



**HAL**  
open science

# Étude des potentialités chondrogéniques des cellules souches mésenchymateuses, caractérisation et suivi en IRM du biomatériau fonctionnalisé

Émilie Roeder

► **To cite this version:**

Émilie Roeder. Étude des potentialités chondrogéniques des cellules souches mésenchymateuses, caractérisation et suivi en IRM du biomatériau fonctionnalisé. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0046 . tel-01750748

**HAL Id: tel-01750748**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750748>**

Submitted on 14 Jan 2020

**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>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie – Santé – Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de La Santé »

Par Emilie ROEDER

**ETUDE DES POTENTIALITES CHONDROGENIQUES DES CELLULES  
SOUCHES MESENCHYMATEUSES, CARACTERISATION ET SUIVI EN IRM DU  
BIOMATERIAU FONCTIONNALISE**

Le 26 Mai 2014

Membres du jury :

***Rapporteurs***

Mme Véronique MIGONNEY, Professeure,  
UMR 7244 CNRS-Paris XIII,  
Laboratoire de Chimie, Structures,  
Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques (CSPBAT), Villetaneuse,  
Université Paris XIII, Paris Nord

M. Hervé PETITE, Directeur de Recherche,  
UMR 7052 CNRS-Paris Diderot  
Laboratoire de Bioingénierie et Biomécanique Ostéo-articulaires (B2OA), Université  
Paris Diderot, Paris 7

***Examineurs***

M. Pierre GILLET, Professeur,  
Directeur de Thèse  
UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine  
Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMOPA),  
Biopôle, Faculté de Médecine, VANDŒUVRE LES NANCY

Mme Astrid PINZANO, Chargée de Recherche,  
Co-Directeure de Thèse  
UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine  
Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMOPA),  
Biopôle, Faculté de Médecine, VANDŒUVRE LES NANCY

M. OLIVIER BEUF, Directeur de Recherche,  
Creatis, UMR CNRS 5220, Inserm U1044, Université de Lyon, INSA Lyon,  
VILLEURBANNE

M. Jacques FELBLINGER, Professeur,  
Imagerie Adaptative Diagnostique Interventionnelle, INSERM U947,  
CHU Nancy, VANDŒUVRE-LÈS-NANCY

***Laboratoire où a été réalisée la thèse :***

UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, "Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire" (IMoPA)  
Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus biologie-santé, Faculté de Médecine, Avenue de la forêt de Haye,  
CS 50184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France



Le présent travail a été effectué au sein de l'équipe « Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Vectorisation, Imagerie » de l'UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine « Ingénierie Moléculaire et Pharmacologie Articulaires » (IMoPA) de la Faculté de Médecine de Nancy.

Je remercie Monsieur Jean-Yves JOUZEAU, directeur d'IMoPA, pour son accueil au sein du laboratoire.

Je tiens à remercier vivement Monsieur Jacques MAGDALOU, précédent directeur de l'UMR 7561 CNRS-UHP, Nancy I « Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaires », de m'avoir accordé sa confiance en me donnant la possibilité de réaliser ma thèse au laboratoire. Je tiens à lui témoigner ma gratitude pour son soutien, ses conseils et sa gentillesse ainsi que mon profond respect.

J'adresse mes vifs remerciements et mon profond respect à Monsieur Pierre GILLET pour son aide, son encadrement, ses conseils scientifiques, son soutien et sa disponibilité ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ces années.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Astrid PINZANO pour son aide précieuse, son encadrement remarquable, ses conseils avisés, sa rigueur, sa gentillesse et son soutien au quotidien. Je lui suis également extrêmement reconnaissante pour la confiance qu'elle m'a témoignée durant ma thèse. Je lui exprime ma sincère gratitude et mon profond respect.

Je remercie chaleureusement Madame Christel HENRIONNET pour m'avoir formée aux différentes techniques qui m'ont permis de réaliser ce travail, sa contribution à une partie de ce travail, son soutien au quotidien en particulier durant la rédaction de ce manuscrit et sa gentillesse.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Madame Valérie MIGONNEY, membre de mon comité de thèse, et Monsieur Hervé PETITE d'avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse mes remerciements à Messieurs Olivier BEUF et Denis GRENIER du laboratoire CREATIS-LRMN, UMR 5220 CNRS, Inserm U1044 de Villeurbanne et Jean-Christophe GOEBEL pour leur collaboration dans l'évaluation de nos biomatériaux *in vitro* et *in vivo* en IRM haut champs dans le cadre du projet ANR Blanc CEMABIR ANR-09-BLAN-0150-01.

Je tiens à remercier tout particulièrement, Monsieur Jacques FELBLINGER, Directeur du IADI et du CIC-IT, membre de mon comité de thèse, pour nous avoir permis d'obtenir des vacances IRM, pour ses conseils avisés, sa disponibilité, ses explications sur le principe de l'IRM et ses applications ainsi que pour sa patience.

Merci également à Madame Marine BEAUMONT, Monsieur Pierre-André VUISSOZ et Madame Bailiang CHEN pour leur collaboration dans le travail de visualisation de nos biomatériaux *in vitro* en IRM clinique, leur collaboration pour l'évaluation du cartilage par cartographie T2 et cartographie du tenseur de diffusion *ex vivo* chez le porc.

Une attention toute particulière à nos collègues orthopédistes (COT), Messieurs Didier MAINARD et Laurent GALOIS, et biologistes (UTCT), Monsieur Jean François STOLTZ et Madame Danièle BENSOUSSAN, sans lesquels la partie clinique de ce travail (CSM) n'aurait pas été possible.

Je souhaite également remercier l'ANR (Agence Nationale pour la Recherche) pour le financement d'une partie de ces travaux concernant la caractérisation par IRM d'un implant fonctionnalisé à base de cellules souches sur un imageur haut champ (7 Teslas) *in vitro* et *in vivo* : *Projet ANR Blanc CEMABIR ANR-09-BLAN-0150-01 "Cartilage Engineering and MRI : Assessment of Biointegration and Biofunctionality in the Rat"*

Je ne peux oublier de remercier tout particulièrement Alice, Caroline, Lydia, Mathieu, Mostapha et Nick, pour leur sympathie et la bonne humeur dans laquelle nous avons travaillé depuis notre arrivée au Biopôle.

Bien qu'extérieurs au laboratoire, je tiens à remercier mes amis Claire, Jérôme et leur petit Elliott, Justine et Andréas de m'avoir apporté leur soutien et d'avoir supporté certaines contraintes d'une thèse et pour leur amitié tout simplement.

Je dédie cette thèse

A mes parents,

A ma sœur Catherine, à Laurent et à ma grand-mère,

Qu'ils voient en ce travail toute ma reconnaissance pour leur patience, leur soutien et leur amour.





## Liste des abréviations

3D : trois dimensions

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

bFGF-2 : basic Fibroblastic Growth Factor – 2

B<sub>0</sub> : champ magnétique principal

B<sub>1</sub> : champ magnétique appliqué

BA : Bleu Alcian

BMP : Bone Morphogenic Protein

C4S : Chondroïtine-4-Sulfate

C6S : Chondroïtine-6-Sulfate

CMF : Cytométrie en Flux

Col2 : Collagène de type II

COMP : Cartilage Oligomeric Matrix Protein

CSM : Cellules souches Mésoenchymateuses

CSSs : Cellules souches Synoviales

dGEMRIC : Delayed Contrast-Enhanced MRI of Cartilage

DMB : Dimethyl methylene blue

D-PBS : Phosphate Buffered Saline

EDTA : Acide Ethylène-Diamino-Tétra-Acétique

FCD : Densité de charges fixées

FNa : Fluorure de Sodium (<sup>18</sup>F)

FOV : Field of view

GAGs : Glycoaminoglycannes sulfatés

Gd-DTPA : gadolinium diéthylène-triamine-penta-acetic acid

GE ou GRE : Echo de Gradient

HCl : Acide chlorhydrique

HES : Hématoxyline – Eosine – Safran

Hz : Hertz

IGF-1 : Insuline Growth Factor 1

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

ITS : Insuline – Transferrine – Sélénium

MEC : Matrice Extracellulaire

μTEP : Microtomographie par Emission de Positons

MIA : Monoiodoacétate

MMPs : Métalloprotéases

MO : Moelle Osseuse

NaOH : Hydroxyde de Sodium

NEX : Nombre d'excitation  
NO : Monoxyde d'Azote

PA : Phosphatase Alcaline  
PAD : Proline – Acide Ascorbique – Dexaméthasone  
PCL : Poly- $\epsilon$ -Caprolactone  
PEG : Poly-éthylèneglycol  
PGE<sub>2</sub> : Prostaglandine E<sub>2</sub>  
PLL : Poly-L-Lysine  
PVA : Alcool Poly-vinyle

