératoire ainsi que sa présence après l'intervention. L'anesthésie générale est assurée par une injection de kétamine (38 mg/kg) et d'acépromazine (1,25 mg/kg) par voie intrapéritonéale. Après rasage de la voie d'abord et désinfection, l'intervention est menée sous asepsie stricte (flux laminaire, instruments et gants stériles). Une incision parapatellaire médiale de 3 centimètres est réalisée, permettant l'accès à l'articulation du genou droit. La luxation latérale de la rotule procure un excellent jour sur l'échancrure intercondylienne et le ligament croisé antérieur.

Sur le genou fléchi, le LCA est repéré puis sectionné au bistouri fin (lame n°11) en protégeant le ligament croisé postérieur et les structures vasculaires postérieures. Un ressaut est immédiatement perceptible et la section du LCA est validée par la recherche du tiroir antérieur. Un lavage articulaire abondant au sérum physiologique est pratiqué avant la fermeture de l'articulation. Après repositionnement de la rotule, une suture en 2 plans au fil résorbable est effectuée, complétée d'une suture cutanée simple par points séparés de nylon. Il s'agit d'une modification de la procédure décrite par Williams [1982]. Aucune complication locale et aucune infection n'ont été à déplorer. Toutes les étapes de l'expérimentation ont

respecté les principes éthiques et méthodologiques en vigueur relatifs à l'expérimentation animale.

### **A.1.2.3- Effort calibré**

Les rats ont été soumis à des intensités d'exercice quotidien différentes afin de déterminer un seuil de course susceptible d'influencer l'évolution des lésions articulaires. Trois intensités de course quotidienne sont étudiées, 15 min, 30 min et 1 h par jour sur un tapis roulant (30 cm/s). Ce tapis roulant adapté aux animaux opérés (Figure 14), permet de calibrer exactement l'effort et la distance effectuée. Il s'agit d'un tapis de course motorisé, contrôlé électriquement par un voltmètre (Treadmill le 8700 Letika®, Barcelone, Espagne)



*Figure 14 : Tapis roulant permettant d'effectuer un exercice calibré.*

La course est débutée le jour de l'intervention (de façon modérée, pendant 5 minutes pour habituer les animaux) puis quotidiennement pour les 3 groupes de rats bénéficiant de la course. Les rats ont été répartis au hasard selon 4 groupes :

- Témoin : Section LCA sans course
- Course faible, 30 cm/s pendant 15 minutes
- Course modérée, 30 cm/s pendant 30 minutes
- Course intensive, 30 cm/s pendant 60 minutes

Les distances parcourues au bout de 28 jours pour chaque durée de course quotidienne sont indiquées dans le tableau 4 ci-dessous.

*Tableau 4 : Distances parcourues au bout de 28 jours pour chaque groupe de rats*

Groupe de rats	Abréviations des groupes	Durée de course quotidienne	Distance parcourue au bout de 28 jours
Exercice libre	T	Exercice libre	-
Course faible	CF	15 min/j	7,5 Km
Course modérée	CM	30 min/j	15 Km
Course intensive	CI	60 min/j	30 Km

Une analyse histologique classique utilisant le score de Mankin (Tableau 5) est utilisée. Une étude immunohistochimique appréciant les phénomènes apoptotiques *via* la caspase 3 activée et l'expression de la protéine de choc thermique Hsp 70 est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. L'étude a été réalisée 28 jours après la section du LCA.

Les résultats ont été exprimés par comptage des cellules positives par rapport au nombre de cellules totales sur chaque compartiment du genou pour chaque groupe de rats. Les comptages ont été réalisés en zones portantes du cartilage.

#### **A.1.2.4- Histologie**

Les animaux sont sacrifiés à J7, J14 et J28 par dislocation cervicale sous anesthésie. Les genoux sont soigneusement disséqués et fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4% (vol/vol), préparée dans du PBS (Phosphate Buffer Saline, Eurobio, France) à pH 7.4 pendant 8 heures puis décalcifiés (Rapide Décalcifiant Osseux RDO, Apex, Canada) et déshydratés dans des bains d'alcool successifs de concentration croissante. Les prélèvements sont ensuite inclus dans la paraffine et des coupes de 5 microns sont réalisées perpendiculairement à la surface du cartilage à l'aide d'un microtome (Leica, France). Les coupes sont déparaffinées et réhydratées avant coloration au bleu de toluidine (BT), à l'hématoxyline éosine safran (HES) et au rouge Sirius (RS). Le score de Mankin modifié (normal = 0, maximal = 15 par compartiment avec un score maximal de 60 par genou, rotule exclue).

### Bleu de toluidine

Le BT est une coloration métachromatique permettant la mise en évidence de glycosaminoglycanes (GAGs) carboxylés, sulfatés ou phosphatés, donc les composés matriciels du cartilage. La coloration au BT nécessite une incubation de 5 minutes dans une solution à 1%. Les lames sont ensuite plongées dans l'acétone, l'alcool absolu puis déshydratées. Le montage des lames est réalisé avec une résine synthétique (Vogel, Bayer diagnostic, France).

### Hématoxyline Eosine Safran

L'HES est une coloration standard qui permet d'étudier la morphologie des cellules ainsi que les constituants matriciels. Les lames sont colorées dans l'hématoxyline 0,5% pendant 5 minutes et rincées à l'eau. Puis, elles sont passées dans l'alcool ammoniacal pendant 1 minute. L'alcool ammoniacal permet de différencier le noyau du reste de la cellule. Les lames sont ensuite colorées dans une solution aqueuse d'éosine à 1% pendant 5 minutes afin de mettre en évidence les éléments acidophiles tel le cytoplasme. Après rinçage, déshydratation dans l'alcool 95° et absolu, elles sont colorées dans une solution alcoolique de Safran à 1% pendant 5 minutes. Les lames sont déshydratées et montées avec une résine synthétique (Vogel, Bayer diagnostic, France). L'hématoxyline colore les noyaux en bleu foncé, l'éosine se fixe sur les éléments acidophiles et leur confère une coloration rose (cytoplasme). Le safran se lie aux collagènes et à certaines protéines comme la chondrine (coloration jaune).

### Rouge Sirius

Le RS est un colorant anionique du collagène. La réaction se produit entre les groupements sulfoniques du colorant et les groupements basiques présents sur les molécules de collagène. Cette coloration est effectuée avec une solution saturée en acide picrique à 1%. Les lames sont ensuite rincées dans un bain d'acide chlorhydrique 0,01N pendant 2 minutes puis dans une solution d'alcool à 95° et enfin dans l'alcool absolu pendant 2 minutes. Après déshydratation, elles sont montées avec une résine synthétique (Vogel, Bayer diagnostic, France). Les lames colorées au rouge Sirius sont observées en lumière classique puis en lumière polarisée en disposant les lames à 45° sous un microscope équipé de 2 filtres spécifiques. La lumière polarisée permet de visualiser l'architecture du réseau collagénique.

Evaluation des lésions histologiques

Le score de Mankin [1971] modifié a été utilisé prenant en compte la structure, la cellularité, la matrice extracellulaire et les modifications osseuses (remaniements et ostéolyse) (Tableau 5). Une absence de lésion correspond à un score de 0. Le score maximal est de 15 par compartiment. Le score est réalisé dans les 4 compartiments suivants : fémur médial et latéral, tibia médial et latéral conduisant ainsi à un score maximal de 60 par genou.

Tableau 5 : Score histologique de Mankin modifié

<b>Cartilage</b>			
<b>Structure</b>	<b>Grade</b>	<b>Coloration au bleu de toluidine</b>	<b>Grade</b>
Normal	0	Normal	0
Irrégulière avec pannus	1	Décoloration faible	1
Fissures jusqu'à la zone de transition	2	Décoloration modérée	2
Fissures jusqu'à la zone radiale	3	Décoloration sévère	3
Fissures jusqu'à la zone calcifiée	4		
Désorganisation complète	5		
<b>Cellules</b>		<b>Epaisseur de la couche de chondrocytes hypertrophiques</b>	
Normal	0	Normal	0
Hypercellularité	1	Diminution modérée	1
Clusters	2	Diminution totale	2
Hypocellularité	3		
<b>Os</b>			
<b>Remaniements osseux</b>	<b>Grade</b>	<b>Ostéolyse</b>	<b>Grade</b>
Non	0	Non	0
Oui	1	Oui	1

**A.1.2.5- Immunohistochimie**

Après déparaffinage et réhydratation, les coupes sont digérées par la chondroïtinase ABC (0,25 U/ml, dans du PBS pH 8, Sigma, digestion des liaisons des chondroïtines sulfates des protéoglycannes) pendant 1 h 30 à 37 °C. Après 3 lavages au PBS, les cellules des tissus sont perméabilisées par une solution de Triton X100 (Sigma) 3% (v/v) dans du PBS pendant 30 minutes à température ambiante. L'activité peroxydase endogène est ensuite inhibée par une incubation dans une solution extemporanée de peroxyde d'hydrogène 3% (v/v) (Acros)

pendant 30 minutes. Après lavages au PBS, les coupes sont mises en contact avec un sérum bloquant pendant 1 heure (kit Novocastra, Tebu), permettant la saturation de tous les sites aspécifiques, puis avec le premier anticorps toute la nuit à 4°C en chambre humide. Les dilutions de chaque anticorps utilisés sont mentionnées dans le tableau 6. Le second anticorps est un anticorps de chèvre anti-lapin fourni dans le kit (45 minutes à température ambiante). Un système d'amplification à la streptavidine-biotine couplé à peroxydase est utilisé selon les recommandations du fournisseur. La révélation est obtenue avec du 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Tebu) contenant du peroxyde d'hydrogène. Les coupes sont alors soumises à une contre-coloration dans une solution de vert de méthyl à 1% (p/v) pendant 3 minutes. Après plusieurs lavages dans de l'eau, les lames sont déshydratées dans 3 bains successifs d'alcool absolu, puis de toluène. Les lames sont ensuite montées avec lamelles à l'aide d'une résine synthétique (Eukitt).

*Tableau 6 : Dilution des différents premiers anticorps utilisés*

<i>Anticorps</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Dilution</i>
Anticorps polyclonal de lapin anti-Hsp 70	Stressgen, Tebu, Le perray en Yvelines, France	1/300
Anticorps polyclonal de lapin anti-caspase-3 active	R & D system, Abingdon, Oxon, United Kingdom	1/300

### **A.1.3- Résultats**

#### **A.1.3.1- Caractérisation du modèle de section du ligament croisé antérieur**

##### *Paramètres cliniques*

Les paramètres cliniques (poids, température et mobilité) ont été appréciés par télémétrie [Gegout-Pottie, 1999]. Deux jours après l'intervention, une légère perte de poids a été observée dans les groupes S et NS par rapport au groupe T. Ce phénomène s'est inversé dans les jours suivants et le poids des animaux a augmenté progressivement jusqu'à la fin de l'étude sans différence statistiquement significative entre les 3 groupes. Les animaux ont repris rapidement leurs activités habituelles après une phase temporaire de cicatrisation. Une légère diminution de la mobilité nocturne spontanée a été observée dans les groupes opérés S et NS. Aucune réaction fébrile n'a été observée dans les différents groupes. Enfin, aucune

différence significative n'a été observée en ce qui concerne l'activité et la température corporelle entre les différents groupes.

### Lésions histologiques après section du LCA

Le cartilage articulaire des genoux du groupe témoin (T) était considéré comme normal tout au long de l'étude ainsi que celui du groupe opéré sans section de LCA (NS). Dans les genoux avec section du LCA (S), en revanche, les lésions histologiques se sont progressivement aggravées entre J7 et J28 (Figures 15 et 16)

A J7, une synovite transitoire, en relation avec le geste chirurgical, était parfois observée. Les lésions cartilagineuses étaient visibles dans les genoux avec section du LCA, principalement au niveau du condyle médial. Une légère déplétion en protéoglycannes était observée quel que soit le compartiment.

A J14, les lésions des condyles étaient stables. En revanche, des altérations structurales du cartilage apparaissaient nettement au niveau des plateaux tibiaux médial et latéral. Des fissures en zone radiale étaient observées voire une exposition osseuse dans certains cas. Une diminution importante de la cellularité était constatée dans l'ensemble des compartiments du genou. La diminution des protéoglycannes restait stable.

A J28, les lésions se répartissaient dans tous les compartiments (plateaux et condyles). Des lésions en miroir étaient visibles essentiellement sur le compartiment médial. Le remodelage osseux ainsi que l'ostéolyse étaient particulièrement visibles à ce stade.

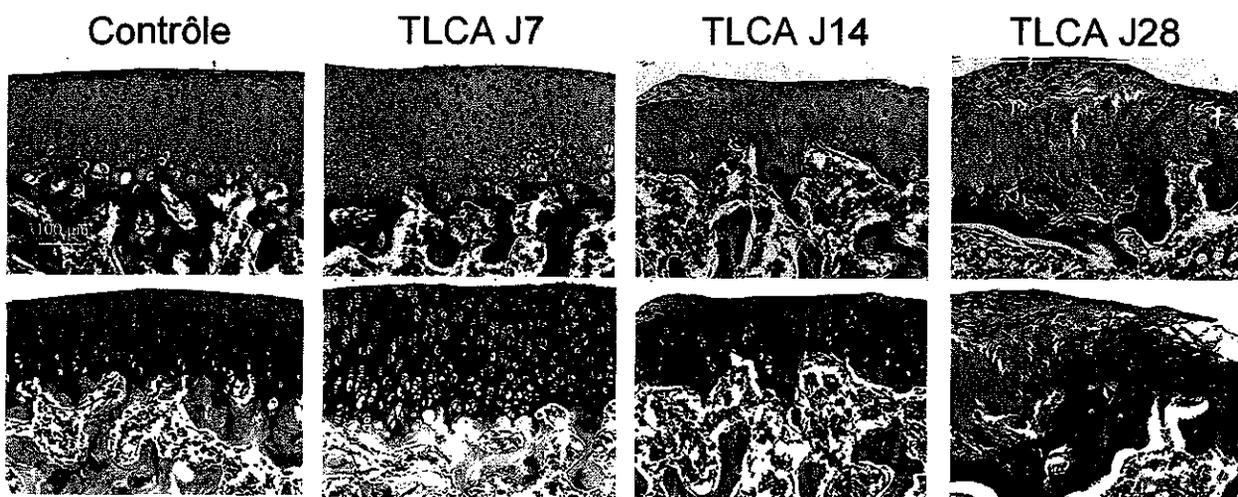


Figure 15 : Evolution des lésions histologiques (plateau tibial médial) après section du LCA (S). Le contenu en protéoglycannes est évalué par la coloration en bleu de toluidine. La cellularité et l'état de surface sont appréciés par la coloration en Hématoxyline Eosine Safran. Le groupe témoin ou contrôle présente un aspect histologique normal. A J7, une légère déplétion en PGs est observée ainsi qu'une hypercellularité. A J14, des fissures atteignent la zone radiale du cartilage et la cellularité diminue. A J28, des modifications de l'os sous-chondral apparaissent et les fissures se majorent. (Grossissement original x10).

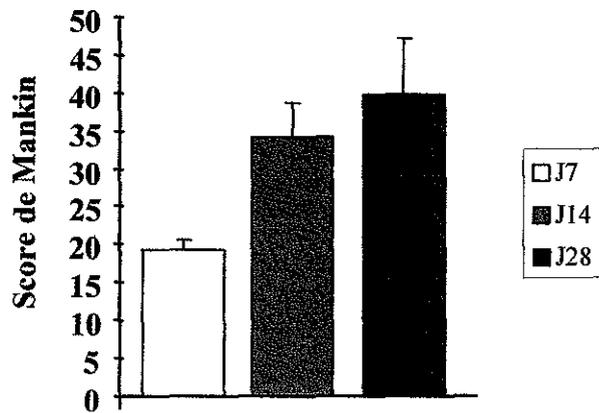


Figure 16 : Evolution des lésions histologiques après section du LCA (S) selon le score de Mankin modifié au cours de l'étude. Les résultats exprimés correspondent à la somme des scores de chaque compartiment (condyle médial et latéral, plateau tibial médial et latéral). Le score maximum par compartiment est de 15 et de 60 par genou. Le score se majore progressivement avec la gravité des lésions histologiques.

#### Apoptose et Hsp70

L'apoptose était visualisée en immunohistochimie par un marquage Caspase 3 activée (Figures 17 et 19). A J7, les phénomènes apoptotiques étaient déjà significativement plus marqués dans le groupe S par rapport au groupe T. Ce phénomène était constant tout au long de l'étude jusqu'à J28. L'apoptose était visible plutôt en zone superficielle à J7 et en zone profonde à J14, tandis qu'à J28 le phénomène concernait toute l'épaisseur du cartilage. L'apoptose prédominait dans le compartiment médial.

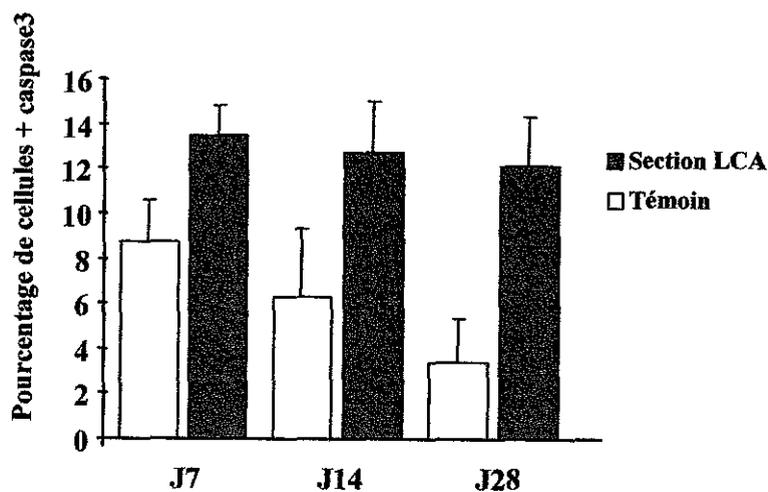


Figure 17 : Evolution des phénomènes apoptotiques au cours du temps par rapport au témoin. Il existe une augmentation de l'apoptose dès J7 et une stabilisation de l'expression jusqu'à J28.

L'expression d'Hsp 70, protéine chaperone anti-apoptotique, était augmentée dans le groupe S comparativement au groupe T pour toute la durée de l'étude (Figures 18 et 19).

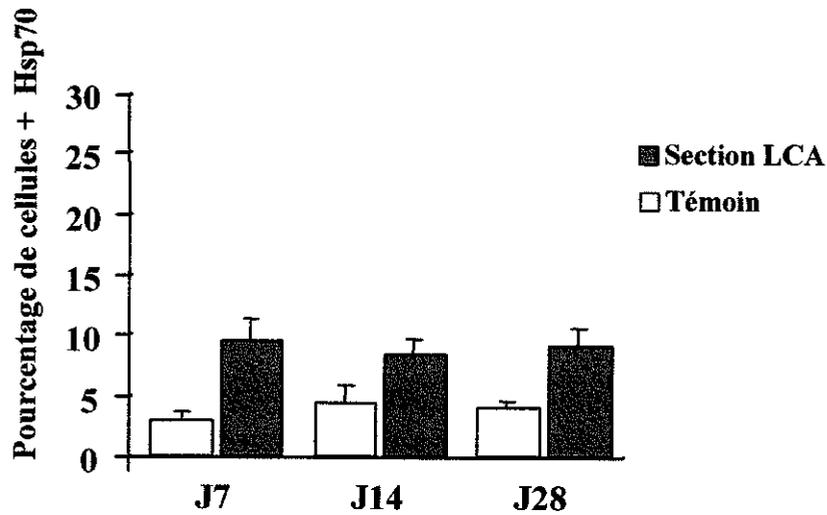


Figure 18 : Expression d'Hsp 70 au cours du temps par rapport au témoin.

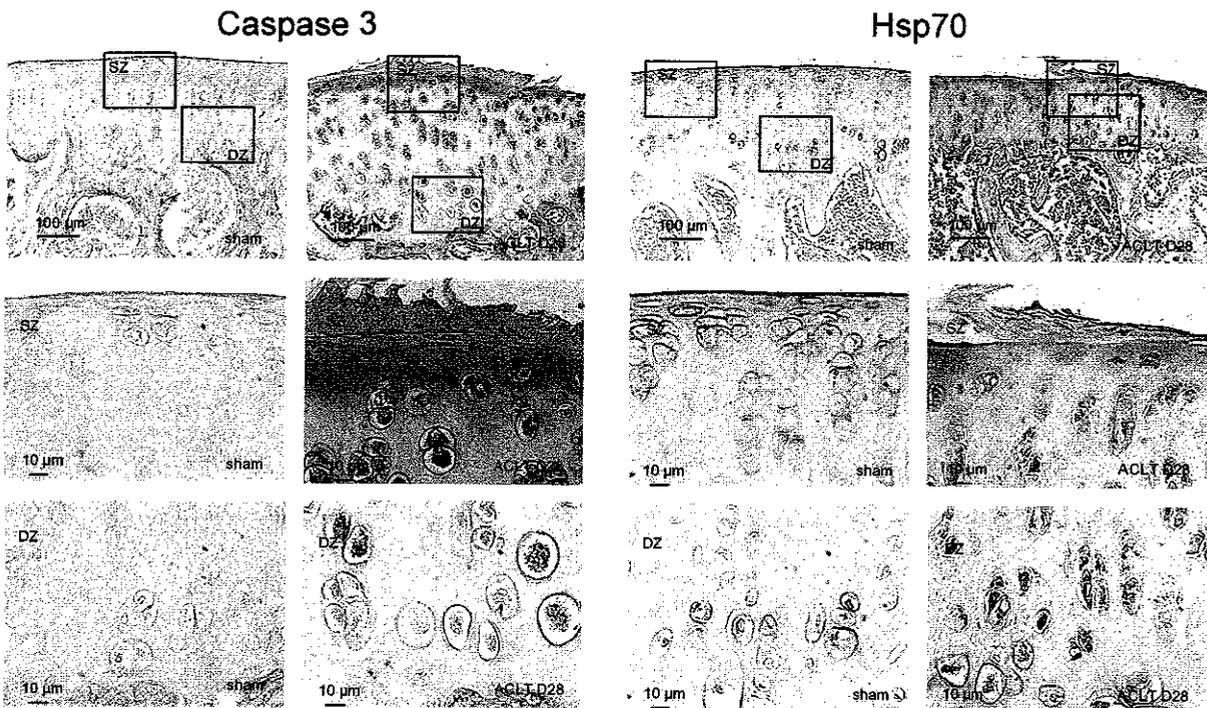


Figure 19 : Immunomarquage Caspase 3 et Hsp 70 des groupes NS (colonnes 1 et 3) et S (colonnes 2 et 4). Le marquage est estimé par le comptage du nombre de cellules positives par rapport au nombre total de cellules en surface (SZ) et en profondeur (DZ) du cartilage à J28 pour le champ considéré au grossissement x40. Quatre champs par lame sont ainsi examinés pour les 2 groupes NS et S. Le grossissement est de 10x (ligne 1) et 40x (lignes 2 et 3).

### A.1.3.2- Influence de l'exercice physique

« Le groupe témoin dans ce chapitre correspond au groupe avec section du LCA sans course et non au groupe non opéré du chapitre caractérisation. »

Une légère perte de poids était notée à J14 dans les groupes course modérée et intense par rapport au groupe témoin. Ce phénomène n'était pas observé dans le groupe course faible. Aucune réaction fébrile ni perte de mobilité spontanée n'ont été observées dans les différents groupes. A J28 (Figure 20), le groupe TLCA (section LCA sans effort) est caractérisé par des fissures atteignant la zone radiale et par une déplétion en protéoglycannes. L'exercice léger limitait les fissures à la zone de transition et limitait la perte en PGs. Dans le groupe course modérée, les lésions cartilagineuses étaient limitées à une hypercellularité et une fibrillation de surface. Dans le groupe course intense, en revanche, les lésions étaient similaires à celles observées dans le groupe témoin (section du LCA sans exercice) : fissures jusqu'à la zone radiale et déplétion en PGs.

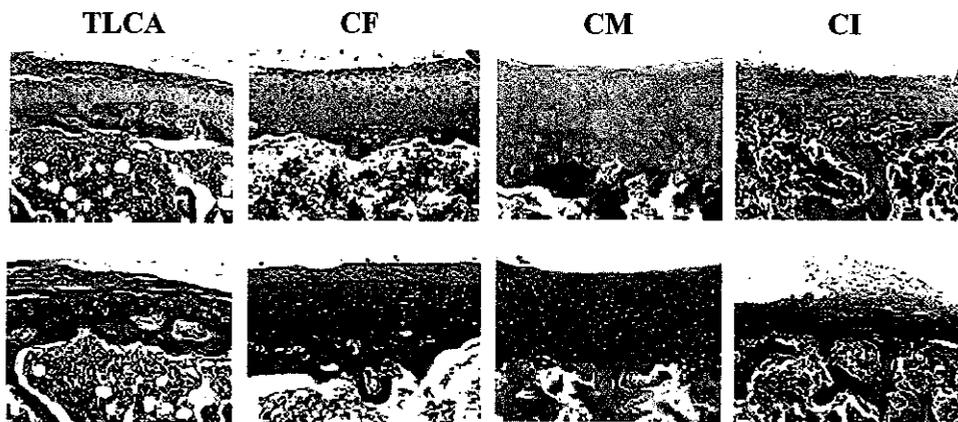


Figure 20 : Evolution des lésions histologiques après section du LCA selon l'intensité de la course à J28. Le contenu en protéoglycannes était évalué par la coloration en bleu de toluidine (BT, images du bas). La cellularité et l'état de surface étaient appréciés par la coloration en Hématoxyline Eosine Safran (HES, images du haut). Le groupe TLCA (section du LCA sans effort) était caractérisé par des fissures atteignant la zone radiale et par une déplétion en protéoglycannes. La course faible (CF) conduisait à des fissures atteignant la zone de transition et à une perte en PGs. La course modérée (CM) limitait les lésions cartilagineuses à une hypercellularité et à une fibrillation de surface. La course intense (CI), en revanche, conduisait à des lésions similaires à celles observées dans le groupe TLCA : fissures jusqu'à la zone radiale et déplétion en PGs.

Selon le score de Mankin, les lésions histologiques étaient significativement moins importantes dans les groupes course faible et course modérée par rapport au groupe témoin. La significativité était plus marquée à J28 ( $p < 0.005$ ) qu'à J14 ( $p < 0.05$ ). Une course intense en

revanche abolissait cet effet bénéfique (Figure 21). L'analyse par compartiment retrouvait l'atteinte prédominante du compartiment tibial en particulier médial. L'effet protecteur était observé dans les groupes course faible et course modérée en médial avec une significativité respectivement de 0.005 et 0.05. L'exercice intense abolissait cet effet bénéfique avec même une tendance à l'aggravation des lésions sur le versant médial. La même tendance était constatée en latéral avec une significativité moindre (Figure 22).

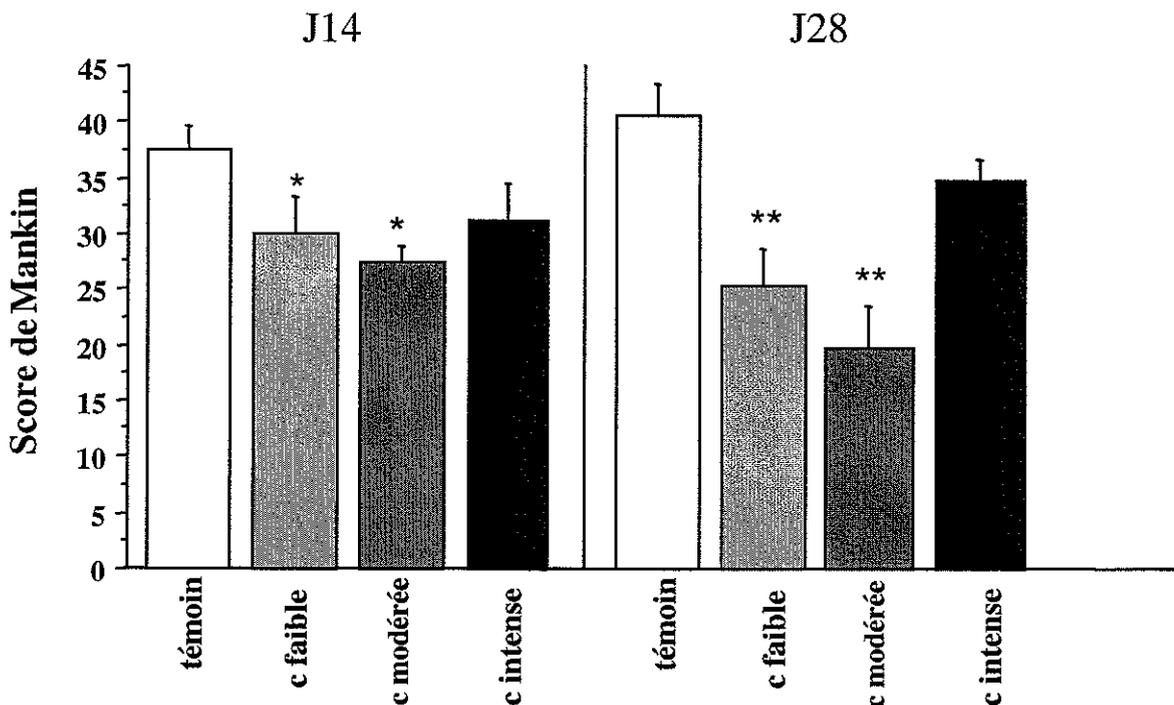


Figure 21 : Influence de l'intensité d'un exercice physique calibré sur les lésions histologiques du cartilage dues à la section du LCA selon le score de Mankin à J14 et J28. Les lésions histologiques étaient statistiquement moins importantes à J14 ( $p < 0.05$ ) et J28 ( $p < 0.005$ ) dans les groupes Course Faible (CF) et Course Modérée (CM) par rapport au groupe témoin (T=section du LCA sans course). Une Course Intense (CI) en revanche abolissait cet effet bénéfique. Les résultats ont été exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM. ( $n = 5$  rats par groupe, 2 expériences indépendantes), Test t de Student avec  $p = 5\%$ , \* =  $p \leq 0.05$  ; \*\* =  $p \leq 0.005$ .

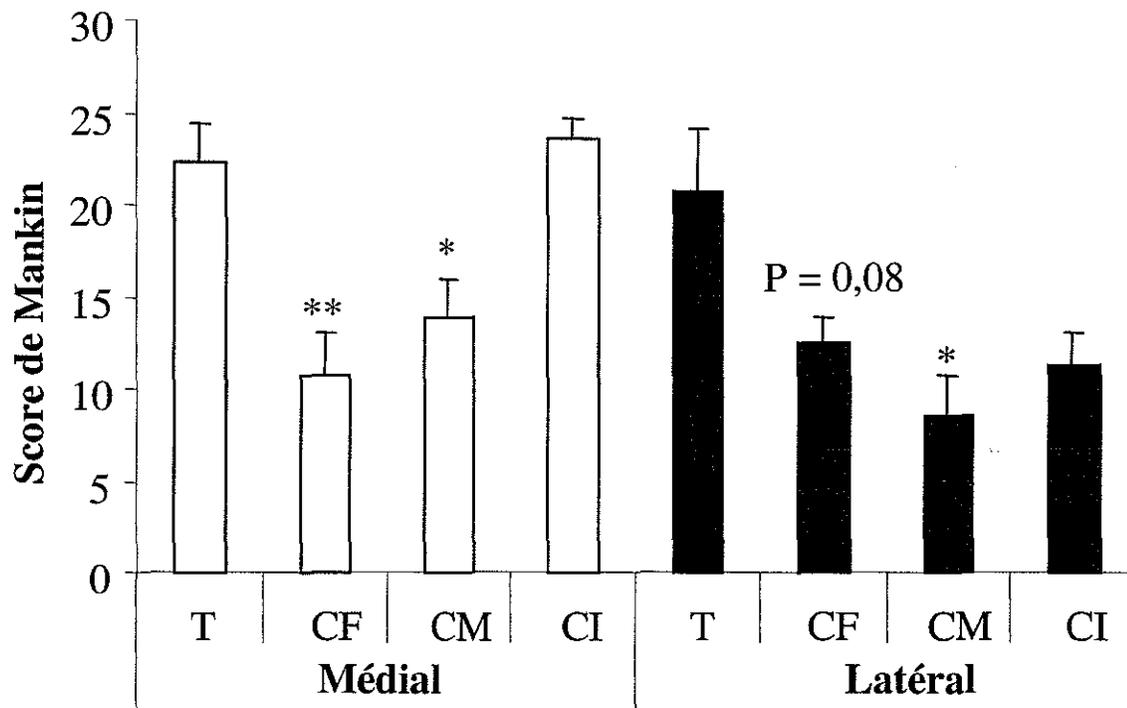


Figure 22 : Influence de l'intensité d'un exercice physique calibré sur les lésions histologiques du cartilage dues à la section du LCA, selon le score de Mankin en fonction du compartiment médial ou latéral du genou à J28..

Les lésions histologiques étaient statistiquement moins importantes dans les groupes Course Faible (CF) ( $p < 0.005$ ) et Course Modérée (CM) ( $p < 0.05$ ) par rapport au groupe témoin (T=section du LCA sans course) dans le compartiment médial. Une Course Intense (CI) en revanche abolissait cet effet bénéfique. Dans le compartiment latéral, la tendance était la même mais avec une significativité moindre. Les résultats ont été exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM. ( $n = 5$  rats par groupe, 2 expériences indépendantes), Test t de Student avec  $p = 5\%$ , \* =  $p \leq 0.05$ ; \*\* =  $p \leq 0.005$

Les phénomènes apoptotiques (Figure 23) étaient moins prononcés dans le groupe course modérée à la fois en zone superficielle et en zone profonde pour le compartiment médial ( $p < 0.05$ ). Aucune différence significative n'était notée entre les groupes course faible et course intense par rapport au groupe témoin. Une tendance identique était observée pour le compartiment latéral mais sans significativité statistique.

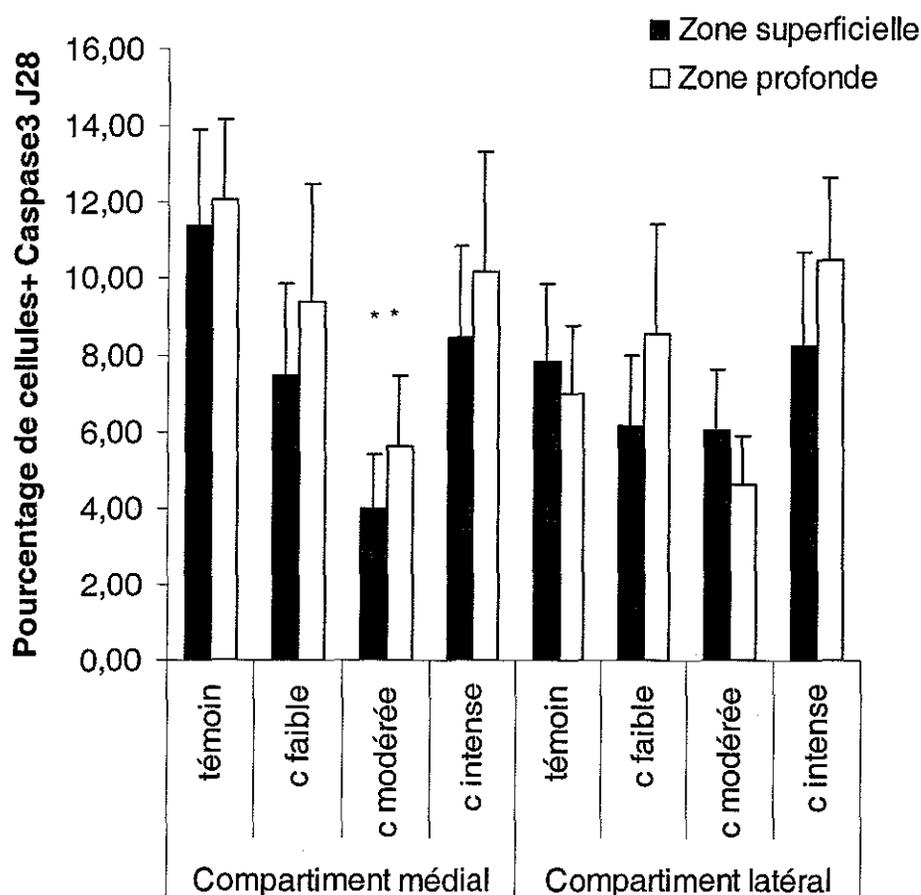


Figure 23 : Influence de l'effort sur l'expression de Caspase3 en fonction du compartiment médial et latéral en surface et profondeur du cartilage. La course modérée (CM) entraîne une diminution statistiquement significative ( $p < 0.05$ ) de l'expression de la caspase3 en surface et profondeur du cartilage au niveau du compartiment médial. Les résultats ont été exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 10$  rats pour le groupe témoin,  $n = 5$  pour les autres groupes). Test  $t$  de Student avec  $p = 5\%$ , \* =  $p \leq 0.05$ .

Une surexpression d'Hsp70 à J28 était notée dans le groupe course modérée ( $p < 0.05$ ) dans le compartiment médial en superficie et en profondeur du cartilage (Figure 24). Dans le groupe course faible, cette surexpression n'était observée qu'au niveau du compartiment latéral, en zone superficielle et profonde. En revanche, l'expression d'Hsp70 était superposable dans le groupe course intense et le groupe témoin quel que soit le compartiment. Il est intéressant de noter que l'expression d'Hsp70 et de Caspase 3 varient en sens inverse suggérant le rôle anti-apoptotique d'Hsp70. L'exercice intense fait disparaître cette surexpression conduisant à la perte de l'effet bénéfique.