RA : Rouge Alizarine  
Rapport S/B : Rapport Signal sur Bruit  
RF : Radiofréquence  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
ROI : Région d'intérêt (Region Of Interest)  
RS : Rouge Sirius

SE : Echo de Spin  
SPIO : Petites Particules d'Oxyde de Fer Superparamagnétiques

T : Tesla  
T1 : Temps de relaxation longitudinale  
T2 : temps de relaxation transversale  
TE : Temps d'Echo  
TEP : Tomographie par Emission de positons  
TEMP : Tomographie d'émission photonique  
TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor Beta  
TI : Temps d'Inversion  
TR : Temps de Répétition

v/v : Volume à volume

## SOMMAIRE

<b>I. Travaux issus de la thèse .....</b>	<b>11</b>
<b>A. Publications dans des revues à comité de lecture.....</b>	<b>11</b>
<b>B. Présentations dans les congrès avec actes publiés.....</b>	<b>11</b>
<b>C. Présentations dans les congrès sans actes publiés .....</b>	<b>12</b>
<b>D. Communications orales.....</b>	<b>12</b>
<b>II. Introduction .....</b>	<b>13</b>
<b>III. Etude bibliographique.....</b>	<b>15</b>
<b>A. Le cartilage hyalin .....</b>	<b>15</b>
1. Composition du cartilage.....	15
2. Structure et ultrastructure du cartilage .....	18
3. L'homéostasie du cartilage .....	20
<b>B. La membrane synoviale .....</b>	<b>20</b>
1. Fonction et structure .....	20
2. Les cellules.....	21
<b>C. Les lésions du cartilage.....</b>	<b>21</b>
1. Les lésions du cartilage.....	21
2. Les mécanismes de dégradation du cartilage.....	22
3. Traitements des lésions focales du cartilage articulaire.....	23
<b>D. L'ingénierie tissulaire du cartilage .....</b>	<b>26</b>
1. Les biomatériaux.....	26
2. Le contingent cellulaire .....	28
3. Induction de la chondrogenèse en ingénierie du cartilage .....	33
<b>E. Modèles expérimentaux en ingénierie du cartilage.....</b>	<b>36</b>
1. Les animaux de petite taille .....	37
2. Les animaux de grande taille .....	39
3. Choix de l'espèce .....	40
<b>F. Méthodes d'imagerie du cartilage.....</b>	<b>41</b>
1. La radiographie.....	41
2. Le scanner et l'arthroscanner.....	42
3. L'échographie .....	42
4. L'IRM.....	42
<b>G. L'IRM .....</b>	<b>43</b>
1. Généralités sur l'IRM .....	43
2. IRM du cartilage.....	49
<b>H. IRM morphologique et structurale du cartilage .....</b>	<b>50</b>
1. Etudes morphologiques .....	50
<b>I. Imagerie moléculaire et ingénierie .....</b>	<b>54</b>
1. Suivi <i>in vivo</i> des cellules souches par l'imagerie.....	54
2. Les agents de contraste en IRM .....	55
3. Marquage des CSM par des particules ferromagnétiques et suivi IRM .....	56
<b>IV. Travaux Réalisés.....</b>	<b>59</b>
<b>A. CSM et chondrogenèse: rôles du site, de l'expansion et de l'hypoxie .....</b>	<b>59</b>
1. Acquis de l'équipe.....	59
2. Objectifs de notre travail .....	59
3. Matériels et Méthodes.....	59
4. Résultats.....	64
5. Discussion.....	76
6. Conclusion .....	79
<b>B. Redifférenciation chondrocytaire: rôles de l'expansion et de l'hypoxie ....</b>	<b>81</b>
1. Objectifs.....	81
2. Matériels et méthodes.....	81

3. Résultats.....	85
4. Discussion.....	90
5. Conclusions.....	92
<b>C. Marquage des CSM et différenciation chondrogenique : suivi IRM .....</b>	<b>93</b>
1. Objectifs.....	93
2. Matériels et Méthodes.....	93
3. Résultats.....	98
4. Suivi <i>in vitro</i> par IRM 7T et 3T des CSM marquées .....	111
5. Discussion.....	117
6. Conclusion.....	120
<b>D. Implantation hétérotopique des biomatériaux (souris nude) .....</b>	<b>121</b>
1. Objectifs.....	121
2. Matériels et Méthodes.....	121
3. Résultats.....	122
4. Discussion.....	123
5. Conclusion.....	126
<b>E. Encapsulation en alginate des implants hétérotopiques (souris nude) ..</b>	<b>127</b>
1. Objectifs.....	127
2. Matériels et Méthodes.....	127
3. Résultats.....	128
4. Discussion.....	131
5. Conclusion.....	133
<b>F. Implantation du biomatériau en site articulaire (rat nude) .....</b>	<b>135</b>
1. Objectifs.....	135
2. Matériels et Méthodes.....	135
3. Résultats.....	137
4. Discussion.....	140
5. Conclusion.....	145
<b>V. Conclusions et perspectives .....</b>	<b>147</b>
A. Potentialités chondrogéniques des différentes CSM.....	148
B. Caractérisation <i>in vivo</i> de l'implant hétérotopique et orthotopique .....	149
C. Suivi IRM de l'implant <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	150
D. Conclusion générale .....	151
<b>VI. Références bibliographiques.....</b>	<b>153</b>
<b>VII. Annexes</b>	<b>185</b>

# I. TRAVAUX ISSUS DE LA THESE

## A. PUBLICATIONS DANS DES REVUES A COMITE DE LECTURE

**E. Roeder\***, C. Henrionnet\*, J.C. Goebel, N. Gambier, O. Beuf, D. Grenier, B. Chen, P.A. Vuissoz, P. Gillet, A. Pinzano.

*Dose-Response of superparamagnetic iron. Oxide labelling on Mesenchymal Stem Cells chondrogenic differentiation : a multi-scale in vitro study.*

*PLOS One, En révision.*

A.L. Perrier, J.C. Goebel, A. Pinzano, **E. Roeder**, P. Gillet, D. Grenier, O. Beuf.

*Design of a four-channel surface coil for high-resolution rat knee MR imaging : design without preamplifiers for the decoupling between elements.*

IEEE Sensors journal 2013, 13(6):2450-8

B. Chen\*, **E. Roeder\***, P.A. Vuissoz, P. Gillet, J. Felblinger, M. Beaumont, A. Pinzano.  
*Respective interest of T2 mapping and diffusion tensor imaging in assessing porcine knee cartilage with MR at 3 Teslas.*

Biomed Mater Eng 2013. 23(4):263-72.\*equal contribution

C. Henrionnet, Y. Wang, **E. Roeder**, N. Gambier, L. Galois, D. Mainard, D. Bensoussan, P. Gillet, A. Pinzano.

*Effect of dynamic loading on MSCs chondrogenic differentiation in 3D alginate culture.*

Biomed Mater Eng 2012, 22(4): 209-18.

C. Henrionnet, **E. Roeder**, R. Gillet, L. Galois, D. Bensoussan, D. Mainard, P. Netter, P. Gillet, A. Pinzano.

*Expression of chondrogenic genes by undifferentiated vs. differentiated human mesenchymal stem cells using array technology.*

Biomed Mater Eng 2010, 20(3):175-81.

## B. PRESENTATIONS DANS LES CONGRES AVEC ACTES PUBLIES

O. Beuf, J.C., Goebel, **E. Roeder**, A.L. Perrier, D. Grenier, P. Gillet, A. Pinzano. Bio-intégration assessment of rat knee cartilage repair using in vivo MRI at 7T.

ISMRM, Salt Lake City, 2013 (*Conférence*)

A.L. Perrier, J.C. Goebel, A. Pinzano, **E. Roeder**, P. Gillet, D. Grenier, O. Beuf. Design of a four-channel array coil for dual high-resolution rat knee MR imaging.

ISMRM, Salt Lake City, 2013 (*Conférence*)

J.C. Goebel, A.L. Perrier, D. Grenier, **E. Roeder**, C. Henrionnet, A. Pinzano, P. Gillet, O. Beuf.

*MRI contribution to physiopathology assessment in animals models of osteoarthritis.*

Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique, Grenoble 2011

Fundamental & Clinical Pharmacology 2011, 25 Suppl 1

C. Henrionnet, **E. Roeder**, J.C. Goebel, L. Galois, D. Bensoussan, D. Mainard, P. Netter, P. Gillet, A. Pinzano. Effects of superparamagnetic iron oxide labeling on chondrocyte

differentiation of mesenchymal stem cells in collagen sponge. Osteoarthritis Cartilage 2010: 18 Supplement: 2 Pages: S83-S83 (2010 World Congress on Osteoarthritis, Brussels, Belgium September 23 – 26, 2010..

## C. PRESENTATIONS DANS LES CONGRES SANS ACTES PUBLIES

C. Henrionnet, **E. Roeder**, R. Gillet, L. Galois, D. Bensoussan, D. Mainard, P. Netter, P. Gillet, A. Pinzano.

*Gene expression profile of undifferentiated and chondrogenic differentiated human mesenchymal stem cells using array technology.*

4ème journée du Pôle Lorrain d'Ingénierie du Cartilage, Nancy, 4-5 février 2010 (*Poster*)

C. Henrionnet, **E. Roeder**, R. Gillet, L. Galois, D. Bensoussan, D. Mainard, P. Netter, P. Gillet, A. Pinzano.

*Gene expression profile of undifferentiated and chondrogenic differentiated human mesenchymal stem cells using array technology.*

Congrès "Autour de la cellule", Bordeaux 17-19 Mars 2010. (*Poster*)

C. Henrionnet, **E. Roeder**, J.C. Goebel, C. Huselstein, L. Galois, D. Bensoussan, D. Mainard, P. Netter, P. Gillet, A. Pinzano.

*Différenciation chondrocytaire des cellules souches mésenchymateuses humaines dans des éponges de collagène.*

Congrès "Autour de la cellule", Bordeaux 17-19 Mars 2010. (*Poster*)

**E. Roeder**, C. Henrionnet, J.C. Goebel, O. Beuf, D. Grenier, L. Galois, P.A. Vuissoz, J. Magdalou, P. Gillet, A. Pinzano.

*Impact of superparamagnetic iron oxide labeling on chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells : a dose response.*

GDR de mécanotransduction. Ecole thématique "Biomécanique et Bioingénierie du Vieillissement des Tissus". Marrakech 26 Novembre – 3 Décembre 2011. (*Poster*)

## D. COMMUNICATIONS ORALES

**E. Roeder**, C. Henrionnet, J.C. Goebel, O. Beuf, D. Grenier, L. Galois, P.A. Vuissoz, J. Magdalou, P. Gillet, A. Pinzano.

*Influence du marquage par des particules ferromagnétiques sur la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses et visualisation en IRM.*

7<sup>e</sup> Journée Claude Huriet de la Recherche Biomédicale. Vandoeuvre-Les-Nancy 2 mars 2012.

**E. Roeder**, C. Henrionnet, P. Gillet, A. Pinzano.

*Ingénierie du cartilage: de la conception à l'imagerie.*

Journée du GDR de Mécanobiologie. Marseille, 30 septembre 2013.

## II. INTRODUCTION

La régénération du cartilage suite à une pathologie articulaire diffuse (arthrose) ou à une lésion focale (traumatisme) reste un objectif essentiel en orthopédie. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) paraissent de meilleures candidates que les chondrocytes autologues pour une thérapie cellulaire ciblée. Par ailleurs, un traitement complet de la lésion cartilagineuse doit conduire à un tissu cartilagineux viable, bio-fonctionnel et bio-intégré en site articulaire.

L’Imagerie par résonance magnétique (IRM) se profile, à ce titre, comme une excellente technique d’évaluation de ces paramètres. L’originalité du projet est de poser les bases méthodologiques pour la production d’implants cartilagineux, d’évaluer leur bio-fonctionnalité dans un modèle de greffe ectopique chez la souris *nude* et puis la bio-intégration par IRM (3T *ex vivo* ou 7T *ex vivo* et *in vivo*) en site lésionnel chez l’animal (rat *nude*). Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le CIC-IT dirigé par Jacques FELBLINGER à Nancy (3T) et en collaboration avec l’équipe d’Olivier BEUF au laboratoire Creatis-LRMN à Lyon (*modèle rat nude in vivo* à 7T dans le cadre du projet ANR Blanc CEMABIR ANR-09-BLAN-0150-01).

Les objectifs des travaux de recherche présentés dans ce manuscrit sont organisés en trois objectifs majeurs :

**Objectif 1 :** Nous avons étudié les capacités de différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses d’origine ostéomédullaire ou synoviale en fonction des paramètres (hypoxie, expansion) ou des suppléments de culture utilisés (TGF- $\beta$ 1) mais également les capacités de redifférenciation des chondrocytes après la phase d’expansion en monocouche.

**Objectif 2 :** Les CSM ostéomédullaires ont été également marquées par des particules de fer superparamagnétiques (SPIO) afin de suivre par IRM le devenir de ces cellules au sein du biomatériau implanté. Pour cela, il a été nécessaire d’étudier les paramètres requis afin d’obtenir un marquage efficace, durable et surtout n’ayant pas ou peu d’impact sur les données biologiques telles que la viabilité cellulaire et les capacités de différenciation chondrogénique. La morphologie du biomatériau colonisé, son contenu en protéoglycannes, l’organisation du tissu et la présence des particules de fer ont été évalués en histologie. Les taux d’expression des différents gènes d’intérêt du cartilage ont été déterminés par RT-PCRq. La persistance de ce marquage dans les biomatériaux fonctionnalisés a été évaluée en IRM à 3T et à 7T.

**Objectif 3 :** Après l’obtention des biomatériaux fonctionnalisés, la transplantation a été réalisée en sous-cutanée chez la souris *nude* et au niveau du condyle fémoral chez le rat *nude* (xénogreffes). Ensuite une caractérisation du tissu de réparation en site articulaire chez le rat *nude*, pour suivre l’intégration et le devenir du biomatériau *in situ*, a été réalisée quantitativement en IRM à 7T en utilisant des cartographies 3D T1 et T2. Toutes ces données ont été confrontées aux données macroscopiques et histologiques. Notre projet, poursuite de travaux menés *in vitro*, se propose d’être une avancée applicative dans le domaine de l’ingénierie articulaire.





### III. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

#### A. LE CARTILAGE HYALIN

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif non innervé et non vascularisé recouvrant les surfaces osseuses des articulations et est composé d'un seul type cellulaire, les chondrocytes et d'une matrice extracellulaire dense.

##### 1. Composition du cartilage

###### a) *Les chondrocytes*

Les chondrocytes, uniques cellules du cartilage, sont des cellules spécialisées et hautement différenciées et métaboliquement très actives jouant un rôle essentiel dans le développement, le maintien et la régénération de la matrice extracellulaire. Ils occupent approximativement 1 à 5% du volume du cartilage articulaire [1-2]. Dérivés des cellules souches mésenchymateuses, les chondrocytes diffèrent en forme, en nombre et en taille en fonction de la région du cartilage articulaire où ils se trouvent. Les chondrocytes de la région superficielle sont généralement plus plats et plus petits que les cellules des régions plus profondes [3]. Ils sont responsables de la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire du cartilage (MEC) dans laquelle ils sont enchâssés mais également de la détérioration de cette matrice par leur capacité à produire des enzymes permettant la dégradation des protéoglycannes et des collagènes, telles que les métalloprotéinases (MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9 et 13) ou les agrécannases (ADAMTS-1, 4, 5, 8, 9, 15, 16 et 18) [4].

###### b) *La matrice extracellulaire*

La matrice extracellulaire (MEC) est majoritairement constituée de molécules d'eau (65 à 80% du poids total du tissu), de collagène (10 à 30% du poids humide) et de protéoglycannes (5 à 10% du poids humide) [5, 6]. Quelques autres molécules minoritaires composent également la MEC comme des lipides, phospholipides, glycoprotéines et protéines non collagéniques.

###### (1) L'eau

L'eau est la composante majeure du cartilage articulaire. Sa teneur est d'approximativement 80% en surface et décroît jusqu'à 65% dans la zone profonde. Au sein de la matrice, les molécules d'eau sont sous forme libre ou liée aux protéoglycannes. Sous forme libre, elles permettent de véhiculer les nutriments et les déchets. Les molécules d'eau liées aux protéoglycannes forment une composante gélatineuse conférant au cartilage des propriétés élastiques lui permettant de résister aux contraintes compressives exercées sur l'articulation [7].

###### (2) Les collagènes

Le cartilage articulaire comprend un important réseau collagénique formant un maillage dense au sein duquel les chondrocytes sont piégés. Il contient différents types de collagènes : type II, VI, IX, X et XI dont les proportions et leurs rôles au sein de la MEC sont très variables. Ce réseau représente environ 60% du poids sec du cartilage.