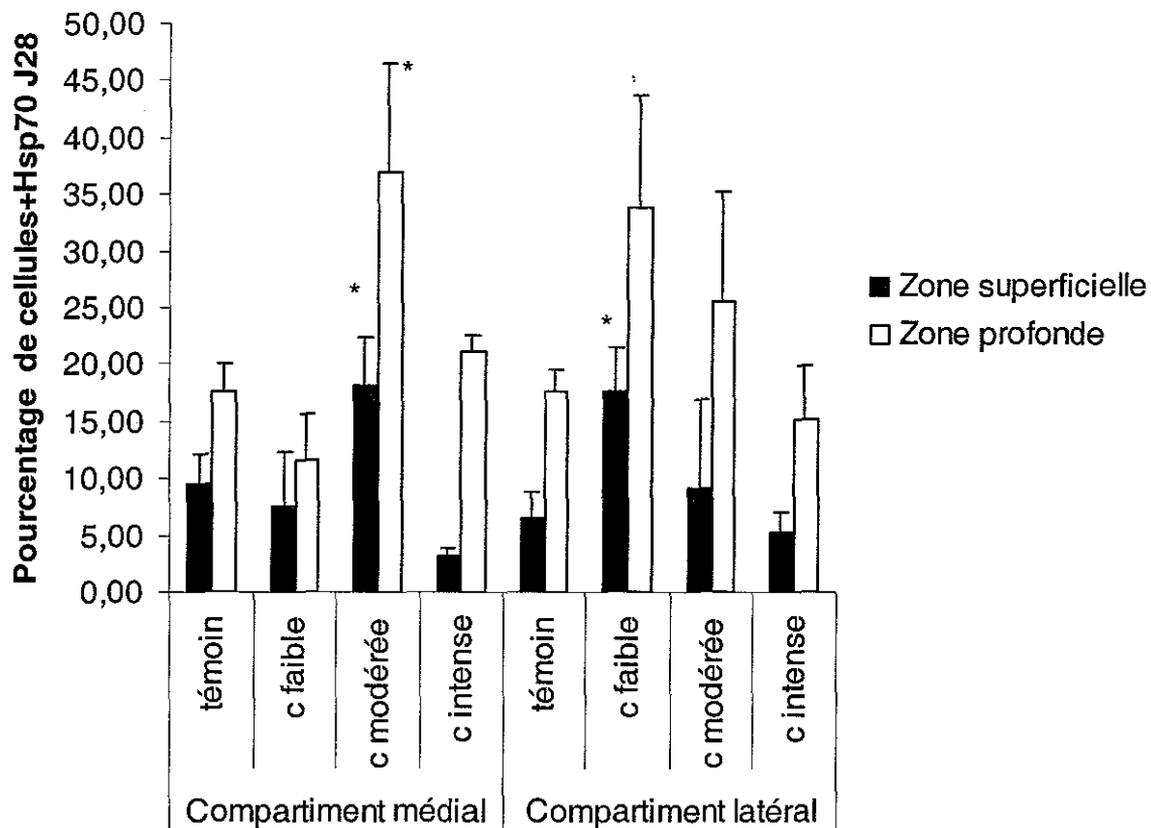


Figure 24 : Influence de l'effort sur l'expression d'Hsp70 en fonction du compartiment médial et latéral en superficie et profondeur du cartilage. La course modérée (CM) entraînait une surexpression statistiquement significative ( $p < 0.05$ ) d'Hsp70 en superficie et profondeur du cartilage au niveau du compartiment médial. Dans le groupe course faible (CF), cette surexpression n'était observée qu'au niveau du compartiment latéral en zone superficielle et profonde. Les résultats ont été exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM. Test t de Student avec  $p = 5\%$  ( $n = 10$  rats pour le groupe témoin,  $n = 5$  pour les autres groupes), \* =  $p \leq 0.05$ .

#### A.1.4- Discussion

L'effet ambivalent de l'effort sur le cartilage est bien connu en clinique [Felson, 1998]. Il est communément admis que les activités physiques ou sportives intenses ont des conséquences délétères sur le cartilage et qu'à l'inverse les activités modérées n'augmentent pas le risque d'arthrose et pourraient même dans certaines circonstances prévenir la survenue d'une arthrose de genou [Maninnen, 2001]. Cet effet ambivalent a été démontré expérimentalement chez l'animal. Ainsi, chez le rat, un effort intense appliqué sur le genou après méniscectomie aboutit au développement d'une arthrose [Lozoya, 2000] et dans une moindre mesure sur un genou de rat sain non opéré [Pap, 1998]. A l'inverse, l'activité physique pourrait prévenir l'apparition d'une gonarthrose chez le hamster [Otterness, 1998]. L'exercice physique augmenterait la synthèse des protéoglycannes et permettrait le renforcement de la MEC [Kiviranta, 1988 ; van de Lest, 2002]. *A contrario*, l'absence de contraintes mécaniques ou l'immobilisation exercent un effet délétère sur le cartilage articulaire [Behrens, 1989 ; Saamanen, 1990].

D'autres études sur le cheval démontrent également l'effet délétère des activités physiques intenses sur le métabolisme du cartilage articulaire en particulier sur la synthèse des protéoglycannes [Murray, 1999 ; Little, 1997]. Notre étude conduite chez le rat a permis d'appliquer un effort parfaitement calibré et reproductible grâce à l'utilisation d'un tapis roulant contrôlant parfaitement les paramètres de course (vitesse et distance). Elle a permis de démontrer pour la première fois l'influence bénéfique d'une activité physique modérée sur un modèle d'arthrose expérimentale chez le rat. Une activité intense en revanche conduisait à la perte de ce bénéfice.

Par ailleurs, le modèle de section du LCA reproduit un certain nombre de paramètres de l'arthrose en clinique à savoir la réaction inflammatoire initiale [Pelletier, 2001] accompagnée d'un pannus synovial plus ou moins important [Shibakawa, 2003], les modifications du contenu en PGs et de structure du collagène, les fibrillations [Stockwell, 1971] prédominant sur le compartiment médial, l'ostéophytose, le remodelage de l'os sous-chondral, et les phénomènes apoptotiques [Hashimoto, 1998] avec activation de la caspase 3 [Matsuo, 2001]. L'ensemble de ces éléments renforce donc l'intérêt de ce modèle pour appréhender les phénomènes liés au développement des processus arthrosiques.

Des études de laboratoire conduites *in vitro et in vivo* ont montré l'action directe des contraintes mécaniques sur le métabolisme chondrocytaire. Ce facteur mécanique pourrait

dans certaines conditions induire la synthèse de facteurs anti-apoptotiques, les protéines Hsp70 [Milne, 2002], comme dans notre étude. Inversement, un stress mécanique excessif, conduit à l'augmentation des phénomènes apoptotiques [Ye, 2003]. Cet effet ambivalent est clairement démontré par le fait qu'une course régulière modérée ne semble pas déclencher de réaction négative sur le métabolisme cartilagineux alors qu'à l'inverse, des contraintes mécaniques élevées et répétées au niveau articulaire déclenchent des phénomènes dégénératifs sur un cartilage préalablement fragilisé (par section ligamentaire ou méniscale) mais aussi sur un cartilage sain [Lozoya, 2000], comme si un phénomène d'épuisement ou d'échappement apparaissait.

La mort cellulaire observée dans l'arthrose (qu'il s'agisse de mort par nécrose ou apoptose) est également observée chez le rat dans le modèle de section du LCA [Stoop, 2000] mais également dans le modèle de méniscectomie [Kouri-Flores, 2002]. Le pourcentage d'apoptose dans ces modèles est de 12 à 14% contre 4 à 9% chez les témoins en rapport avec un processus de maturation. L'utilisation en thérapeutique d'agents modulateurs de l'apoptose pourrait avoir des implications prometteuses dans la stratégie thérapeutique des premières phases de l'arthrose [Rudel, 1999 ; Nuttall, 2001]. Des études préalables ont montré que l'expression d'Hsp70 est corrélée avec la sévérité de l'arthrose [Kubo, 1985 ; Takahashi, 1997] et que la protéine Hsp70 joue un rôle dans la protection cellulaire contre le stress en particulier le stress d'origine mécanique [Kaarniranta, 2001]. Lorsque l'arthrose progresse, la charge mécanique appliquée sur le compartiment médial, en particulier, augmente et stimule l'expression d'Hsp70. Ce phénomène a été démontré expérimentalement chez le rat dans le muscle quadricipital après section du LCA et effort de course [Okuyama, 2003] ainsi que sur un modèle d'arthrose spontanée chez la souris [Takahashi, 1997]. Parallèlement, des études *in vivo* [Grossin, 2002] et *in vitro* [Kubo, 2001] ont démontré l'effet protecteur de l'induction ou de la surexpression d'Hsp70 contre la mort cellulaire. Nos observations sur la répartition inversement proportionnelle des cellules positives pour Hsp70 et Caspase 3 corroborent ces données. Cette répartition inverse des protéines apoptotiques et des protéines de stress a été observée préalablement au niveau des plaques de croissance du tibia chez le rat [Tiffée, 2000] et correspondrait à un phénomène de régulation de la minéralisation osseuse. Cependant, nos résultats démontrent qu'il existe un effet d'épuisement de la surexpression des protéines de stress Hsp70 face aux contraintes mécaniques. Un stress mécanique trop élevé aura donc pour conséquence un dépassement de ce phénomène protecteur et pour conséquence une réaction apoptotique prédominante.

### **A.1.5- Conclusion**

Ainsi, un effort faible ou modéré exerce un effet protecteur vis à vis des lésions cartilagineuses engendrées par la section du LCA, en limitant la sévérité de celles-ci. En revanche, un effort intense supprime cet effet chondroprotecteur par un phénomène d'«épuisement». La surexpression d'Hsp70 exerce donc un effet chondroprotecteur en limitant les phénomènes apoptotiques. L'utilisation d'Hsp70 comme agent chondroprotecteur représente ainsi une perspective intéressante en clinique pour traiter les phases précoces de l'arthrose ou prévenir leur aggravation. Le développement des techniques de transfert de gène visant à obtenir cette surexpression d'Hsp70 pourrait à l'avenir ouvrir des perspectives thérapeutiques prometteuses dans la prise en charge de la maladie arthrosique.

## Letters to the Editor

Rheumatology 2003;42:692–693

doi:10.1093/rheumatology/keg094

### Moderate-impact exercise is associated with decreased severity of experimental osteoarthritis in rats

SIR, We read with interest the article by Manninen *et al.* [1] reporting that moderate physical exercise is associated with a decreased risk of knee osteoarthritis (OA). We have recently investigated the influence of moderate exercise on the course of an OA model induced by anterior cruciate ligament transection (ACLT) in the rat. ACLT, a well-known model of OA that was characterized initially in various species (e.g. dog, rabbit, monkey [2]), has recently been validated in the rat [3].

Sixty male Wistar rats (200 g) underwent ACLT under anaesthesia (ketamine 50 mg/kg + acepromazine 1.25 mg/kg intraperitoneally) according to Williams *et al.* [4], with minor modifications. On day 0, a parapatellar skin incision was performed on the medial side of the right knee joint and then on the medial side of the patellar tendon. The patella was then dislocated laterally to provide access to the joint space and the anterior cruciate ligament was transected in the flexed knee. A positive anterior drawer test confirmed complete transection of the ligament. The joint was then irrigated with sterile saline to avoid ancillary inflammation, and a purpose-made suture was inserted. The left knee joint was sham-operated as a negative control. Animal welfare guidelines were adhered to at all times.

Rats that had received ACLT were then assigned randomly to two groups: (i) animals in the control group were allowed to move freely in standardized cages; and (ii) animals in the exercise group were made to run on a training mill (LE 8700; LSI Letica, Barcelona, Spain) at a constant speed of 30 cm/s for 30 min, thus leading to a total distance run of 15 km over 28 days. A previous study [5] demonstrated, in naive mature rats, that a running distance of 15 km may lead to moderate knee OA compared with running for 30 km, which induces severe OA. In our experience, running 15 km induces no OA changes in the knees of young naive Wistar rats. Rats were weighed regularly and their spontaneous nocturnal mobility and body temperature were assessed by biotelemetry [6]. Rats were killed after 7, 14 and 28 days. Macroscopic grading was done according to Guingamp *et al.* [7], and for histological scoring we used a scoring system adapted from Mankin *et al.* [8] on each compartment of the knee. Additionally, immunostaining of activated caspase 3 was done to evaluate apoptotic events in chondrocytes.

In ACLT knees, on day 7 there were marked synovitis and surface alterations consisting of fibrillation. The severity of chondral lesions peaked on day 14 and was then stable until day 28. Chondral erosions predominated

on the medial tibial plateau, and were present to a lesser extent on the medial femoral condyle in weight-bearing areas. On the other hand, only moderate lesions occurred on the patella. Similar changes were noted macroscopically. Apoptotic events peaked on day 7 and were then stable until day 28, occurring in approximately 12% of chondrocytes vs 1.5% in the control naive rats. These findings are similar to those reported by Stoop *et al.* [3].

No body weight loss was found in the exercised group compared with the control group. Neither febrile reaction nor loss of spontaneous nocturnal mobility was found in the exercise group, and macroscopic score and histological lesions were significantly decreased ( $P < 0.05$ ) in this group on days 14 and 28 (Fig. 1). Chondrocytic apoptotic events were significantly less pronounced in the exercise group on days 7, 14 and 28.

To our knowledge, this is the first experimental study demonstrating the beneficial influence of moderate exercise on the development of surgically induced OA in the rat. It has been established previously that a high load effort has a detrimental effect on the operated knee in

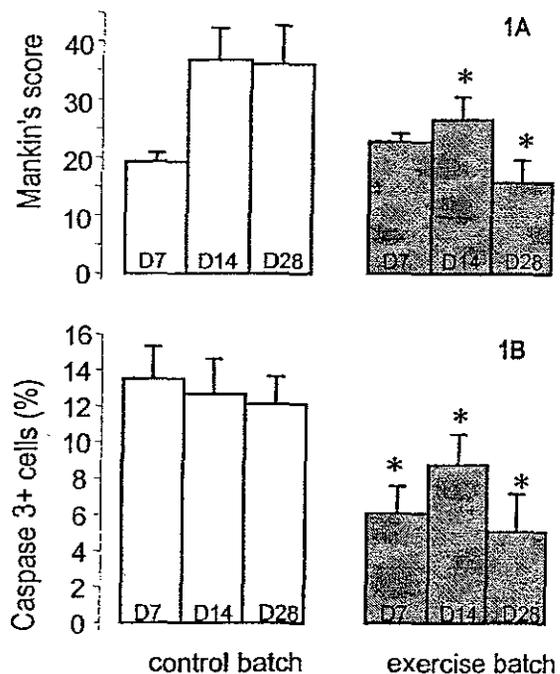


FIG. 1. Time course of OA lesions in control (open columns) and exercised rats (grey columns) that had been subjected to ACLT. Histological grading was recorded blindly by two observers (LG, SE). Values are mean and S.E.M. for five rats. \* $P < 0.05$ , exercised rats vs controls at the same times (Student's *t* test). (A) Histological grading according to Mankin's score, demonstrating the significant beneficial effect of moderate exercise on days 14 and 28. (B) Time course of apoptotic events assessed by immunostaining of activated caspase 3. Note the early apoptotic events in the control group and the significant beneficial effect of exercise on days 7, 14 and 28.

meniscectomized rats and, to a lesser extent, control rats [5]. Recent experimental studies in equine articular cartilage also showed ambivalent effects of strenuous vs moderate exercise on the metabolism and aspect of articular cartilage [9, 10]. This ambivalence is well known in the clinic [11], where it has been established that OA is associated with heavy lifting, farming and elite sports activity but that moderate exercise does not seem to increase the risk of OA [12]; under certain circumstances it may even prevent spontaneous knee OA in the hamster [13] or in humans in the clinic [1].

As the use of a training mill makes it possible to measure the effort applied to weight-bearing joints, we actually assess a 'dose-response' relationship for exercise in ACLT rats, and also the contributions of endogenous proinflammatory cytokines and anti-apoptotic mediators such as Hsp70, which is overexpressed during repeated loading [14].

This study was supported by grants from Pole Européen de Santé and GIP Fonds de Recherches HMR- (FR99RHU037).

L. GALOIS<sup>1,2</sup>, S. ETIENNE<sup>1</sup>, L. GROSSIN<sup>1</sup>, C. COUNIL<sup>1</sup>,  
A. PINZANO<sup>1</sup>, P. NETTER<sup>1</sup>, D. MAINARD<sup>1,2</sup>, P. GILLET<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR 7561 CNRS, University of Nancy I and

<sup>2</sup>Department of Orthopedic Surgery, University Hospital of Nancy, France.

Accepted 8 August 2002

Correspondence to: P. Gillet, UMR 7561 CNRS-Nancy I, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Nancy, Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandœuvre, France. E-mail: Pierre.Gillet@medecine.uhp-nancy.fr

1. Manninen P, Riihimäki H, Heliövaara M, Suomalainen O. Physical exercise and risk of severe knee osteoarthritis requiring arthroplasty. *Rheumatology* 2001;40:432-7.
2. Jouzeau JY, Gillet P, Netter P. Interest of animal models in the preclinical screening of anti-osteoarthritic drugs. *Joint Bone Spine* 2000;67:565-9.
3. Stoop R, Buma P, van der Kraan PM *et al.* Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:308-15.
4. Williams JM, Felten DL, Peterson RG, O'Connor BL. Effects of surgically induced instability on rat knee articular cartilage. *J Anat* 1982;134:103-9.
5. Pap G, Eberhardt R, Stürmer I *et al.* Development of osteoarthritis in the knee joints of Wistar rats after strenuous running exercise in a running wheel by intracranial self-stimulation. *Pathol Res Pract* 1998;194:41-7.
6. Gegout-Pottier P, Philippe L, Simonin MA *et al.* Biotelemetry: an original approach to experimental models of inflammation. *Inflamm Res* 1999;48:417-24.
7. Guingamp C, Gegout-Pottier P, Philippe L, Terlain B, Netter P, Gillet P. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum* 1997;40:1670-9.
8. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 1971;53:523-37.
9. Murray RC, Zhu CF, Goodship AE, Lakhani KH, Agrawal CM, Athanasiou KA. Exercise affects the mechanical properties and histological appearance of equine articular cartilage. *J Orthop Res* 1999;17:725-31.
10. Little CB, Ghosh P, Rose R. The effect of strenuous versus moderate exercise on the metabolism of proteoglycans in articular cartilage from different weight-bearing regions of the equine third carpal bone. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:161-72.
11. Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 1998;41:1343-55.
12. Penninx BW, Messier SP, Rejeski WJ *et al.* Physical exercise and the prevention of disability in activities of daily living in older persons with osteoarthritis. *Arch Intern Med* 2001;161:2309-16.
13. Otterness IG, Eskra JD, Bliven ML, Shay AK, Pelletier JP, Milici AJ. Exercise protects against articular cartilage degeneration in the hamster. *Arthritis Rheum* 1998;41:2068-76.
14. Kaarniranta K, Holmberg CI, Lammi MJ, Eriksson JE, Sistonen L, Helminen HJ. Primary chondrocytes resist hydrostatic pressure-induced stress while primary synovial cells and fibroblasts show modified Hsp70 response. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;9:7-13.

## Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats

GALOIS Laurent <sup>1,2</sup>	MD
ETIENNE Stéphanie <sup>1</sup>	MSc
GROSSIN Laurent <sup>1</sup>	PhD,
WATRIN-PINZANO Astrid <sup>1</sup>	PhD,
COURNIL-HENRIONNET Christel <sup>1</sup>	PhD,
LOEUILLE Damien <sup>1</sup>	MD, PhD,
NETTER Patrick <sup>1</sup>	MD, PhD,
MAINARD Didier <sup>1,2</sup>	MD
GILLET Pierre <sup>1</sup>	MD, PhD

<sup>1</sup> UMR 7561 CNRS - Université Nancy I,

<sup>2</sup> Department of Orthopaedic Surgery, University Hospital of Nancy,

This study was supported by grants from Pole "Européen de Santé", CPRC CHU Nancy, and GIP Fonds de recherches HMR AVENTIS (FR99RHU037).

Corresponding author:

Pr. Patrick Netter, MD, PhD  
UMR 7561 CNRS - Nancy I  
« *Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires* »  
Faculté de Médecine, BP 184, Avenue de la Forêt de Haye  
F54505 VANDOEUVRE-LES-NANCY, FRANCE.  
Tel : +33 (0) 383 683 950 Fax : +33 (0) 383 683 959  
E-mail : [Patrick.Netter@medecine.uhp-nancy.fr](mailto:Patrick.Netter@medecine.uhp-nancy.fr)

Key words: cartilage, chondrocyte, apoptosis, exercise, anterior cruciate ligament transection

## Abstract

**Objective.** To investigate the influence of a calibrated exercise on the progression of structural lesions in an experimental model osteoarthritis in the rat, and to explore the effect of exercise on the level of chondrocyte caspase-dependant apoptosis and of Hsp70.

**Methods :** The OA model was created induced by anterior cruciate ligament transection (ACLT). Rats were placed in 4 experimental groups: operated (ACLT) free moving rats, and 3 exercise groups (slight, moderate and intense) subjected to running training. Rats were killed 14 and 28 days after surgery.

**Results :** On D14 histological assessment demonstrated a beneficial influence of a slight and a moderate exercise vs. control ACLT group. Hsp70 increased significantly in the moderate group versus controls. On D28, histological lesions strongly decreased in the slight and moderate exercise groups vs. ACLT group, while an intense effort abolished this beneficial trend. Interestingly, the concomitant course of apoptotic events (caspase 3 positive cells) and the co-expression of Hsp70 in the various groups varied, when significant, in an inverse manner. In the intense group this overexpression was not noted, as a “burn out” appeared, thus leading to a loss of this protective effect.

**Conclusion :** This study shows that a calibrated slight or moderate exercise exerts a beneficial influence on the severity of chondral lesions in ACLT rats. Conversely, a strong effort abolishes this chondroprotective effect. This effect could be related to a reduced level of chondrocyte apoptosis through anti-apoptotic capacities of stress-induced Hsp70 overexpression.

**Key words :** chondrocyte, heat shock protein, experimental osteoarthritis, apoptosis

## Introduction

Osteoarthritis (OA) is characterized by a progressive degeneration of articular cartilage associated with remodelling of the subchondral bone, marginal osteophyte formation and progressive symptomatic loss of mechanical function. As the aetiology of osteoarthritis (OA) remains incompletely understood, a variety of animal models have been developed with the aim of characterizing the features of the early phases of OA, studying its progression and evaluating new drugs and/or original therapies<sup>1</sup>. Experimental OA can be induced by various manner<sup>2</sup> : abnormal biomechanical forces resulting from joint destabilisation, displaced loading or structural alterations resulting either from a degradation of the extracellular matrix by physical, enzymatic means (papain, collagenase) or from a disturbance of chondrocyte metabolism (e.g. iodoacetate, vitamin A).

Anterior cruciate ligament transection (ACLT) model has widely been studied in various animal species (rabbits<sup>3,4</sup> and dogs<sup>5,6</sup>) and more recently in the rat<sup>7</sup>, thus providing new insights into pathogenic mechanisms and impact of loading on hyaline cartilage. Biomechanical calculations suggest that damage of the surface zone leads to increased loading of the cartilage matrix, higher stresses on the underlying cartilage, leading to a sequence of events in which the degeneration of the superficial zone develops into fibrillations of the cartilage and eventually results in erosions and ulcerations. In this model, there is an increase in the number of cells exhibiting signs of degeneration or even death, often related to chondrocyte apoptosis<sup>8,9</sup>, as previously shown in the dog<sup>10</sup> and in the rabbit<sup>11</sup>. Our preliminary data also suggest that chondrocyte caspase-dependant apoptosis also occurs in ACLT-induced OA in the rat, and that a moderate impact exercise in ACLT rats is associated with decreased severity of chondral lesions and apoptotic events<sup>12</sup>.

Caspases are a family of proteases that have been demonstrated to play a prominent role in determining DNA damages and ancillary caspase-dependent cell-death. The initial death signals can activate the apoptotic pathway which involves a cascade of highly regulated hierarchical molecular events<sup>13</sup>. These events are mediated by a proteolytic cascade in which upstream activator caspases initiate and amplify the maturation of effectors caspases that, in turn, cleave a discrete subset of cellular polypeptides to manifest the apoptotic phenotype. Caspase 3 in its active form is one of the key mediators of apoptosis in its execution phase and its expression may herald imminent apoptosis better than TUNEL assay,<sup>14</sup> and may act as a surrogate specific marker for early chondrocyte apoptosis<sup>15,16</sup>.

On the other hand, a number of other factors, like heat shock proteins (Hsps), have been shown to exert a protective effect against chondrocyte apoptosis. Some Hsp members are constitutively expressed, and the expression levels increase in response to stress, while others are induced after exposure to stress. Hsp70, especially in its inducible form, is now the focus of scientific attention as a protein that can influence the apoptotic process through physical interaction with key components of the machinery<sup>17</sup>, and could obstruct the activation of caspase 3 during NO- or staurosporine-induced apoptosis in primary chondrocytes<sup>18</sup>. Because Hsp70 has been suggested to play an important role in the early stages of adaptation of chondrocytes to biomechanical joint constraints<sup>19</sup>, the primary aim of this study was to extend our previous observations on the effect of a calibrated exercise on the histological and immunohistochemical changes of experimental OA in rats. In this “dose-response” study, we first studied the influence of various levels of exercise on the natural course of the disease (histological score). Secondly we examined whether stress-induced Hsp70 overexpression was associated with the magnitude of caspase 3 activation.

## Materials and Methods

### ANIMALS

Male Wistar rats (200 gr; 8 weeks-old) were obtained from Charles River Laboratories (St Aubin les Elbeuf, France). The maintenance and care of the experimental rats were in accordance with the guidelines of the NIH for Animal Welfare Act. Rats were kept in individual plastic cages in a 12:12 light-dark cycle (light-on period, 6:00 AM – 6:00 PM) in a controlled temperature chamber on sawdust bedding. They were fed a standard diet and had access tap water *ad libitum*. Body weight was recorded at regular intervals.

### SURGICAL PROCEDURE

Rats underwent a anterior cruciate ligament transection (ACLT) under anaesthesia (*i.p.* injection of a mixture of acepromazine 1.25 mg/kg + ketamine 38 mg/kg). According to Williams *et al.*<sup>20</sup>, a parapatellar skin incision was performed on the medial side of the right knee joint, and thereafter on the medial side of the patellar tendon. Patella was then dislocated laterally to provide access to the joint space and ACL was transected in the flexed knee. A positive anterior drawer test validated complete transection of the ligament. The joint was then irrigated with sterile saline to avoid ancillary inflammatory process, and a purpose-made suture was processed. A naive group (*sham group*)

undergoing arthrotomy without ACLT was included as an internal control for characterizing this experimental model on various key points.

#### CALIBRATED EFFORT

Rats that had received ACLT were then assigned randomly to various groups, a control group, and 3 exercise groups. In the *control group*, ACLT rats were allowed to move freely in standardized cages. According to our previous data, in the *exercise groups*, ACLT rats were subjected to running training once a day 5 days a week for 2 or 4 weeks on a motor driven treadmill (LE 8700, LSI Letica®, Barcelona, Spain) for rodents with a constant speed of :

- 30 cm/s for 15 min (*slight exercise*), leading to a distance of 7.5 km over 28 days
- 30 cm/s for 30 min (*moderate exercise*), leading to a distance of 15 km over 28 days
- 30 cm/s for 60 min (*intense exercise*), thus leading to a total distance of 30 km over 28 days.

#### HISTOLOGICAL GRADING

Animals were killed by cervical dislocation under anaesthesia. Whole knee joints were dissected, fixed in 4% paraformaldehyde (pH 7.4), decalcified with “*Rapid Decalcifiant Osseux*” (RDO, Apex, Canada), dehydrated through a descending series of ethanol with the use of an automated tissue processing apparatus. After embedding in paraffin, serial sections with a thickness of 5 µm were prepared for histological examination and immunohistochemistry. The sections were stained with hematoxylin-eosin to observe cellularity, and toluidine blue to assess proteoglycan content.

The severity of OA lesions was graded on a scale adapted from Mankin’s score<sup>21</sup> by two independent observers (LG and SE). This score ranged from 0 to 15 according to structure, cellularity, toluidine blue staining, thickness of hypertrophic chondrocyte layer, bone remodelling and osteolysis. Structure was graded from 0 to 5 (0 = Normal, 1= Pannus and surface irregularities, 2= Clefts to transitional zone, 3= Clefts to radial zone, 4= Clefts to calcified zone, 5= Complete disorganization). Cellularity was graded from 0 to 3 (0= Normal, 1= Diffuse hypercellularity, 2= Cloning, 3= Hypocellularity). Toluidine blue staining was graded from 0 to 3 (0= Normal, 1= Slight reduction, 2=Moderate reduction, 3= Severe reduction). Thickness of hypertrophic chondrocyte layer graded from 0 to 2 (0= Normal, 1= Moderate decrease, 2= Total decrease). Bone remodelling and bone osteolysis were graded from 0 to 1 respectively with 0= No and 1= Yes. This score was determined in four compartments: medial and lateral part of the tibia and medial and lateral part of the femur (the patella was not assessed) thus leading to a maximal score of 60 per knee.

## IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Immunohistochemistry was performed on the serial paraffin sections as previously described<sup>12</sup>. Tissue sections were deparaffinized and rehydrated. The sections were pre-treated with chondroitinase ABC (0.25 U/ml in PBS, pH 8.0; Sigma, St. Louis, MO, USA) for 90 min at 37°C. Permeability was enhanced by using 0.3% Triton X-100 in PBS (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubing sections with freshly prepared 3% hydrogen peroxide (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min. Non-specific staining was blocked by incubation of the sections with blocking serum supplied by Novostain superABC kit (Novocastra, Newcastle, UK) for 60 min. Sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies in a humidified chamber. A biotin-labelled goat anti-rabbit IgG (Novostain superABC kit) was used as a secondary antibody for 45 min. A biotin-avidin detection system (Novostain superABC kit) was used according to the manufacturer's recommendations. The peroxidase was detected using liquid diaminobenzidine substrate kit (Novocastra, Newcastle, UK). After counterstaining with methyl green, slides were dehydrated and mounted with Eukitt (Labonord, France).

The primary antibodies used in this study was: rabbit polyclonal active Caspase 3 antibody (R & D Systems, Abington, U.K) diluted at a ratio of 1:300 and rabbit polyclonal Hsp70 antibody (StressGen Biotechnologies, Victoria, Canada) diluted at a ratio of 1:300. The presence of antigen was estimated by determining the number of specific chondrocytes staining positive in the superficial zone (superficial and upper intermediate cartilage layers) and in deep zone (lower intermediate and deep layers). Each zone was divided into 4 different sections. The cell count scores were determined separately for the medial and lateral sides of condyles and plateaus. The total number of chondrocytes and the number of chondrocytes staining positive for the specific antigen were determined at 40× magnification for the superficial and the deep zones, respectively.

## STUDY DESIGN & STATISTICAL ANALYSIS

A preliminary pilot descriptive study was performed in a small number of rats (3 ACLT and 3 sham on D7, 14 and 28) to verify *in vivo* the occurrence of both apoptotic events and overexpression of Hsp70 in this model. Next, for studying the dose-response relationship for exercise, 10 ACLT rats were compared to 5 "slight", 5 "moderate" and 5 "intense" rats only on D14 and D28, since our previous results indicated no statistical influence of exercise on D7. Data are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). One way ANOVA followed by a Student's t test was used to

determine the statistical significance of the differences between ACLT group and ACLT group with calibrated effort. P values smaller than 0.05 were considered significant. A total of 68 rats were used in this study.

## Results

### HISTOLOGICAL CHANGES AFTER ACL TRANSECTION

*Histological changes.* Articular cartilage from the sham-operated knee joints was histologically normal throughout the study (score of 0). In ACLT rats, histological score progressively increased ( $19.2 \pm 1.6$  on D7,  $34.0 \pm 4.7$  on D14, and  $39.8 \pm 7.4$  on D28). On D7, a mild transient synovitis inherent to the surgical procedure of arthrotomy was noted. Structural alterations appeared in the ACLT group, predominating in the medial condyle. Slight proteoglycan depletion and diffuse hypercellularity were present in all compartments. On D14, condyle lesions were stable. Structural alteration of cartilage increased in medial and lateral tibial plateaus. This tibial alteration consisted of clefts to radial zone, leading in some cases to bone exposure. A dramatic decrease in cellularity was observed in the whole cartilage. Proteoglycan depletion was stable and the fibrosis persisted. On day 28, degenerative lesions were homogeneous in all compartments (plateaus and condyles). Mirror-image lesions were observed specially in medial compartment. Subchondral remodelling was more pronounced at this stage.

*Apoptotic events,* depicted by active Caspase 3 immunostaining (Figure 2), were increased throughout the experiment (12-14% on D7, D14 & D28) when compared with sham-operated knees (4-9%). Apoptotic events predominated on D7 in the superficial zone of cartilage and on D14 in the deep zone. On D28, apoptotic events were homogeneous throughout the whole cartilage. Interestingly, apoptosis predominated in the medial compartment. *Hsp70* immunostaining was enhanced in ACLT group (10%) vs. control group (3-5 %) at all time-periods (Figure 2).

### INFLUENCE OF A CALIBRATED EFFORT ON THE COURSE OF ACLT MODEL

On D14 histological assessment demonstrated a beneficial influence of a slight and a moderate exercise vs. control ACLT group ( $p < 0.05$ ). In contrast, no significant beneficial or detrimental influence was noted in the intense group. Apoptotic events (10% caspase 3 positive cells in the control group) were not significantly decreased in "slight", "moderate" and "intense" groups. *Hsp70* increased significantly in the moderate group versus controls (22.4% vs 12.8%,  $p < 0.05$ ). On the other

hand, a beneficial trend was observed in the “*slight*” group (16.7%, NS) and no influence was present in the “*intense*” group (11.2%).

On D28, histological lesions strongly decreased in the slight and moderate exercise groups vs. ACLT group, while an intense effort abolished this beneficial trend (Figure 3). Typically, ACLT group was characterized by clefts reaching the radial zone and strong proteoglycan depletion. In the “*slight*” group, clefts were less pronounced, limited to the transitional zone. Additionally, as shown in Figure 4, proteoglycan depletion was less marked. In the “*moderate*” group, when compared with ACLT group, cartilage presented a dramatic hypercellularity and less fibrillations located only in the superficial zone. Conversely, no beneficial or detrimental effect was observed in the “*intense*” vs. ACLT group: clefts reached the radial zone and proteoglycan content was strongly decreased.

Interestingly, the concomitant course of apoptotic events (Figure 5) and the co-expression of Hsp70 in the various groups varied, when significant, in an inverse manner. A global assessment of apoptotic events demonstrated a global beneficial trend ( $p=.09$ ) in the “*moderate*” group. Interestingly, this beneficial trend was strongly significant in the medial compartment, mostly involved in this experimental model. In this particular group, concomitant Hsp70 overexpression was more pronounced, in both superficial and deep zones, suggesting that this “anti-apoptotic” factor could, at least in part, contribute to this beneficial effect. Additionally, in the “*intense*” group this overexpression was not noted, as a “*burn out*” appeared, thus leading to a loss of this protective effect.

## Discussion

Osteoarthritis is the most common joint disorder in a large number of people older than 65 years. Knee OA is more commonly associated with disability than OA of the other joints. Many treatment programs have been developed including medications with NSAIDs, chondroprotective drugs, physical modalities and therapeutic exercises. Therapeutic exercise in OA may prevent accelerated degeneration caused by disuse without causing further degeneration, as suggested by recent longitudinal clinical studies<sup>22,23</sup>. Ambivalent effects of training on cartilage is well known in the clinics<sup>24</sup>: it is established that OA is associated with heavy lifting, farming and elite sport activity, and, on the other hand, moderate exercise does not seem to increase the risk of OA, and under certain circumstances, even could prevent knee OA. This ambivalent effect has previously been observed experimentally: a high load effort has a detrimental effect on the operated knee in

meniscectomized rat<sup>25</sup>, and to a lesser extent, in naive rats<sup>26</sup>, but in other situations it may prevent spontaneous knee OA in the hamster<sup>27</sup>. Additionally, recent experimental studies in equine articular cartilage also showed ambivalent effect of strenuous versus moderate exercise on the metabolism and aspect of articular cartilage<sup>28,29</sup>.

This study has been conducted in rats because the use of a training mill makes it possible to measure the effort applied to weight-bearing joints, and, to the best of our knowledge, these results demonstrate for the first time the beneficial influence of a calibrated moderate exercise on the natural course of experimental rat OA, while a strong effort was without beneficial outcome. Furthermore, ACLT model mimics some features of human OA, like early inflammatory synovitis<sup>30</sup>, in some case leading to synovial pannus-like tissue<sup>31</sup> (Figure 4), changes in proteoglycan content and collagen structure, cartilage erosions<sup>32</sup> predominating in the medial compartment, late osteophytosis, subchondral bone remodelling, and chondrocytic apoptosis<sup>33</sup> with caspase 3 activation<sup>34</sup>, thus reinforcing the clinical relevance of our experimental approach.