### (3) Le collagène de type II

Le collagène de type II est la composante collagénique principale du cartilage hyalin. Il représente 90% à 95% des collagènes de la MEC du cartilage hyalin et forme des fibres et fibrilles entremêlées piégeant les protéoglycannes au sein de cette matrice. Il appartient au groupe des collagènes fibrillaires. La triple hélice du collagène de type II est composée de trois chaînes  $\alpha 1(\text{II})$  formant une molécule homotrimérique dont la taille et les propriétés biomécaniques sont semblables à celles du collagène de type I. Cependant, les chaînes constituant le collagène de type II sont plus riches en résidus hydroxylysine, glucosyl et galactosyl qui permettent des interactions avec les protéoglycannes, autres composants caractéristiques du cartilage hyalin. Deux formes de la chaîne  $\alpha 1(\text{II})$  proviennent de l'épissage alternatif des pré-ARNm du collagène de type II. Le variant IIB est prédominant dans le cartilage mature. Le second exon, codant pour un domaine globulaire riche en cystéines dans le pro-peptide N-terminal, est exclu alors qu'il est présent dans le variant IIA prépondérant dans le cartilage embryonnaire. Cette transition entre la forme IIA et IIB présume d'un rôle du collagène IIA durant le processus de développement alors que la forme IIB représente un marqueur spécifique du cartilage mature [8].

### (4) Le collagène de type VI

Le collagène de type VI est un constituant matriciel ubiquitaire, il est également présent dans le cartilage articulaire hyalin et représente moins de 1% de son contenu en collagènes. Cette protéine s'assemble en dimères et trimères riches en ponts disulfures et forme des microfibrilles perlées avec une périodicité de 110 nm. Ce réseau filamentueux se concentre autour des chondrocytes suggérant un rôle de ce type de collagène dans l'attachement des cellules aux structures avoisinantes. Il est important dans le développement du cartilage et dans le maintien de l'intégrité du micro-environnement cellulaire [9].

### (5) Le collagène de type IX

Il fait partie du groupe de collagènes appelé FACIT (Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple hélices). Il contient trois domaines hélicoïdaux (COL1, COL2, COL3) et quatre régions non collagéniques (NC1, NC2, NC3, NC4). Chaque molécule de collagène IX est composée de trois chaînes polypeptidiques codées par des gènes différents. La chaîne  $\alpha 1(\text{IX})$  comprend un volumineux domaine globulaire aminoterminal (NC4) de 266 résidus aminoacides. La chaîne  $\alpha 2(\text{IX})$  comporte une chaîne de glycosaminoglycannes (Chondroïtine-Sulfate et Dermatine-Sulfate) attachée à un domaine non hélicoïdal (NC3) localisé entre les domaines triple-hélice central (COL2) et terminal (COL3) [10]. La composition de la chaîne  $\alpha 3(\text{IX})$  demeure peu documentée dans la littérature. Le collagène IX est lié de manière covalente au peptide terminal du collagène II grâce à des interactions entre la triple hélice du collagène de type II et les domaines COL1 et COL2 du collagène IX [11-12].

### (6) Le collagène de type X

Ce type de collagène est présent dans le cartilage hypertrophique, est associé à la différenciation terminale des chondrocytes. Il a été préalablement isolé à partir de chondrocytes hypertrophiques de poulet [13] et est considéré dès lors comme un marqueur spécifique des chondrocytes hypertrophiques de la plaque de croissance, stade précédent l'ostéogenèse [14, 15]. Le collagène X est synthétisé et sécrété avant l'apparition de calcifications et interagit avec les fibrilles du collagène II au sein de la matrice extracellulaire [16, 17]. Sa synthèse est surrégulée dans les chondrocytes arthrosiques.

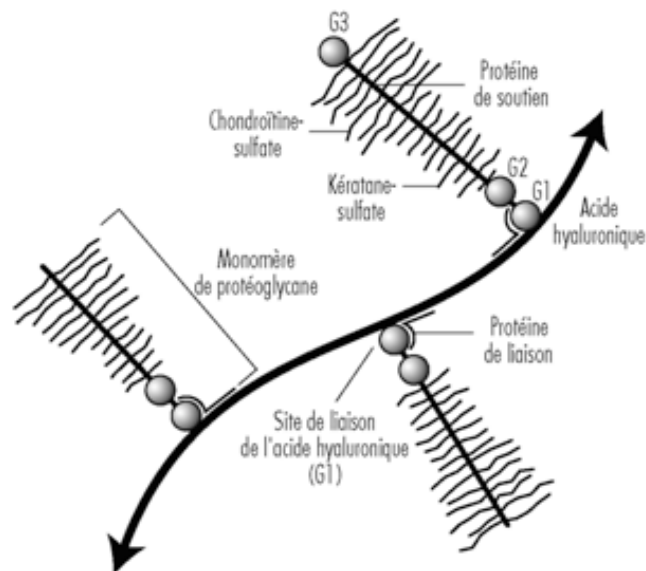
En ingénierie du cartilage, l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (CSM), dont la différenciation chondrogénique a été induite *in vitro*, est considérée comme une alternative thérapeutique d'avenir des lésions cartilagineuses. Il a été démontré que des CSM provenant d'un prélèvement de patient souffrant d'arthrose expriment le collagène X [18, 19], marqueur de l'hypertrophie des CSM différenciées. Ce collagène, normalement impliqué dans l'ossification endochondrale, est absent du cartilage hyalin. L'expression de ce marqueur par les chondrocytes ou les CSM différenciées est considérée comme le reflet d'un phénotype dégénératif. Cependant, il a également été prouvé que l'expression du collagène X pouvait être retrouvée durant la différenciation chondrogénique des CSM. A ce stade, il ne constitue pas un marqueur hypertrophique car il est exprimé en amont de l'expression du collagène II durant le processus de différenciation [20, 21].

#### (7) Le collagène de type XI

Il appartient au groupe des collagènes fibrillaires et est formé de trois chaînes différentes :  $\alpha 1(XI)$ ,  $\alpha 2(XI)$  et  $\alpha 3(XI)$ . Le collagène XI est localisé au cœur des fibrilles de collagène II et est impliqué dans la croissance des fibrilles de collagène II et la limitation de leur diamètre [22].

#### c) Les protéoglycannes

Les protéoglycannes sont des protéines sous forme de monomères hautement glycosylés. Au sein du cartilage articulaire, ils représentent 10 à 15% du poids total du cartilage et constituent le deuxième plus grand groupe de macromolécules de la matrice extracellulaire. Ils sont constitués d'une protéine axiale à laquelle sont attachées de façon covalente une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycannes (GAG) parmi lesquels sont retrouvés la chondroïtine-sulfate, le kératane-sulfate ou encore des oligosaccharides (*Figure 1*).



**Figure 1 : Schéma d'un agrégat de protéoglycannes.**

<http://www.ilo.org>

Le cartilage articulaire comprend deux classes majeures de protéoglycannes : les agrégannes et les petits protéoglycannes.

## (1) Les agrécannes

Les plus abondants et les plus grands des protéoglycannes sont les agrécannes. Ils peuvent posséder plus de 100 chaînes de chondroïtine-sulfate et 50 de kératane-sulfate [23]. La plupart des agrécannes sont liés de façon covalente à l'acide hyaluronique pour former de larges agrégats de protéoglycannes avec le réseau fibrillaire collagénique, stabilisés par une protéine de liaison appelée « link protein ». L'agrécanne possède un domaine globulaire de liaison du hyaluronate, appelé G1. Il existe également un second domaine (G2), différant du domaine G1 de quelques acides aminés mais incapable de fixer l'acide hyaluronique et dont la fonction n'a pas encore été déterminée. Le dernier domaine (G3) se trouve au niveau du C-terminal et présente une homologie de séquence avec la leptine de type C. La fonction de ce domaine a récemment été identifiée dans l'interaction avec des protéines matricielles contenant des répétitions EGF comme les fibrillines, les fibullines et les tenascines [24].

## (2) Les petits protéoglycannes

Ils ne forment pas d'agrégat et sont caractérisés par leur faculté à interagir avec les collagènes. Bien que la décorine, le biglycan et la fibromoduline soient plus petits que l'agrécanne, ils sont présents en quantité équimolaire. La décorine et le biglycan possèdent respectivement une et deux chaînes de dermatane-sulfate alors que la fibromoduline est composée de plusieurs chaînes de kératane-sulfate. La décorine et la fibromoduline interagissent avec les fibrilles du collagène de type II et joue un rôle dans la fibrillogenèse et dans les interactions interfibrillaires. Le biglycan est principalement localisé dans l'environnement direct des chondrocytes au niveau des zones où ils peuvent s'associer au collagène VI.