Basically, cartilage is an avascular tissue, and chondrocyte metabolism depends on diffusion and convection of synovial fluid for nutrition. Cyclic loading induced by physiological and overuse activities produce deformations, pressure gradients and fluid flows within the tissue. Laboratory investigations, performed *in vitro* and *in vivo*, have shown that mechanical stress has a direct effect on chondrocyte metabolism, and could, under certain conditions, induce anti-apoptotic factors such as Hsp70, as demonstrated herein in ACLT rats. Conversely, overuse, or excessive stress, can induce an excess of apoptosis<sup>35</sup>. This ambivalent effect is highlighted by the fact that regular distance running seems to have experimentally no adverse effect on normal joints, contrasting with the fact that high impact joint loading may exert joint degeneration in healthy and experimental OA cartilages<sup>25</sup>, as if a 'burn out' appeared.

As observed in the clinics, chondrocyte death, either necrotic or apoptotic, is also observed in this particular rat model of OA following ACLT<sup>36</sup>, as shown in meniscectomized rats<sup>37</sup>. Apoptotic events are noted in 12-14% of chondrocytes versus 4-9% in controls, probably due to the maturation process. Consequently, therapeutical modulation of apoptotic caspases could be of great benefits during early phases of OA<sup>38</sup>. Previous studies have demonstrated that the chondrocytic expression of Hsp70 is positively correlated with the clinical severity of OA<sup>39,40</sup> and that Hsp70 played a role in cell protection from stress, especially in the early events. Mechanical stress<sup>41</sup>, heat stress or cytokines are presumed to act as stress on OA cartilage. When OA progresses, due to matrix

disruption, compressive load increases, especially in the medial compartment, and subsequently Hsp70 can be induced in cartilage, as previously reported in rat quadriceps muscle following ACLT and exercise training<sup>42</sup> and spontaneous OA in C57 black mouse<sup>43</sup>. Additionally, it has been reported that the overexpression or the induction of Hsp70 protects chondrocytes from cell death *in vitro*<sup>44</sup> and *in vivo*<sup>45</sup>. This presumption is supported by our finding that Hsp70-positive cells were mainly found (Figure 5) in the areas where apoptotic events (caspase 3 - positive cells) were dramatically lessened. This negative imbalance between apoptotic events and expression of different stress proteins has already been observed in chondrocytic cells of the growing plate in the rat tibia<sup>46</sup>, as a key process in the promotion or the regulation of bone calcification. Unfortunately, as observed in the present study, overexpression of Hsp70 to mechanical constraints is not “*dose dependent*” (minimal and maximal thresholds) and a too-high load impact could lead to a “*burn out*” of this machinery, leading to override these protective effects, with a restored apoptosis as an end result.

***In conclusion***, a calibrated slight or moderate exercise exerts a beneficial influence on the severity of chondral lesions in ACLT rats. Conversely, a strong effort abolishes this chondroprotective effect. In these conditions stress-induced Hsp70 overexpression may exert chondroprotective properties through its anti-apoptotic capacities. Hsp70 exerts cytoprotective and biosynthetic functions in acting as a chaperone within chondrocytes, but concomitant pro-inflammatory (e.g. cytokines and eicosanoids) and apoptotic signals (e.g. NO, Fas-L) as well as co-expression of other Hsps, may counteract these beneficial effects in some instance during OA. Given the fact that Hsp70 has chondroprotective effects increasing intracellular expression of Hsp70 may be a highly effective approach to prevent apoptotic cell death. Therefore, future studies should be directed toward gene delivery of Hsp70 to chondrocyte in experimental OA models.

***Acknowledgments***. The authors thank Venkatesan NARAYANAN and Jean Yves JOUZEAU for their expert advices and Michel THIERY for his good care to animals.

## References

1. van den Berg WB. Lessons from animal models of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:452-6.
2. Jouzeau JY, Gillet P, Netter P. Interest of animal models in the preclinical screening of anti-osteoarthritic drugs *Joint Bone Spine* 2000;67:565-9.
3. Shapiro F, Glimcher MJ Induction of osteoarthrosis in the rabbit knee joint. *Clin Orthop* 1980 147:287-95.
4. Vignon E, Bejui J, Hartmann DJ, Ville G, Vial B, Mathieu P. Quantitative study of experimental osteoarthritic lesions in the rabbit. Value for the study of anti-osteoarthritis drugs. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1986;53:649-52.
5. Marshall KW, Chan AD. Arthroscopic anterior cruciate ligament transection induces canine osteoarthritis. *J Rheumatol* 1996;23:338-43.
6. Brandt KD, Braunstein EM, Visco DM, O'Connor B, Heck D, Albrecht M. Anterior (cranial) cruciate ligament transection in the dog: a bona fide model of osteoarthritis, not merely of cartilage injury and repair. *J Rheumatol* 1991;18:436-46.
7. Stoop R, Buma P, van der Kraan PM, Hollander AP, Billingham RC, Meijers TH, Poole AR, van den Berg WB. Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:308-15.
8. Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 2001;3:107-13.
9. Aigner T, Kim HA. Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration. *Arthritis Rheum* 2002;46:1986-96.
10. Boileau C, Martel-Pelletier J, Jouzeau JY, Netter P, Moldovan F, Laufer S, Tries S, Pelletier JP. Licofelone (ML-3000), a dual inhibitor of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase, reduces the

- level of cartilage chondrocyte death in vivo in experimental dog osteoarthritis: inhibition of pro-apoptotic factors. *J Rheumatol* 2002; **29**:1446-53.
11. Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998; **41**:1266-74.
  12. Galois L, Etienne S, Grossin L, Cournil C, Pinzano A, Netter P, Mainard D, Gillet P. Moderate-impact exercise is associated with decreased severity of experimental osteoarthritis in rats. *Rheumatology (Oxford)* 2003; **42**:692-3.
  13. Schultz DR, Harrington WJ Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum* 2003; **32**:345-69.
  14. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995; **21**:1465-8.
  15. Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, Fernandes JC, Manning PT, Connor JR, Currie MG, Martel-Pelletier J. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum* 2000; **43**:1290-9.
  16. Grogan SP, Aklin B, Frenz M, Brunner T, Schaffner T, Mainil-Varlet P. In vitro model for the study of necrosis and apoptosis in native cartilage. *J Pathol.* 2002; **198**:5-13.
  17. Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **304**:505-12.
  18. Terauchi R, Takahashi KA, Arai Y, Ikeda T, Ohashi S, Imanishi J, Mazda O, Kubo T. Hsp70 prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2003; **48**:1562-8.

19. Kaarniranta K, Holmberg CI, Lammi MJ, Eriksson JE, Sistonen L, Helminen HJ. Primary chondrocytes resist hydrostatic pressure-induced stress while primary synovial cells and fibroblasts show modified Hsp70 response. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;**9**:7-13.
20. Williams JM, Felten DL, Peterson RG, O'Connor BL. Effects of surgically induced instability on rat knee articular cartilage. *J Anat* 1982;**134**:103-9.
21. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 1971;**53**:523-37.
22. Manninen P, Riihimaki H, Heliovaara M, Suomalainen O. Physical exercise and risk of severe knee osteoarthritis requiring arthroplasty. *Rheumatology (Oxford)* 2001;**40**:432-7.
23. Huang MH, Lin YS, Yang RC, Lee CL. A comparison of various therapeutic exercises on the functional status of patients with knee osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2003;**32**:398-406.
24. Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 1998;**41**:1343-55.
25. Lozoya KA, Flores JB. A novel rat osteoarthrosis model to assess apoptosis and matrix degradation. *Pathol Res Pract* 2000;**196**:729-45.
26. Pap G, Eberhardt R, Sturmer I, Machner A, Schwarzberg H, Roessner A, Neumann W. Development of osteoarthritis in the knee joints of Wistar rats after strenuous running exercise in a running wheel by intracranial self-stimulation. *Pathol Res Pract* 1998;**194**:41-7.
27. Otterness IG, Eskra JD, Bliven ML, Shay AK, Pelletier JP, Milici AJ. Exercise protects against articular cartilage degeneration in the hamster. *Arthritis Rheum* 1998;**41**:2068-76.
28. Murray RC, Zhu CF, Goodship AE, Lakhani KH, Agrawal CM, Athanasiou KA. Exercise affects the mechanical properties and histological appearance of equine articular cartilage. *J Orthop Res* 1999;**17**:725-31.

29. Little CB, Ghosh P, Rose R. The effect of strenuous versus moderate exercise on the metabolism of proteoglycans in articular cartilage from different weight-bearing regions of the equine third carpal bone. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;**5**:161-72
30. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 2001;**44**:1237-47.
31. Shibakawa A, Aoki H, Masuko-Hongo K, Kato T, Tanaka M, Nishioka K, Nakamura H. Presence of pannus-like tissue on osteoarthritic cartilage and its histological character. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;**11**:133-40.
32. Stockwell RA. The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. *J Anat* 1971;**109**:411-21
33. Hashimoto S, Ochs RL, Komiyama S, Lotz M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;**41**:1632-8
34. Matsuo M, Nishida K, Yoshida A, Murakami T, Inoue H. Expression of caspase-3 and -9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med Okayama* 2001;**55**:333-40.
35. Ye J, Haro H, Takahashi M, Kuroda H, Shinomiya K. Induction of apoptosis of articular chondrocytes and suppression of articular cartilage proteoglycan synthesis by heat shock. *J Orthop Sci* 2003;**8**:387-95.
36. Stoop R, Buma P, van der Kraan PM, Hollander AP, Clark Billingham R, Robin Poole A, van den Berg WB. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum* 2000;**43**:2121-31.
37. Kouri-Flores JB, Abbud-Lozoya KA, Roja-Morales L Kinetics of the ultrastructural changes in apoptotic chondrocytes from an osteoarthrosis rat model: a window of comparison to the cellular mechanism of apoptosis in human chondrocytes. *Ultrastruct Pathol* 2002;**26**:33-40.

38. Nuttall ME, Lee D, McLaughlin B, Erhardt JA. Selective inhibitors of apoptotic caspases: implications for novel therapeutic strategies. *Drug Discov Today* 2001;**6**:85-91.
39. Kubo T, Towle CA, Mankin HJ, Treadwell BV. Stress-induced proteins in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1985;**28**:1140-5
40. Takahashi K, Kubo T, Arai Y, Imanishi J, Kawata M, Hirasawa Y. Localization of heat shock protein in osteoarthritic cartilage. *Scand J Rheumatol* 1997;**26**:368-75.
41. Kaarniranta K, Holmberg CI, Lammi MJ, Eriksson JE, Sistonen L, Helminen HJ. Primary chondrocytes resist hydrostatic pressure-induced stress while primary synovial cells and fibroblasts show modified Hsp70 response. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;**9**:7-13.
42. Okuyama R, Honda M, Fujiya H, Goto K, Sugiura T, Akema T. Expression of heat shock protein 72 in rat quadriceps muscles following anterior cruciate ligament resection. *J Orthop Sci* 2003;**8**:213-7.
43. Takahashi K, Kubo T, Goomer RS, Amiel D, Kobayashi K, Imanishi J, Teshima R, Hirasawa Y. Analysis of heat shock proteins and cytokines expressed during early stages of osteoarthritis in a mouse model. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;**5**:321-9.
44. Kubo T, Arai Y, Takahashi K, Ikeda T, Ohashi S, Kitajima I, Mazda O, Takigawa M, Imanishi J, Hirasawa Y. Expression of transduced HSP70 gene protects chondrocytes from stress. *J Rheumatol* 2001;**28**:330-5.
45. Grossin L, Henrionnet C, Liagre B, Mir L, Dumas D, Etienne S, Loeuille D, Netter P, Gillet P.; Electric Gene Transfer of Hsp70 in Rat Patella Protects in vivo from Iodoacetate Induced Chondrotoxicity. *Arthritis Rheum* 2002, **46** (Suppl 9):S221 (Abstract 513).
46. Tiffée JC, Griffin JP, Cooper LF. Immunolocalization of stress proteins and extracellular matrix proteins in the rat tibia. *Tissue Cell* 2000;**32**:141-7.

## Figure Legends

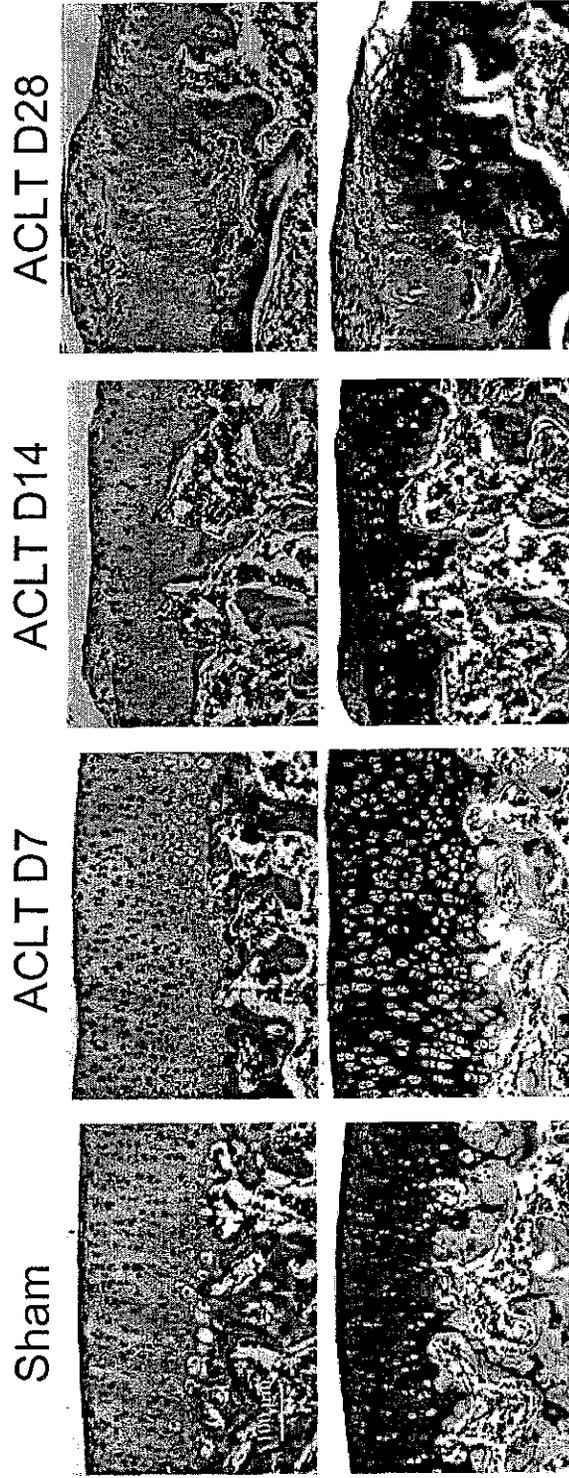
**Figure 1.** Time course of histological lesions (medial tibial plateaus) in ACLT rats. Proteoglycan content was evaluated by toluidine blue staining (bottom images), cellularity, and surface integrity by hematoxylin-eosin (HES) staining (upper images). On D7, a slight proteoglycan depletion was observed as a structural alteration (hypercellularity). On D14, superficial lesion reached radial zone. The cellularity progressively decreased compared with D7. On D28, subchondral bone modifications appeared. Clefts were more pronounced at this stage.

**Figure 2:** Apoptotic events and overexpression of chondrocytic Hsp70 in ACLT rats versus control rats (*sham*) on D28. Caspase 3 and Hsp 70 expressions were estimated by determining the number of specific chondrocytes staining positive in superficial (SZ) and deep (DZ) zones of the control group (*sham*) or in superficial (SZ) and deep (DZ) zones of ACLT group on D28. (The original magnification was  $\times 10$  for above figures and  $\times 40$  for corresponding highlighted zones).

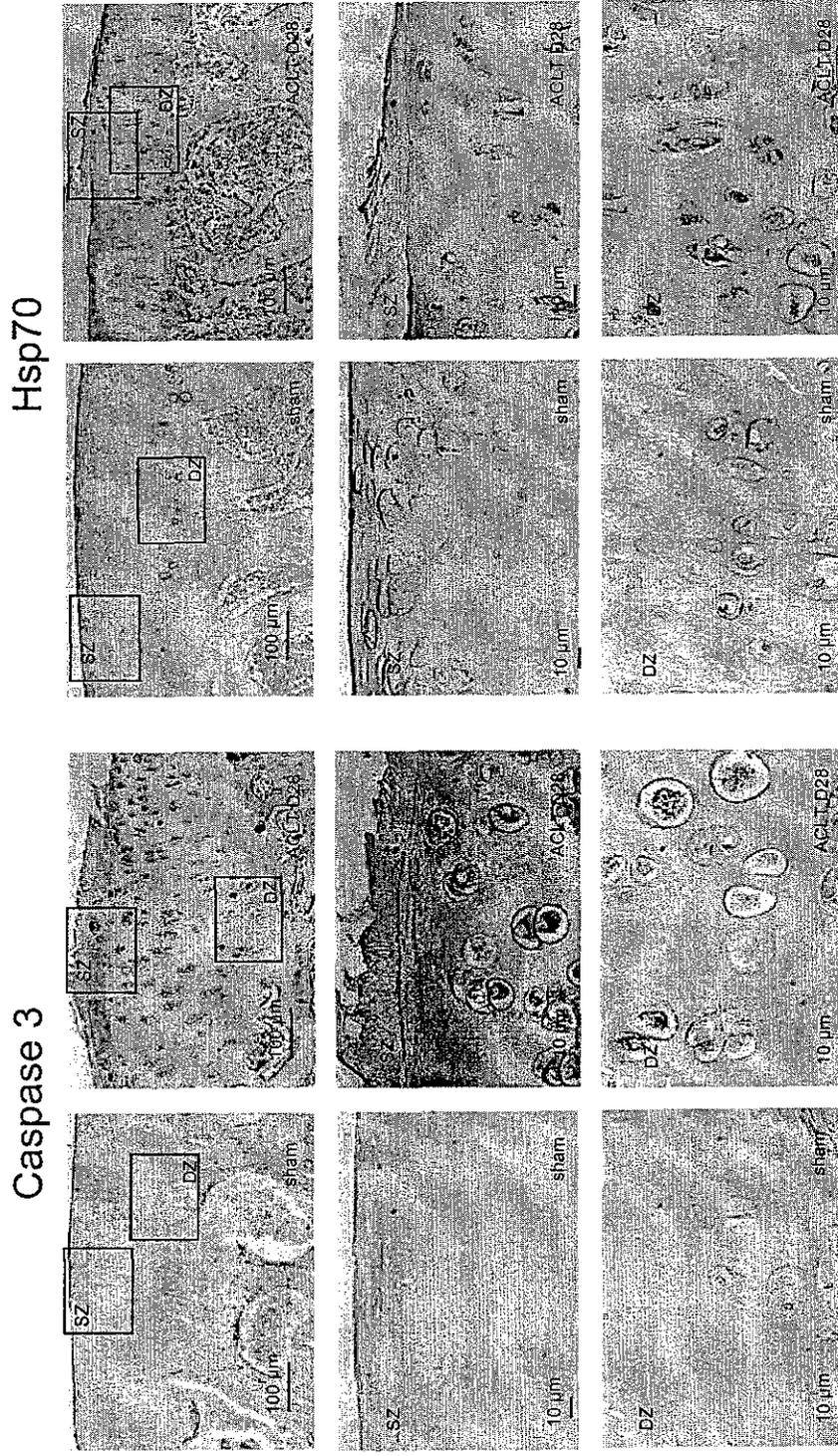
**Figure 3.** Influence of a calibrated effort on histological lesions (according to Mankin's score) in ACLT rats. Histological lesions were significantly decreased ( $p < 0.05$ ) on D14 and D28 ( $p < 0.005$ ) in the "slight" and "moderate" exercise groups versus ACLT group, whereas an intense exercise abolished this beneficial effect (P values were determined by t-test,  $n=10$  rats for ACLT group,  $n=5$  rats for other groups, mean score  $\pm$  standard error).

**Figure 4.** Histological analysis of cartilage lesions during ACLT model in rats undergoing a calibrated effort (D28). Cellularity and surface integrity were evaluated with Hematoxylin-Eosin (HES, upper figures) staining and proteoglycan content was assessed by using toluidine blue staining (TB, bottom images). For the "slight exercise" group (15 min), the lesions reached the transitional zone and the proteoglycan content decreased (note the synovial pannus, bottom image). For the moderate exercise group (30 min), the cartilage was characterized by a slight superficial fibrillation and a hypercellularity. After an "intense exercise" (60 min), the erosion reached the radial zone and lesions were similar to those observed in the ACLT group without exercise (*sham*).

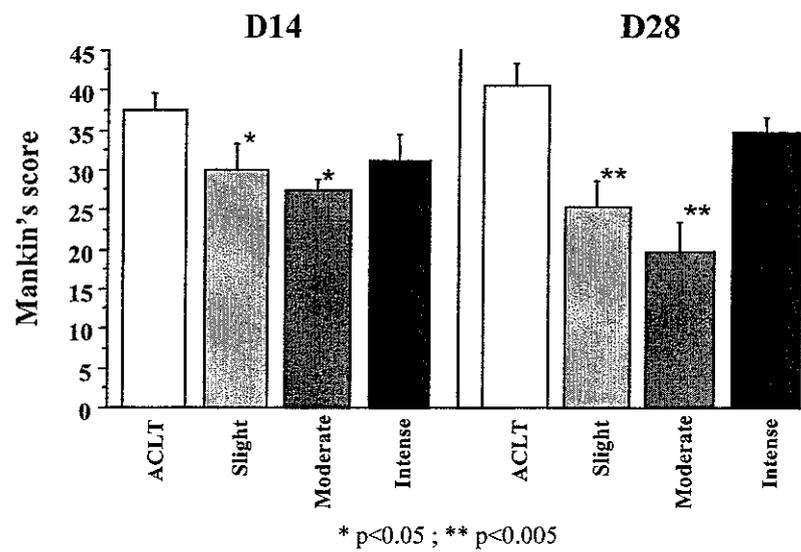
**Figure 5. Caspase 3 and Hsp 70 expressions assessed by immunostaining on D28.** Caspase 3 expression was less pronounced in "moderate" exercise group in both superficial and deep zones ( $p < 0.05$ ) in the medial compartment. No significant differences were observed in slight and intense exercise when compared to the ACLT group. A concomitant overexpression of Hsp70, an anti-apoptotic factor was noted in the moderate exercise group ( $p < 0.05$ ). (P values were determined by t-test,  $n=10$  rats for ACLT group,  $n=5$  rats for other groups, mean score  $\pm$  standard error).



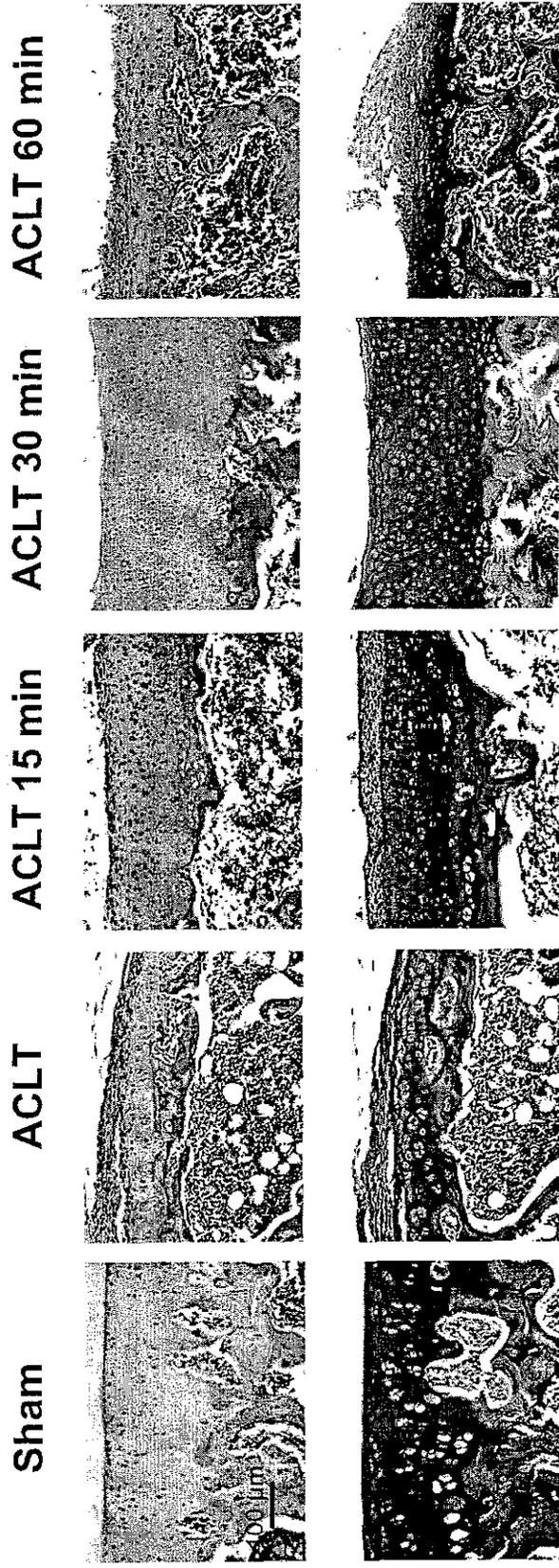
**Figure 1.** Time course of histological lesions (medial tibial plateaus) in ACLT rats. Proteoglycan content was evaluated by toluidine blue staining (bottom images), cellularity, and surface integrity by Hematoxylin-Eosin HES staining (upper images). On D7, a slight proteoglycan depletion was observed as a structural alteration (hypercellularity). On D14, superficial lesion reached radial zone. The cellularity progressively decreased compared with D7. On D28, subchondral bone modifications appeared. Clefts were more pronounced at this stage.



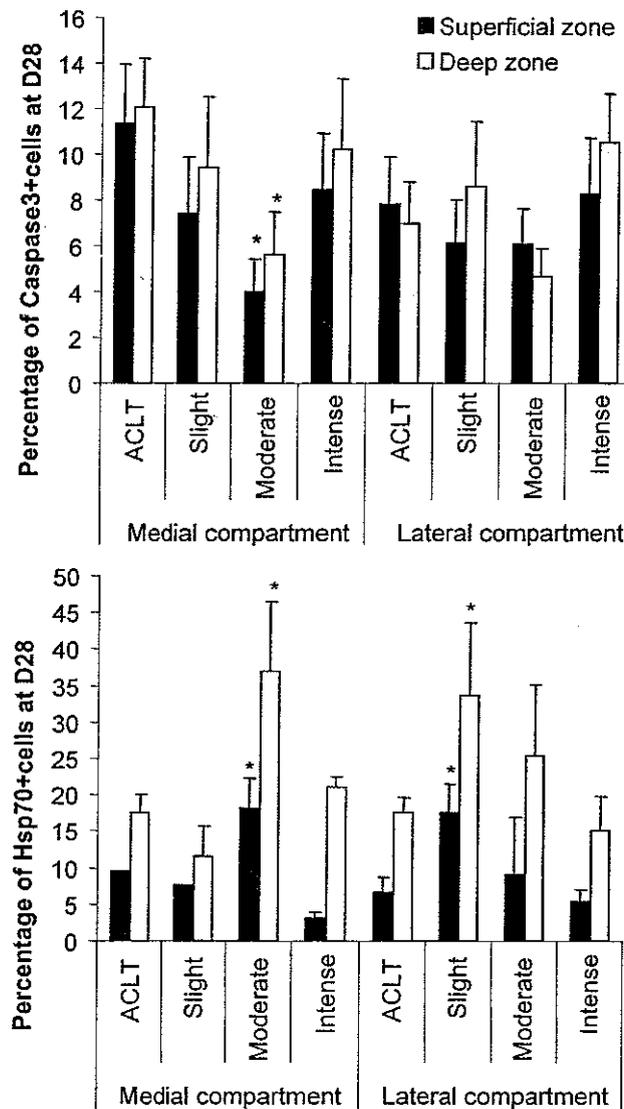
**Figure 2:** Apoptotic events and overexpression of chondrocytic Hsp70 in *ACLT* rats versus control rats (*sham*) on D28. Caspase 3 and Hsp 70-expressions were estimated by determining the number of specific chondrocytes staining positive in superficial (SZ) and deep (DZ) zones of the control group (*sham*) or in superficial (SZ) and deep (DZ) zones of *ACLT* group on D28. (The original magnification was  $\times 10$  for above figures and  $\times 40$  for corresponding highlighted zones).



**Figure 3.** Influence of a calibrated effort on histological lesions (according to Mankin's score) in ACLT rats. Histological lesions were significantly decreased ( $p<0.05$ ) on D14 and D28 ( $p<0.005$ ) in the "slight" and "moderate" exercise groups versus ACLT group, whereas an intense exercise abolished this beneficial effect (P values were determined by t-test,  $n=10$  rats for ACLT group,  $n=5$  rats for other groups, mean score  $\pm$  standard error).



**Figure 4.** Histological analysis of cartilage lesions during ACLT model in rats undergoing a calibrated effort (D28). Cellularity and surface integrity were evaluated with Hematoxylin-Eosin (HES, upper figures) staining and proteoglycan content was assessed by using toluidine blue staining (TB, bottom images). For the “*slight exercise*” group (15 min), the lesions reached the transitional zone and the proteoglycan content decreased (note the synovial pannus, bottom image). For the moderate exercise group (30 min), the cartilage was characterized by a slight superficial fibrillation and a hypercellularity. After an “*intense exercise*” (60 min), the erosion reached the radial zone and lesions were similar to those observed in the ACLT group without exercise (sham).



**Figure 5.** Caspase 3 and Hsp 70 expressions assessed by immunostaining on D28. Caspase 3 expression was less pronounced in “moderate” exercise group in both superficial and deep zones ( $p < 0.05$ ) in the medial compartment. No significant differences were observed in slight and intense exercise when compared to the ACLT group. A concomitant overexpression of Hsp70, an anti-apoptotic factor was noted in the moderate exercise group ( $p < 0.05$ ). (P values were determined by t-test,  $n=10$  rats for ACLT group,  $n=5$  rats for other groups, mean score  $\pm$  standard error).

**B-INGENIERIE TISSULAIRE, BIOMATERIAUX ET LESIONS  
DU CARTILAGE**

## B.1- Influence de l'injection intra-articulaire de MG 132

### *B.1.1- Objectifs*

Le MG132 est un inhibiteur réversible du protéasome appartenant à la famille des peptides aldéhydes (carbobenzoxyl-leucinyll-leucinyll-leucinal). Des études récentes ont mis en évidence l'induction des protéines de choc thermique suite à l'inhibition du protéasome, site de dégradation de la plupart des protéines chez les cellules eucaryotes.

Le but de ce travail a été de valider le potentiel chondro-protecteur de la protéine Hsp70 *in vivo* sur le modèle d'arthrose expérimentale par section du ligament croisé antérieur, proche de certaines conditions physiopathologiques favorisant la gonarthrose.

La caractérisation des lésions ostéo-cartilagineuses nous a permis de nous placer dans les conditions où les lésions érosives sont maximales, c'est à dire une évolution jusqu'à 28 jours après l'opération. Ainsi, après vérification de l'induction de la protéine Hsp70 par le MG132, les effets de la surexpression d'Hsp70 sur les lésions du cartilage chez le rat ont été évalués.

### *B.1.2- Matériels et méthodes*

La procédure chirurgicale était identique à celle décrite précédemment (§ A.1.2.2) de même que le protocole histologique (§ A.1.2.4).

Nous avons utilisé le MG132 en injections intra-articulaires de façon à induire l'expression de la protéine Hsp70. La veille de l'opération (J-1), une première injection intra-articulaire avec la plus faible concentration de MG132 (1,5  $\mu$ M) a été réalisée dans la cavité articulaire du genou à opérer. La section du LCA a été réalisée à J0. Les autres injections intra-articulaires de MG132 ont eu lieu à J7, J14 et J21. Les animaux ont été sacrifiés à J28 et les genoux prélevés pour étude histologique. Les lésions histologiques ont été évaluées selon le score de Mankin modifié décrit précédemment (Tableau 5). Les techniques immunohistochimiques décrites précédemment ont également été utilisées pour Hsp70 et Caspase3 (§ A.1.2.5)

### **B.1.3- Résultats**

#### **B.1.3.1- Optimisation de l'induction d'Hsp70 par le MG132**

Nous avons injecté le MG132 en intra-articulaire par voie infrapatellaire médiane, de façon à induire l'expression de la protéine Hsp70 dans les chondrocytes du cartilage du genou de rat. L'innocuité de telles injections a été au préalable vérifiée [Cournil, 2003]. Ainsi, l'injection répétée de MG132 n'entraîne ni effet systémique ni variation du métabolisme chondrocytaire. Ces injections ne provoquent pas non plus de réaction d'apoptose chondrocytaire (absence de détection de la Caspase 3 active). Ces études préliminaires ont montré qu'une injection par semaine de MG132 était capable d'augmenter l'expression de la protéine Hsp70.

#### **B.1.3.2- Evaluation histologique du potentiel protecteur du MG132 sur le modèle de section du LCA**

Les études d'induction de la protéine Hsp70 par injections répétées de MG132 ont mis en évidence une augmentation de l'expression d'Hsp70 dans les chondrocytes du cartilage articulaire au bout de 28 jours. L'absence de lésions articulaires (histologiques, macroscopiques, métaboliques) et de toxicité pour les différents organes vitaux nous ont permis d'utiliser le MG132 afin d'évaluer les effets bénéfiques de cette induction d'Hsp70 sur les lésions ostéo-articulaires suite à la section du ligament croisé antérieur chez le rat.

Pour ce faire, la veille de l'opération (J-1), une première injection intra-articulaire de MG132 (1,5  $\mu$ M) a été réalisée dans la cavité articulaire du genou à opérer (coté droit). Le coté gauche nous a servi de témoin. La section du LCA a été réalisée à J0. Les autres injections intra-articulaires de MG132 ont eu lieu à J7, J14 et J21 du coté droit.

Les rats ont ensuite été sacrifiés à J7, J14 et J28. Les genoux ont été prélevés, fixés, décalcifiés et inclus en paraffine afin de réaliser les études histologiques. Des coupes sagittales ont été colorées par de l'hématoxyline-éosine-safran, du bleu de toluidine et du rouge sirius afin d'établir un score histologique des lésions observées. Les scores de tous les compartiments articulaires (fémur et tibia médial et latéral, rotule) ont été additionnés avec un maximum de 75 (score de 15 au maximum pour chaque compartiment).

Les résultats obtenus mettent en évidence la présence de lésions ostéo-articulaires caractéristiques suite à la section du ligament croisé antérieur dès J7 avec surtout des lésions de surface du cartilage (fibrillations) mais également une inflammation post-opératoire (synovite). De J15 à J28, les lésions articulaires deviennent plus prononcées avec des fissures du cartilage pouvant aller jusqu'à la zone radiale, une hypercellularité des chondrocytes et d'importants remaniements osseux.

Les injections répétées de MG132 n'aggravent pas les lésions du cartilage mais au contraire les améliorent en diminuant la sévérité des lésions articulaires provoquées par la section du LCA. Ces résultats sont corrélés avec l'induction de l'expression d'Hsp70 par le MG132 (surexpression à J28). Le MG132 *via* l'induction de l'expression de la protéine Hsp70 semble agir en stabilisant les lésions histologiques de J14 à J28.

La séparation entre le compartiment médial et latéral pour l'évaluation des scores histologiques a pu mettre en évidence une prédominance des lésions histologiques au niveau médial. Les injections répétées de MG132 ont une action bénéfique sur l'ensemble de l'articulation genou, avec une significativité sur les 2 compartiments (Figures 25 et 26).

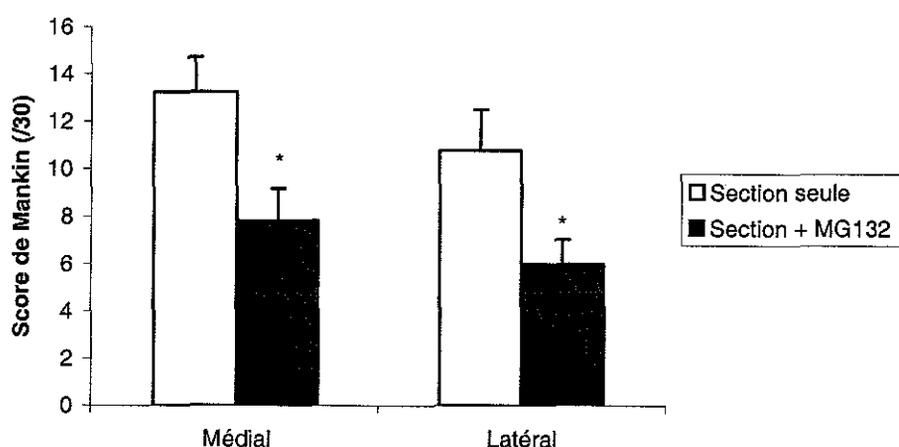


Figure 25 : Lésions histologiques selon le score de Mankin en fonction de l'injection ou non de MG132 en intra-articulaire sur le modèle de section du LCA au niveau du compartiment médial et latéral du genou. Les rats ont été sacrifiés 28 jours après la section du LCA. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=5$  genoux par groupe,  $* = p < 0.05$ , Test t de Student). L'utilisation du MG132 entraîne une diminution significative des lésions histologiques ( $p < 0.05$ ).