## **2. Structure et ultrastructure du cartilage**

La composition, la structure et les fonctions des chondrocytes varient en fonction de la profondeur de la zone cartilagineuse par rapport à la surface. D'un point de vue morphologique, le cartilage articulaire est constitué de 4 couches histologiques de la superficie vers la profondeur (Figure 2) : superficielle, transitionnelle, radiale et calcifiée.

### *a) La couche superficielle*

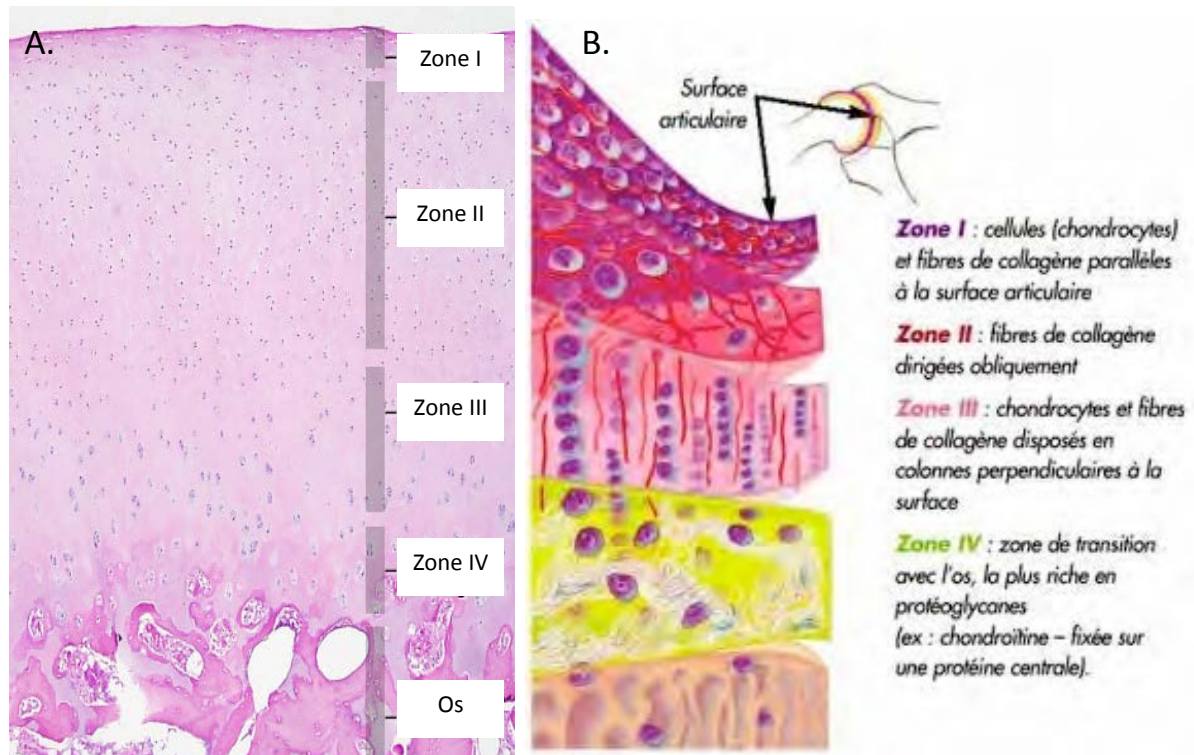
Elle est également appelée *Zone I ou tangentielle*. Elle est en contact avec le liquide synovial et sert de surface de glissement. Elle représente la plus fine des quatre zones. Elle est composée de cellules ellipsoïdes aplaties. Dans cette zone, les chondrocytes synthétisent une forte proportion de collagènes et une faible concentration de protéoglycannes. Cette couche est formée de fines fibres de collagènes organisées parallèlement à la surface conférant à cette zone de grandes forces d'étirement et de cisaillement.

### *b) La couche transitionnelle*

Egalement nommée couche *intermédiaire ou Zone II*, elle est principalement constituée d'une faible densité de cellules sphériques entourées d'une abondante matrice extracellulaire riche en agrécannes et en épaisses fibres de collagène. L'arrangement des fibres de collagène est aléatoire en superficie de cette zone mais tend à devenir vertical en profondeur formant des arcades de Benninghoff [25].

### c) La couche radiale

Communément appelé *Zone III*, elle est composée de fibres de collagène de type II orientées perpendiculairement à la surface du cartilage. Elle représente la zone la plus riche en protéoglycannes. Les chondrocytes, qui la composent, sont larges et ronds et s'empilent verticalement par rapport à la surface du cartilage. Dans la partie la plus profonde, ils sont regroupés par deux ou trois et constituent la couche hypertrophique.



**Figure 2. Structure du cartilage. A. Coupe histologique d'un cartilage articulaire bovin (coloration Hématoxyline-Eosine – grossissement x 4). B. Représentation schématique des différentes zones du cartilage.** Le cartilage articulaire se divise en 4 couches histologiques. Zone I : couche superficielle ou tangentielle. Zone II : couche transitionnelle ou intermédiaire. Zone III : couche radiale. Zone IV : couche calcifiée.

A. : <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au> - B. : <http://www.labrha.com>

### d) La couche calcifiée

Elle est la couche *la plus profonde* (*Zone IV*) et contient un très faible volume cellulaire entouré d'une matrice calcifiée dont l'activité métabolique est réduite. Dans cette région, les chondrocytes expriment un phénotype hypertrophique et synthétisent du collagène de type X. La limite entre les Zones III et IV ou « tidemark » ou encore front de minéralisation, est une zone de transition visible en histologie car elle fixe les colorants basiques tel que le bleu de Toluidine. Cette couche est caractérisée par la présence de cristaux d'hydroxyapatite et d'amas calciques au contact des fibres de collagène [2].

La jonction entre le cartilage calcifié et l'os sous-chondral est très irrégulière et résistante. Elle est perforée par de rares vaisseaux provenant des cavités de la moelle sous-jacente. L'os sous-chondral joue également un rôle dans la nutrition du cartilage [26, 27].

### 3. L'homéostasie du cartilage

Les chondrocytes assurent la synthèse et le renouvellement mais également la dégradation de la matrice extracellulaire. Dans le cartilage sain, il existe un équilibre entre synthèse et dégradation. Cet équilibre est possible grâce à l'intervention de facteurs anaboliques comme les facteurs de croissance mais aussi cataboliques telles que les cytokines pro-inflammatoires.

Le chondrocyte est responsable de la synthèse de ces deux types de messagers. La synthèse des constituants matriciels est régulée par des facteurs de croissance comme les TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta), les BMPs (Bone Morphogenic Protein) ou IGF-1 (Insuline-like Growth Factor 1), etc... La dégradation de la matrice cartilagineuse est sous le contrôle de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  (Interleukine 1 Beta) ou le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor Alpha). Ces cytokines perturbent l'activité de remodelage des chondrocytes en augmentant la production d'enzymes protéolytiques (métalloprotéinases matricielles : MMPs et agrécanases : ADAMTS) médiée par l'acide nitrique (NO), les PGE<sub>2</sub> (Prostaglandine E<sub>2</sub>) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces protéinases vont permettre le clivage à la fois des collagènes et des protéoglycannes conduisant à l'augmentation de fragments matriciels favorisant le catabolisme au profit de l'anabolisme [28].

## B. LA MEMBRANE SYNOVIALE

### 1. Fonction et structure

La membrane synoviale est un tissu qui tapisse la cavité articulaire et sécrète le liquide synovial. Elle permet la lubrification du cartilage, contrôle le volume et la composition du liquide synovial et assure la nutrition des chondrocytes [29].

La membrane synoviale saine est reconnue comme relativement acellulaire. Elle s'organise en trois couches :

- La **couche bordante** ou **intima** mesure 20 à 40 microns d'épaisseur et est constituée de 1 à 4 assises cellulaires entourées d'une fine matrice fibreuse et de quelques fibres de collagène I. Elle est en contact direct avec la cavité articulaire.
- La **couche sous-intimale** ou **subintima** contient de nombreux capillaires dans la partie la plus superficielle, des artérioles et des vaisseaux lymphatiques.
- La **subsynoviale** repose sur la subintima. Elle est caractérisée par un tissu conjonctif lâche non spécialisé qui permet à la membrane synoviale de se mouvoir librement. Ce tissu peut être de différents types : type alvéolaire, adipeux ou fibreux.

## 2. Les cellules

La membrane synoviale est bordée par des cellules spécialisées, les synoviocytes : des cellules de type macrophagique (synoviocytes A) et des cellules de type fibroblastique (synoviocytes B).