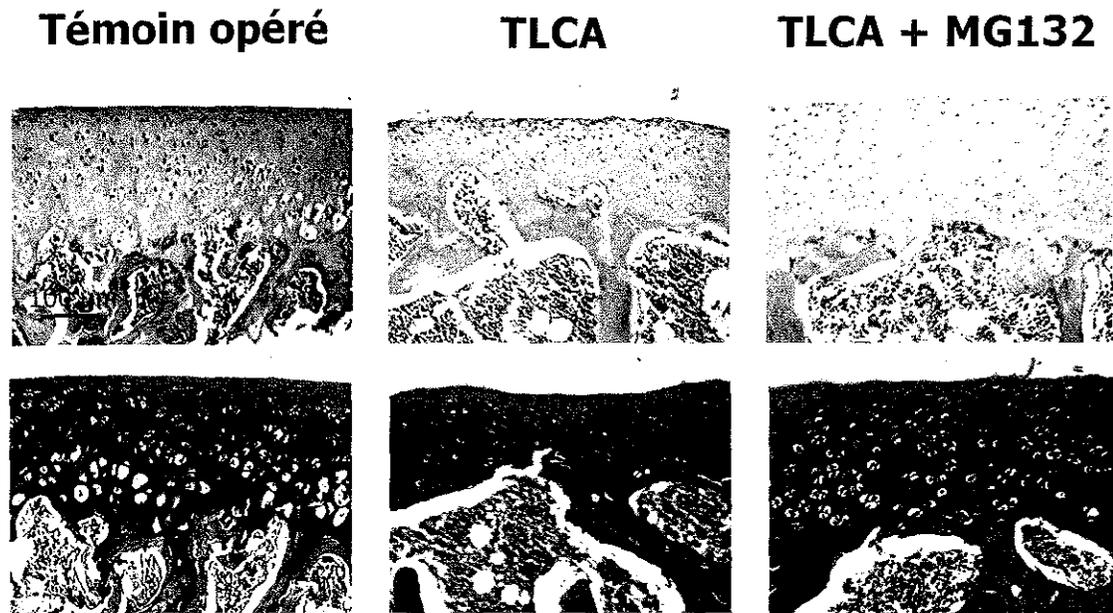


Figure 26 : Aspect du cartilage après injection de MG132 en intra-articulaire sur le modèle de section du LCA. Les rats ont été sacrifiés 28 jours après la section du LCA. Le contenu en protéoglycannes était évalué par la coloration en bleu de toluidine (BT, images du bas). La cellularité et l'état de surface étaient appréciés par la coloration en Hématoxyline Eosine Safran (HES, images du haut). Le groupe témoin opéré correspond à une arthrotomie sans section du LCA. L'injection de MG132 (3<sup>ème</sup> colonne) protège des lésions cartilagineuses engendrées par la section du LCA (2<sup>ème</sup> colonne).

Une prolifération synoviale était notée après section du LCA (TLCA) avec hypercellularité, fibrose et angiogenèse. L'injection de MG132 permettait de limiter cette prolifération synoviale (Figure 27).

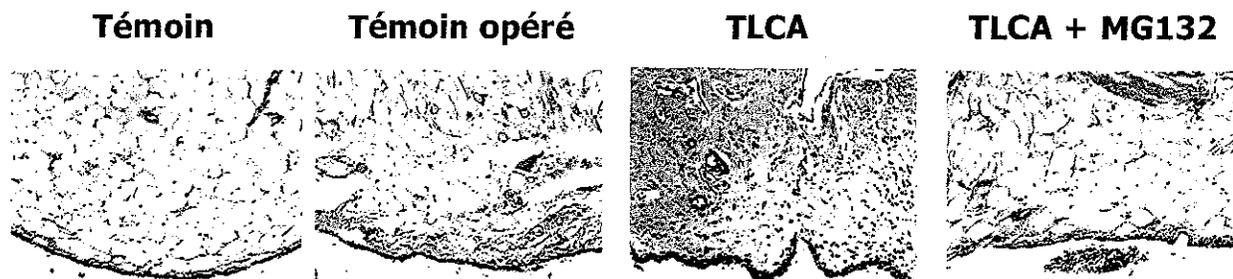


Figure 27 : Aspect de la membrane synoviale après injection de MG132 en intra-articulaire sur le modèle de section du LCA. Les rats ont été sacrifiés 28 jours après la section du LCA. Le groupe témoin n'a pas été opéré. Le groupe témoin opéré a bénéficié d'une arthrotomie sans section. Une prolifération synoviale modérée était notée après section du LCA (TLCA) avec hypercellularité, fibrose et angiogenèse. L'injection de MG132 ne modifiait pas l'aspect de la synoviale qui restait superposable à celle des témoins.

### **B.1.4- Discussion**

Une inhibition réversible de la voie du protéasome entraîne une surexpression des protéines de stress Hsp 70 et dans une moindre mesure Hsp27. Cette induction débute rapidement après l'exposition (30-60 min) avec un maximum d'expression après 4 heures de traitement. L'effet protecteur est dépendant de la surexpression d'Hsp70 dans le chondrocyte et s'accompagne d'une augmentation de la viabilité cellulaire et d'une diminution du nombre de cellules entrant en apoptose.

L'utilisation d'un inhibiteur du protéasome en administration locale ouvre d'intéressantes perspectives dans le traitement des pathologies articulaires. La faible dissémination de l'expression dans le reste de l'organisme permet de considérer le MG132 en tant qu'inhibiteur du protéasome réversible, comme un outil pharmacologique intéressant pour moduler l'apoptose chondrocytaire après injection intra-articulaire. La réversibilité de l'inhibiteur du protéasome est en effet un pré-requis indispensable pour une utilisation thérapeutique *in vivo*. La diminution significative des lésions cartilagineuses dans le modèle de section du LCA par le traitement répété avec l'inhibiteur réversible du protéasome semble confirmer les propriétés bénéfiques du MG 132. La surexpression de la protéine Hsp70 dans les chondrocytes du cartilage au bout de 28 jours de traitement, par un mécanisme de sommation de l'expression dans le temps, est corrélée avec la protection histologique obtenue, et laisse penser que le MG132 agit de façon bénéfique en partie par l'intermédiaire de la synthèse d'Hsp70. Il apparaît donc que la surexpression d'Hsp70 permet de diminuer la gravité de l'évolution des lésions histologiques à J14 et J28, tout en diminuant les phénomènes apoptotiques. Des études immunohistochimiques complémentaires avec un anticorps anti-caspase-3 permettraient de déterminer l'effet de cette surexpression sur l'apoptose induite par la section du LCA. Un transfert direct du gène Hsp70 par la technique d'électroporation sur ce modèle de section du LCA serait tout à fait intéressant pour valider ses potentialités chondroprotectrices. Par ailleurs, l'injection de MG132 a entraîné une diminution de l'hyperplasie synoviale présente après section du LCA. Le MG132 renforcerait ainsi à la fois la résistance des chondrocytes et celle des synoviocytes en diminuant leur sensibilité à l'action des cytokines pro-inflammatoires par inhibition de la voie d'activation liée au facteur NF- $\kappa$ B [Yoo, 2003]. Le MG132 bloquerait la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et inhiberait la synthèse des gènes qui en découlent (en particulier ceux impliqués dans la dégradation matricielle et l'inflammation). Il en résulte une préservation des fonctions

mitochondriales, une diminution de l'apoptose et une amélioration de l'intégrité de la matrice extra-cellulaire.

### ***B.1.5- Conclusion***

Ces données indiquent que le traitement par de faibles concentrations de MG132 en injections intra-articulaires répétées (1 injection par semaine) est susceptible de diminuer la sévérité des lésions histologiques provoquées par la section du ligament croisé antérieur chez le rat, probablement *via* l'induction de la protéine Hsp70 tout en limitant l'inflammation synoviale. Le traitement de lésions calibrées du cartilage utilisant les techniques de thérapie cellulaire associant un environnement matriciel adapté et des cellules exprimant Hsp70 et/ou traitées au MG132 ouvre des perspectives intéressantes dans la réparation du cartilage. Les cellules ainsi « renforcées » par l'action du MG132, une fois (ré)implantées dans le site lésionnel, amélioreraient leurs capacités de synthèses protéiques et donc les dépôts matriciels, renforçant ainsi les qualités du tissu de cicatrisation.

## **B.2- Influence de l'injection intra-articulaire de hyaluronate de sodium dans le modèle de section du LCA**

### ***B.2.1- Objectifs***

L'acide hyaluronique est un acteur essentiel de la mécanique articulaire favorisant les phénomènes de glissement des surfaces articulaires et les phénomènes d'amortissement des contraintes mécaniques. Il est le principal constituant du liquide synovial dont la viscosité est diminuée dans l'arthrose, du fait d'un acide hyaluronique moins concentré et de plus faible poids moléculaire. C'est donc à partir de ces constatations, que l'utilisation de l'acide hyaluronique a été proposée comme thérapeutique de la gonarthrose [Peyron, 1993] : il s'agit du concept de la viscosupplémentation. Nous avons voulu étudier l'efficacité de cette thérapeutique sur le modèle d'arthrose expérimentale par section du LCA.

### ***B.2.2- Matériels et méthodes***

Notre protocole était le suivant : les rats ont été répartis en 5 groupes. Un groupe de témoins absolus, un groupe avec section du LCA et injection de sérum physiologique (L+), un groupe

avec section de LCA et injection de Synvisc® , un groupe avec section du LCA et injection de HA C18 (cf. infra) et un groupe avec section du LCA et injection de Hyalgan®. Les propriétés des différents HA utilisés sont rappelées dans le tableau 3. Le Synvisc® issu de crête de coq, est un composé réticulé de haut poids moléculaire (6000 kDa). Le Hyalgan® également issu de crête de coq est non réticulé et de plus faible poids moléculaire (500 kDa). Le C18 est un hyaluronate de sodium « hydrophobisé » par des chaînes carboxyliques en C18. Ce hyaluronate a déjà été étudié au laboratoire comme matériau de comblement de lésion ostéochondrale et a fait l'objet d'un brevet [Dellacherie, 1999]. Le C18 est un hydrogel associatif stable à température ambiante et qui possède des propriétés viscoélastiques permettant de l'injecter à la seringue avant qu'il ne reprenne sa viscosité et rigidité initiale dans le site injecté. Les injections ont été effectuées à J7, J14 et J21 sous courte anesthésie générale à l'Isoflurane. La concentration injectée était de 10 mg/ml (soit un volume de 50µl). Les rats ont été sacrifiés à J28. Les genoux ont été prélevés et préparés pour examen histologique selon le protocole décrit précédemment. Le score de Mankin a été utilisé pour apprécier la gravité des lésions cartilagineuses. Une étude immunohistochimique (Caspase 3 activée et Hsp 70) a été pratiquée selon le protocole précédemment décrit (§ A.1.2.5).

### ***B.2.3- Résultats***

Les lésions histologiques observées étaient statistiquement moins importantes (Figure 28) dans les 3 groupes HA par rapport au groupe Témoin L+ ( $p < 0.005$ ). On ne retrouvait pas de différence entre les 3 groupes HA. L'aspect histologique était superposable quel que soit le HA injecté. La figure 29 illustre ces résultats avec le Hyalgan®. L'analyse par compartiment a révélé également une différence entre les compartiments fémoro-tibiaux médial et latéral avec une atteinte cartilagineuse moindre avec HA.

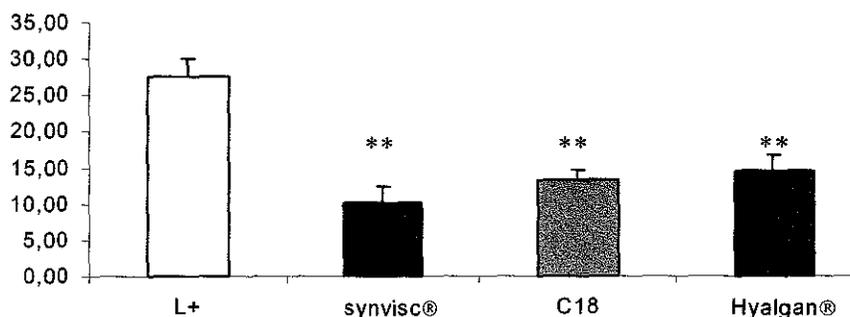


Figure 28 : Score histologique de Mankin en fonction de l'injection intraarticulaire de hyaluronate (Synvisc, C18 et Hyalgan). Les résultats ont été exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 5$  rats pour le groupe témoin,  $n=5$  pour les autres groupes). Test t de Student avec  $p=5\%$ ,  $** = p \leq 0.005$ . Le score est statistiquement moins élevé pour les 3 types de hyaluronate ( $p < 0.005$ ) comparativement au témoin L+ (section sans HA).

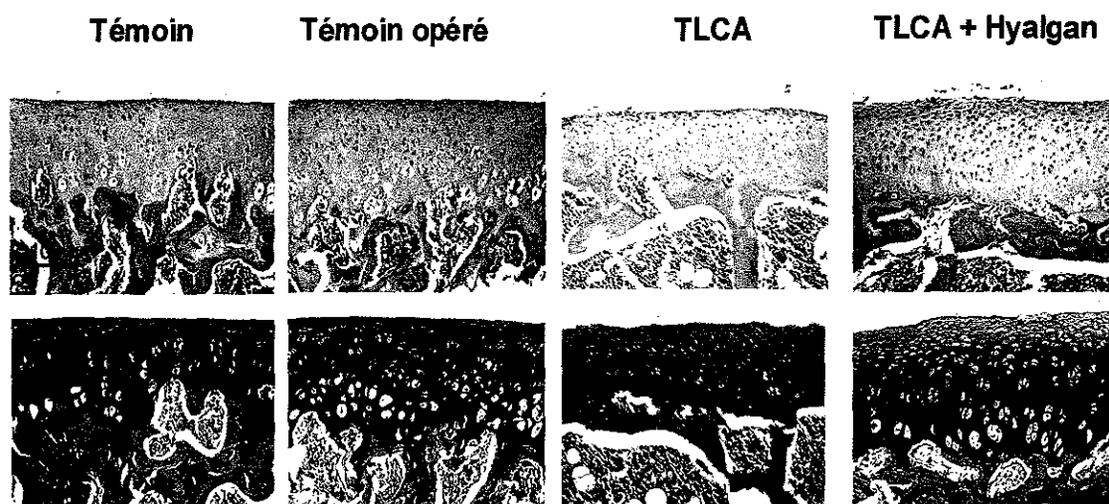


Figure 29 : Aspect du cartilage après injection de Hyalgan® en intra-articulaire sur le modèle de section du LCA. Les rats ont été sacrifiés 28 jours après la section du LCA. Le contenu en protéoglycannes était évalué par la coloration en bleu de toluidine (BT, images du bas). La cellularité et l'état de surface étaient appréciés par la coloration en Hématoxyline Eosine Safran (HES, images du haut). Le groupe témoin n'est pas opéré (1<sup>ère</sup> colonne). Le groupe témoin opéré correspond à une arthrotomie sans section du LCA (2<sup>ème</sup> colonne). L'injection de Hyalgan® (4<sup>ème</sup> colonne) protège des lésions cartilagineuses engendrées par la section du LCA (3<sup>ème</sup> colonne). Seules des fibrillations de surface sont notées après injection de Hyalgan® alors que la section seule engendre une hypocellularité et des fissures en zone de transition. L'arthrotomie seule ne modifie pas l'aspect du cartilage qui reste normal.

L'analyse de la synoviale après injection de HA met en évidence une hyperplasie de celle-ci avec fibrose, hypercellularité et angiogenèse comparativement au témoin et à la section seule (Figure 30).

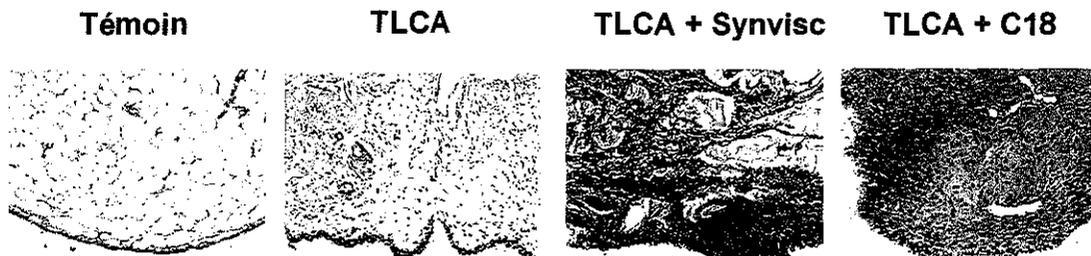


Figure 30 : Aspect histologique de la membrane synoviale. La synoviale apparaît normale dans le genou témoin (non opéré). La section entraîne une hyperplasie et une hypercellularité faibles. L'injection de HA déclenche une hyperplasie synoviale marquée avec hypercellularité, fibrose et angiogenèse importantes.

Les phénomènes apoptotiques étaient statistiquement moins élevés après injection de Synvisc® et de C18 (Figure 31). En revanche, on ne retrouvait pas cette différence avec le Hyalgan®. Par ailleurs, nous n'avons pas constaté de surexpression d'Hsp70 dans cette étude.

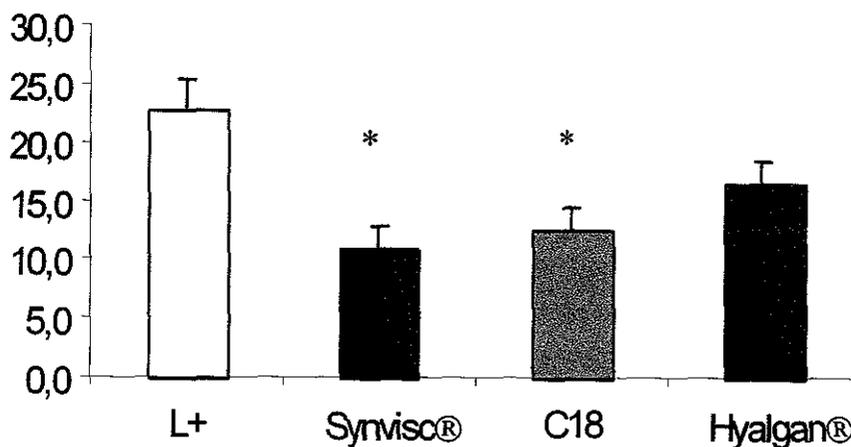


Figure 31 : Evolution de l'apoptose (immunomarquage Caspase3, pourcentage de cellules marquées) en fonction de l'injection des différents types de HA. Le marquage est estimé par le comptage du nombre de cellules positives par rapport au nombre total de cellules en surface et en profondeur du cartilage à J28 pour le champ considéré au grossissement x40. Quatre champs par lame sont ainsi examinés. Il existe une différence statistiquement significative ( $p < 0.05$ ) pour le Synvisc® et le C18 avec une diminution de l'apoptose dans ces 2 cas. On ne note pas de différence pour le Hyalgan®.

### **B.2.4- Discussion**

De nombreux essais cliniques testant différentes préparations de HA ont été réalisés. La plupart des études ont montré une supériorité du HA par rapport au placebo dans la gonarthrose [Altman, 1998]. Le bénéfice clinique débute 3 à 4 semaines après la première injection et se prolonge jusqu'à 6 mois ou 1 an. Les présentations de hyaluronate de sodium diffèrent principalement par leurs concentrations et leurs poids moléculaires respectifs (Tableau 3). La réticulation augmente le poids moléculaire ce qui améliore le pouvoir de lubrification et la capacité d'absorption des chocs et permet également un temps de présence prolongé en intra-articulaire. Un récepteur membranaire spécifique du hyaluronate de sodium a été identifié [Culty, 1994]. Il s'agit d'une protéine appartenant à la famille des glycoprotéines d'adhésion CD44 qui permettrait au hyaluronate de moduler la fonction cellulaire par une voie qui dépend directement du poids moléculaire. Ainsi, il a été établi que le HA à haut poids moléculaire serait un inhibiteur plus efficace des médiateurs de l'inflammation [Forrester, 1980] et donc théoriquement plus efficace pour le traitement de l'arthrose. C'est sur ces arguments que le Synvisc® a été développé. Cependant, il n'existe pas d'étude comparant différents types de HA dans des groupes identiques de patients.

Par ailleurs, il est difficile de dire quelle est ou quelles sont les propriétés du HA qui apportent un bénéfice clinique. Seules des études prospectives, randomisées, à moyen et long terme, permettront de dire si l'effet protecteur observé chez l'animal au niveau du cartilage et de l'os sous-chondral est valable chez l'homme.

Des études expérimentales (Tableau 7) ont montré que le hyaluronate pouvait prévenir l'apparition des lésions cartilagineuses et protéger l'os sous-chondral de certaines contraintes mécaniques excessives comme la méniscectomie [Kobayashi, 2000 ; Ghosh, 1995 ; Armstrong, 1994 ; Wigren, 1975] ou la section du LCA [Abatangelo, 1989 ; Schiavinato, 1989]. Nos résultats corroborent ces données expérimentales montrant l'efficacité de l'acide hyaluronique dans la prévention des lésions d'arthrose après section du LCA à court terme. D'autres études [Shimizu, 1998 ; Yoshioka, 1997] ont rapporté un effet prolongé du HA (jusqu'à 21 semaines après section du LCA) avec réduction des lésions cartilagineuses de surface et augmentation du contenu en PGs. Il semble que l'efficacité du traitement dépende de la masse moléculaire du hyaluronate. Ainsi, Shimizu *et al* [1998] ont démontré la supériorité des produits réticulés de haut poids moléculaire (masse moléculaire = 6000 kDa

[Synvisc®]) par rapport à ceux de plus faible poids moléculaire (500 kDa [Hyalgan®]) sur des modèles expérimentaux. Une étude récente de Brandt [2003] ne rapporte d'ailleurs pas d'effet bénéfique avec le HA de faible poids moléculaire (500 kDa) utilisé chez le chien après section du LCA.

*Tableau 7 : Principales études expérimentales avec le HA*

<b>Actions</b>	<b>Modèle/Protocole</b>	<b>Référence</b>
Prévention des lésions cartilagineuses	Section LCA chez le chien, injections de HA 1-7 semaines ou 7-17 semaines après chirurgie, suivi à 7-13-17 semaines	Schiavinato 1989
Prévention des lésions cartilagineuses et de la déplétion en PG	Ménisectomie chez le mouton, injections (5) de HA 16 semaines après chirurgie, étude histologique 5 semaines après la dernière injection	Ghosh 1995
Prévention des lésions cartilagineuses, conservation de l'épaisseur du cartilage et de l'aspect lisse de surface	Section LCA chez le lapin, injection de HA 4 semaines après chirurgie, suivi à 9 semaines au niveau des condyles fémoraux	Yoshioka 1997
Suppression des altérations du cartilage	Section LCA chez le lapin, 5 injections de HA pdt 4 semaines après chirurgie, suivi à 9 semaines	Shimizu <i>J Rheum</i> 1998
Prévention des lésions cartilagineuses, conservation de l'épaisseur du cartilage et de l'aspect lisse de surface	Section LCA chez le lapin, injections de HA pdt 4 semaines après chirurgie, suivi à 21 semaines au niveau des condyles fémoraux	Shimizu <i>Osteoarthritis</i> 1998
Suppression des lésions cartilagineuses, amélioration de la cicatrisation méniscale	Ménisectomie partielle chez le lapin, injections de HA (5) une semaine après chirurgie, étude histologique à 6 mois sur le cartilage tibial et le ménisque	Kobayashi 2000

L'efficacité du HA semble liée à une diminution des phénomènes apoptotiques mais il ne semble pas y avoir de lien avec les protéines de choc thermique Hsp 70 qui ne sont pas exprimées dans ce modèle. Des études complémentaires s'avèrent nécessaires pour déterminer les facteurs anti-apoptotiques mis en jeu dans ce système.

L'efficacité du hyaluronate reste encore mal comprise mais elle semble dépendre de plusieurs facteurs : augmentation de la synthèse de PGs, inhibition de certains facteurs pro-inflammatoires et de certaines protéases, action sur les nocicepteurs... Aucune étude clinique prospective contrôlée et randomisée n'a réellement été effectuée à ce jour. Quelques études récentes font état de résultats globalement positifs sur l'état cartilagineux (Tableau 8). Frizziero *et al* [1998] ont montré à partir de biopsies de cartilage et de synoviale une

diminution de l'inflammation synoviale et une amélioration de l'état cartilagineux. Guidolin *et al* [2001] ont montré une augmentation de l'épaisseur de la couche superficielle du cartilage après 6 mois de traitement. La densité et la morphologie des chondrocytes étaient également améliorées. Enfin, le nombre et l'agrégation des synoviocytes diminueraient après injection de HA ainsi que le nombre de cellules inflammatoires, incluant macrophages, lymphocytes et mastocytes [Pasquali Ronchetti, 2001]. Les conclusions de cette étude doivent néanmoins être nuancées. En effet, si la tolérance du HA apparaît globalement bonne, certains cas de syndromes inflammatoires persistants après viscosupplémentation ont été publiés récemment [Chen, 2002]. Les auteurs de cette étude rapportent 6 observations de synovite granulomateuse après injection d'Hylan G-F 20 avec réaction inflammatoire douloureuse. L'étude anatomo-pathologique de cette synoviale retrouvait un aspect de synovite chronique avec infiltration lymphoplasmocytaire et surtout l'existence de granulomes à corps étrangers centrés par un matériel amorphe acellulaire coloré par le bleu alcian et disparaissant après traitement par la hyaluronidase et donc compatible avec le HA. Des investigations complémentaires devront déterminer si le hyaluronate lui-même est en cause ou s'il s'agit d'un problème lié à la purification ou à la fabrication du hyaluronate. Ces observations sont à rapprocher de nos constatations sur l'état de la synoviale qui apparaissait inflammatoire dans notre étude après 3 injections de HA, associant hypercellularité, fibrose et angiogenèse.

Tableau 8 : Etudes cliniques récentes avec le HA

Actions	Modèle/Protocole	Référence
Diminution des lésions cartilagineuses	Etude clinique, patients arthrosiques (n=36, 12 mois), 3 injections hebdomadaires de HA/3 mois, évaluation arthroscopique à 12 mois	Listrat 1997
Réduction de l'épaisseur de la synoviale et de l'inflammation. Amélioration de la couche superficielle du cartilage.	Etude clinique, patients arthrosiques (n=40), 5 injections hebdomadaires de HA, biopsies de cartilage et de synoviale et évaluation arthroscopique à 6 mois	Frizziero 1998
Diminution de l'inflammation synoviale. Amélioration de la morphologie du synoviocyte.	Etude clinique, patients arthrosiques (n=99), 5 injections hebdomadaires de HA, biopsies de synoviale avant et après traitement	Pasquali Ronchetti 2001
Amélioration de la couche superficielle du cartilage. Augmentation de la densité cellulaire et amélioration de la morphologie cellulaire.	Etude clinique, patients arthrosiques (n=24), 5 injections hebdomadaires de HA, biopsies de cartilage 6 mois après traitement	Guidolin 2001

L'efficacité clinique du HA est multifactorielle (action anti-inflammatoire, rôle sur la nociception, stimulation de la synthèse des PGs...). L'utilisation du HA permet (à court terme) de prévenir l'apparition des lésions cartilagineuses et pourrait également favoriser la réparation de lésions existantes. Cependant, des études complémentaires seront nécessaires pour déterminer si le HA permet de prévenir durablement la progression de l'arthrose et si l'augmentation du poids moléculaire à elle seule suffit à son efficacité. Enfin, son usage en clinique dans la prévention des lésions d'arthrose après rupture du LCA est une perspective intéressante qui n'a pas été réellement étudiée dans la littérature et qui mériterait des études contrôlées.

## **B.3- Synthèse *in vitro* d'un néo-cartilage par ingénierie tissulaire en vue de réparation de lésions ostéochondrales localisées**

### ***B.3.1- Objectifs***

Physiologiquement, le cartilage a une très faible capacité de régénération. Pour réparer une lésion du tissu cartilagineux, une intervention clinique est donc indispensable. En fonction de la taille de la lésion, différents traitements sont envisageables. Pour les lésions de faible étendue, des techniques palliatives consistent à réaliser des microfractures ou des forages qui stimulent la repousse d'un fibrocartilage. Des greffes de périchondre, de périoste ou encore des autogreffes ostéochondrales en mosaïque ont également été proposées. Ces techniques qui semblent montrer des résultats satisfaisants à court et moyen termes sont néanmoins décevantes à long terme. C'est la raison pour laquelle de nombreuses équipes ont orienté leurs travaux vers la transplantation de chondrocytes et vers l'ingénierie tissulaire du cartilage en raison du succès obtenu par la technique dite de Brittberg qui consiste en l'implantation de chondrocytes autologues (ACI) au niveau de la lésion [Brittberg, 1994]. Pour autant, cette technique ne permet pas de contrôler le phénotype chondrocytaire et d'autre part la fuite cellulaire lors de l'implantation est grande. De nouvelles stratégies ont donc été envisagées, utilisant des matrices en 3-dimensions à base de collagène pour implanter des chondrocytes différenciés ou redifférenciés. Le collagène est en effet une substance de choix pour la réalisation de ces biomatériaux car cette protéine possède une bonne résistance mécanique, une biocompatibilité et une biodégradabilité contrôlables et elle joue un rôle favorable dans le développement cellulaire. Nous présentons nos résultats obtenus *in vitro* par la culture de chondrocytes en gels de collagène appliquée à la bioingénierie du cartilage.

### ***B.3.2- Matériels et Méthodes***

#### **B.3.2.1- Extraction des chondrocytes primaires**

Les chondrocytes sont extraits des cartilages par digestion enzymatique de pieds de veau âgés de moins de six mois, provenant des abattoirs de Corbas (Lyon).



Figure 32 : Articulation (ouverte) métatarso-phalangienne de pied de veau

Les pieds de veau sont récupérés 2 heures après le sacrifice de l'animal de boucherie. L'articulation métatarsophalangienne (Figure 32) est ouverte sous la hotte de culture (à flux laminaire) avec du matériel stérile et le cartilage est prélevé avec une lame de scalpel et récupéré dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) contenant 1% de pénicilline streptomycine et 0.1 % d'amphotéricine. L'étape suivante consiste en la digestion du tissu pendant 45 minutes avec de la hyaluronidase (Sigma H-3506) à 2mg/ml dans du PBS à température ambiante. Une seconde digestion est réalisée dans du PBS avec de la collagénase à 1,25 mg/ml (Sigma C-9891) et de la dispase à 1,25 mg/ml (Boehringer Mannheim 83668423-63). Cette digestion se fait à 37°C dans des cellules de Green sous agitation jusqu'à disparition complète des lambeaux de cartilage. Les cellules sont lavées en milieu complet pour chondrocytes et comptées. Le comptage des cellules est réalisé dans une cellule de Malassez, après ajout de bleu Trypan, qui permet de déterminer le nombre de cellules viables. Puis les chondrocytes sont ensemencés à raison de 2 millions par puits dans les gels de collagène placés dans des boîtes multipuits. Après l'ensemencement les boîtes sont mises à l'étuve à 37°C contenant 5% CO<sub>2</sub>, puis une heure après, les gels ensemencés sont recouverts de 1 ml de milieu complet.

### **B.3.2.2- Les gels de collagène**

Il s'agit de collagène de type I issu de broyat de peau de veau fourni par la société Symatèse Biomatériaux (Lyon). Le collagène est utilisé à la concentration finale de 1,25mg/ml.

### **B.3.2.3- Techniques de cultures cellulaires**

Un mélange volume à volume de RPMI1640 (Sigma R-6504 supplémenté par 2mg/ml de bicarbonate de sodium) et de NCTC 109 (Sigma N-1140 supplémenté par 0,136mg/ml L glutamine) est utilisé. On ajoute à ce mélange 10% de sérum bovin fœtal (SVFAMS2052

Biomedica), 100U/ml pénicilline, 100µg/ml streptomycine (Sigma P4333 mélange100X), 250ng/ml d'amphotéricine B (Sigma A2942 à 250 µg/ml ). Ce milieu est changé trois fois par semaine pour toutes les conditions de culture.

#### **B.3.2.4- Etude de la prolifération cellulaire dans les gels de collagène**

##### *Prolifération cellulaire (dosage ADN)*

Une observation systématique en microscopie optique des cellules au sein des gels a été effectuée. Pour tous les dosages, il faut réaliser une extraction du matériel à doser. Les échantillons sont congelés à -70°C, lyophilisés et repris avec 900 µl de tampon Tris HCl 10 mM, pH 8,1. Ils sont chauffés dans un bain marie à 94°C pendant 20 minutes et vortexés deux fois durant l'expérience. Après refroidissement des tubes il faut ajouter 100µl d'une solution d'enzymes : Papaïne 6 mg/ml (Sigma P-4762, 22,7 U/mg solide) et Protéinase K 6 mg /ml (Sigma P-8044, 1,4 U/mg solide). Les enzymes sont dissoutes dans du tampon Tris 10 mM CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Une pré-digestion est réalisée dans un bain marie à 60°C pendant une heure avec agitation régulière. La digestion, elle, s'effectue dans un four sous agitation pendant 20 heures à 60°C. Les tubes sont centrifugés à 15000 rpm à 4°C pendant 25 minutes, les surnageants sont prélevés et congelés pour réaliser les dosages par méthode fluorimétrique.

La gamme étalon se prépare à l'aide d'une solution d'ADN de thymus de veau (Sigma N-01501) à 100µg/ml diluée au 1/10<sup>ème</sup> dans un tampon Tris 10mM, pH 8,1.

Les surnageants sont décongelés, deux volumes sont prélevés 35 et 70 µl auxquels sont ajoutés 1 ml de réactif de Hœchst. Les échantillons sont conservés pendant 20 minutes à l'abri de la lumière avant d'être lus sur le fluorimètre FLX-800 Bio-Tek Instruments (λ excitation 358 nm, λ émission 458 nm). Le nombre de cellules est calculé à partir de la quantité d'ADN dosé en utilisant la correspondance suivante : 7,8 pg ADN/chondrocyte.

#### **B.3.2.5- Etude de la synthèse de matrice extra cellulaire dans les gels de collagène**

##### *Dosage des GAG*

Le dosage colorimétrique des glycosaminoglycannes sulfatés s'effectue avec le bleu de diméthylméthylène (DMMB). Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution mère de chondroïtine sulfate à 0,5 mg/ml (Sigma C-8529).

Pour chaque échantillon, deux volumes sont prélevés (100 et 200 µl) et placés dans une cuve avec 2,5 ml de DMMB. L'absorbance est lue au spectrophotomètre UV-DU 460 Beckman à 525 nm immédiatement après le mélange.

#### *Histologie : coloration Safranine-O*

Cette coloration permet de visualiser les protéoglycannes en orange. Après fixation dans l'AFA (750 ml Alcool, 20 ml de Formalin, 50 ml d'acide Acétique, 180 ml d'eau distillée) déshydratation et l'inclusion en paraffine, les échantillons sont coupés (5 µm d'épaisseur) posés sur lame et déparaffinés. La coloration dans une solution de Safranine-0 0,5% en un tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 7,4. Puis les coupes sont déshydratées et montées avec un milieu hydrophobe entre lame et lamelle.

#### *Immunohistochimie du collagène de types I et II et alpha sma*

Les échantillons sont fixés dans de l'Alcool-Formalin-acide Acétique pendant 24 heures. Ils sont déshydratés puis inclus dans un bloc de paraffine pour permettre leurs coupes à l'aide d'un microtome (5 µm d'épaisseur). Les coupes sont déposées sur des lames silanisées avec de l'albumine glycine pour permettre l'adhésion, puis séchées. Les lames sont déparaffinées dans des bains de xylène, xylène-alcool, alcool 95°C, alcool 95°C-eau distillée (v/v) et eau courante. Les échantillons sont traités à la hyaluronidase 0,2% (Sigma H 3506 type I-S), BSA 3% (Bovine Serum Albumin Sigma A9647) dans du PBS (Phosphate Buffer Saline bioMérieux 75511) pendant 15 minutes et rincés par du PBS.

Les échantillons sont ensuite incubés avec les anticorps primaires polyclonaux de lapin (Novotec) dilués au 1/1000<sup>ème</sup> pour l'anti collagène de type I et au 1/500<sup>ème</sup> pour l'anti collagène de type II et l'alpha sma (dilution dans du PBS avec 3 % BSA). 150 µl de l'extrait dilué sont posés par coupe et la réaction anticorps antigène se déroule pendant une nuit en atmosphère humide à 20°C. Les coupes sont rincées en PBS.

Inhibition des peroxydases endogènes des coupes en laissant agir 20 minutes une solution contenant 10ml PBS, 3% BSA et 500µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 volumes à raison de 150µl/coupe, puis rincer les en PBS.

Les échantillons sont révélés par le Kit Envision (Dako K4002), composé d'anticorps secondaires de chèvre anti Ac primaire de lapin qui sont couplés à la peroxydase. La réaction se déroule pendant 45 minutes, les coupes sont lavées en PBS.

Elles sont colorées par le substrat de l'enzyme, le diaminobenzidine (Dako K3468) pendant 2 minutes, puis sont rincées à l'eau courante 10 minutes. Elles sont montées en milieu aqueux (Dako S3025) entre lame et lamelle puis séchées.

*Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne*

La réaction de transcription inverse permet de synthétiser des brins d'ARN complémentaires monocaténaire à partir des ARN messagers contenus dans la population d'ARN total. Cette réaction nécessite la présence d'oligonucléotides poly-T qui servent d'amorces pour la transcriptase inverse. Nous avons utilisé des oligonucléotides dT12 VN permettant une hybridation au début de la queue poly-A des ARN et non au hasard de cette queue. Le mélange suivant est réalisé dans un tube PCR de 200 $\mu$ l (Perkin-Elmer) :

Oligonucléotides dT12 VN (30 $\mu$ M)	4 $\mu$ l
dNTP (mélange équimolaire 10mM)	8 $\mu$ l
tampon de synthèse du 1 <sup>er</sup> brin 5x	8 $\mu$ l
BSA (1mg/ml)	4 $\mu$ l
Rnase 2U / $\mu$	1 $\mu$ l
DTT 0,1 M	4 $\mu$ l
ARN Total	1 $\mu$ g
H2O stérile	qsp 39 $\mu$ l

La réaction se fait dans un thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer). Les échantillons sont chauffés à 70°C pendant 10 min. pour dénaturer l'ARN, puis à 42°C pendant 2 min. pour permettre aux amorces de s'hybrider. La transcriptase inverse (SuperScript II, GibcoBRL) est ajoutée à raison de 1 $\mu$ l par échantillon. La réaction est réalisée à 42°C pendant 40 min. Une phase d'incubation à 75°C pendant 15 min. permet de dénaturer la SuperScript. Un traitement à la RNase H (GibcoBRL) permet de dégrader les ARN dans les hétéroduplexes ADN/ARN.

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) amplifie un fragment d'ADN de façon exponentielle. Cette réaction est initiée avec des oligonucléotides qui sont spécifiques du gène étudié. Le mélange réactionnel est déposé dans un tube de 200 $\mu$ l calibré pour le thermocycler dans lequel nous effectuons la réaction. Afin de minimiser les risques d'erreur introduits lors

des pipetages, les réactifs sont d'abord mélangés dans le même tube avant leur distribution. La matrice ADNc est ensuite ajoutée à chaque tube.

Mélange des réactifs :

- Tampon Taq 10x 5 $\mu$ l
- MgCl<sub>2</sub> 25mM 3 $\mu$ l
- dNTP 10mM 1 $\mu$ l
- Oligonucléotide sens 10 $\mu$ M 1 $\mu$ l
- Oligonucléotide antisens 10 $\mu$ M 1 $\mu$ l
- AmpliTaq DNA polymérase 0,5 $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O stérile qsp 50 $\mu$ l

Matrice ADNc 2 $\mu$ l

Une première étape à 94°C pendant 2 min dénature les structures secondaires de l'ADNc. La séquence PCR est la suivante :

- Dénaturation : 94°C, 30 sec : permet la séparation des brins d'ADN
- Hybridation : 30 sec : les amorces se fixent sur les séquences homologues. La température varie selon les oligonucléotides utilisés
- Elongation : 72°C, 30 sec : le brin d'ADN est synthétisé par la polymérase

Le choix du nombre de cycles dépend de la représentativité de la séquence à amplifier. Ainsi, un nombre de cycles élevé est nécessaire pour amplifier un gène faiblement exprimé. Pour chaque marqueur étudié, le nombre de cycles déterminé correspond à la phase exponentielle d'amplification.

Le magnésium est un co-facteur dans la réaction de PCR et la diminution de sa concentration évite une amplification non spécifique.

Cette technique de PCR ne permet pas de quantifier l'expression d'un gène mais de comparer entre plusieurs échantillons le niveau d'expression d'un gène donné. Nous établissons une normalisation par rapport à un gène de ménage, la GAPDH, dont l'expression est reconnue stable dans les différentes conditions de culture des chondrocytes. Dans un premier temps, il faut déterminer les volumes de transcription inverse des divers échantillons qui vont générer des signaux d'intensité équivalents après coloration au BET du gel d'électrophorèse. Les

mêmes volumes de transcription inverse sont ensuite analysés pour l'étude de l'expression des autres marqueurs.

### ***B.3.3- Résultats***

#### **B.3.3.1- RT-PCR**

Le collagène de type II ainsi que l'agrécanne restent exprimés tout au long de la culture et par ailleurs l'expression du collagène de type I n'augmente pas. La MMP13 en revanche n'est pas exprimée attestant de l'absence de mise en route de collagénase dans le gel. Le phénotype chondrocytaire apparaît maintenu (Figure 33).

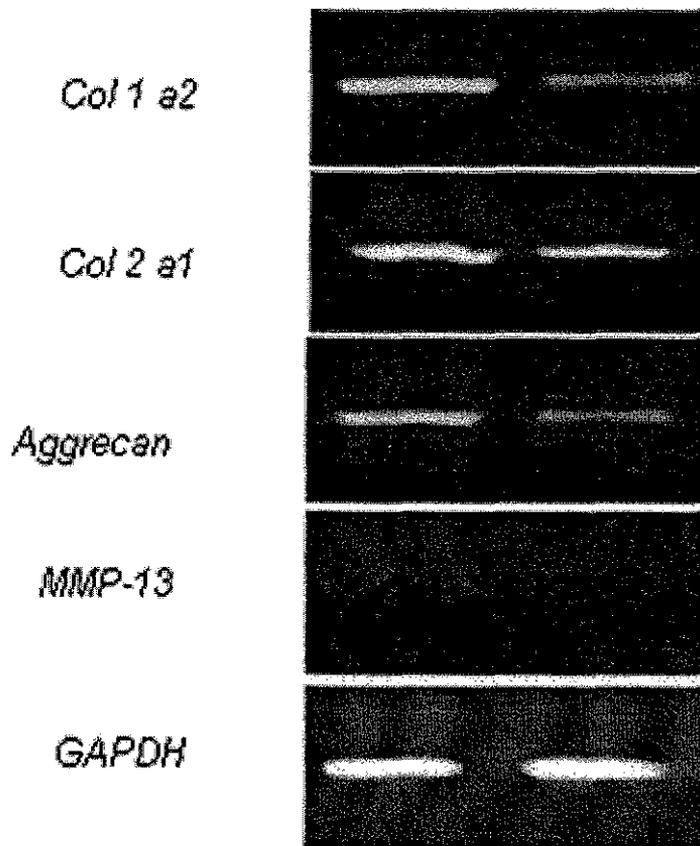


Figure 33 : RT-PCR à J0 et J15. Maintien du phénotype chondrocytaire.

#### **B.3.3.2- Prolifération**

Les gels voient leur population cellulaire multipliée par 2 à J7 avant de décroître progressivement (Figure 34).

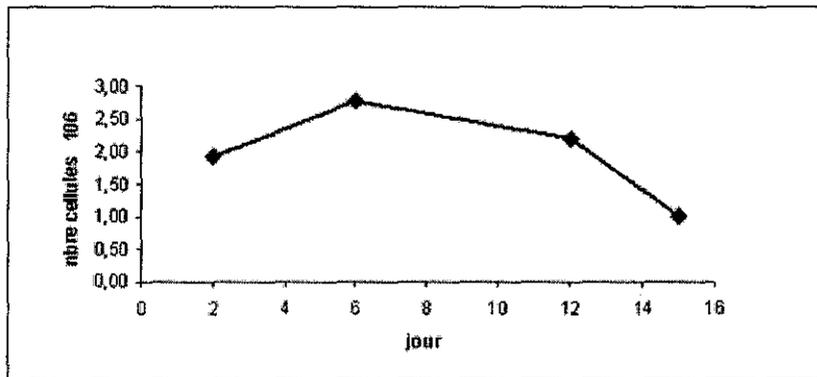


Figure 34 : Courbe de prolifération cellulaire. Dosage de l'ADN par méthode fluorimétrique

### B.3.3.3- Synthèse des GAG

Une synthèse progressive de sGAG est mise en évidence avec une multiplication par 5 entre J2 et J15 (Figure 35).

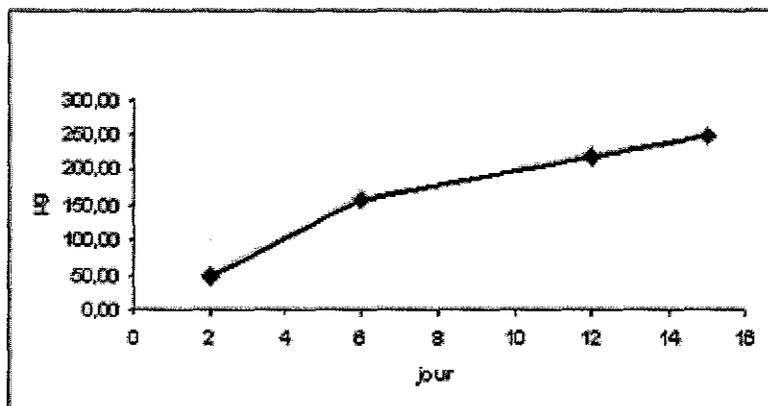


Figure 35 : Dépôts de GAG (en µg). Dosage colorimétrique des glycosaminoglycannes sulfatés par la méthode au bleu de diméthylméthylène

### B.3.3.4- Histologie

Au sein du gel, la répartition cellulaire apparaît homogène. En revanche, on note la présence d'une couronne cellulaire à l'interface gel/milieu nutritif.

La coloration en Safranine O met en évidence un dépôt de GAG qui débute à J6 localisé en bordure du gel. Ces dépôts augmentent progressivement jusqu'à J15 mais se répartissent de façon non homogène dans le gel. Par ailleurs, la morphologie cellulaire reste arrondie pendant toute la durée de l'étude (Figure 36).



Figure 36 : Microscopie optique x 40. Coloration en Safranine O. Les dépôts de GAGs sont parfaitement visibles en bordure du gel. Noter la morphologie arrondie des cellules.

#### B.3.3.5- Immunohistochimie

Des dépôts de collagène de type II sont visibles dès le 9<sup>ème</sup> jour de culture en périphérie des cellules. Ces dépôts augmentent au fil de la culture mais restent localisés dans les zones de forte densité cellulaire (Figure 37). L'utilisation d'anticorps anti collagène de type I n'a pas permis de discriminer les dépôts de ce collagène de la matrice initiale (gel constitué de collagène natif de type I).

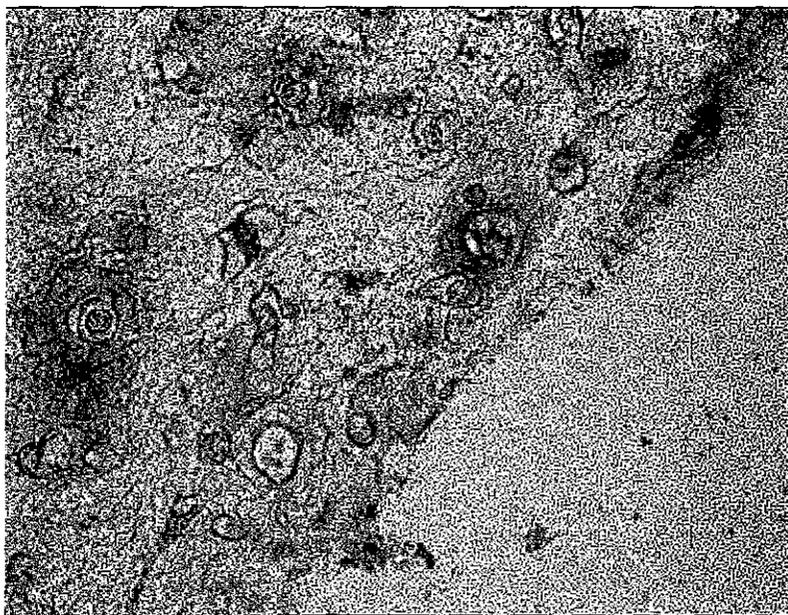


Figure 37 : Microscopie optique x 40. Marquage collagène II. Les dépôts sont parfaitement visibles en périphérie des cellules.

### ***B.3.4- Discussion***

Le traitement des lésions cartilagineuses demeure un problème d'actualité en clinique. De nombreuses techniques ont été développées afin de réparer ces lésions : greffes ostéochondrales, greffes de périoste [Carranza-Bencano, 2000], transplantation de chondrocytes autologues [Brittberg, 1994 ; Peterson, 2000], de cellules souches [Wakitani, 2002]. Néanmoins, ces méthodes ont montré leurs limites et le développement de nouveaux biomatériaux (alginate [Marijnissen, 2002], acide hyaluronique [Kawasaki, 1999], fibrine) *via* les techniques d'ingénierie tissulaire offrent de nouvelles et prometteuses perspectives. Parmi ces biomatériaux, les collagènes bien connus et largement utilisés sur le plan biomédical [Lee, 2001] peuvent également être utilisés comme support tridimensionnel à la culture cellulaire, sous forme d'éponges [Roche, 2001] ou de gels [Grande, 1999 ; Nishikori, 2002 ; Ochi, 2001 ; Rudert, 2000 ; Sheu, 2001 ; van Susante, 1995] dans la perspective de la synthèse d'un nouveau tissu cartilagineux. La première implantation clinique de gels de collagène vient d'ailleurs d'être publiée récemment par une équipe Japonaise [Ochi, 2002] avec des résultats intéressants. Dans cette étude, 26 patients souffrant de lésions ostéochondrales ont été traités par implantation de gels de collagène contenant des chondrocytes autologues. Le protocole utilisé était superposable à celui de Brittberg [1994] sauf la technique de culture cellulaire puisque les chondrocytes étaient cultivées en 3D en gels de collagène. Après 2 ans de recul, les patients signalaient une fonction articulaire améliorée (score de Lysholm). Le bilan arthroscopique montrait un cartilage de morphologie normale dans 93% des cas (selon la classification de l'ICRS International Cartilage Repair Society). L'évaluation biomécanique du transplant constatait une résistance mécanique superposable à celle du tissu cartilagineux environnant. Enfin, 2 biopsies effectuées (lors d'un geste thérapeutique associé) montraient la présence de collagène de type II au niveau du cartilage transplanté. Les auteurs concluaient à l'intérêt de cette nouvelle méthode d'ingénierie tissulaire pour la réparation des lésions chondrales localisées du genou.

Nos résultats montrent que la culture en 3 dimensions de chondrocytes au sein de gels de collagène permet la construction d'une matrice extracellulaire et la conservation du phénotype chondrocytaire pendant la période de culture. En effet, l'expression des gènes pour le collagène de type II et l'agrécanne est maintenue : il n'y a pas d'augmentation de l'expression du gène du collagène de type I et la morphologie cellulaire reste arrondie. Des dépôts de

sGAG et de collagène de type II ont été mis en évidence dans notre système. L'environnement 3D mimant l'organisation *in vivo* permet donc le maintien du phénotype chondrocytaire comme l'ont suggéré d'autres études [Katsube, 2000 ; Kawamura, 1998 ; Nishikori, 2002 ; Uchio, 2000 ; Wakitani, 1998] mais sans démonstration sur le plan moléculaire par les techniques de RT-PCR. Ces résultats confirment donc l'intérêt des gels de collagène comme support cellulaire pour favoriser la synthèse d'une matrice extracellulaire proche du tissu cartilagineux en vue de son implantation dans les défauts cartilagineux.

La prolifération cellulaire reste néanmoins limitée dans ce système contrairement à la culture en monocouche, d'où l'intérêt de l'association de facteurs chimiques ou mécaniques à la culture. Du fait, de la faible quantité de matériel recueillie (en clinique), certains auteurs préconisent d'ailleurs la multiplication préalable des chondrocytes en monocouche (donc la différenciation des cellules) puis leur redifférenciation en culture 3D [Jakob, 2001].

### ***B.3.5- Conclusion***

Cette étude a démontré qu'il est possible de fabriquer *in vitro* du tissu cartilagineux à partir de chondrocytes et d'une matrice collagène sous forme de gel sur /ou au sein de laquelle les cellules vont s'attacher, proliférer et synthétiser leur propre matrice extracellulaire. Le système de culture que nous avons développé permet le maintien du phénotype chondrocytaire et donc la synthèse d'un tissu cartilagineux très proche du cartilage hyalin articulaire tout en étant peu exigeant en nombre de cellules. Le néo-tissu ainsi produit pourra être soit transplanté dans des défauts cartilagineux dans le dessein de réparer localement le cartilage ou servir de modèle pour des études fondamentales sur la biologie du cartilage et pour des essais pharmacologiques en remplacement des modèles animaux actuellement utilisés.

L'utilisation de facteurs de croissance [Fortier, 2002 ; Jakob, 2001 ; Matsusaki, 1998 ; Weiser, 1999] l'association d'acide hyaluronique [Kawasaki, 1999] ou encore l'application de stimulations mécaniques ou physiques [Nishikori, 2002] devraient permettre d'améliorer encore ce modèle et donc de développer de nouvelles perspectives pour la réparation des lésions cartilagineuses.

Enfin, l'apport de la thérapie génique est un atout supplémentaire pour guider la cicatrisation, la biofonctionnalité et la biointégration du tissu de réparation. Les progrès réalisés dans les techniques de l'ADN recombinant au cours de la dernière décade permettent d'envisager une association de la thérapie génique et des biomatériaux. Ainsi, la modification génétique des

cellules, de façon à ce qu'elles puissent synthétiser, sur commande, des facteurs de croissance, nécessaires à une prolifération et à une augmentation du taux de synthèse des composants matriciels laisse apparaître des retombées intéressantes en clinique, dans les années à venir, en ce qui concerne le traitement des lésions focales mais également des atteintes diffuses du cartilage. De plus, l'orientation de ces travaux vers l'utilisation de cellules souches, devrait permettre de s'affranchir du prélèvement de chondrocytes autologues.

## **Cartilage repair: surgical techniques and tissue engineering using polysaccharide- and collagen-based biomaterials**

L. Galois<sup>1,2,5</sup>, AM. Freyria<sup>2</sup>, L. Grossin<sup>1,5</sup>, P. Hubert<sup>3,5</sup>, D. Mainard<sup>1,5</sup>, D. Herbage<sup>2,5</sup>, JF. Stoltz<sup>4,5</sup>, P. Netter<sup>1,5</sup>, E. Dellacherie<sup>3,5</sup>, E. Payan<sup>1,5</sup>

**1 UMR 7561 CNRS-UHP Nancy I, Faculté de Médecine, 54505 Vandoeuvre les Nancy,**

**2 UMR 5086 CNRS-UCB Lyon I & IFR 128-Biosciences Lyon-Gerland, 7 passage du Vercors 69367 Lyon**

**3 UMR 7568 CNRS-INPL, ENSIC, 1 rue Grandville, 54000 Nancy**

**4 UMR 7563 CNRS-INPL-UHP Nancy I, Faculté de Médecine, 54505 Vandoeuvre les Nancy**

**5 IFR 111 « Bioingénierie »**

**Keywords:** cartilage repair – surgical techniques – tissue engineering – collagen – polysaccharide-based biomaterials - chondrocyte

**Correspondence:** L.Galois

Laboratoire de Pharmacologie et UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine, Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandoeuvre les Nancy Cedex

Tel : +33 3 83 68 39 81

Fax : +33 3 83 68 39 59

E-Mail : lgalois@free.fr

**Abstract:**

Lesions of articular cartilage have a large variety of causes among which traumatic damage, osteoarthritis and osteochondritis dissecans are the most frequent. Replacement of articular defects in joints has assumed greater importance in recent years. This interest results in large part because cartilage defects cannot adequately heal themselves. Many techniques have been suggested over the last 30 years, but none allows the regeneration of the damaged cartilage, i.e. its replacement by a strictly identical tissue. In the first generation of techniques, relief of pain was the main concern, which could be provided by techniques in which cartilage was replaced by fibrocartilage. Disappointing results led investigators to focus on more appropriate bioregenerative approaches using transplantation of autologous cells into the lesion.

Unfortunately, none of these approaches has provided a perfect final solution to the problem. The latest generation of techniques, currently in the developmental or preclinical stages, involve biomaterials for the repair of chondral or osteochondral lesions. Many of these scaffolds are designed to be seeded with chondrocytes or progenitor cells. Among natural and synthetic polymers, collagen- and polysaccharide-based biomaterials have been extensively used. For both these supports, studies have shown that chondrocytes maintain their phenotype when cultured in three dimensions. In both types of culture, a glycosaminoglycan-rich deposit is formed on the surface and in the inner region of the cultured cartilage, and type II collagen synthesis is also observed. Dynamic conditions can also improve the composition of such three-dimensional constructs. Many improvements are still required, however, in a number of key aspects that so far have received only scant attention. These aspects include: adhesion/integration of the graft with the adjacent native cartilage, cell-seeding with genetically-modified cell populations, biomaterials that can be implanted without open joint surgery and combined therapies, aimed at disease modification, pain relief and reduction of inflammation.

## 1. Introduction

Over the past decade, one of the most active areas of biomaterials research has involved cartilage repair. Replacement of articular defects in joints has assumed greater importance in recent years because of two main factors. The first is the increasing longevity of the population which is leading to a higher incidence of osteoarthritis initiated in some cases by early injuries to the joint, and the second is the increased incidence of joint injuries as a result of sports-related and other accidents in the young population [28]. This interest results in large part because cartilage defects cannot adequately heal themselves. This fact has been known for some time, probably even before it was first noted in 1743 by Hunter - "From Hippocrates to the present age, it is universally allowed that ulcerated cartilage is a troublesome thing and that when destroyed, it is not recovered" [17]. Many techniques have been suggested over the last 30 years, but none allows the regeneration of the damaged cartilage, i.e. its replacement by a strictly identical tissue (in terms of composition, structure and resistance). Surgical treatments available for treatment include debridement [21,27,33], drilling [18,38,47], micro-fractures [52,53], abrasion arthroplasty [27], autogenous [3,15,19] and allogeneic osteochondral grafts [2,6,14] periosteal and perichondral grafting [7,16,44,45,50] and autogenous chondrocyte transplantation [4]. Each of these methods has had a measure of success. Methods that rely on fibrocartilage replacement are limited by the inherent altered biomechanics of replacing hyaline cartilage with fibrocartilaginous tissue. Other methods have specific problems (fixation of the graft, maintenance of the phenotype, cost...). These disappointing results have led investigators to focus on more appropriate bioregenerative approaches using tissue engineering techniques especially with collagen- and polysaccharide-based biomaterials.

## 2. Conventional surgical techniques (articular resurfacing techniques)

Following articular resurfacing techniques such as chondral shaving [21, 30], abrasion arthroplasty [27], subchondral drilling [40] and microfracture [52,53], the repair tissue changes to fibrocartilage after about 6 months, thereby losing the biomechanical properties of normal articular cartilage. Chondral shaving of partial-thickness defects provides symptomatic relief for a brief period but does not stimulate cartilage regeneration [21,37]. The biological rationale behind this empirical type of intervention remains unclear. It may represent merely an intuitive move by the surgeon to do the patient 'some good' by removing

the fibrillated articular cartilage seen by arthroscopic inspection, and thus by 'smoothing the surface' reduce possible friction. But from a biomechanical point of view, such an undertaking makes no sense at all.

Abrasion arthroplasty yields variable results in the repair tissue produced ranging from fibrous tissue to hyaline-like cartilage with type II collagen [5,21]. Nevertheless, abrasion arthroplasty seems to give worse long-term results with increasing breakdown of the repair compared to subchondral drilling [27].

Pridie and Insall described debridement along with drilling in the exposed subchondral bone to encourage fibrocartilaginous repair [18]. The newly formed fibrocartilaginous layer that develops over the lesion in osteoarthritis may be enough to decrease patient symptoms. This procedure appears, however, to confer only short-term benefits; in the long run (several years after surgery), these are lost [47,48]. The drilling operation remains useful however in osteoarthritis and osteochondrosis dissecans.

Spongialization is an extension of the concept of Pridie for resurfacing damaged joints. The diseased cartilage is excised and the subchondral plate completely removed exposing the cancellous bone or "spongiosa" from which a new fibrous tissue surface can grow [12]. This technique was developed initially for diseased patellae but has been progressively discontinued [35].

The microfracture technique was developed by Steadman [52,53] to enhance chondral resurfacing by providing a suitable environment for new tissue formation and taking advantage of the body's own healing potential. Specially designed awls are used to make multiple perforations, or microfractures, into the subchondral bone plate. Perforations are made as close together as possible, but not so close that one breaks into another. They are usually approximately 3 to 4 mm apart. The integrity of the subchondral bone plate must be maintained. The principle of repair by micro-fractures is based on the construction of a super-clot that is progressively invaded by multipotent cells from the marrow and platelets. The cells first form a fibrous tissue that progressively undergoes metaplasia leading to active chondrocytes. The repair tissue is habitually a mixture of fibrocartilage and efficient « hyaline-like » cartilage. Microfracture has been done in more than 1800 patients. The rehabilitation program is crucial to optimise the results of the surgery. The other factors determining the result are the quality of the technical procedure, the oxygen content, and the absence of constraints on the repair zone.

### **3. Biological techniques using transplantation**

#### **3.1. Soft tissue grafts**

Among soft tissue grafts, perichondrial and periosteal grafts have had the best results. Autologous perichondrial and periosteal grafts were tested in the tarsocrural joint of horses. Periosteal grafts resulted in neochondrogenesis in 83% of the animals [56]. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts was also studied histologically in rabbits [34,44,45]. The results revealed that the defects were repaired and filled after 4 weeks with a hyaline-like cartilage that was histologically similar to the cartilage adjacent to the transplant.

Cartilage repair tissue derived from rib perichondrium could also mature into hyaline articular cartilage over time [10] in rabbits. Clinical trials in humans utilising free perichondrial grafts in hand surgery [50] or in chondral lesions of the knee [16] have had mixed results. Some of the failures of this type of graft were deemed secondary to inadequate fixation and graft instability. Despite these interesting results, few publications however using these techniques can be found in the literature.

#### **3.2. Allografts**

A frozen or fresh allograft has the advantage of being able to replace the destroyed articular zone exactly [24]. Osteochondral allografting also appears to be effective in treating larger osteochondral lesions, where there are few other attractive alternatives [6]. While antigenic effects due to the chondrocytes are avoided with this approach, there is a risk of viral transmission (HIV, Hepatitis C) with fresh allografts. The transplanted chondrocytes remain alive for several years after transplantation, even in the event of failure. The graft must be tailored perfectly to fit the loss of substance and fixation must be firm. Nevertheless, the anchorage of such a graft is not easy and is still problematic. The results obtained in the literature are good: 73% to 85% success at 10 years [2,9,14]. Bipolar replacements are possible, but the success rate falls to 50%. Frozen allografts have the advantage of a better detection of viral disorders, but at the cost of a less satisfying mechanical quality of the cartilage and a less viability of the transplanted cells.

### **3.3 Osteochondral autografts**

This concerns a technique, which is long recommended and has been revived in recent years, as it offers advantages over allografts in presenting no risk of viral transmission and permitting one-stage surgery, with encouraging results. This always involves grafts of rather large size which risks morbidity at the donor site and incongruity at the receptor site hence the concept of packing extensive losses of substance with several small cylindrical autografts, removed at the knee and capable of restoring better congruence. These techniques have been especially developed since 1992 under the influence of Hangody [15], Bobic [3], Matusue [26] and, more recently, Jakob [19].

In summary, autologous osteochondral mosaicplasty - as an easy, one-step procedure, providing a relatively quick rehabilitation - can be an alternative in the treatment of small and medium sized lesions. Excellent clinical outcome, low costs of the treatment and short rehabilitation time represent the main advantages of this method. Treatment of full-thickness cartilage damage to weight bearing surfaces depends not only on the method of cartilage repair but also on treatment of the underlying cause. Accordingly, effective treatment of full thickness defects on the weight bearing surfaces requires careful patient selection, complex operative planning and a well organised treatment course.

### **3.4. Chondrocyte transplantation**

The first human implantation (autologous chondrocyte transplantation or ACT) was made by a Swedish team (Brittberg, Lindahl and Peterson) in 1994 in 23 cases [4]. The principle of the technique consists of filling the cartilaginous defect using the biological dynamic represented by the periosteal-chondrocytic complex. Three stages are necessary. The first consists of the removal of around 200 mg of healthy cartilage from a non-weight bearing zone of the knee. Then, chondrocytes are removed from the cartilage after an enzymatic digestion and cultured in a monolayer procedure over a period of 3 weeks. The third stage is implantation which is performed by arthrotomy. The slightly over-sized periosteal flap is raised from the medial surface of the tibia and is attached very carefully around the loss of substance with its bony aspect towards the defect. The cell culture is then injected under the periosteal patch. Active and passive mobilisation of the knee is possible but some weight relief by crutches for 8 weeks is necessary so as not to compromise the development of the

periosteal flap. The results are based essentially on the Swedish studies, whose follow-up is remarkable. Peterson *et al* [39] reported their experience with 110 implantations performed between October 1987 and December 1995 for lesions of 1.3 cm<sup>2</sup> to 12 cm<sup>2</sup> with a minimum follow-up of 2 years. Among these, 92% were found to be improved in isolated lesions of the femoral condyle, 89% in osteochondritis, and 68% in cases of associated lesions of the anterior cruciate ligament or patella. A hyaline-like phenotype (type II collagen) was found in 85% of the biopsies and was well correlated with the good clinical results. The problem is the interpretation of findings relating to the autologous chondrocyte transplantation approach. It represents theoretically not a single but potentially a triple chondrogenic system, in that repair responses may originate from the transplanted cells, the cambial layer of the periosteal flap, and the subchondral bone-tissue spaces. Finally, no prospective, double-blinded clinical studies have been undertaken to compare this methodology with alternative, well-established and less-expansive treatment protocols.

#### **4. Tissue engineering and bioregeneration approaches**

Tissue engineering can be defined as the art of reconstituting mammalian tissues both structurally and functionally. Such material could be used at sites where native tissue has been lost or compromised by trauma or pathological processes. Articular cartilage provides its own particular challenges for tissue engineering. Its structure appears simple, it only contains one cell type but it shows different phenotypes, with a complex, highly organised extracellular matrix (ECM). Cartilage has no blood vessels, it is not innervated and normal mechanisms of tissue repair, involving the recruitment of cells to the site of damage, do not occur. The challenge for cartilage tissue engineering is to produce cartilage tissue with suitable structure and properties *ex vivo*, which can be implanted into joints to provide a natural repair that with time will become integrated with the patient's tissues.

Cartilage regeneration continues to challenge state-of-the-art three dimensional scaffold technology. Three key constituents usually form the basis of a tissue engineering approach: a matrix scaffold, cells and signalling molecules (such as growth factors or genes). Many different types of matrix have been tested *in vitro*, as well as in experimental animals and in human patients. These matrices can be broadly categorised according to their chemical nature into protein-based polymers, carbohydrate-based polymers, artificial materials and combinations of these.

Interactions between cells and their environment play an important role in many biological processes. Most studies on the role of the extracellular matrix components have been carried out with cells cultured on matrix proteins deposited on plastic. This kind of system is far from that found *in vivo*. *In vivo*, cells are in a three-dimensional matrix and receive physical and chemical signals from their environment. Cells are capable of recognising collagen by specific membrane receptors called integrins. Integrins  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$  and  $\alpha3\beta1$  are the principal integrins involved in interactions with collagen.

#### 4.1. Polysaccharide-based matrices

Numerous polysaccharide polymers have been proposed to build three-dimensional scaffolds to enhance neosynthesis of extracellular matrix by cells placed inside them. Among these, agarose, alginate or chitosan are used either alone or associated with other polymers to act as biocompatible and biodegradable networks for cartilage repair. Since some years, another group of naturally derived components, the glycosaminoglycans, existing in the cartilaginous matrix, have also proposed to conceive new biosystems for cartilage engineering. Glycosaminoglycans may create an appropriate environment for the regeneration of cartilage-like tissue when associated with other polymers. The main glycosaminoglycans, hyaluronic acid (HA) and chondroitin sulphate (CS) are already commercialised for treatment of osteoarthritis by intra-articular injection [32] and oral [43,55] administration respectively. Numerous studies in the literature have proposed a combination of CS with porous collagen matrix [46] or chitosan [49] and have found that the resulting scaffold supports the production of proteoglycans and type II collagen by seeded chondrocytes.

Among the HA-based devices, the benzylic esters of hyaluronan, referred to as HYAFF, are a promising new class of semi-synthetic biomaterials in tissue engineering because they support the growth of human chondrocytes and maintain their original phenotype [13]. Esterified HA has also been investigated in a gelatin-based matrix to facilitate the differentiation of bone marrow mesenchymal progenitor cells into chondral or osseous tissue [1]. In the same way, sponges, constituted of fibronectin coated with hyaluronan, provide a structural support that can be filled with progenitor cells. This composite material might be superior to others for osteochondral repair and appears to organise the natural response and facilitate the integration of the neocartilage with the adjacent tissue [51].

Our own experience on HA-based biomaterials consists of associating this polymer chemically modified or not with calcium alginate to obtain hydrogels or sponges usable for *in*

*vitro* or *in vivo* cartilage neosynthesis. The *in vitro* investigations have been carried out by seeding rat chondrocytes inside hydrogels or sponges to test different parameters such as proliferation, synthesis activity of proteoglycans and production of types I and II collagens. The results obtained showed a higher proliferation and synthesis activity for rat cells in the presence of hyaluronate (Fig.1)

For all the biosystems, the neosynthesised matrix contained a high level of collagen which was in part type II collagen [29]. The same result was obtained *in vitro* with a hyaluronate substituted by C18 alkyl chains (HAC18). The advantage of this chemical modification is that it leads to viscoelastic properties mimicking perfectly those of matrix surrounding the chondrocytes. Moreover, this hydrophobic polysaccharide implanted in a rat model of an osteochondral lesion showed a good biotolerance and biocompatibility. The reconstructed tissue obtained is very similar to the native cartilage [11]. In the future, the concept of cell seeding will be associated with the design of this chemically modified HA, so as to develop an innovative injectable device affording optimal adhesion/integration of the graft with the tissue surrounding the defect.

#### 4.2. Collagen-based matrices

Among biological scaffolds, collagen-based biomaterials have been extensively used in tissue engineering [54] as they have low immunogenicity and are easily configured into different shapes. They have been used for skin replacement, bone substitutes, artificial blood vessels and valves and more recently in cartilage repair. Chondrocyte seeded-3-D scaffolds have an advantage over conventional autologous chondrocyte transplantation (ACT) as they help the growth of chondrocytes and enhance matrix production [22]. Previous *in vitro* studies have shown that differentiated bovine chondrocytes seeded in type I collagen sponges proliferated ( $2.3 \times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup>) and maintained their phenotype ( $2.3 \times 10^7$  cells/cm<sup>3</sup>) [41]. Thus it did not seem necessary to use type II collagen matrices to produce neocartilage. Moreover the arthritogenic potential of type II collagen does not favour its clinical use in humans. The composition of the construct may be also modified using culture conditions involving mechanical and/or chemical stimuli. Indeed the intensity of the compression applied on the construct may or may not favour the deposition of ECM as the biomechanical environment is a key factor in the modulation of chondrocyte proliferation and metabolism [8,31,57]. Culture in stirred conditions using an orbital shaker (30 rpm) favoured a more homogenous distribution of ECM components throughout the scaffold (Fig.2 b-d) compared

to static conditions (Fig.2 a-c) and accelerated the deposition of ECM components. The substitution of foetal calf serum (FCS; 10%) by media supplement (ITS; 1%) for long term cultures led to a neocartilage with the same cell number, the same amount of aggrecan deposited (Fig.2 c-d) but less collagen deposited than with FCS (Fig.2 e-f). The presence of ascorbic acid during the culture stimulated cell proliferation but did not increase cartilage matrix synthesis. It also induced a partial loss of the chondrocyte phenotype as the cells produced high amounts of collagen type I as well as a maturation of the chondrocytes based on the expression of type X collagen mRNA and MMP-13 [42]. Thus the presence or absence of ascorbic acid in the culture medium of cartilage construct has to be considered in the light of its effect on the chondrocyte phenotype.

Experimental studies using collagen gels have shown that chondrocytes maintain their phenotype when cultured in such 3-D biomaterials [20,22,23,25,58]. A glycosaminoglycan-rich deposition was formed on the surface of cultured cartilage probably because more nutrition and oxygen were provided from the medium, which both help chondrocyte growth of enhanced matrix production [59]. Synthesis of collagen type II was also observed in such conditions. When maintained in culture in these conditions for 2-3 weeks, the collagen scaffold acquired a higher elastic resistance without alterations in chondrogenic phenotype. Our own *in vitro* study suggests that collagen gels support primary bovine chondrocyte proliferation with accumulation of an extracellular matrix (Fig.2 g-h), as well as maintenance of a round morphology and phenotype (assessed by gene expression, unpublished data) during 2-week culture periods. By allowing the cartilage matrix to accumulate while culturing the collagen-chondrocyte composite, partial protection against mechanical pressure or metabolic changes is provided. This hardened gel-chondrocyte composite is easy to manipulate and shape and could serve as an appropriate vehicle for chondrogenic cell-mediated repair of cartilage defects. The first clinical use of collagen gels for the treatment of full-thickness defects of cartilage in 28 knees has recently been published with promising results [36]. Transplantation eliminated locking of the knee and reduced pain and swelling in all patients. Chondrocytes in a newly formed collagen gel matrix can promote restoration of the articular cartilage of the knee.

## 5. Conclusion

The goal of cartilage engineering is to achieve mechanical properties identical to those of the native tissue. A simple and minimal invasive procedure to collect cells from the patient is mandatory. One of the most important problems to be solved is the fixation of the construct to the subchondral bone in the joint. Composite biomaterials seem to provide promising ways to organise the natural response and to facilitate the integration of the neocartilage with the adjacent tissue. Further studies are mandatory to optimise culture methodologies to ensure the successful function of engineered tissue.

## 6. References

- [1] P. Angele, R. Kujat, M. Nerlich, J. Yoo, V. Goldberg, B. Johnstone. Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge. *Tissue Eng*, **5** (1999), 545-554.
- [2] P.P. Aubin, H.K. Cheah, A.M. Davis, A.E. Gross. Long-term follow-up of fresh femoral osteochondral allografts for post-traumatic knee defects. *Clin. Orthop.* **391** (2001), S318-327.
- [3] V. Bobic. Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions. *Orthopade.* **28** (1999), 19-25.
- [4] M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, L. Peterson. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* **331** (1994), 889-895.
- [5] J.A. Buckwalter, S. Lohmander. Operative treatment of osteoarthritis. Current practice and future development. *J. Bone Joint Surg. [Am]*. **76** (1994), 1405-1418.
- [6] W.D. Bugbee, F.R. Convery. Osteochondral allograft transplantation. *Clin. Sports Med.* **18** (1999), 67-75.
- [7] S.K. Bulstra, G.N. Homminga, W.A. Buurman, E. Terwindt-Rouwenhorst, A.J. van der Linden. The potential of adult human perichondrium to form hyaline cartilage in vitro. *J Orthop Res.* **8** (1990), 328-335.
- [8] S.E. Carver, C.A. Heath. Semi-continuous perfusion system for delivering intermittent physiological pressure to regenerating cartilage. *Tissue Engin.* **5** (1999), 1-11.
- [9] F.R. Convery, M.H. Meyers, W.H. Akeson. Fresh osteochondral allografting of the femoral condyle. *Clin. Orthop.* **273** (1991), 139-145.
- [10] R.D. Coutts, S.L. Woo, D. Amiel, H.P. von Schroeder, M.K. Kwan. Rib perichondrial autografts in full-thickness articular cartilage defects in rabbits. *Clin. Orthop.* **275** (1992), 263-273.
- [11] Y. Dausse, L. Grossin, G. Miralles, S. Pelletier, D. Mainard, P. Hubert, D. Baptiste, P. Gillet, E. Dellacherie, P. Netter, E. Payan. Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials : macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defects. *Osteoarthritis and Cartilage* **11** (2003), 16-28.
- [12] R.P. Ficat, C. Ficat, P. Gedeon, J.B. Toussaint. Spongialization: a new treatment for diseased patellae. *Clin. Orthop.* **144** (1979), 74-83.

- [13] B. Grigolo, G. Lisignoli, A. Piacentini, M. Fiorini, P. Gobbi, G. Mazzotti, M. Duca, A. Pavesio, A. Facchini. Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAff 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials* **23** (2002), 1187-1195.
- [14] A.E. Gross, P. Aubin, H.K. Cheah, A.M. Davis, M.T. Ghazavi. A fresh osteochondral allograft alternative. *J. Arthroplasty*. **17** (2002), Suppl 50-53.
- [15] L. Hangody, G. Kish, Z. Karpati, I. Udvarhelyi, I. Szigeti, M. Bely. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics*. **21** (1998), 751-756.
- [16] G.N. Homminga, S.K. Bulstra, P.S. Bouwmeester, A.J. van der Linden. Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J. Bone Joint Surg. [Br]* **72** (1990), 1003-1007.
- [17] W. Hunter. On the structure and disease of articular cartilage. *Philos Trans R Soc London Biol* **42** (1743), 514-521.
- [18] J. Insall. The Pridie debridement operation for osteoarthritis of the knee. *Clin. Orthop.* **101** (1974), 61-67.
- [19] R.P. Jakob, T. Franz, E. Gautier, P. Mainil-Varlet. Autologous osteochondral grafting in the knee: indication, results, and reflections. *Clin. Orthop.* **401** (2002), 170-184.
- [20] K. Katsube, M. Ochi, Y. Uchio, S. Maniwa, M. Matsusaki, M. Tobita, J. Iwasa. Repair of articular cartilage defects with cultured chondrocytes in Atelocollagen gel. Comparison with cultured chondrocytes in suspension. *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* **120** (2000), 121-127.
- [21] H.K. Kim, M.E. Moran, R.B. Salter. The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. *J. Bone Joint Surg. [Am]* **73** (1991), 1301-1315.
- [22] T. Kimura, N. Yasui, S. Ohsawa, K. Ono. Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin. Orthop.* **186** (1987) 231-239.
- [23] C.R. Lee, H.A. Breinan, S. Nehrer, M. Spector. Articular cartilage chondrocytes in type I and type II collagen-GAG matrices exhibit contractile behaviour in vitro. *Tissue Eng.* **6** (2000), 555-565.
- [24] E. Lexer. Substitution of whole or half joints from freshly amputated extremities by freeplastic operation. *Surg. Gynecol. Obstetr.* **6** (1908), 601-605.
- [25] M. Matsusaki, M. Ochi, Y. Uchio, N. Shu, H. Kurioka, K. Kawasaki, N. Adachi. Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation and phenotype expression of chondrocytes embedded in collagen gel. *Gen. Pharmacol.* **31** (1998), 759-764

- [26] Y. Matsusue, T. Kotake, Y. Nakagawa, T. Nakamura. Arthroscopic osteochondral autograft transplantation for chondral lesion of the tibial plateau of the knee. *Arthroscopy*. **17** (2001), 653-659.
- [27] D.S. Menche, S.R. Frenkel, B. Blair, N.F. Watnik, B.C. Toolan, R.S. Yaghoubian, M.I. Pitman. A comparison of abrasion burr arthroplasty and subchondral drilling in the treatment of full-thickness cartilage lesions in the rabbit. *Arthroscopy*. **12** (1996), 280-286.
- [28] K. Messner, W. Maletius. The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee—a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop. Scand.* **67** (1996), 165-168.
- [29] G. Miralles, R. Baudoin, D. Dumas, D. Baptiste, P. Hubert, J.F. Stoltz, E. Dellacherie, D. Mainard, P. Netter, E. Payan. Sodium alginate sponges loaded or not with sodium hyaluronate: In vitro engineering of cartilage. *J. Biomed Mater. Res.* **57** (2001), 268-278.
- [30] Mitchell, N. Shepard. Effect of patellar shaving in the rabbit. *J. Orthop. Res.* **5** (1987), 388-392.
- [31] S. Mizuno, T. Tateishi, T. Ushida, J. Glowacki. Hydrostatic fluid pressure enhances matrix synthesis and accumulation by bovine chondrocytes in three-dimensional culture. *J. Cell. Physiol.* **193** (2002), 319-327.
- [32] L.W. Moreland. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res. Ther.* **5** (2003), 54-67.
- [33] J.B. Moseley, K. O'Malley, N.J. Petersen, T.J. Menke, B.A. Brody, D.H. Kuykendall, J.C. Hollingsworth, C.M. Ashton, N.P. Wray. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N. Engl. J. Med.* **347** (2002), 81-88.
- [34] S.W. O'Driscoll, F.W. Keeley, R.B. Salter. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J. Bone Joint Surg. [Am.]*. **68** (1986), 1017-1035.
- [35] M. Oberlander, C. Baker, B. Morgan. Patellofemoral arthrosis: the treatment options. *Am. J. Orthop.* **27** (1998), 263-270.
- [36] M. Ochi, Y. Uchio, K. Kawasaki, S. Wakitani, J. Iwasa. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J. Bone Joint Surg.* **84** (2002), 571-578.
- [37] D.J. Ogilvie-Harris, RW Jackson. The arthroscopic treatment of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg. [Br.]*. **66** (1984), 660-665.

- [38] M. Pedersen, A. Moghaddam, K. Bak, J. Koch. The effect of bone drilling on pain in gonarthrosis. *Int. Orthop.* **19** (1995), 12–15.
- [39] L. Peterson, T. Minas, M. Brittberg, A. Nilsson, E. Sjogren-Jansson, A. Lindahl. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin. Orthop.* **374** (2000), 212-234.
- [40] K.H. Pridie. A method of resurfacing osteoarthritic knee joint. *J. Bone Joint Surg.* [Br] **41** (1959), 618
- [41] S. Roche, M.C. Ronzière, D. Herbage, A.M. Freyria. Native and DPPA cross-linked collagen sponges seeded with fetal bovine epiphyseal chondrocytes used for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **22**,(2001), 9-18.
- [42] M.C. Ronzière, S. Roche, J. Gouttenoire, O. Demartean, D. Herbage, A.M. Freyria. Ascorbate modulation of bovine chondrocyte growth, matrix protein gene expression and synthesis in three- dimensional collagen sponges. *Biomaterials* **24**, (2003), 851-861.
- [43] G. Rovetta, P. Monteforte, G. Molfetta, V Balestra. Chondroitin sulfate in erosive osteoarthritis of the hands. *Int. J. Tissue React.* **24** (2002), 29-32.
- [44] J.M. Rubak, M. Poussa, V. Ritsila. Chondrogenesis in repair of articular cartilage defects by free periosteal grafts in rabbits. *Acta Orthop. Scand.* **53** (1982), 181-186.
- [45] J.M. Rubak. Reconstruction of articular cartilage defects with free periosteal grafts. An experimental study. *Acta Orthop Scand.* **53** (1982), 175-180.
- [46] R.E. Samuel, C.R. Lee, S.C. Ghivizzani, C.H. Evans, I.V. Yannas, B.R. Olsen, M. Spector. Delivery of plasmid DNA to articular chondrocytes via novel collagen-glycosaminoglycan matrices. *Hum. Gene Ther.* **13** (2002), 791-802.
- [47] H. Schmidt, K. Schulze, R. Cyffka. Results of treatment of cartilage damage by Pridie drilling of the knee joint. *Beitr. Orthop. Traumatol.* **35** (1988), 117–122.
- [48] H. Schmidt, E. Hasse. Arthroscopic surgical treatment of circumscribed cartilage damage with spongiolization or Pridie drilling. *Beitr. Orthop. Traumatol.* **36** (1989), 35–37.
- [49] V.F. Sechriest, Y.J. Miao, C. Niyibizi, A. Westerhausen-Larson, H.W. Matthew, C.H. Evans, F.H. Fu, J.K. Suh. GAG-augmented polysaccharide hydrogel: a novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis. *J. Biomed. Mater. Res.* **49** (2000), 534-541.
- [50] T. Skoog, S.H. Johansson. The formation of articular cartilage from free perichondrial grafts. *Plast. Reconstr. Surg.* **57** (1976),1-6.

- [51] L.A. Sochalga, J. Gao, J.E. Dennis, A. Awadallah, M. Lundberg, A.I. Caplan, V.M. Goldberg. Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle. *Tissue Eng.* **8** (2002), 333-347.
- [52] J.R. Steadman, W.G. Rodkey, J.J. Rodrigo. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop.* **391** (2001), Suppl 362-369.
- [53] J.R. Steadman, W.G. Rodkey, K.K. Briggs. Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation, and outcomes. *J Knee Surg.* **15** (2002), 170-176.
- [54] J.S. Temenoff, A.G. Mikos. Review : tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* **21** (2000) 431-440.
- [55] D. Uebelhart, E.J. Thonar, P.D. Delmas, A. Chantaine, E. Vignon. Effects of oral chondroitin sulphate on the progression of knee osteoarthritis: a pilot study. *Osteoarthritis Cartilage* **6** (1998), Suppl A, 39-46.
- [56] A.M. Vachon, C.W. McIlwraith, G.W. Trotter, R.W. Norrdin, B.E. Powers. Morphologic study of repair of induced osteochondral defects of the distal portion of the radial carpal bone in horses by use of glued periosteal autografts. *Am. J. Vet. Res.* **52** (1991), 317-27.
- [57] G. Vunjak-Novakovic, I. Martin, B. Obradovic, S. Treppo, A.J. Grodzinsky, R. Langer, L.E. Freed. Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *J. Orthop. Res.* **17** (1999), 130-139.
- [58] S. Wakitani, T. Goto, R.G. Young, J.M. Mansour, V.M. Goldberg, A. Caplan. Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng.* **4** (1998), 429-444.
- [59] T. Yamamoto, M. Katoh, R. Fukushima, T. Kurushima, M. Ochi. Effect of glycosaminoglycan production on hardness of cultured cartilage fabricated by the collagen-gel embedding method. *Tissue Eng.* **8** (2002), 119-29.

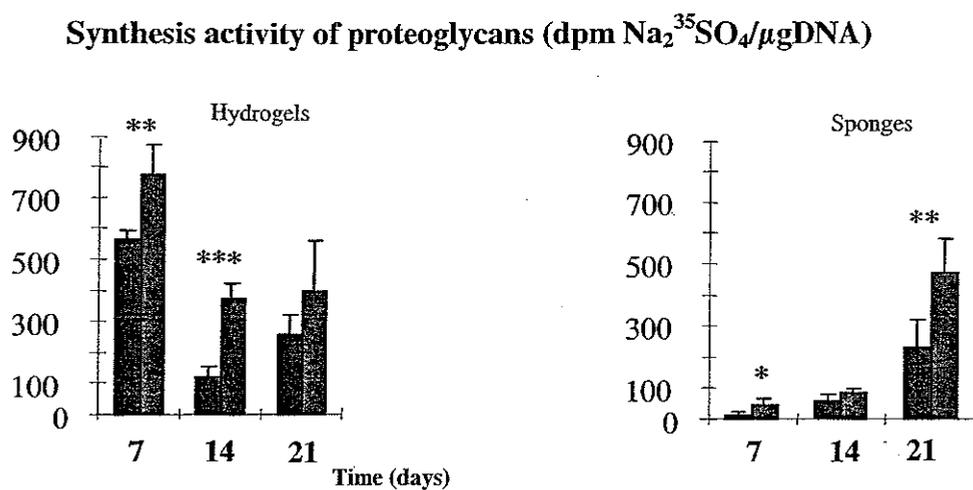
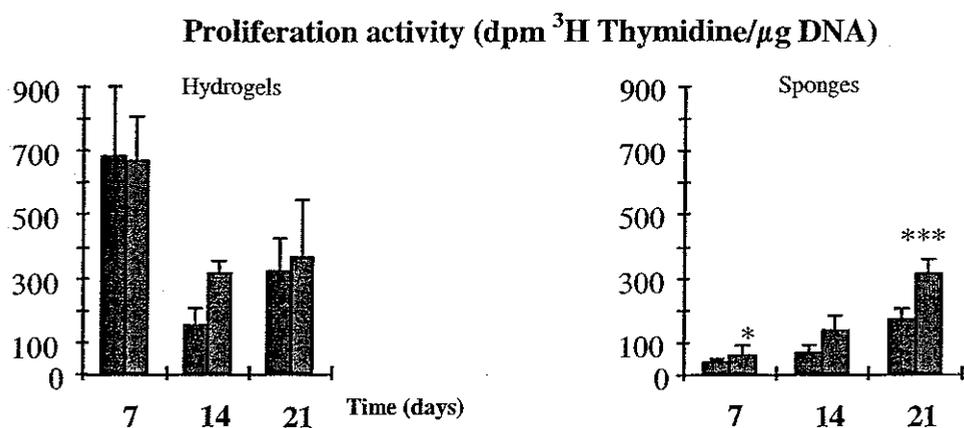
### **Acknowledgements.**

This work was funded by a "Programme Thématique Prioritaire" (085113) from the Rhône-Alpes region, a CNRS-INSERM grant "Ingénierie Tissulaire" (2000-03), and one grant from the Fondation de l'Avenir pour la recherche appliquée (Paris, ET2-320).

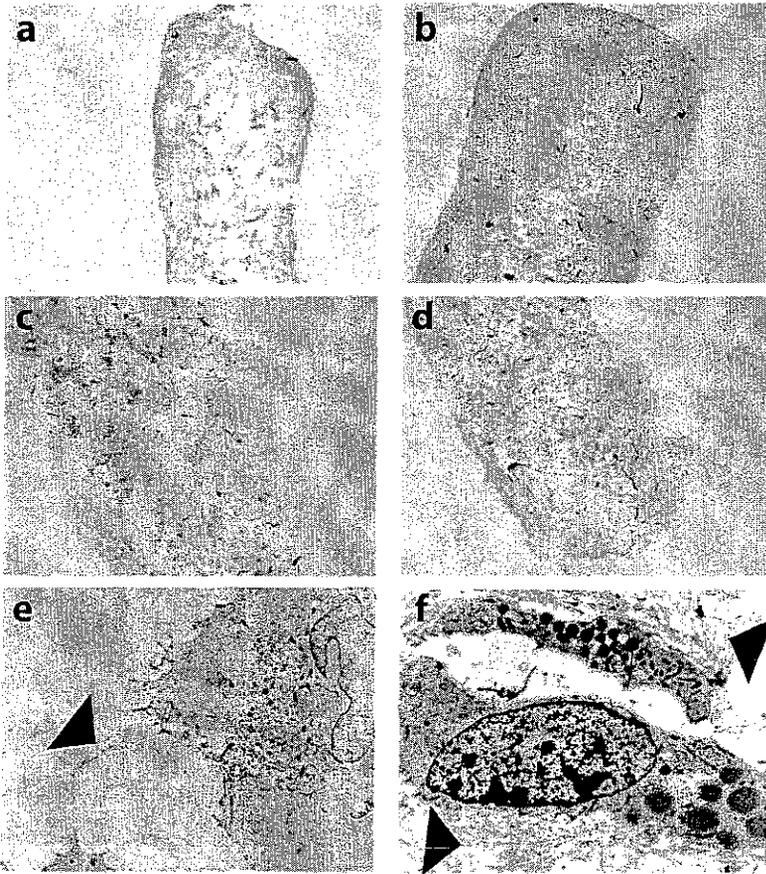
## Legends

**Figure 1:** Proliferation activity and synthesis activity of proteoglycans in hydrogels and sponges-based on Alginate (blue) or on Alginate/Hyaluronate (red). Results are the mean of n=3 experiments +/- SD.

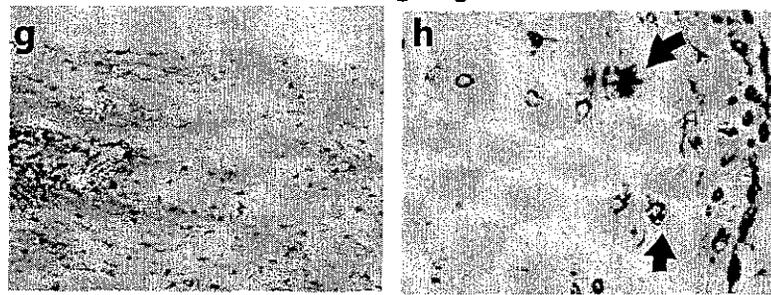
**Figure 2:** Analysis of the neomatrix deposited by bovine chondrocytes grown in collagen-based biomaterials: collagen sponges (a-f) and collagen gels (g and h). Glycosaminoglycan staining and scanning electron micrographs of collagen sponges initially seeded with one million foetal bovine chondrocytes and grown for three months in serum-supplemented medium 10 % FCS (a, b and f) or serum-free medium supplemented with 1% ITS and cysteine (c,d and e). When static conditions (a and c) were applied the glycosaminoglycan deposits were at the border of the sponge or in clusters whereas stirred conditions favoured homogenous deposition of glycosaminoglycans (b and d). Collagen fibrils (arrowheads), abundant in FCS conditions, are fewer in ITS conditions. Glycosaminoglycan staining (g) and immunohistology of collagen type II (h) of a collagen gel seeded with two million veal chondrocytes and grown for 2 weeks in 10% FCS supplemented media. Deposits of glycosaminoglycan were present at the periphery of the gels and collagen type II had mostly a pericellular distribution. . Bar : a,b,c,d : 640  $\mu\text{m}$ ; e: 4.3  $\mu\text{m}$ ; f: 2.7  $\mu\text{m}$ ; g : 160  $\mu\text{m}$  and h : 40  $\mu\text{m}$ .



**Collagen sponges**



**Collagen gels**



## **Chondrocytes cultivés en gels de collagène et bioingénierie du cartilage**

**L. Galois<sup>1,2</sup>, S. Hutasse<sup>2</sup>, MC. Ronzière<sup>2</sup>, D. Herbage<sup>2</sup>, AM. Freyria<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Service de chirurgie orthopédique et traumatologique (C.O.T)  
Hôpital Central, 29 Av Maréchal de Lattre de Tassigny, CO n°34  
54035 NANCY Cedex

<sup>2</sup> Institut de Biologie et Chimie des Protéines (I.B.C.P)  
7 passage du Vercors  
69007 LYON

## I. Introduction

Physiologiquement, le cartilage a une très faible capacité de régénération. Pour réparer une lésion du tissu cartilagineux, une intervention clinique est donc indispensable. En fonction de la taille de la lésion, différents traitements sont envisageables. Pour les lésions de faible étendue, des techniques palliatives consistent à réaliser des microfractures ou des forages qui stimulent la repousse d'un fibrocartilage. Des greffes de périchondre, de périoste ou encore des autogreffes ostéocondrales en mosaïque ont également été proposées. Ces techniques qui semblent montrer des résultats satisfaisants à court et moyen termes sont néanmoins décevantes à long terme. C'est la raison pour laquelle de nombreuses équipes ont orienté leurs travaux vers la transplantation de chondrocytes et vers l'ingénierie tissulaire du cartilage en raison du succès obtenu par la technique dite de Brittberg qui consiste en l'implantation de chondrocytes autologues (ACI) au niveau du défaut cartilagineux (1). Pour autant, cette technique ne permet pas de contrôler le phénotype chondrocytaire et d'autre part la fuite cellulaire lors de l'implantation est grande. De nouvelles stratégies ont donc été envisagées, utilisant des matrices en 3-dimensions à base de collagène pour implanter des chondrocytes différenciés ou redifférenciés. Le collagène est en effet une substance de choix pour la réalisation de ces biomatériaux car cette protéine possède une bonne résistance mécanique, une biocompatibilité et une biodégradabilité contrôlables et elle joue un rôle favorable dans le développement cellulaire. Nous présentons nos résultats obtenus *in vitro* par la culture de chondrocytes en gels de collagène appliquée à la bioingénierie du cartilage.

## II. Matériel et Méthodes

### 1) Extraction des chondrocytes primaires

Les chondrocytes sont extraits des cartilages par digestion enzymatique de pieds de veau âgés de moins de six mois, provenant des abattoirs de Corbas (Lyon).

Les pieds de veau sont récupérés 2 heures après l'abattage de l'animal. L'articulation métatarsophalangienne (figure 1) est ouverte sous la hotte de culture (à flux laminaire) avec du matériel stérile et le cartilage est prélevé avec une lame de scalpel et récupéré dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) contenant 1% de pénicilline streptomycine et 0.1 % d'amphotéricine. L'étape suivante consiste en la digestion du tissu pendant 45 minutes avec de la hyaluronidase (Sigma H-3506) à 2mg/ml dans du PBS à température ambiante. Une seconde digestion est réalisée dans du PBS avec de la collagénase à 1,25 mg/ml (Sigma C-9891) et de la dispase à 1,25 mg/ml (Boehringer Mannheim 83668423-63). Cette digestion se fait à 37°C dans des cellules de Green sous agitation jusqu'à disparition complète des lambeaux de cartilage. Les cellules sont lavées en milieu complet pour chondrocytes et comptées. Le comptage des cellules est réalisé dans une cellule de Malasséy, après ajout de bleu trypan, qui permet de déterminer le nombre de cellules viables. Puis les chondrocytes sont ensemencés à raison de 2 millions de cellules dans les gels de collagène placés dans des boîtes multipuits. Après l'ensemencement les boîtes sont mises à l'étuve à 37°C contenant 5% CO<sub>2</sub>, puis une heure après, les gels ensemencés sont recouverts de 1 ml de milieu complet.

## 2) Les gels de collagène

Il s'agit de collagène de type I issu de broyat de peau de veau fourni par la société Symatèse Biomatériaux (Lyon). Le collagène est utilisé à la concentration finale de 1,25mg/ml.

## 3) Techniques de cultures cellulaires

Un mélange volume à volume de RPMI1640 (Sigma R-6504 supplémenté par 2mg/ml de bicarbonate de sodium) et de NCTC 109 (Sigma N-1140 supplémenté par 0,136mg/ml L glutamine) est utilisé. On ajoute à ce mélange 10% de sérum bovin foetal (SVFAMS2052 Biomedica), 100U/ml pénicilline, 100µg/ml streptomycine (Sigma P4333 mélange100X), 250ng/ml d'amphotéricine B (Sigma A2942 à 250 µg/ml ). Ce milieu est changé trois fois par semaine pour toutes les conditions de culture.

## 4) Etude de la prolifération et de la synthèse de matrice extra cellulaire dans les gels de collagène

### a) Prolifération cellulaire (dosage ADN)

Pour tous les dosages, il faut réaliser une extraction du matériel à doser. Les échantillons sont congelés à -70°C, lyophilisés et repris avec 900 µl de tampon Tris HCl 10 mM, pH 8,1. Ils sont chauffés dans un bain marie à 94°C pendant 20 minutes et vortexés deux fois durant l'expérience. Après refroidissement des tubes il faut ajouter 100µl d'une solution d'enzymes : Papaine 6 mg/ml (Sigma P-4762, 22,7 U/mg solide) et Protéinase K 6 mg /ml (Sigma P-8044, 1,4 U/mg solide)

Les enzymes sont dissoutes dans du tampon Tris 10 mM CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Une pré-digestion est réalisée dans un bain marie à 60°C pendant une heure avec agitation régulière. La digestion, elle, s'effectue dans un four sous agitation pendant 20 heures à 60°C. Les tubes sont centrifugés à 15000 rpm à 4°C pendant 25 minutes, les surnageants sont prélevés et congelés pour réaliser les dosages par méthode fluorimétrique.

La gamme étalon se prépare à l'aide d'une solution d'ADN de thymus de veau (Sigma N-01501) à 100µg/ml diluée au 1/10<sup>ème</sup> dans un tampon Tris 10mM, pH 8,1.

Les surnageants sont décongelés, deux volumes sont prélevés 35 et 70 µl auxquels sont ajoutés 1 ml de réactif de Hoechst. Les échantillons sont conservés pendant 20 minutes à l'abri de la lumière avant d'être lus sur le fluorimètre FLX-800 Bio-Tek Instruments (λ excitation 358 nm, λ émission 458 nm). Le nombre de cellules est calculé à partir de la quantité d'ADN dosé en utilisant la correspondance suivante : 7,8 pg ADN/chondrocyte.

### b) Etude de la matrice néo-synthétisée

#### *-Dosage des GAG*

Le dosage colorimétrique des glycosaminoglycannes sulfatés s'effectue par le bleu de diméthylméthylène (DMMB). Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution mère de chondroïtine sulfate à 0,5 mg/ml (Sigma C-8529).

Pour chaque échantillon, deux volumes sont prélevés (100 et 200  $\mu$ l) et placés dans une cuve avec 2,5 ml de DMMB. L'absorbance est lue au spectrophotomètre UV-DU 460 Beckman à 525 nm immédiatement après le mélange.

#### *-Histologie, coloration Safranine-o*

Cette coloration permet de visualiser les protéoglycannes en orange. Après fixation dans l'AFA (750 ml Alcool, 20 ml de Formalin, 50 ml d'acide Acétique, 180 ml d'eau distillée) déshydratation et l'inclusion en paraffine, les échantillons sont coupés (5 $\mu$ m d'épaisseur) posés sur lame et déparaffinés. La coloration dans une solution de Safranine-O 0,5% en un tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 7,4. Puis les coupes sont déshydratées et montées avec un milieu hydrophobe entre lame et lamelle.

#### *-Immunohistochimie du collagène de types I et II et alpha sma*

Les échantillons sont mis dans un fixateur AFA (Alcool-Formalin-acide Acétique) pendant 24 heures. Ils sont déshydratés puis enduits dans un bloc de paraffine pour permettre leur coupes via un microtome (5  $\mu$ m d'épaisseur). Les coupes sont déposées sur des lames silanisées avec de l'albumine glycine pour permettre l'adhésion, puis séchées. Les lames sont déparaffinées dans des bains de xylène, xylène-alcool, alcool 95°C, alcool 95°C-eau distillée (v/v) et eau courante. Les échantillons sont traités à la hyaluronidase 0,2% (Sigma H 3506 type I-S), BSA 3% (Bovine Serum Albumin Sigma A9647) dans du PBS (Phosphate Buffer Saline bioMérieux 75511) pendant 15 minutes et rincés par du PBS.

Les échantillons sont ensuite incubés avec les anticorps primaires polyclonaux de lapin (Novotec) dilués au 1/1000<sup>ème</sup> pour l'anti collagène de type I et au 1/500<sup>ème</sup> pour l'anti collagène de type II et l'alpha sma (dilution dans du PBS avec 3 % BSA). 150  $\mu$ l de l'extrait dilué sont posé par coupe et la réaction anticorps antigène se déroule pendant une nuit en atmosphère humide à 20°C. Les coupes sont rincées en PBS.

Inhibition des peroxydases endogènes des coupes en laissant agir 20 minutes une solution contenant 10ml PBS, 3% BSA et 500 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 volume à raison de 150 $\mu$ l/coupe, puis rincer les en PBS.

Les échantillons sont révélés par le Kit Envision (Dako K4002), composé d'anticorps secondaires de chèvre anti Ac primaire de lapin qui sont couplés à la peroxydase. La réaction se déroule pendant 45 minutes, les coupes sont lavées en PBS.

Elles sont colorées par le substrat de l'enzyme, le diaminobenzidine (Dako K3468) pendant 2 minutes, puis sont rincées à l'eau courante 10 minutes.

Elles sont montées en milieu aqueux (Dako S3025) entre lame et lamelle puis séchées.

### **5) Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne**

La réaction de transcription inverse permet de synthétiser des brins d'ARN complémentaires monocaténares à partir des ARN messagers contenus dans la population d'ARN total. Cette réaction nécessite la présence d'oligonucléotides poly-T qui servent d'amorces pour la transcriptase inverse. Nous avons utilisé des oligonucléotides dT12 VN permettant une hybridation au début de la queue poly-A des ARN et non au hasard de cette queue. Le mélange suivant est réalisé dans un tube PCR de 200 $\mu$ l (Perkin-Elmer) :

- Oligonucléotides dT12 VN (30 $\mu$ M)            4 $\mu$ l
- dNTP (mélange équimolaire 10mM)        8 $\mu$ l

- tampon de synthèse du 1 <sup>er</sup> brin 5x	8 $\mu$ l
- BSA (1mg/ml)	4 $\mu$ l
- Rnase 2U/ $\mu$	1 $\mu$ l
- DTT 0,1 M	4 $\mu$ l
- ARN Total	1 $\mu$ g
- H2O stérile	qsp 39 $\mu$ l

La réaction se fait dans un thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer). Les échantillons sont chauffés à 70°C pendant 10 min. pour dénaturer l'ARN, puis à 42°C pendant 2 min. pour permettre aux amorces de s'hybrider. La transcriptase inverse (SuperScript II, GibcoBRL) est ajoutée à raison de 1 $\mu$ l par échantillon. La réaction est réalisée à 42°C pendant 40 min. Une phase d'incubation à 75°C pendant 15 min. permet de dénaturer la SuperScript. Un traitement à la RNase H (GibcoBRL) permet de dégrader les ARN dans les hétéroduplexes ADN/ARN.

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) amplifie un fragment d'ADN de façon exponentielle. Cette réaction est initiée avec des oligonucléotides qui sont spécifiques du gène étudié. Le mélange réactionnel est déposé dans un tube de 200 $\mu$ l calibré pour le thermocycler dans lequel nous effectuons la réaction. Afin de minimiser les risques d'erreur introduits lors des pipetages, les réactifs sont d'abord mélangés dans le même tube avant leur distribution. La matrice ADNc est ensuite ajoutée à chaque tube.

Mélange des réactifs :

• Tampon Taq 10x	5 $\mu$ l
• MgCl <sub>2</sub> 25mM	3 $\mu$ l
• dNTP 10mM	1 $\mu$ l
• Oligonucléotide sens 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l
• Oligonucléotide antisens 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l
• AmpliTaq DNA polymérase	0,5 $\mu$ l
• H2O stérile	qsp 50 $\mu$ l

Matrice ADNc 2 $\mu$ l

Une première étape à 94°C pendant 2 min dénature les structures secondaires de l'ADNc. La séquence PCR est la suivante :

- Dénaturation : 94°C, 30 sec : permet la séparation des brins d'ADN
- Hybridation : 30 sec : les amorces se fixent sur les séquences homologues. La température varie selon les oligonucléotides utilisés
- Elongation : 72°C, 30 sec : le brin d'ADN est synthétisé par la polymérase

Le choix du nombre de cycles dépend de la représentativité de la séquence à amplifier. Ainsi, un nombre de cycles élevé est nécessaire pour amplifier un gène faiblement exprimé. Pour chaque marqueur étudié, le nombre de cycles déterminé correspond à la phase exponentielle d'amplification.

Le magnésium est un co-facteur dans la réaction de PCR et la diminution de sa concentration évite une amplification non spécifique.

Cette technique de PCR ne permet pas de quantifier l'expression d'un gène mais de comparer entre plusieurs échantillons le niveau d'expression d'un gène donné. Nous établissons une normalisation par rapport à un gène de ménage, la GAPDH, dont l'expression est reconnue

stable dans les différentes conditions de culture des chondrocytes. Dans un premier temps, il faut déterminer les volumes de transcription inverse des divers échantillons qui vont générer des signaux d'intensité équivalents après coloration au BET du gel d'électrophorèse. Les mêmes volumes de transcription inverse sont ensuite analysés pour l'étude de l'expression des autres marqueurs.

### **III. Résultats**

#### **1. RT-PCR (figure 2)**

Le collagène de type II ainsi que l'agrécanne restent exprimés tout au long de la culture et par ailleurs l'expression du collagène de type I n'augmente pas. La MMP13 en revanche n'est pas exprimée attestant de l'absence de mise en route de collagénase dans le gel.

#### **2. Prolifération (figure 3)**

Les gels voient leur population cellulaire multipliée par 2 à J7 avant de décroître progressivement.

#### **3. Synthèse de sGAG (figure 4)**

Une synthèse progressive de sGAG est mise en évidence avec une multiplication par 5 entre J2 et J15.

#### **4. Histologie (figure 5)**

Au sein du gel, la répartition cellulaire apparaît homogène. En revanche, on note la présence d'une couronne cellulaire à l'interface gel/milieu nutritif.

La coloration en Safranine O met en évidence un dépôt de GAG qui débute à J6 localisé en bordure du gel. Ces dépôts augmentent progressivement jusqu'à J15 mais se répartissent de façon non homogène dans le gel. Par ailleurs, la morphologie cellulaire reste arrondie pendant toute la durée de l'étude.

#### **5. Immunohistochimie (figure 6)**

Des dépôts de collagène de type II sont visibles dès le 9<sup>ème</sup> jour de culture en périphérie des cellules. Ces dépôts augmentent au fil de la culture mais restent localisés dans les zones de forte densité cellulaire. L'utilisation d'anticorps anti collagène de type I n'a pas permis de

discriminer les dépôts de ce collagène de la matrice initiale (gel constitué de collagène natif de type I).

#### IV. Discussion

Le traitement des lésions cartilagineuses demeure un problème d'actualité en clinique. De nombreuses techniques ont été développées afin de réparer ces lésions : greffes ostéochondrales, greffes de périoste (2), transplantation de chondrocytes autologues (1, 16), ou de cellules souches (23). Néanmoins, ces méthodes ont montré leurs limites et le développement de nouveaux biomatériaux (alginate (10), acide hyaluronique (8), fibrine ...) *via* les techniques d'ingénierie tissulaire offrent de nouvelles et prometteuses perspectives. Parmi ces biomatériaux, les collagènes bien connus et largement utilisés sur le plan biomédical (9) peuvent également être utilisés comme support tridimensionnel à la culture cellulaire, sous forme d'éponges (17) ou de gels (4, 12, 15, 18, 19, 21), dans la perspective de la synthèse d'un nouveau tissu cartilagineux. La première implantation humaine de gels de collagène vient d'ailleurs d'être publiée récemment par une équipe Japonaise (14) avec des résultats intéressants. Vingt-six patients souffrant de lésions ostéochondrales ont été traités par implantation de gels de collagène contenant des chondrocytes autologues. Le protocole utilisé était superposable à celui de Brittberg (1) sauf la technique de culture cellulaire puisque les chondrocytes étaient cultivées en 3D en gels de collagène. A 2 ans de recul, tous les patients voyaient leur fonction articulaire améliorée (score de Lysholm). Le bilan arthroscopique montrait un cartilage de morphologie normale dans 93% des cas (selon la classification de l'ICRS International Cartilage Repair Society). L'évaluation biomécanique du transplant constatait une résistance mécanique superposable à celle du tissu cartilagineux environnant. Enfin, 2 biopsies effectuées (lors d'un geste thérapeutique associé) montraient la présence de collagène de type II au niveau du cartilage transplanté. Les auteurs concluaient à l'intérêt de cette nouvelle méthode d'ingénierie tissulaire pour la réparation des lésions cartilagineuses localisées du genou.