- Les *synoviocytes de type A* (macrophage-like) dérivent des monocytes circulant migrant probablement depuis les capillaires sanguins de la couche subintimale vers l'intima. Ils sont principalement localisés dans la couche superficielle de la membrane synoviale (intima) mais peuvent être retrouvés dans la subintima. Ils présentent des marqueurs spécifiques de la lignée macrophagique tels que CD163 et CD68. Mais ils ne représentent qu'une minorité cellulaire dans une membrane synoviale saine. Ils absorbent les débris et les déchets de la cavité articulaire et de la membrane synoviale.
- Les *synoviocytes de type B* (de type « fibroblastique ») présentent des caractéristiques des cellules fibroblastiques contenant de grandes quantités de réticulum endoplasmique granuleux (REG). Ils sont présents essentiellement au niveau de la zone profonde de la membrane synoviale. Ils sécrètent entre autres de l'acide hyaluronique permettant la lubrification de l'articulation et des collagènes lui conférant ses propriétés de résistance à la compression.

## C. LES LÉSIONS DU CARTILAGE

### 1. Les lésions du cartilage

Le cartilage est dépourvu de vascularisation sanguine, lymphatique et d'innervation. Il possède de fait des capacités de réparation très limitées dues à son caractère avasculaire. Si les lésions n'atteignent pas l'os sous-chondral pour permettre aux cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse de coloniser le lieu de la lésion, la réparation du cartilage est quasi nulle. Ces lésions surviennent généralement sur une matrice saine dans un contexte de traumatisme, d'activités sportives (entorse grave, rupture du ligament croisé antérieur ou encore après luxation rotulienne), de dégénérescence chronique (surcharge mécanique) ou d'anomalies de l'os sous-chondral (nécrose, ostéochondrite). Ces lésions conduisent à une altération progressive de l'articulation pouvant être favorisée par un déséquilibre de la balance entre les métabolismes anabolique et catabolique. Dans certains cas, ces lésions conduisent à l'arthrose, qui dans les cas les plus sévères, conduit à la mise en place d'une prothèse articulaire (hanche, genou).

En cas de lésions partielles, le cartilage ne cicatrise pas spontanément car les dommages n'atteignent pas l'os sous-chondral. La moelle osseuse, contenant des cellules souches mésenchymateuses, des facteurs de croissance et des vaisseaux qui font défaut au cartilage, n'est donc pas accessible et ces composants ne peuvent donc pas migrer vers la lésion pour induire la cicatrisation. Alors que les dommages profonds, touchant le cartilage jusqu'à l'os sous-chondral, et permettant l'extrusion des cellules de moelle osseuse, donnent lieu à une réparation spontanée par un tissu de type fibreux (fibrocartilage) dont les caractéristiques biomécaniques et biochimiques diffèrent du cartilage hyalin. L'ensemble de ces dégradations conduit dans la majorité des cas à un phénomène d'arthrose [30].

En chirurgie orthopédique, les lésions cartilagineuses demeurent un problème sous-estimé. Quelques revues ont démontré la présence de dommages cartilagineux lors du traitement chirurgical de patients ayant bénéficié au préalable d'une arthroscopie du genou. Hjelle *et coll.* ont montré lors d'une évaluation prospective de 1000 patients symptomatiques que des lésions chondrales ou ostéochondrales, dont la taille moyenne était de 2,1 cm<sup>2</sup> (90% des cas), étaient présentes dans 61% des cas [31]. Dans une étude similaire, sur 993 patients de médecine sportive, Aroen a démontré une prévalence importante des lésions du cartilage puisque 66% des patients présentaient un défaut cartilagineux [32]. Ces auteurs ont également noté que le condyle fémoral médial était majoritairement affecté par ces problèmes.

Avec le développement de l'arthroscopie, les chirurgiens orthopédiques ont acquis de meilleures connaissances sur la dégénérescence du cartilage et Outerbridge, en 1961, a instauré une classification des lésions basées sur leur aspect lors d'une arthrotomie qui est encore acceptée à ce jour. Le grade I correspond à un cartilage enflé et mou et qui peut parfois avoir un aspect cloqué. Les lésions de grade II sont caractérisées par des fibrillations de surface, des fissures et des fentes dont la taille est inférieure à 1,5 mm de diamètre. Le grade III se traduit par l'apparition de fissures profondes s'étendant jusqu'à l'os sous-chondral. Les lésions de grade IV se différencient par l'exposition de l'os sous-chondral [33]. Plus récemment, en 2000, l'ICRS (International Cartilage Repair Society) a également établi une classification gradée des dommages cartilagineux. Le grade 0 est donné pour un cartilage intact. Le grade I ou grade superficiel regroupe les lésions constituant de légères indentations, fissures ou crevasses. Les grades II et III représentent respectivement des lésions dont la profondeur est inférieure et supérieure à la moitié de l'épaisseur du cartilage articulaire. Les lésions s'étendant jusqu'à l'os sous-chondral constituent le grade IV. Les grades V et VI représentent respectivement les lésions dues à une ostéochondrite disséquante et celles dues à une nécrose avasculaire [34].

## **2. Les mécanismes de dégradation du cartilage**

Dans un contexte particulier de traumatisme, d'activités sportives (entorses graves ou des luxations rotuliennes) voire de lésions spécifiques rencontrées au cours de l'enfance (ostéochondrite), des lésions focales du cartilage peuvent apparaître sur une matrice saine. Ces lésions focales conduisent progressivement à l'apparition d'une dégénérescence du cartilage prédisposant, dans la majorité des cas, à un phénomène arthrosique.

En raison des sollicitations continues des articulations, les dommages focaux non traités s'étendent et sont généralement affiliés à une perte de volume du cartilage et à des signes histopathologiques de la dégradation du cartilage adjacent à la lésion [35]. Lors de la dégénérescence du cartilage, différentes modifications biochimiques et biomécaniques se produisent. Dans un premier temps, les contenus en protéoglycannes et en collagènes sont altérés puis dégradés. Ensuite, le réseau collagénique est remodelé anormalement. L'ensemble de ces changements matriciels résulte d'une réduction du nombre de cellules ainsi que de l'usure mécanique du cartilage. La fragmentation et la détérioration des fibres de collagènes sont localisées dans les régions adjacentes aux lésions focales [36]. La dégradation du réseau collagénique cause une diminution de la rigidité élastique et de la résistance à l'étirement du cartilage articulaire alors que la détérioration des protéoglycannes induit une réduction de la résistance à la compression du tissu.

Des altérations du contingent cellulaire sont également impliquées dans la fragilisation du cartilage lors de sa dégradation. Un cartilage atteint de fibrillations présente une densité cellulaire moindre qu'un cartilage sain. Une telle perte cellulaire peut s'avérer



néfaste pour le maintien de l'homéostasie de la matrice cartilagineuse et conduit à la détérioration du tissu et des fonctions biomécaniques du cartilage [37].

### 3. Traitements des lésions focales du cartilage articulaire

Le traitement des lésions cartilagineuses focales reste un problème d'actualité. Les facultés très faibles de réparation spontanée du cartilage expliquent les difficultés rencontrées pour traiter ces lésions focales. Le tissu de réparation obtenu se révèle être du fibrocartilage ne possédant pas les capacités de résistance biomécanique du cartilage hyalin, prompt à une dégradation à court terme [38, 39]. Cette réparation inadéquate concourt à l'établissement d'une arthrose plus ou moins rapide. De ce fait, la régénération du cartilage lésé suite à une pathologie articulaire (arthrose) ou à une lésion traumatique reste un objectif essentiel en orthopédie.

#### a) *Les traitements chirurgicaux*

De nombreuses techniques chirurgicales sont actuellement utilisées pour tenter de réparer le cartilage lésé. Le traitement chirurgical à adopter doit être choisi en fonction de l'aire de la surface de la lésion mais également du coût qu'elle engendre.

##### (1) Lavage et débridement sous arthroscopie

Le lavage des articulations lésées est le premier traitement connu des lésions chondrales, en permettant l'élimination des médiateurs de l'inflammation, des débris cartilagineux et collagéniques qui peuvent être retenus dans la membrane synoviale et provoqués une inflammation. Le débridement consiste en l'élimination des bords lâches encombrant l'articulation. Différentes techniques peuvent être utilisées telles que le curetage et le débridement mécanique. Cependant, ces techniques ne permettent pas d'obtenir des surfaces cartilagineuses lisses et régulières, et entraînent parfois une dégradation amplifiée du cartilage avec une mort prématurée des chondrocytes et une altération de la matrice cartilagineuse.