Nos résultats montrent que la culture en 3 dimensions de chondrocytes au sein de gels de collagène permet effectivement la construction d'une matrice extracellulaire et la conservation du phénotype chondrocytaire pendant la période de culture. En effet, l'expression des gènes pour le collagène de type II et l'agrécane est maintenue, il n'y a pas d'augmentation de l'expression du gène du collagène de type I et enfin la morphologie cellulaire reste arrondie. Des dépôts de sGAG et de collagène de type II ont été mis en évidence dans notre système. L'environnement 3D mimant l'organisation *in vivo* permet donc le maintien du phénotype chondrocytaire ce qui avait déjà été suggéré par d'autres études (6, 7, 12, 20, 22) mais n'avait pas été démontré sur le plan moléculaire par les techniques de RT-PCR. Ces résultats confirment donc l'intérêt des gels de collagène comme support cellulaire pour favoriser la synthèse d'une matrice extracellulaire proche du tissu cartilagineux en vue de son implantation dans les défauts cartilagineux.

La prolifération cellulaire reste néanmoins limitée dans ce système contrairement à la culture en monocouche, d'où l'intérêt de l'association de facteurs chimiques ou mécaniques à la culture. Du fait de la faible quantité de matériel recueillie (en clinique), certains auteurs préconisent d'ailleurs la multiplication préalable des chondrocytes en monocouche (donc la dédifférentiation des cellules) puis leur redifférentiation en culture 3D (5).

## V. Conclusion

Cette étude a démontré qu'il est possible de fabriquer *in vitro* du cartilage à partir de chondrocytes et d'une matrice collagène sous forme de gel sur /ou au sein de laquelle les cellules vont s'attacher, proliférer et synthétiser leur propre matrice extracellulaire. Notre système de culture permet le maintien du phénotype chondrocytaire et donc la synthèse d'un tissu cartilagineux très proche du cartilage hyalin articulaire tout en étant peu exigeant en nombre de cellules. Le néo-tissu ainsi produit pourra être - soit transplanté dans des défauts cartilagineux dans le dessein de réparer localement le cartilage - soit servir de modèle pour des études fondamentales sur la biologie du cartilage et pour des essais pharmacologiques en remplacement des modèles animaux actuellement utilisés.

L'utilisation de facteurs de croissance (3, 5, 11, 24), l'association d'acide hyaluronique (8) ou encore l'application de stimulations mécaniques ou physiques (13), devraient permettre d'améliorer encore ce modèle et donc de développer de nouvelles perspectives pour la réparation des lésions cartilagineuses.

## VI. Références

1. **Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L.** Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994; 331(14): 889-895.
2. **Carranza-Bencano A, Garcia-Paino L, Armas Padron JR, Cayuela Dominguez A.** Neochondrogenesis in repair of full-thickness articular cartilage defects using free autogenous periosteal grafts in the rabbit. A follow-up in six months. *Osteoarthritis Cartilage.* 2000 ;8(5):351-358.
3. **Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ.** Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br.* 2002 ;84(2):276-288.
4. **Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, Laser J, Schwartz RE.** Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions. *Clin Orthop.* 1999 ;(367 Suppl):S176-85.
5. **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(2):368-377.
6. **Katsube K, Ochi M, Uchio Y, Maniwa S, Matsusaki M, Tobita M, Iwasa J.** Repair of articular cartilage defects with cultured chondrocytes in Atelocollagen gel. Comparison with cultured chondrocytes in suspension. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2000;120(3-4):121-127.

7. **Kawamura S, Wakitani S, Kimura T, Maeda A, Caplan AI, Shino K, Ochi T.** Articular cartilage repair. Rabbit experiments with a collagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it. *Acta Orthop Scand.* 1998 ;69(1):56-62.
8. **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(2):142-148.
9. **Lee CH, Singla A, Lee Y.** Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm.* 2001 ; 221(1-2):1-22.
10. **Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, van der Veen SW, Hollander AP, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA.** Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2002 ;23(6):1511-1517.
11. **Matsusaki M, Ochi M, Uchio Y, Shu N, Kurioka H, Kawasaki K, Adachi N.** Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation and phenotype expression of chondrocytes embedded in collagen gel. *Gen Pharmacol.* 1998 ;31(5):759-764.
12. **Nishikori T, Ochi M, Uchio Y, Kataoka H, Maniwa S.** Effects of different embedding gels on periosteal chondrogenesis in vitro. *APMIS.* 2002 ;110(4):340-346.
13. **Nishikori T, Ochi M, Uchio Y, Maniwa S, Kataoka H, Kawasaki K, Katsube K, Kuriwaka M.** Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen gel. *J Biomed Mater Res.* 2002 ;59(2):201-206.
14. **Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J.** Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br.* 2002 ;84(4):571-578.
15. **Ochi M, Uchio Y, Tobita M, Kuriwaka M.** Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artif Organs.* 2001 ;25(3):172-179.
16. **Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A.** Two to 9 year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop.* 2000; 374:212-234.
17. **Roche S, Ronziere MC, Herbage D, Freyria AM.** Native and DPPA cross-linked collagen sponges seeded with fetal bovine epiphyseal chondrocytes used for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2001;22(1):9-18.
18. **Rudert M, Hirschmann F, Schulze M, Wirth CJ.** Bioartificial cartilage. *Cells Tissues Organs.* 2000;167(2-3):95-105.
19. **Sheu MT, Huang JC, Yeh GC, Ho HO.** Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. *Biomaterials.* 2001 ;22(13):1713-1719.

20. **Uchio Y, Ochi M, Matsusaki M, Kurioka H, Katsube K.** Human chondrocyte proliferation and matrix synthesis cultured in Atelocollagen gel. *J Biomed Mater Res.* 2000 ;50(2):138-143.
21. **van Susante JL, Buma P, van Osch GJ, Versleyen D, van der Kraan PM, van der Berg WB, Homminga GN.** Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthop Scand.* 1995 ;66(6):549-556.
22. **Wakitani S, Goto T, Young RG, Mansour JM, Goldberg VM, Caplan AI.** Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng.* 1998 ;4(4):429-444.
23. **Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M.** Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002 ; 10(3):199-206.
24. **Weiser L, Bhargava M, Attia E, Torzilli PA.** Effect of serum and platelet-derived growth factor on chondrocytes grown in collagen gels. *Tissue Eng.* 1999 ;5(6):533-544.

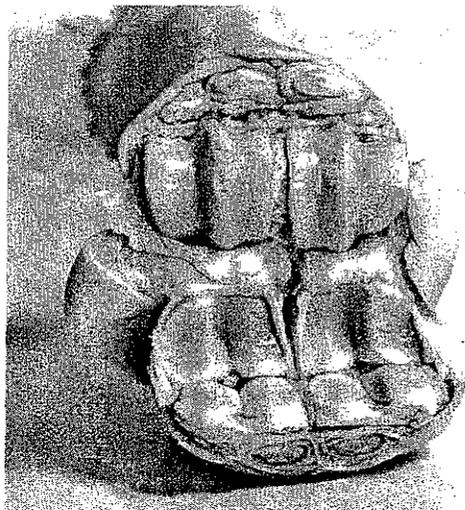


Figure 1. Articulation (ouverte) métatarso-phalangienne de pied de veau frais

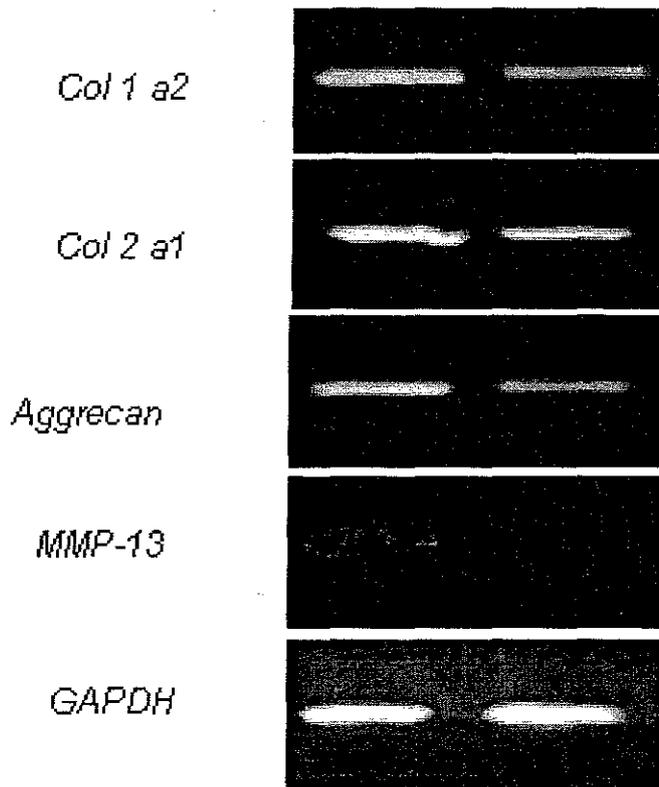


Figure 2. RT-PCR à J0 et J15. Maintien du phénotype chondrocytaire.

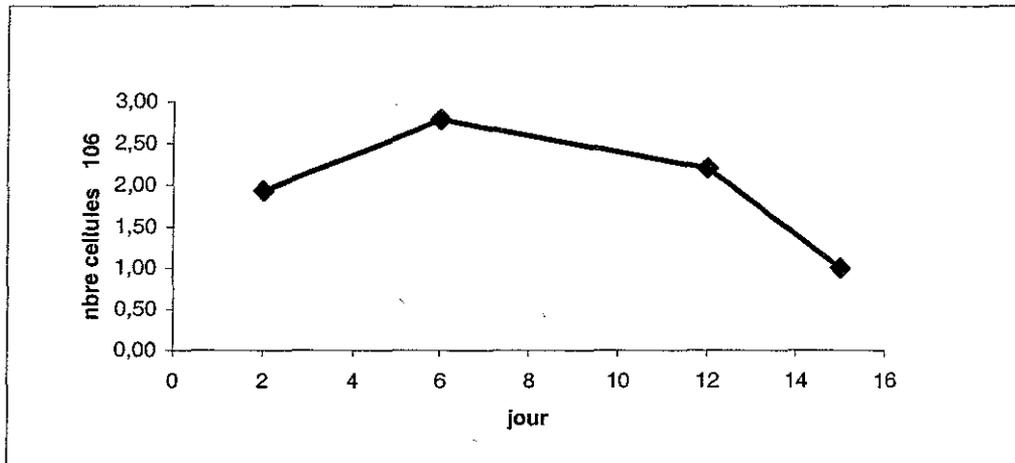


Figure 3. Courbe de prolifération cellulaire.

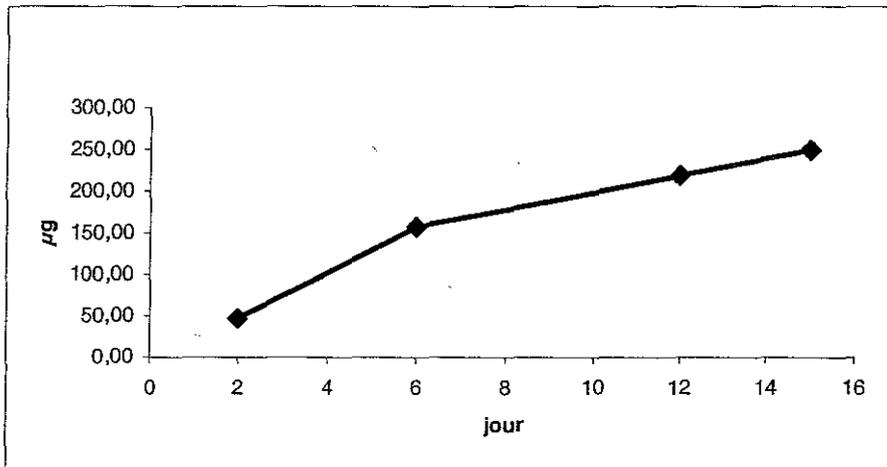


Figure 4. Dépôt de sGAG.



Figure 5. Microscopie optique x 40. Coloration en Safranine O. Les dépôts sont parfaitement visibles en bordure du gel. Noter la morphologie arrondie des cellules.



Figure 6. Microscopie optique x 40. Marquage collagène II. Les dépôts sont parfaitement visibles en périphérie des cellules.

## **IV- DISCUSSION**

Nous avons démontré le rôle arthrogène du modèle de section du LCA. Ainsi, 28 jours après l'intervention, une arthrose bien établie est constituée avec des lésions macroscopiques et histologiques caractéristiques : altérations de surface du cartilage avec fissures, réaction inflammatoire synoviale, modifications de la cellularité et altération de la matrice extracellulaire avec désorganisation des fibres de collagène et appauvrissement en protéoglycannes. L'apoptose chondrocytaire participe également activement à l'apparition des lésions cartilagineuses. Les études immunohistochimiques effectuées avec un anticorps anti-caspase3 mettent en évidence un pourcentage de cellules en apoptose non négligeable 7 jours après section du LCA et qui augmente progressivement jusqu'à 28 jours après la section pour atteindre 12 % de chondrocytes en apoptose (contre 1,5% chez le témoin). L'application d'un exercice calibré sur ce modèle permet de moduler les lésions histologiques observées. Ainsi, une activité physique modérée « protège » le cartilage des lésions engendrées par la section du LCA. Ce résultat est intéressant car la place de l'activité physique dans le développement d'une arthrose reste controversé. Si une activité physique modérée ne semble pas avoir d'impact négatif sur le cartilage articulaire, en revanche, il est démontré que la répétition de ces efforts et l'intensité de ceux-ci sont délétères [Pap, 1998 ; Saamanen, 1994]. En effet, les sports dits de contact (football, rugby) qui comportent de brusques changements de direction, favorisent à haut niveau le développement d'une arthrose. Il s'agit d'une arthrose préférentiellement fémoro-tibiale du moins au départ. D'autres sports comme l'athlétisme, la gymnastique ou encore l'haltérophilie favoriseraient plutôt la survenue de lésions dégénératives rotuliennes. Le risque de gonarthrose chez le sportif semble donc dépendre du niveau d'activité, du sport pratiqué et des accidents survenus au cours de cette pratique (contusions, lésions ménisco-ligamentaires). A l'opposé, l'immobilisation prolongée (par un plâtre ou une attelle) est également nocive pour le cartilage articulaire [Palmoski, 1979 ; Haapala, 1996].

L'activité physique modérée en revanche semble bénéfique pour prévenir les lésions arthrosiques en améliorant la composition du cartilage : augmentation de la teneur en protéoglycannes et de l'épaisseur du cartilage en particulier [Kiviranta, 1988]. Une étude clinique récente [Manninen, 2001] confirme cette tendance à la protection du cartilage par l'activité physique modérée.

Aucune étude à ce jour n'avait décrit les conséquences de l'activité physique sur les lésions du cartilage induites par la section du LCA chez le rat. Nous avons pu démontrer l'effet chondroprotecteur d'une activité physique modérée sur ce modèle. Le temps de course de 30

minutes par jour semble être le temps d'exercice idéal pour limiter au maximum la progression des lésions arthrosiques. Il s'accompagne d'une surexpression d'Hsp70 et d'une diminution des phénomènes apoptotiques. La surexpression d'Hsp70, protéine de choc thermique, a déjà été observée dans d'autres tissus (muscle strié, muscle cardiaque) après un exercice physique [Milne, 2002 ; Liu, 2000 ; Samelman, 2000]. La surexpression d'Hsp70 par la course exerce un effet chondroprotecteur vis à vis des lésions induites par la section du LCA. En revanche, un temps de course intense (1 heure/jour) abolit cet effet bénéfique et la surexpression d'Hsp70 comme s'il se produisait un phénomène d'épuisement ou d'échappement. Un certain degré d'aggravation des lésions histologiques est même observé. De la même façon, la diminution significative des lésions cartilagineuses avec un traitement répété par un inhibiteur du protéasome MG132 (induisant Hsp70) montre l'effet bénéfique sur le cartilage articulaire du MG132. La surexpression de la protéine Hsp70 dans les chondrocytes après 28 jours de traitement est corrélée avec la protection histologique obtenue et laisse penser que le MG132 agit de façon bénéfique en partie par l'intermédiaire de la synthèse d'Hsp70. L'effet chondroprotecteur observé pourrait être lié à un renforcement de la trame collagénique et à une limitation des contraintes mécaniques subies par le genou grâce au renforcement musculo-ligamentaire engendré par l'exercice [Lapvetelainen, 2001].

La concentration et le poids moléculaire du hyaluronate (HA) sont diminués dans l'arthrose. La supplémentation articulaire en HA ou viscosupplémentation apparaît donc logique sur le plan théorique. Son utilisation en clinique tend d'ailleurs à se développer compte tenu des résultats encourageants constatés dans la littérature. Néanmoins, son mécanisme d'action reste mal connu et plusieurs hypothèses sont avancées : stimulation de la production endogène de HA, action anti-inflammatoire directe sur le synoviocyte en bloquant la synthèse de PGE2 ou le relargage de l'acide arachidonique, effet analgésique direct sur les nocicepteurs articulaires, inhibition de l'effet délétère de certains radicaux libres [Moreland, 2003]. L'utilisation du HA dans le modèle de section du LCA s'est montrée tout à fait favorable sur le plan articulaire en limitant les lésions dégénératives engendrées par la section ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans la littérature [Schiavinato, 1989 ; Yoshioka, 1997 ; Shimizu 1998]. Cet effet favorable s'accompagne d'une diminution des phénomènes apoptotiques. Néanmoins, l'analyse de la synoviale après injection de HA met en évidence une hyperplasie de celle-ci avec hypercellularité, fibrose et angiogenèse. Ce phénomène pourrait expliquer certains cas de syndromes inflammatoires persistants publiés récemment après viscosupplémentation [Chen, 2002]. L'utilisation conjointe intra-articulaire du HA et du MG 132 pourrait s'avérer

intéressante pour limiter cette synovite, car aucune prolifération synoviale n'a été mise en évidence avec le MG132.

Concernant le traitement des lésions localisées, les techniques d'ingénierie tissulaire offrent des perspectives très intéressantes. Le collagène est utilisé depuis plus de 20 ans dans le domaine biomédical (cosmétologie, agents hémostatiques...) mais son utilisation dans le domaine de l'ingénierie du cartilage est récente. Pourtant, l'utilisation du collagène comme matrice 3D pour la culture de chondrocytes semble logique. Ainsi, nous avons choisi de développer la culture *in vitro* de chondrocytes en gels de collagène dans la perspective de réparation de lésions ostéochondrales. Les études récentes utilisant l'association de chondrocytes et de gels de collagène sont peu nombreuses et aucune étude sur le devenir du phénotype cellulaire au sein de ces matrices collagéniques n'a été publiée à ce jour. Nos résultats montrent que la différenciation de chondrocytes bovins cultivés au sein de gels de collagène est conservée tout au long de la culture et qu'une matrice extracellulaire se dépose progressivement avec la constitution d'un néocartilage. Une publication clinique récente utilisant cette technique pour réparer des lésions ostéochondrales localisées a montré des résultats encourageants [Ochi, 2002]. L'ajout de facteurs de croissance, l'adjonction d'autres biomatériaux (comme l'acide hyaluronique) ou encore l'application de stimulations mécanique (agitation) ou physique (ultra-sons) à la culture sont autant de pistes à explorer pour l'amélioration de la synthèse du néotissu.

## **V- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Le traitement des lésions cartilagineuses n'est pas univoque car il n'existe pas un type de lésion mais plusieurs et à des stades évolutifs différents. Les approches thérapeutiques se doivent donc d'être multiples. Ainsi, les lésions localisées le plus souvent ostéochondrales (post-traumatiques du sujet jeune en particulier) peuvent à l'heure actuelle relever soit d'une prise en charge chirurgicale classique (forages, abrasions, microfracture, mosaïcoplastie ...) soit des techniques d'ingénierie cellulaire (Brittberg) ou tissulaire en plein développement (à ce titre, les matrices collagéniques offrent des perspectives tout à fait prometteuses). Les autres voies de recherche dans le domaine de la réparation du cartilage concernent le choix des cellules (cellules autologues, cellules souches...), l'éventuel transfert de plasmides codant pour des facteurs bioactifs et l'amélioration de l'environnement matriciel.

Le traitement des lésions diffuses en revanche est plus difficile car il correspond au traitement de l'arthrose. Les thérapeutiques médicamenteuses classiques (antalgiques, anti-inflammatoires) sont limitées au traitement de la douleur et vouées à moyen terme à l'échec. Ces patients arthrosiques parfois trop jeunes (<50 ans) pour bénéficier d'une arthroplastie ne peuvent pas bénéficier jusqu'à présent de véritables thérapeutiques alternatives. Nos résultats laissent apparaître plusieurs perspectives. D'une part, le maintien d'une activité physique modérée permet de limiter l'apparition des lésions dégénératives articulaires et de limiter l'aggravation des lésions existantes. D'autre part, l'utilisation de la viscosupplémentation présente un intérêt évident dans les arthroses débutantes pour son effet chondroprotecteur. Enfin, l'obtention d'une surexpression d'Hsp70 par le chondrocyte au moyen des techniques de thérapie génique ou d'électroporation nécessite une attention toute particulière car les retombées dans le domaine ostéo-articulaire sont potentiellement très importantes. Ces différentes voies ne s'excluent d'ailleurs pas mutuellement. De nouvelles études seront nécessaires pour préciser la place et les indications de ces nouvelles thérapeutiques parmi l'arsenal thérapeutique existant.

Nous envisageons de poursuivre les applications de ce modèle de section du LCA en utilisant d'une part les techniques d'électroporation mises au point au laboratoire pour surexprimer Hsp70 sur ce modèle. D'autre part, l'utilisation conjointe du MG132 et du HA en intra-articulaire sur ce modèle permettra d'apprécier les conséquences de cette association sur le cartilage articulaire d'une part et sur la synoviale d'autre part. Enfin, nous souhaiterions initier un projet de recherche clinique sur l'utilisation des gels de collagène dans le traitement des lésions focales du cartilage qui semble une technique extrêmement prometteuse dans l'avenir.

## **VI- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

Abatangelo G, Botti P, Del Bue M, Gei G, Samson JC, Cortivo R, De Galateo A, Martelli M. Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. I. Biochemical results. *Clin Orthop* 1989;241:278-85.

Adams MA, Pelletier JP. Canine anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. In: Greewald RA, Diamond HS. *CRC Handbook of animal models for rheumatic diseases*, volIII, Boca Raton, CRC Press Inc, 1990:57-81.

Altman RD, Moskowitz R. Intraarticular sodium hyaluronate (Hyalgan) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial. Hyalgan Study Group. *J Rheumatol* 1998;25:2203-12.

Aragona F, D'Urso L, Marcolongo R. Immunologic aspects of bovine injectable collagen in humans. A review. *Eur Urol* 1998;33:129-33.

Armstrong S, Read R, Ghosh P. The effects of intraarticular hyaluronan on cartilage and subchondral bone changes in an ovine model of early osteoarthritis. *J Rheumatol* 1994;21:680-8.

Ashok BT, Kim E, Mittelman A, Tiwari RK. Proteasome inhibitors differentially affect heat shock protein response in cancer cells. *Int J Mol Med* 2001;8:385-90.

Aubin PP, Cheah HK, Davis AM, Gross AE. Long-term followup of fresh femoral osteochondral allografts for posttraumatic knee defects. *Clin Orthop* 2001;391 Suppl:S318-27.

Baker P, Coggon D, Reading I, Barrett D, McLaren M, Cooper C. Sports injury, occupational physical activity, joint laxity, and meniscal damage. *J Rheumatol* 2002;29:557-63.

Barrack RL, Bruckner JD, Kneisl J, Inman WS, Alexander AH. The outcome of nonoperatively treated complete tears of the anterior cruciate ligament in active young adults. *Clin Orthop* 1990; 259:192-9.

Beere HM, Green DR. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2001;11:6-10.

Behrens F, Kraft EL, Oegema TR Jr. Biochemical changes in articular cartilage after joint immobilization by casting or external fixation. *J Orthop Res* 1989;7:335-43.

Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J Rheumatol* 1988;15:1833-40.

Bennet GA, Bauer W. Joint changes resulting from patellar displacement and their relation to degenerative joint disease. *J Bone Surg* 1937;19:667.

- Bentley G. Experimental osteoarthritis. In "Normal and osteoarthritic articular cartilage". Ed. by Ali SY, Elves MW, Leaback DH, vol1, Institute of Orthopaedics Publ., London, 1974:259-280.
- Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 1992;8:365-93.
- Bert JM. Role of abrasion arthroplasty and debridement in the management of osteoarthritis of the knee. *Rheum Dis Clin North Am* 1993;19:725-39.
- Bertolami C, Currie R. Sodium hyaluronate for TMJ disorders. *Aust Dent J* 1995;40:399.
- Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 1998;41:284-9.
- Bobic V. Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions. *Orthopade* 1999;28:19-25.
- Boileau C, Martel-Pelletier J, Jouzeau JY, Netter P, Moldovan F, Laufer S, Tries S, Pelletier JP. Licofelone (ML-3000), a dual inhibitor of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase, reduces the level of cartilage chondrocyte death *in vivo* in experimental dog osteoarthritis: inhibition of pro-apoptotic factors. *J Rheumatol* 2002;29:1446-53.
- Boni M, Berlenda P, Lenzi L. Experimental production of arthritis by intra-articular injection of vitamin A in rabbits. In XII Congrès International de Rhumatologie, Prague, 1969
- Brandt KD. Osteoarthritis. *Clin Geriatr Med* 1988;4:279-93.
- Brandt KD, Myers SL, Burr D, Albrecht M. Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, subchondral bone, and synovium fifty-four months after transection of the anterior cruciate ligament. *Arthritis Rheum* 1991;34:1560-70.
- Brandt KD. Anti-inflammatory and analgesic treatment of osteoarthritis. *Rev Prat* 1996;46:S41-S47.
- Brandt KD. Animal models of osteoarthritis. *Biorheology* 2002;39:221-35.
- Brandt KD, Smith Jr GN, Myers SL, Mickler EA, Albrecht ME. Intra-articular injection of hyaluronan does not slow progression of osteoarthritis or increase vertical ground reaction forces in the cruciate-deficient dog. *Biorheology* 2003 (sous presse).
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:889-95.
- Brocq O, Tran G, Breuil V, Grisot C, Flory P, Euller-Ziegler L. Hip osteoarthritis: short-term efficacy and safety of viscosupplementation by hylan G-F 20. An open-label study in 22 patients. *Joint Bone Spine* 2002;69:388-91.

- Buckwalter JA, Rosenberg LC. Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. *Electron Microscop Rev* 1988;1:87-112.
- Buckwalter JA, Mow VC, Ratcliffe A. Restoration of Injured or Degenerated Articular Cartilage. *J Am Acad Orthop Surg* 1994;2:192-201.
- Buckwalter JA, Lane NE. Athletics and osteoarthritis. *Am J Sports Med* 1997;25:873-81.
- Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 1998;47:487-504.
- Cao Y, Rodriguez A, Vacanti M, Ibarra C, Arevalo C, Vacanti CA. Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9:475-87.
- Carranza-Bencano A, Garcia-Paino L, Armas Padron JR, Cayuela Dominguez A. Neochondrogenesis in repair of full-thickness articular cartilage defects using free autogenous periosteal grafts in the rabbit. A follow-up in six months. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:351-8.
- Chandra J, Niemer I, Gilbreath J, Kliche KO, Andreeff M, Freireich EJ, Keating M, McConkey DJ. Proteasome inhibitors induce apoptosis in glucocorticoid-resistant chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *Blood* 1998;92:4220-9.
- Chen AL, Desai P, Adler EM, Di Cesare PE. Granulomatous inflammation after Hylan G-F 20 viscosupplementation of the knee : a report of six cases. *J Bone Joint Surg [Am]* 2002;84:1142-7.
- Cheng Y, Macera CA, Davis DR, Ainsworth BE, Troped PJ, Blair SN. Physical activity and self-reported, physician-diagnosed osteoarthritis: is physical activity a risk factor? *J Clin Epidemiol* 2000;53:315-22.
- Chevalier X. Le cartilage articulaire normal de l'adulte. *Cahiers d'enseignement de la Sofcot* 1996;57:55-61.
- Christensen SB. Localization of bone-seeking agents in developing, experimentally induced osteoarthritis in the knee joint of the rabbit. *Scand J Rheumatol* 1983;12:343-9.
- Ciocca DR, Oesterreich S, Chamness GC, McGuire WL, Fuqua SA. Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1558-70.
- Clatworthy M, Amendola A. The anterior cruciate ligament and arthritis. *Clin Sports Med* 1999;18:173-98.
- Clyman B. Sports, exercise and arthritis. *Bull Rheum Dis* 2001;50:1-3.
- Convery FR, Meyers MH, Akeson WH. Fresh osteochondral allografting of the femoral condyle. *Clin Orthop* 1991;273:139-45.

- Cooper C, Coggon D. Physical activity and knee osteoarthritis. *Lancet* 1999;353:2177-8.
- Cournil-Henrionnet C. Potentialités chondroprotectrices d'Hsp70 vis à vis des phénomènes apoptotiques : études *in vitro* et *in vivo* chez le rat. Thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré Nancy I, 2003, 243 pages.
- 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;112:375-82.
- Culty M, O'Mara TE, Underhill CB, Yeager H Jr, Swartz RP. Hyaluronan receptor (CD44) expression and function in human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 1994;56:605-11.
- Dausse Y, Grossin L, Miralles G, Pelletier S, Mainard D, Hubert P, Baptiste D, Gillet P, Dellacherie E, Netter P, Payan E. Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:16-28.
- Davies NM, Gudde TW, de Leeuw MA. Celecoxib: a new option in the treatment of arthropathies and familial adenomatous polyposis. *Expert Opin Pharmacother* 2001;2:139-52.
- Dellacherie E, Hubert P, Pelletier S, Payan E, Netter P. Hyaluronates associatifs. *Brevet National Français* 1999 ; N°9907183.
- Derendorf H, Mollmann H, Gruner A, Haack D, Gyselby G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of glucocorticoid suspensions after intra-articular administration. *Clin Pharmacol Ther* 1986;39:313-7.
- Deyle GD, Henderson NE, Matekel RL, Ryder MG, Garber MB, Allison SC. Effectiveness of manual physical therapy and exercise in osteoarthritis of the knee. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2000;132:173-81.
- Dougados M, Nguyen M, Listrat V, Amor B. High molecular weight sodium hyaluronate (hyalectin) in osteoarthritis of the knee: a 1 year placebo-controlled trial. *Osteoarthritis Cartilage* 1993;1:97-103.
- Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, Herndon JH, Kang R, Bahnson AB, Barranger JA, Elders EM, Gay S, Tomaino MM, Wasko MC, Watkins SC, Whiteside TL, Glorioso JC, Lotze MT, Wright TM. Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther* 1996;7:1261-80.
- Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 1999;61:243-82.
- Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 1998;41:1343-55.

- Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Gene therapy for osteoarthritis: new perspectives for the twenty-first century. *Clin Orthop* 2000;379 Suppl:S262-72.
- Fetto JF, Marshall JL. The natural history and diagnosis of anterior cruciate ligament insufficiency. *Clin Orthop* 1980;147:29-38.
- FitzGerald O, Bresnihan B. Synovial membrane cellularity and vascularity. *Ann Rheum Dis* 1995;54:511-5.
- Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B. Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:824-9.
- Forrester JV, Balazs EA. Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology* 1980;40:435-46.
- Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg [Br]* 2002;84:276-88.
- Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel 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.
- Freemont AJ. The pathophysiology of cartilage and synovium. *Br J Rheumatol* 1996;35 Suppl 3:10-3.
- Frenkel SR, Di Cesare PE. Degradation and repair of articular cartilage. *Front Biosci* 1999 15;4:671-85.
- Frisbie DD, McIlwraith CW. Evaluation of gene therapy as a treatment for equine traumatic arthritis and osteoarthritis. *Clin Orthop* 2000;379 Suppl:S273-87.
- Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994;124:619-26.
- Frizziero L, Govoni E, Bacchini P. Intra-articular hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis of the knee: clinical and morphological study. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16:441-9.
- Gadher SJ, Woolley DE. Comparative studies of adherent rheumatoid synovial cells in primary culture: characterisation of the dendritic (stellate) cell. *Rheumatol Int* 1987;7:13-22.
- Galois L, Etienne S, Grossin L, Cournil C, Pinzano A, Netter P, Mainard D, Gillet P. Moderate-impact exercise is associated with decreased severity of experimental osteoarthritis in rats. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:692-3.
- Galois L, Hutasse S, Ronziere MC, Herbage D, Freyria AM. Cultures de chondrocytes en gel de collagène. Application à la bioingénierie du cartilage. *Actualités en Biomatériaux*, Vol VII, Sous la Direction de D. Mainard, Editions Romillat, Paris (sous presse).

Gedeon P, Mazieres B, Ficat P. A new model of experimental arthrosis: contusion of the cartilage. Experimental and clinical study. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1978;45:401-8.

Gegout-Pottie P, Philippe L, Simonin MA, Guingamp C, Gillet P, Netter P, Terlain B. Biotelemetry: an original approach to experimental models of inflammation. *Inflamm Res* 1999;48:417-24.

Georgopoulos C, Welch WJ. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* 1993;9:601-34.

Ghosh P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and chondroprotection. A review of the evidence. *Drugs* 1993;46:834-46.

Ghosh P, Holbert C, Read R, Armstrong S. Hyaluronic acid (hyaluronan) in experimental osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 1995;43:155-7.

Gill TJ. The treatment of articular cartilage defects using microfracture and debridement. *Am J Knee Surg* 2000;13:33-40.

Gouze JN, Gouze E, Palmer GD, Liew VS, Pascher A, Betz OB, Thornhill TS, Evans CH, Grodzinsky AJ, Ghivizzani SC. A comparative study of the inhibitory effects of interleukin-1 receptor antagonist following administration as a recombinant protein or by gene transfer. *Arthritis Res Ther* 2003;5:301-9.

Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, Laser J, Schwartz RE. Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions. *Clin Orthop* 1999;367:S176-85.

Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. *In situ* detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995;21:1465-8.

Gritzka TL, Fry LR, Cheesman RL, LaVigne A. Deterioration of articular cartilage caused by continuous compression in a moving rabbit joint. A light and electron microscopic study. *J Bone Joint Surg [Am]* 1973;55:1698-720.

Grogan SP, Aklin B, Frenz M, Brunner T, Schaffner T, Mainil-Varlet P. *In vitro* model for the study of necrosis and apoptosis in native cartilage. *J Pathol* 2002;198:5-13.

Grossin L, Cournil-Henrionnet C, Liagre B, Mir L, Dumas D, Etienne S, Loeuille D, Netter P, Gillet P. Electric gene transfert of Hsp 70 in rat patella protects *in vivo* from iodoacetate induced chondrotoxicity. *Arthritis Rheum* 2002;46(Suppl 9):S221 (Abstract 513).

Grossin L, Cournil-Henrionnet C, Mir LM, Liagre B, Dumas D, Etienne S, Guingamp C, Netter P, Gillet P. Direct gene transfer into rat articular cartilage by *in vivo* electroporation. *FASEB J* 2003;17:829-35.

Gu Z, Wu Q, Zhang Y, Zhang Z, Sun K. Visco-supplementation therapy in internal derangement of temporomandibular joint. *Chin Med J (Engl)* 1998;111:656-9.

Guarda-Nardini L, Tito R, Staffieri A, Beltrame A. Treatment of patients with arthrosis of the temporomandibular joint by infiltration of sodium hyaluronate: a preliminary study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2002;259:279-84.

Guidolin DD, Ronchetti IP, Lini E, Guerra D, Frizziero L. Morphological analysis of articular cartilage biopsies from a randomized, clinical study comparing the effects of 500-730 kDa sodium hyaluronate (Hyalgan) and methylprednisolone acetate on primary osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis cartilage* 2001;9:371-81.

Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, Terlain B, Netter P, Gillet P. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum* 1997;40:1670-9.

Haapala J, Lammi MJ, Inkinen R, Parkkinen JJ, Agren UM, Arokoski J, Kiviranta I, Helminen HJ, Tammi MI. Coordinated regulation of hyaluronan and aggrecan content in the articular cartilage of immobilized and exercised dogs. *J Rheumatol* 1996;23:1586-93.

Haldeman KO. The healing of joint fractures. Clinical and experimental study. *J Bone Joint Surg* 1938;20:1912.

Hamerman D. The biology of osteoarthritis. *N Engl J Med* 1989;320:1322-30.

Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bely M. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics* 1998 ;21:751-6.

Hannan MT, Felson DT, Anderson JJ, Naimark A. Habitual physical activity is not associated with knee osteoarthritis: the Framingham Study. *J Rheumatol* 1993;20:704-9.

Hardingham T, Bayliss M. Proteoglycans of articular cartilage: changes in aging and in joint disease. *Semin Arthritis Rheum* 1990;20:12-33.

Hardingham TE, Muir H. The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Biochim Biophys Acta* 1972;279:401-5.

Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1632-8.

Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coûtts RD, Lotz M. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1266-74.

Homandberg GA, Meyers R, Williams JM. Intraarticular injection of fibronectin fragments causes severe depletion of cartilage proteoglycans *in vivo*. *J Rheumatol* 1993;20:1378-82.

Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PS, van der Linden AJ. Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg [Br]* 1990;72:1003-7.

Huang MH, Lin YS, Yang RC, Lee CL. A comparison of various therapeutic exercises on the functional status of patients with knee osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2003;32:398-406.

Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report. *Acta Orthop Scand* 1970;41:522-30.

Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:432-63.

Huskiison EC, Donnelly S. Hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:602-7.

Iwata H. Pharmacologic and clinical aspects of intraarticular injection of hyaluronate. *Clin Orthop* 1993;289:285-91.

Jakob RP, Franz T, Gautier E, Mainil-Varlet P. Autologous osteochondral grafting in the knee: indication, results, and reflections. *Clin Orthop* 2002;401:170-84.

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;99:51-8.

Johnson RG. Transection of the canine anterior cruciate ligament: a concise review of experience with this model of degenerative joint disease. *Exp Pathol* 1986;30:209-13.

Johnson RJ, Beynon BD, Nichols CE, Renstrom PA. The treatment of injuries of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg [Am]* 1992;74:140-51.

Jouzeau JY, Gillet P, Netter P. Interest of animal models in the preclinical screening of anti-osteoarthritic drugs. *Joint Bone Spine* 2000;67:565-9.

Kaab MJ, Ito K, Clark JM, Notzli HP. The acute structural changes of loaded articular cartilage following meniscectomy or ACL-transection. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:464-73.

Kaarniranta K, Elo M, Sironen R, Lammi MJ, Goldring MB, Eriksson JE, Sistonen L, Helminen HJ. Hsp70 accumulation in chondrocytic cells exposed to high continuous hydrostatic pressure coincides with mRNA stabilization rather than transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2319-24.

Kaarniranta K, Holmberg CI, Lammi MJ, Eriksson JE, Sistonen L, Helminen HJ. Primary chondrocytes resist hydrostatic pressure-induced stress while primary synovial cells and fibroblasts show modified Hsp70 response. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:7-13.

Kabakov AE, Budagova KR, Latchman DS, Kampinga HH. Stressful preconditioning and HSP70 overexpression attenuate proteotoxicity of cellular ATP depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C521-34.

Kalbhen DA, Blum U. Hypothesis and experimental confirmation of a new pharmacological model of osteoarthrosis. *Arzneimittelforschung* 1977;27:527-31.

Katsube K, Ochi M, Uchio Y, Maniwa S, Matsusaki M, Tobita M, Iwasa J. Repair of articular cartilage defects with cultured chondrocytes in Atelocollagen gel. Comparison with cultured chondrocytes in suspension. *Arch Orthop Trauma Surg* 2000;120:121-7.

Kawamura S, Wakitani S, Kimura T, Maeda A, Caplan AI, Shino K, Ochi T. Articular cartilage repair. Rabbit experiments with a collagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it. *Acta Orthop Scand* 1998;69:56-62.

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;179:142-8.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.

Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 1998;80:183-201.

Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 1998;16:224-30.

Kim SH, Kim S, Evans CH, Ghivizzani SC, Oligino T, Robbins PD. Effective treatment of established murine collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express IL-4. *J Immunol* 2001;166:3499-505.

Kim SH, Lechman ER, Kim S, Nash J, Oligino TJ, Robbins PD. *Ex vivo* gene delivery of IL-1Ra and soluble TNF receptor confers a distal synergistic therapeutic effect in antigen-induced arthritis. *Mol Ther* 2002;6:591-600.

Kiviranta I, Tammi M, Jurvelin J, Saamanen AM, Helminen HJ. Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs. *J Orthop Res* 1988;6:188-95.

Klopper PJ. Collagen in surgical research. *Eur Surg Res* 1986;18:218-23.

Kobayashi K, Amiel M, Harwood FL, Healey RM, Sonoda M, Moriya H, Amiel D. The long-term effects of hyaluronan during development of osteoarthritis following partial meniscectomy in a rabbit model. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:359-65.

Konradsen LA, Hansen EM, Sondergaard L. Arthrosis of the lower limb and running. *Ugeskr Laeger* 1990;152:3697-9.

Konradsen L, Hansen EM, Sondergaard L. Long distance running and osteoarthritis. *Am J Sports Med* 1990;18:379-81.

Kouri JB, Rosales-Encina JL, Chaudhuri PP, Luna J, Mena R. Apoptosis in human osteoarthritic cartilage : a microscopy report. *Med Sci Res* 1997 :245-48.

Kouri-Flores JB, Abbud-Lozoya KA, Roja-Morales L. Kinetics of the ultrastructural changes in apoptotic chondrocytes from an osteoarthritis rat model: a window of comparison to the cellular mechanism of apoptosis in human chondrocytes. *Ultrastruct Pathol* 2002;26:33-40.

Kubo T, Arai Y, Takahashi K, Ikeda T, Ohashi S, Kitajima I, Mazda O, Takigawa M, Imanishi J, Hirasawa Y. Expression of transduced Hsp70 gene protects chondrocytes from stress. *J Rheumatol* 2001;28:330-5.

Kubo T, Towle CA, Mankin HJ, Treadwell BV. Stress-induced proteins in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1985;28:1140-5.

Kuettner KE, Aydelotte MB, Thonar EJ. Articular cartilage matrix and structure: a minireview. *J Rheumatol Suppl* 1991;27:46-8.

Kuo SY, Chu SJ, Hsu CM, Chen CM, Chang ML, Chang DM. An experimental model of osteoarthritis in rabbit. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1994;54:377-81.

Lane NE, Buckwalter JA. Exercise: a cause of osteoarthritis? *Rheum Dis Clin North Am* 1993;19:617-33.

Lane NE, Michel B, Bjorkengren A, Oehlert J, Shi H, Bloch DA, Fries JF. The risk of osteoarthritis with running and aging: a 5-year longitudinal study. *J Rheumatol* 1993;20:461-8.

Lane NE. Physical activity at leisure and risk of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1996;55:682-4.

Lane NE, Oehlert JW, Bloch DA, Fries JF. The relationship of running to osteoarthritis of the knee and hip and bone mineral density of the lumbar spine: a 9-year longitudinal study. *J Rheumatol* 1998;25:334-41.

Lane NE, Buckwalter JA. Exercise and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1999;11:413-6.

Lapvetelainen T, Hyttinen M, Lindblom J, Langsjo TK, Sironen R, Li SW, Arita M, Prockop DJ, Puustjarvi K, Helminen HJ. More knee joint osteoarthritis in mice after inactivation of one allele of type II procollagen gene but less OA after lifelong voluntary wheel running exercise. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:152-60.

Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 2001;221:1-22.

Lequesne MG. The algofunctional indices for hip and knee osteoarthritis. *J Rheumatol* 1997;24:779-81.

Lequesne M, Dang N, Peyron JG. Joint overuse in sports and arthrosis. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1989;56:163-7.

Lesquene MG, Dang N, Lane NE. Sport practice and osteoarthritis of the limbs. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:75-86.

Lievensse AM, Bierma-Zeinstra SM, Verhagen AP, van Baar ME, Verhaar JA, Koes BW. Influence of obesity on the development of osteoarthritis of the hip: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:1155-62.

Linsenmayer TF, Eavey RD, Schmid TM. Type X collagen: a hypertrophic cartilage-specific molecule. *Pathol Immunopathol Res* 1988;7:14-9.

Listrat V, Ayrat X, Patarnello F, Bonvarlet JP, Simonnet J, Amor B, Dougados M. Arthroscopic evaluation of potential structure modifying activity of hyaluronan (Hyalgan) in osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:153-60.

Little CB, Ghosh P, Rose R. The effect of strenuous versus moderate exercise on the metabolism of proteoglycans in articular cartilage from different weight-bearing regions of the equine third carpal bone. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:161-72.

Liu Y, Lormes W, Baur C, Opitz-Gress A, Altenburg D, Lehmann M, Steinacker JM. Human skeletal muscle Hsp70 response to physical training depends on exercise intensity. *Int J Sports Med* 2000;21:351-5.

Lozoya KA, Flores JB. A novel rat osteoarthritis model to assess apoptosis and matrix degradation. *Pathol Res Pract* 2000;196:729-45.

Maheu E, Mazieres B, Valat JP, Loyau G, Le Loet X, Bourgeois P, Grouin JM, Rozenberg S. Symptomatic efficacy of avocado/soybean unsaponifiables in the treatment of osteoarthritis of the knee and hip: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial with a six-month treatment period and a two-month followup demonstrating a persistent effect. *Arthritis Rheum* 1998;41:81-91.

Makarov SS, Olsen JC, Johnston WN, Anderle SK, Brown RR, Baldwin AS Jr, Haskill JS, Schwab JH. Suppression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin 1 receptor antagonist cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:402-6.

Mallein-Gerin F, Ruggiero F, Quinn TM, Bard F, Grodzinsky AJ, Olsen BR, van der Rest M. Analysis of collagen synthesis and assembly in culture by immortalized mouse chondrocytes in the presence or absence of alpha1(IX) collagen chains. *Exp Cell Res* 1995;219:257-65.

Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg [Am]* 1971;53:523-37.

Manninen P, Riihimaki H, Heliovaara M, Suomalainen O. Physical exercise and risk of severe knee osteoarthritis requiring arthroplasty. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:432-7.

Marcelino J, McDevitt CA. Attachment of articular cartilage chondrocytes to the tissue form of type VI collagen. *Biochim Biophys Acta* 1995;1249:180-8.

March L, Irwig L, Schwarz J, Simpson J, Chock C, Brooks P. n of 1 trials comparing a non-steroidal anti-inflammatory drug with paracetamol in osteoarthritis. *BMJ* 1994;309:1041-5.

Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, van der Veen SW, Hollander AP, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA. Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2002;23:1511-7.

Marshall KW, Chan AD. Arthroscopic anterior cruciate ligament transection induces canine osteoarthritis. *J Rheumatol* 1996;23:338-43.

Matsuo M, Nishida K, Yoshida A, Murakami T, Inoue H. Expression of caspase-3 and -9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med Okayama* 2001;55:333-40.

Matsusaki M, Ochi M, Uchio Y, Shu N, Kurioka H, Kawasaki K, Adachi N. Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation and phenotype expression of chondrocytes embedded in collagen gel. *Gen Pharmacol* 1998;31:759-64.

Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy* 1993;9:318-21.

Matsusue Y, Kotake T, Nakagawa Y, Nakamura T. Arthroscopic osteochondral autograft transplantation for chondral lesion of the tibial plateau of the knee. *Arthroscopy* 2001;17:653-9.

Mazieres B, Blanckaert A, Thiechart M. Experimental post-contusive osteoarthritis of the knee: quantitative microscopic study of the patella and the femoral condyles. *J Rheumatol* 1987;14:119-21.

Mazieres B, Vignon E. Les arthroses expérimentales. In : Simon L, Loyau G. *L'arthrose : Perspectives et réalités*. Paris, Masson, 1987;57-62.

McAlindon TE, Wilson PW, Aliabadi P, Weissman B, Felson DT. Level of physical activity and the risk of radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in the elderly : the Framingham study. *Am J Med* 1999;106:151-7.

McCoy JP Jr, Schade WJ, Siegle RJ, Waldinger TP, Vanderveen EE, Swanson NA. Characterization of the humoral immune response to bovine collagen implants. *Arch Dermatol* 1985;121:990-4.

Meredith JE Jr, Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 1993;4:953-61.

Milne KJ, Noble EG. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. *J Appl Physiol* 2002;93:561-8.

Miralles G, Baudoin R, Dumas D, Baptiste D, Hubert P, Stoltz JF, Dellacherie E, Mainard D, Netter P, Payan E. Sodium alginate sponges with or without sodium hyaluronate: *in vitro* engineering of cartilage. *J Biomed Mater Res* 2001;57:268-78.

Miyata T, Taira T, Noishiki Y. Collagen engineering for biomaterial use. *Clin Mater* 1992;9:139-48.

Modl JM, Sether LA, Haughton VM, Kneeland JB. Articular cartilage: correlation of histologic zones with signal intensity at MR imaging. *Radiology* 1991;181:853-5.

Moldovan F, Pelletier JP, Jolicoeur FC, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Diacerhein and rhein reduce the ICE-induced IL-1beta and IL-18 activation in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:186-96.

Mollenhauer J, Bee JA, Lizarbe MA, von der Mark K. Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. *J Cell Biol* 1984;98:1572-9.

Moreland LW. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther* 2003;5:54-67.

Mosca JD, Hendricks JK, Buyaner D, Davis-Sproul J, Chuang LC, Majumdar MK, Chopra R, Barry F, Murphy M, Thiede MA, Junker U, Rigg RJ, Forestell SP, Bohnlein E, Storb R, Sandmaier BM. Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Clin Orthop* 2000;379 Suppl:S71-90.

Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, Martens M, Baker J, Mayor M, Burstein AH, Frankel VH. Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. *Arthritis Rheum* 1973;16:397-405.

Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000;20:7146-59.

Muir H, Hardingham T. Cartilage matrix biochemistry. *Textbook of rheumatic disease* 1986 (Jt, S, Ed), Livingstone, Edinbourg, Churchill, 177-198.

Murray DG. Experimentally induced arthritis using intra-articular papaine. *Arthritis Rheum* 1964;7:211-9.

Murray RC, Whitton RC, Vedi S, Goodship AE, Lekeux P. The effect of training on the calcified zone of equine middle carpal articular cartilage. *Equine Vet J Suppl* 1999;30:274-8.

Murray RC, Zhu CF, Goodship AE, Lakhani KH, Agrawal CM, Athanasiou KA. Exercise affects the mechanical properties and histological appearance of equine articular cartilage. *J Orthop Res* 1999;17:725-31.

Myers SL, Brandt KD, O'Connor BL, Visco DM, Albrecht ME. Synovitis and osteoarthritic changes in canine articular cartilage after anterior cruciate ligament transection. Effect of surgical hemostasis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1406-15.

Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Shortkroff S, Young G, Minas T, Sledge CB, Yannas IV, Spector M. Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. *J Biomed Mater Res* 1997;38:95-104.

Nishikori T, Ochi M, Uchio Y, Kataoka H, Maniwa S. Effects of different embedding gels on periosteal chondrogenesis in vitro. *APMIS* 2002;110:340-6.

Nishikori T, Ochi M, Uchio Y, Maniwa S, Kataoka H, Kawasaki K, Katsube K, Kuriwaka M. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen gel. *J Biomed Mater Res* 2002;59:201-6.

Nutall ME, Lee D, McLaughlin B, Erhardt JA. Selective inhibitors of apoptotic caspases: implications for novel therapeutic strategies. *Drug Discov Today* 2001;6:85-91.

Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg [Br]* 2002;84:571-8.

Ochi M, Uchio Y, Tobita M, Kuriwaka M. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artif Organs* 2001;25:172-9.

O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg [Am]* 1986;68:1017-35.

Okuyama R, Honda M, Fujiya H, Goto K, Sugiura T, Akema T. Expression of heat shock protein 72 in rat quadriceps muscles following anterior cruciate ligament resection. *J Orthop Sci* 2003;8:213-7.

Otterness IG, Eskra JD, Bliven ML, Shay AK, Pelletier JP, Milici AJ. Exercise protects against articular cartilage degeneration in the hamster. *Arthritis Rheum* 1998;41:2068-76.

Palmoski M, Perricone E, Brandt KD. Development and reversal of a proteoglycan aggregation defect in normal canine knee cartilage after immobilization. *Arthritis Rheum* 1979;22:4310-22.

Panush RS. Does exercise cause arthritis? Long-term consequences of exercise on the musculoskeletal system. *Rheum Dis Clin North Am* 1989;16:827-36.

Pap G, Eberhardt R, Stürmer I, Machner A, Schwarzberg H, Roessner A, Neumann W. Development of osteoarthritis in the knee joints of wistar rats after strenuous running exercise in a running wheel by intracranial self-stimulation. *Pathol Res Pract* 1998;194:41-7.

Pap T, Gay RE, Muller-Ladner U, Gay S. *Ex vivo* gene transfer in the years to come. *Arthritis Res* 2002;4:10-2.

Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:505-12.

Park KC, Kim DS, Choi HO, Kim KH, Chung JH, Eun HC, Lee JS, Seo JS. Overexpression of HSP70 prevents ultraviolet B-induced apoptosis of a human melanoma cell line. *Arch Dermatol Res* 2000;292:482-7.

Pasquali Ronchetti I, guerra D, Taparelli F, Boraldi F, Bergamini G, Mori G, Zizzi F, Frizziero L. Morphological analysis of knee synovial membrane biopsies from a randomized controlled clinical study comparing the effects of sodium hyaluronate (Hyalgan) and methylprednisolone acetate (Depomedrol) in osteoarthritis. *Rheumatology* 2001;40:158-69.

Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, Di Battista JA, Martel-Pelletier J. Reduced progression of experimental osteoarthritis *in vivo* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 1998;41:1275-86.

Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, Fernandes JC, Manning PT, Connor JR, Currie MG, Martel-Pelletier J. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis *in vivo*: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum* 2000;43:1290-9.

Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Protective effects of corticosteroids on cartilage lesions and osteophyte formation in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1989;32:181-93.

Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 2001;44:1237-47.

Pelletier JP, Mineau F, Faure MP, Martel-Pelletier J. Imbalance between the mechanisms of activation and inhibition of metalloproteases in the early lesions of experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1466-76.

Peterfy CG, Genant HK. Emerging applications of magnetic resonance imaging in the evaluation of articular cartilage. *Radiol Clin North Am* 1996;34:195-213.

Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* 2000;374:212-34.

Petite H, Rault I, Huc A, Menasche P, Herbage D. Use of the acyl azide method for cross-linking collagen-rich tissues such as pericardium. *J Biomed Mater Res* 1990;24:179-87.

Petite H, Frei V, Huc A, Herbage D. Use of diphenylphosphorylazide for cross-linking collagen-based biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1994;28:159-65.

Peyron JG. A new approach to the treatment of osteoarthritis: viscosupplementation. *Osteoarthritis Cartilage* 1993;1:85-7.

Peyron J, Stanescu V. Cartilage articulaire normal de l'adulte. Anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. *Encycl Med Chir (Paris) Appareil locomoteur* 1994;14-003-A-10.

Poeschla E, Corbeau P, Wong-Staal F. Development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11395-9.

- Polla BS, Bachelet M, Elia G, Santoro MG. Stress proteins in inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1998;851:75-85.
- Pond MJ, Nuki G. Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis* 1973; 32:387-8.
- Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;6: 99-104.
- Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:871-5.
- Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthritic knee joint . *J Bone Joint Surg [Br]* 1959; 41:618.
- Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP, Schloo B, Mooney D, Vacanti CA. Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994 ;23:49-53.
- Qi WN, Scully SP. Effect of type II collagen in chondrocyte response to TGF- $\beta$ 1 regulation *Exp Cell Res* 1998;241:142-150.
- Rannou F, Poiraudreau S, Revel M. Cartilage : from mechanobiology to physical therapy. *Ann Readaptation Med Phys* 2001;44:259-67.
- Rault I, Frei V, Herbage D, Abdul-Malak N, Huc A. Evaluation of different chemical methods for cross-linking collagen gel, films and sponges. *J Mater Sci, Mater med* 1996;7:215-21.
- Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 2001;3:839-43.
- Raynauld JP, Buckland-Wright C, Ward R, Choquette D, Haraoui B, Martel-Pelletier J, Uthman I, Khy V, Tremblay JL, Bertrand C, Pelletier JP. Safety and efficacy of long-term intraarticular steroid injections in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2003;48:370-7.
- Reimann I. Experimental osteoarthritis of the knee in rabbits induced by alteration of the load-bearing. *Acta Orthop Scand* 1973;44:496-504.
- de los Reyes GC, Koda RT, Lien EJ. Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey. *Prog Drug Res* 2000;55:81-103.
- Roche S, Ronziere MC, Herbage D, Freyria AM. Native and DPPA cross-linked collagen sponges seeded with fetal bovine epiphyseal chondrocytes used for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2001;22:9-18.
- Rochlitz CF. Gene therapy of cancer. *Drugs Today (Barc)* 2000 ;36:619-29.

Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994;78:761-71.

Romano G, Claudio PP, Kaiser HE, Giordano A. Recent advances, prospects and problems in designing new strategies for oligonucleotide and gene delivery in therapy. *In Vivo* 1998;12:59-67.

Ronziere MC, Roche S, Gouttenoire J, Demartean O, Herbage D, Freyria AM. Ascorbate modulation of bovine chondrocyte growth, matrix protein gene expression and synthesis in three-dimensional collagen sponges. *Biomaterials* 2003;24:851-61.

Roos H, Lindberg H, Gardsell P, Lohmander LS, Wingstrand H. The prevalence of gonarthrosis and its relation to meniscectomy in former soccer players. *Am J Sports Med* 1994;22:219-22.

Rudel T. Caspase inhibitors in prevention of apoptosis. *Herz* 1999;24:236-41.

Rudert M, Hirschmann F, Schulze M, Wirth CJ. Bioartificial cartilage. *Cells Tissues Organs* 2000;167:95-105.

Rudiger S, Buchberger A, Bukau B. Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol* 1997;4:342-9.

Rutishauser E, Taillard W. Articular ischemia in human and experimental pathology. The concept of vascular pannus. *Rev Chir Orthop* 1966;52:197-223.

Rydell N, Balazs EA. Effect of intra-articular injection of hyaluronic acid on the clinical symptoms of osteoarthritis and on granulation tissue formation. *Clin Orthop* 1971;80:25-32.

Saamanen AM, Tammi M, Jurvelin J, Kiviranta I, Helminen HJ. Proteoglycan alterations following immobilization and remobilization in the articular cartilage of young canine knee (stifle) joint. *J Orthop Res* 1990;8:863-73.

Saamanen AM, Kiviranta I, Jurvelin J, Helminen HJ, Tammi M. Proteoglycan and collagen alterations in canine knee articular cartilage following 20km daily running exercise for 15 weeks. *Connect Tissue Res* 1994;30:191-201.

Salter RB, Field P. The effect of continuous compression on living articular cartilage. *J Bone Surg* 1960;42 :31.

Salter RB, Gross A, Hall JH. Hydrocortisone arthropathy--an experimental investigation. *Can Med Assoc J* 1967;97:374-7.

Samelman TR. Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. *Exp Physiol* 2000;85:92-102.

Schiavinato A, Lini E, Guidolin D, Pezzoli G, Botti P, Martelli M, Cortivo R, De Galateo A, Abatangelo G. Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. II. Morphological findings. *Clin Orthop* 1989;241:286-99.

Schultz DR, Harrington WJ Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum* 2003;32:345-69.

Seradge H, Kutz JA, Kleinert HE, Lister GD, Wolff TW, Atasoy E. Perichondrial resurfacing arthroplasty in the hand. *J Hand Surg [Am]* 1984;9:880-6.

Shapiro F, Glimcher MJ. Induction of osteoarthritis in the rabbit knee joint. *Clin Orthop* 1980;147:287-95.

Sheu MT, Huang JC, Yeh GC, Ho HO. Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. *Biomaterials* 2001;22:1713-9.

Shibakawa A, Aoki H, Masuko-Hongo K, Kato T, Tanaka M, Nishioka K, Nakamura H. Presence of pannus-like tissue on osteoarthritic cartilage and its histological character. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:133-40.

Shimizu C, Kubo T, Hirasawa Y, Coûtts RD, Amiel D. Histomorphometric and biochemical effect of various hyaluronans on early osteoarthritis. *J Rheumatol* 1998;25:1813-9.

Shimizu C, Yoshioka M, Coûtts RD, Harwood FL, Kubo T, Hirasawa Y, Amiel D. Long-term effects of hyaluronan on experimental osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:1-9.

Shlopov BV, Lie WR, Mainardi CL, Cole AA, Chubinskaya S, Hasty KA. Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum* 1997;40:2065-74.

Shoji H, D'Ambrosia RD, Dabezies EJ, Taddonio RF, Pendergrass J, Gristina AG. Articular cartilage and subchondral bone changes in an experimental osteoarthritic model. *Surg Forum* 1978;29:554-6.

Smith MM, Ghosh P. The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. *Rheumatol Int* 1987;7:113-22.

Smith GN Jr, Myers SL, Brandt KD, Mickler EA. Effect of intraarticular hyaluronan injection in experimental canine osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:976-85.

Sommarin Y, Larsson T, Heinegard D. Chondrocyte-matrix interactions. Attachment to proteins isolated from cartilage. *Exp Cell Res* 1989;184:181-92.

Sommerlath KG, Gillquist J. The effect of anterior cruciate ligament resection and immediate or delayed implantation of a meniscus prosthesis on knee joint biomechanics and cartilage. An experimental study in rabbits. *Clin Orthop* 1993;289:267-75.

Song XY, Gu M, Jin WW, Klinman DM, Wahl SM. Plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 suppresses chronic disease in a streptococcal cell wall-induced arthritis model. *J Clin Invest* 1998;101:2615-21.

Spector TD, Harris PA, Hart DJ, Cicuttini FM, Nandra D, Etherington J, Wolman RL, Doyle DV. Risk of osteoarthritis associated with long-term weight-bearing sports: a radiologic survey of the hips and knees in female ex-athletes and population controls. *Arthritis Rheum* 1996;39:988-95.

Speer DP, Chvapil M, Eskelson CD, Ulreich J. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1980;14:753-64.

Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK. Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation, and outcomes. *J Knee Surg* 2002;15:170-6.

Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop* 2001;391:S362-9.

Stefanelli C, Bonavita F, Stanic I, Pignatti C, Farruggia G, Masotti L, Guarnieri C, Calderera CM. Inhibition of etoposide-induced apoptosis with peptide aldehyde inhibitors of proteasome. *Biochem J* 1998;332:661-5.

Stockwell RA. The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. *J Anat* 1971;109:411-21.

Stoop R, Buma P, van der Kraan PM, Hollander AP, Clark Billinghamurst R, Robin Poole A, van den Berg WB. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum* 2000;43:2121-31.

Stoop R, Buma P, van der Kraan PM, Hollander AP, Clark Billinghamurst R, Meijers THM, Poole AR, van den berg WB. Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. *Osteoarthritis and Cartilage* 2001;9:308-15.

Sturmer T, Brenner H, Brenner RE, Gunther KP. Non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) and patterns of osteoarthritis. The Ulm osteoarthritis study. *Scand J Rheumatol* 2001;30:169-71.

Sundy JS. COX-2 inhibitors in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2001;3:86-91.

Takahashi K, Kubo T, Goomer RS, Amiel D, Kobayashi K, Imanishi J, Teshima R, Hirasawa Y. Analysis of heat shock proteins and cytokines expressed during early stages of osteoarthritis in a mouse model. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:321-9.

Takasu N. Experimental study on the effect of forced running on occurrence of osteoarthritis in the knee of C 57 BL mice. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1992;66:1165-75.

Tanaka K. Molecular biology of proteasomes. *Mol Biol Rep* 1995;21:21-6.

Terauchi R, Takahashi KA, Arai Y, Ikeda T, Ohashi S, Imanishi J, Mazda O, Kubo T. Hsp70 prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2003;48:1562-8.

Thaxer RH, Mann RA, Anderson CG. Degeneration of immobilized knee joints on rats. *J Bone Joint Surg* 1965;47:567.

Thumboo J, Chew LH, Lewin-Koh SC. Socioeconomic and psychosocial factors influence pain or physical function in Asian patients with knee or hip osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:1017-20.

Tiffée JC, Griffin JP, Cooper LF. Immunolocalization of stress proteins and extracellular matrix proteins in the rat tibia. *Tissue Cell* 2000;32:141-7.

Trattinig S. Overuse of hyaline cartilage and imaging. *Eur J Radiol* 1997;25:188-98.

Uchio Y, Ochi M, Matsusaki M, Kurioka H, Katsube K. Human chondrocyte proliferation and matrix synthesis cultured in Atelocollagen gel. *J Biomed Mater Res* 2000;50:138-43.

Vacanti CA, Upton J. Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin Plast Surg* 1994;21:445-62.

van Baar ME, Assendelft WJ, Dekker J, Oostendorp RA, Bijlsma JW. Effectiveness of exercise therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee: a systematic review of randomized clinical trials. *Arthritis Rheum* 1999;42:1361-9.

van de Lest CHA, Brama PAJ, van Weeren PR. The influence of exercise on the composition of developing equine joints. *Biorheology* 2002;39:183-91.

van den Berg WB. Lessons from animal models of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:452-6.

van der Kraan PM, Vitters EL, van Beuningen HM, van de Putte LB, van den Berg WB. Degenerative knee joint lesions in mice after a single intra-articular collagenase injection. A new model of osteoarthritis. *J Exp Pathol (Oxford)* 1990;71:19-31.

van Susante JL, Buma P, van Osch GJ, Versleyen D, van der Kraan PM, van der Berg WB, Homminga GN. Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthop Scand* 1995;66:549-56.

Vane JR, Botting RM. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm Res* 1998;47 Suppl 2:S78-87.

Vignon E, Bejui J, Hartmann DJ, Ville G, Vial B, Mathieu P. Quantitative study of experimental osteoarthritic lesions in the rabbit. Value for the study of anti-osteoarthritis drugs. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1986;53:649-52.

Vignon E, Bejui J, Mathieu P, Hartmann JD, Ville G, Evreux JC, Descotes J. Histological cartilage changes in a rabbit model of osteoarthritis. *J Rheumatol* 1987;14:104-6.

Vignon E, Mathieu P, Bejui J, Descotes J, Hartmann D, Patricot LM, Richard M. Study of an inhibitor of plasminogen activator (tranexamic acid) in the treatment of experimental osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl.* 1991;27:131-3.

Vingard E, Alfredsson L, Malchau H. Osteoarthritis of the hip in women and its relationship to physical load from sports activities. *Am J Sports Med* 1998;26:78-82.

Von Muhlen D, Morton D, Von Muhlen CA, Barrett-Connor E. Postmenopausal estrogen and increased risk of clinical osteoarthritis at the hip, hand, and knee in older women. *J Womens Health Gen Based Med* 2002;11:511-8.

Wakitani S, Goto T, Young RG, Mansour JM, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng* 1998;4:429-44.

Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:199-206.

Waldschmidt JG, Rilling RJ, Kajdacsy-Balla AA, Boynton MD, Erickson SJ. In vitro and in vivo MR imaging of hyaline cartilage: zonal anatomy, imaging pitfalls, and pathologic conditions. *Radiographics* 1997;17:1387-402.

Walsh RC, Koukoulas I, Garnham A, Moseley PL, Hargreaves M, Febbraio MA. Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Cell Stress Chaperones* 2001;6:386-93.

Weadock K, Olson RM, Silver FH. Evaluation of collagen crosslinking techniques. *Biomater Med Dev Artif Organ* 1984;11:293-318.

Weiser L, Bhargava M, Attia E, Torzilli PA. Effect of serum and platelet-derived growth factor on chondrocytes grown in collagen gels. *Tissue Eng* 1999;5:533-44.

Weiss C, Mirow S. An ultrastructural study of osteoarthritis changes in the articular cartilage of human knees. *J Bone Joint Surg [Am]* 1972;54:954-72.

Weissman B, Cashman DC, Santiago R. Concerted action of beta-glucuronidase and beta-acetylglucosaminidase on hyaluronodextrins. *Connect Tissue Res* 1975;3:7-15.

Wigren A, Wik O, Falk J. Repeated intraarticular implantation of hyaluronic acid. An experimental study in normal and immobilized adult rabbit knee joints. *Ups J Med Sci Suppl* 1975;17:1-20.

Williams JM, Felten DL, Peterson RG, O'Connor BL. Effects of surgically induced instability on rat knee articular cartilage. *J Anat* 1982;134:103-9.

Williams JM, Brandt KD. Triamcinolone hexacetonide protects against fibrillation and osteophyte formation following chemically induced articular cartilage damage. *Arthritis Rheum* 1985;28:1267-74.

Woods JM, Katschke KJ, Volin MV, Ruth JH, Woodruff DC, Amin MA, Connors MA, Kurata H, Arai K, Haines GK, Kumar P, Koch AE. IL-4 adenoviral gene therapy reduces inflammation, proinflammatory cytokines, vascularization, and bony destruction in rat adjuvant-induced arthritis. *J Immunol* 2001;166:1214-22.

Ye J, Haro H, Takahashi M, Kuroda H, Shinomiya K. Induction of apoptosis of articular chondrocytes and suppression of articular cartilage proteoglycan synthesis by heat shock. *J Orthop Sci* 2003;8:387-95.

Yoo CG, Lee S, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS. Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization of I kappa B alpha through preventing I kappa B kinase activation in respiratory epithelial cells. *J Cell Physiol* 2003;197:94-102.

Yoshimi T, Kikuchi T, Obara T, Yamaguchi T, Sakakibara Y, Itoh H, Iwata H, Miura T. Effects of high-molecular-weight sodium hyaluronate on experimental osteoarthritis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. *Clin Orthop* 1994;298:296-304.

Yoshioka M, Coûtts RD, Amiel D, Hacker SA. Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage* 1996;4:87-98.

Yoshioka M, Shimizu C, Harwood FL, Coûtts RD, Amiel D. The effects of hyaluronan during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:251-60.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993;75:641-52.

Zahir A, Freeman AR. Cartilage changes following a single episode of infarction of the capital femoral epiphysis in the dog. *J Bone Joint Surg [Am]* 1972;54:125-36.

Zhang HG, Xie J, Yang P, Wang Y, Xu L, Liu D, Hsu HC, Zhou T, Edwards CK 3rd, Mountz JD. Adeno-associated virus production of soluble tumor necrosis factor receptor neutralizes tumor necrosis factor alpha and reduces arthritis. *Hum Gene Ther* 2000 ;11:2431-42.

Zhang L, Rabussy DP. Clinical evaluation of safety and human tolerance of electrical sensation induced by electric fields with non-invasive electrodes. *Bioelectrochem* 2002;56:233-36.

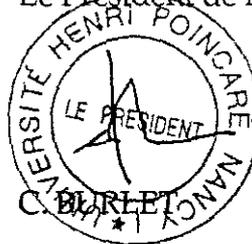
Nom : Mr GALOIS  
Prénom : Laurent

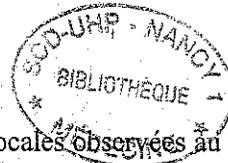
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1  
en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT  
Spécialité : BIOINGÉNIERIE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N° 905

Nancy, le 29 décembre 2003

Le Président de l'Université





Les lésions du cartilage peuvent être divisées en lésions focales observées au décours de traumatismes articulaires ou lors d'ostéochondrites disséquantes et en lésions étendues diffuses présentes dans l'arthrose.

Dans un premier temps, nous avons développé un modèle d'arthrose par section du ligament croisé antérieur (LCA) chez le rat. Ce modèle dit mécanique par opposition au modèle structural a été caractérisé sur le plan histologique et immunohistochimique. Il reproduit les lésions d'arthrose observées en clinique et s'avère donc un modèle particulièrement intéressant. Nous avons ensuite étudié l'influence de différents paramètres sur ce modèle : effort, injection intra-articulaire d'un inhibiteur du protéasome et injection intra-articulaire d'acide hyaluronique. Le lien entre activité physique et arthrose est controversé dans la littérature mais il semble que l'intensité de l'effort soit l'un des facteurs prédominants dans la survenue ou non des lésions cartilagineuses. Nous avons ainsi pu démontrer qu'une activité physique modérée permettait de limiter les lésions cartilagineuses après section du LCA. Cette action bénéfique semble liée à la surexpression d'Hsp70 et à la diminution des phénomènes apoptotiques. L'injection d'un inhibiteur du protéasome, le MG 132, est capable également de diminuer la sévérité des lésions histologiques provoquées par la section du LCA, *via* l'induction de la protéine Hsp70. Enfin, nous avons démontré l'effet bénéfique de la viscosupplémentation sur les lésions cartilagineuses de notre modèle. Dans une seconde approche, nous avons développé *in vitro* une technique de culture de chondrocytes en 3 dimensions au sein de gels de collagène afin de synthétiser un néocartilage. Nos résultats démontrent la faisabilité de cette technique, sa reproductibilité tout en maintenant le phénotype chondrocytaire. Elle pourrait représenter une alternative à la technique classique dite de Brittberg dans les années à venir.

Nos résultats montrent au total d'une part l'intérêt de la surexpression de la protéine Hsp70 pour obtenir un effet chondroprotecteur et prévenir ou limiter les lésions arthrosiques et d'autre part les possibilités de réparation des lésions ostéochondrales localisées par la culture chondrocytaire en gels de collagène *in vitro*.

---

#### **Experimental osteoarthritis and cartilage engineering**

---

Cartilage lesions can be divided into focal defects caused by trauma or osteochondritis and into diffuse lesions caused by osteoarthritis (OA). To study the kinetics of degeneration of the articular cartilage during OA, we investigated the clinical and histological events during the early phases of experimental, mechanically-induced OA in the rat induced by anterior cruciate ligament transection (ACLT). The lesions developed in this model are similar to those observed in clinics. In a second step we investigated the influence of several parameters on the course of the model: calibrated effort, intra-articular injection of a proteasome inhibitor (MG 132) and intra-articular injection of hyaluronate.

The relationship between sport and osteoarthritis is still debated in the literature but the intensity of physical activities seems to be one of the most important factor in the development of OA. We demonstrated in our study that a moderate exercise can limit the severity of chondral lesions after ACLT, in part *via* an overexpression of an anti-apoptotic factor, Hsp70. We also demonstrated the chondroprotective effect of a proteasome inhibitor MG 132 and of hyaluronate in our model. In a second step, we developed the culture of primary bovine chondrocytes in collagen gels for cartilage engineering. Our results suggest that primary bovine chondrocytes cultured in collagen gel grew in 3 dimensions, accumulating an extra cellular matrix while maintaining their phenotype during 2-week culture periods. In summary, the chondroprotective effect *via* an over expression of Hsp70 seems to be useful to prevent cartilage damages and OA. Tissue engineering using collagen gel scaffolds constitutes a new approach to treat cartilage defects.

---

**Discipline:** Bioingénierie

---

**Mots clés :** cartilage – arthrose – exercice - ingénierie tissulaire

---

**Intitulé et adresse du laboratoire:** Laboratoire de Pharmacologie. UMR 7561 CNRS. Faculté de Médecine. 54505 Vandoeuvre-Lès-Nancy