##### (2) L'arthroplastie par abrasion

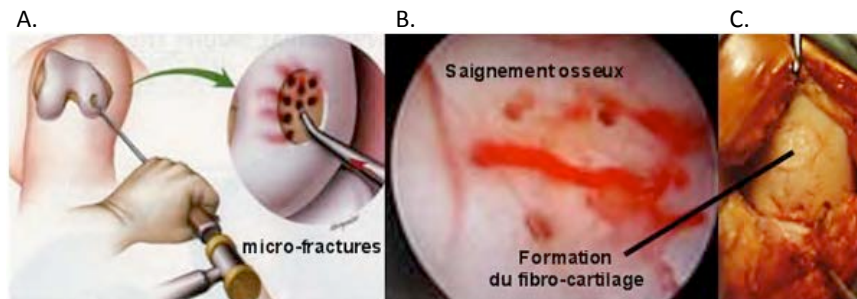
Cette technique a été développée dans les années 1980 par Johnson [40] dont le principe est de débrider les bords de la lésion cartilagineuse pour obtenir des contours collagéniques réguliers et uniformes auxquels un caillot de fibrine peut adhérer [41]. Aucune étude n'a montré de résultats probants de cette méthode pour une bonne réparation du cartilage [42].

##### (3) Le forage sous-chondral ou forage de Pridie

Le forage sous arthroscopie a été introduit initialement par Smillie et Dundee en 1957 [43] mais son utilisation a été popularisée par Pridie en 1959 [44]. Après débridement de la lésion, l'os sous-chondral est foré grâce à une perceuse jusqu'à l'os trabéculaire. Le sang peut alors perfuser dans la cavité réalisée et former un caillot sanguin initiant la réparation du dommage. Le tissu néosynthétisé s'apparente à un amalgame entre cartilage hyalin et fibrocartilage [45].

#### (4) La microfracture

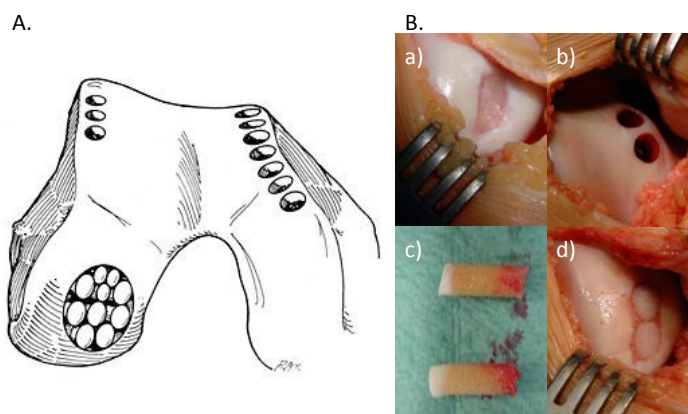
Cette procédure a été initiée par Steadman *et coll.* Elle consiste en l'utilisation d'un poinçon arthroscopique afin de créer des puits de 3 à 4 mm [46]. Après la microfracture, la lésion est comblée par un caillot sanguin contenant les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse capable de synthétiser un nouveau tissu de réparation (**Figure 3**). La microfracture est une variation du forage de Pridie et apparaît par comparaison mieux adaptée car l'utilisation d'un poinçon par arthroscopie est plus facile que celle d'une perceuse et réduit les dommages thermiques causés par cette dernière (nécrose des tissus environnants). Cependant, comme l'ensemble des techniques reposant sur la stimulation médullaire, le tissu néo-synthétisé est un mélange entre cartilage hyalin et fibrocartilage [47].



**Figure 3. La microfracture. A. Représentation schématique de la procédure chirurgicale de la microfracture. La lésion est débridée et les puits sont créés à l'aide d'un poinçon. B. Visualisation arthroscopique des puits créés et du saignement sanguin responsable de la formation du caillot. C. Visualisation macroscopique du tissu cicatriciel obtenu après un traitement de la lésion par microfracture.** <http://www.docteurrouxel.com/chirurgie-cartilage.html>

#### (5) La mosaïcoplastie ou autogreffe ostéochondrale

La mosaïcoplastie a été décrite initialement en 1993 par Matsusue [48], puis davantage développée par Hangody *et coll* [49, 50, 51, 52, 53]. Le but de cette méthode est de réaliser des carottes de cartilage en zone non portante. Elles sont ensuite transférées au sein de la lésion qui a, au préalable, été débridée (**Figure 4**). Cette procédure présente l'avantage d'utiliser des greffons de cartilage hyalin pour induire une réparation des dommages cartilagineux.



**Figure 4. La mosaïcoplastie. A. Représentation schématique d'un genou après mosaïcoplastie. B. Vue macroscopique du cartilage articulaire durant la procédure chirurgicale de mosaïcoplastie. a) lésion cartilagineuse. b) site donneur après retrait des greffons. c) carottes de tissu ostéochondral prêtes à être implantées. D) greffons implantés au sein de la zone lésée.** <http://www.porcopotlas.hu>

## b) L'ingénierie cellulaire

Les techniques présentées précédemment, bien qu'elles permettent d'améliorer les conditions de vie des patients, aboutissent dans la majorité des cas à la synthèse d'un tissu de réparation de mauvaise qualité ne présentant pas les caractéristiques du cartilage hyalin originel. De ce fait, depuis près d'une vingtaine d'années, les procédures chirurgicales impliquant l'ingénierie cellulaire ont connu un réel essor. Elles consistent à utiliser des chondrocytes autologues afin qu'ils synthétisent un nouveau tissu proche, d'un point de vue structural et biochimique, du cartilage hyalin.

### (1) L'implantation de chondrocytes autologues (ACI)

La transplantation de chondrocytes autologues a été documentée, pour la première fois, par Mats Brittberg en 1994 [54]. Le cartilage est prélevé en zone non portante et digéré afin d'isoler les chondrocytes. Ces derniers sont alors mis en culture et amplifiés *in vitro* de façon à obtenir un nombre suffisant de cellules pour pouvoir les réimplanter au sein de la lésion débridée et dont la taille a été ajustée.

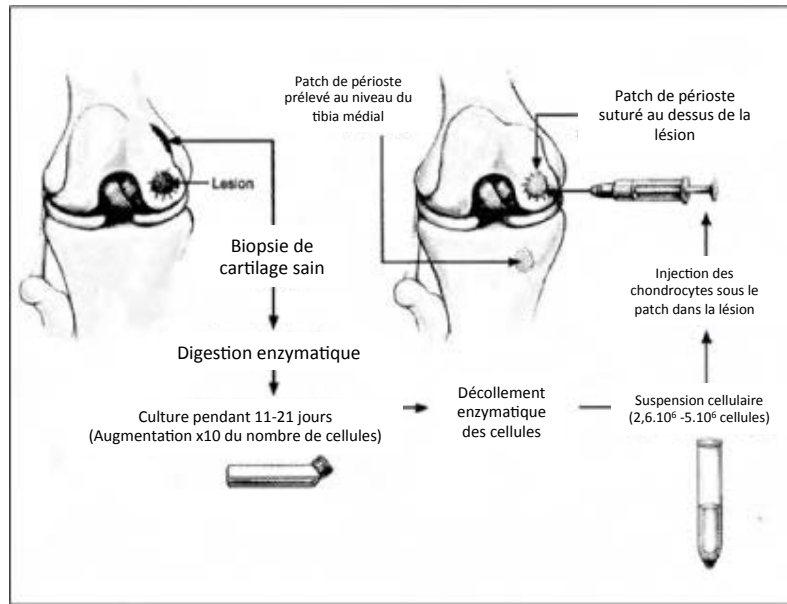
Un lambeau de périoste est suturé/collé de façon à recouvrir le dommage cartilagineux pour limiter la fuite cellulaire après l'injection des cellules autologues amplifiées (*Figure 5*). L'ACI est une bonne technique pour le traitement des lésions de taille moyenne ou de grande taille et permet d'obtenir un tissu de réparation de type hyalin avec une bonne intégration [55].

Brittberg et coll ont prouvé, qu'après un suivi post-opératoire moyen de 4 ans, 90% des patients traités pour des lésions des condyles fémoraux présentaient de bons, voire d'excellents résultats [56]. L'introduction de cette technique a permis l'application des techniques d'ingénierie tissulaire basées sur les thérapies cellulaires afin de promouvoir la réparation du cartilage.

Bien que, comme décrit précédemment, les études cliniques à court et moyen terme ont démontré les bons résultats obtenus par l'ACI [57, 58], cette procédure présente néanmoins certains désavantages tels que le maintien du phénotype des chondrocytes après un temps de culture prolongé en monocouche, le risque de fuite en dehors de la lésion des chondrocytes transplantés, l'inégale répartition des cellules due à l'effet de la gravité [59], et la complexité de cette technique chirurgicale [60].

## a) L'ingénierie tissulaire

Les résultats obtenus par les différentes méthodes exposées dans les paragraphes précédents donnant, certes, des pistes intéressantes ne permettent cependant pas d'obtenir un tissu de réparation optimal. Afin d'améliorer la synthèse d'un néo-tissu de qualité, l'ingénierie tissulaire du cartilage a été développée.



**Figure 5. Représentation schématique de la procédure de transplantation de chondrocytes autologues selon la méthode de Brittberg [54].**

## D. L'INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE

Cette méthode repose sur le développement d'un substitut tissulaire cartilagineux fonctionnel associant un biomatériau, un contingent cellulaire et des conditions de culture *in vitro* adaptées. Ces paramètres doivent permettre la différenciation chondrogénique ou le maintien du phénotype différencié de la cellule afin de synthétiser une matrice extracellulaire cartilagineuse de qualité.

### 1. Les biomatériaux

Les biomatériaux utilisés en ingénierie du cartilage doivent remplir plusieurs caractéristiques. Ils doivent être biocompatibles, stérilisables, être adaptables à la taille de la lésion et être stables d'un point de vue structural et mécanique. Ils constituent une structure d'adhésion pour les cellules, qui, en association avec des substances bioactives (facteurs de croissance, ...) et des conditions de culture adéquates, promeut la prolifération, la synthèse de tissu et la différenciation cellulaire. Enfin, ils doivent être biodégradables et servir seulement de support temporaire à la régénération tissulaire.

En ingénierie du cartilage, plusieurs biomatériaux ont été développés à base de collagène [61, 62, 63], de hyaluronate [64, 65], d'alginate [66], d'agarose [67], de chitosan [68], ou encore, entre autres, d'acide polylactique [69] ou de poly-caprolactone [70].

La majorité des biomatériaux utilisés en ingénierie du cartilage sont à base de polymères, classifiés selon leur origine en polymères naturels et synthétiques.

a) Les biomatériaux naturels

Les polymères naturels présentent un intérêt spécifique en raison de leurs similarités biologiques et biochimiques avec les tissus natifs [71]. Ces biomatériaux sont divisés en deux groupes selon la nature de leurs composants 1) protéique ou 2) à base de carbohydrate. Généralement, les protéines utilisées sont d'origine xénogénique.

(1) De nature protéique

(A) LE COLLAGENE

Le collagène est un composant naturel de la matrice extracellulaire cartilagineuse. Les polymères à base de collagène permettent de constituer d'excellents biomatériaux car il présente une bonne résistance mécanique, une bonne biocompatibilité et une biodégradabilité intéressante et il permet la prolifération cellulaire. Les biomatériaux à base de collagène ont été largement étudiés au cours des dix dernières années. Le collagène constitue un matériau de choix pour l'ingénierie tissulaire car il peut être utilisé pour la fabrication d'une grande diversité de supports comme des membranes, des gels, des mousses et des éponges [72]. Ces dernières sont constituées généralement de collagène de type I, moins immunogène [73], contrairement au collagène de type II, composant majeur du cartilage hyalin, qui paraît mieux adapté à la prolifération et au maintien du phénotype des chondrocytes, mais qui est très immunogène.

(B) AUTRES BIOMATERIAUX D'ORIGINE PROTEIQUE

D'autres biomatériaux à base protéique ont également été étudiés pour leur propriété chondro-inductrice. La soie et la fibrine constituent des supports prometteurs en ingénierie tissulaire. La fibrine permet une production plus importante de glycosaminocannes [74]. La soie constitue aussi un support capable de promouvoir la chondrogenèse de chondrocytes et de cellules souches mésenchymateuses ostéomédullaires [75, 76, 77].

(2) A base de carbohydrates et ses dérivés

(A) L'ALGINATE

L'alginate est un long co-polymère linéaire constitué d'acide D-manuronique et d'acide D-glucuronique. Il existe différents types d'alginate pouvant être utilisés pour l'encapsulation cellulaire. Ils varient en fonction de l'espèce d'origine et de leurs propriétés physico-chimiques. Il a été démontré que l'alginate pouvait constituer un support intéressant pour la régénération du cartilage en ingénierie tissulaire *in vitro* et également *in vivo* chez le petit animal. Cependant, il ne permettrait pas de résister aux forces de friction et aux contraintes mécaniques exercées sur les articulations portantes chez le grand animal [78, 79].

(B) LE HYALURONATE

L'acide hyaluronique est un composant naturel du liquide synovial et de la MEC du cartilage. Il constitue une matrice naturelle qui fournit un environnement tridimensionnel stable pouvant induire la chondrogenèse des CSM ostéomédullaires [80] et adipeuses [81]. Il peut être en association avec d'autres polymères de synthèse comme la poly-ε-caprolactone (PCL) afin d'améliorer la différenciation chondrogénique des CSM [82] et des chondrocytes différenciés [83].

Le chitosan est un polysaccharide linéaire, composé de glucosamine et N-acétyl-glucosamine liées par des ponts glycosidiques. Ses propriétés biodégradable, biocompatible, non toxique, anti-bactérienne lui confèrent un intérêt tout particulier en médecine régénérative. Il possède aussi des caractéristiques structurales similaires à certains GAGs et à l'acide hyaluronique présent dans le cartilage articulaire. Seul ou en association avec des polymères naturels ou synthétiques, il permet le maintien de la synthèse matricielle par les chondrocytes et de favoriser une synthèse abondante de collagène II et d'agrécanne. [84, 85].

---

*b) Les biomatériaux synthétiques*

Les propriétés mécaniques et biochimiques ainsi que la dégradation des biomatériaux synthétiques sont plus facilement modifiables que celles des polymères naturels. Ils peuvent être synthétisés à la demande et fabriqués de façon plus uniforme.

(1) Les polyesters

Les plus utilisés des polymères synthétiques en ingénierie du cartilage appartiennent à la famille des poly- $\alpha$ -hydroxy-esters, dont les acides polylactique (PLA) et polyglycolique (PGA) ainsi que leur combinaison (PLGA) sont les chefs de file en raison de leur biodégradabilité et de leur approbation par la FDA (*US Food and Drug Administration*). Les biomatériaux à base de ces polymères présentent une résistance mécanique supérieure à celle des hydrogels (alginate, agarose, ...) qui leur permet une meilleure fixation au sein de la lésion et d'accroître leur résistance à la charge [86]. Cependant, ensemencées dans ces polymères synthétiques, les cellules tendent à perdre leur phénotype chondrogénique et synthétisent une matrice de moins bonne qualité [87].

(2) La Poly- $\epsilon$ -caprolactone

La Poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) est un polymère stable semi-cristallin biorésorbable. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont été menées afin d'évaluer sa biocompatibilité [88, 89]. Utilisée généralement en association avec d'autres polymères comme le hyaluronate et le collagène, la PCL permet l'induction chondrogénique des CSM ostéomédullaires [82], des CSM adipeuses [90], des cellules souches issues de la gelée de Wharton [91] et des chondrocytes [92].

(3) Autres biomatériaux synthétiques

D'autres matériaux synthétiques sont également étudiés dans le cadre de l'ingénierie du cartilage comme le polyéthylène glycol (PEG) [93-94] et l'alcool polyvinylique (PVA) [95, 96]. Ils présentent de bonnes caractéristiques pour induire la formation d'une matrice mimant les propriétés du cartilage natif.

---

## **2. Le contingent cellulaire**

Les biomatériaux de comblement ne sont plus utilisés comme des supports inertes mais associés à des cellules. Ils sont qualifiés de « biomatériaux hybrides ». Les sources cellulaires utilisées sont variées. Les chondrocytes se sont avérés les premiers candidats. Actuellement, les recherches se sont énormément développées sur l'utilisation des cellules souches comme candidat potentiel à l'ingénierie du cartilage.

Le chondrocyte, unique cellule du cartilage, produit les composants de la MEC et représente, de ce fait, le candidat idéal en ingénierie du cartilage. Les chondrocytes adultes ont été isolés à partir de différentes sources telles que le cartilage articulaire, nasal, costal ou des oreilles. En 2006, Isogai *et coll.* ont démontré que les chondrocytes élaborent un tissu cartilagineux dont les caractéristiques sont semblables à celles du tissu d'origine [97]. Donc, en vue d'une application pour la réparation du cartilage articulaire, la source de chondrocytes la plus appropriée semble être le cartilage hyalin. Cependant, le prélèvement de cartilage chez un patient est un acte invasif qui nécessite d'être réalisé en zone non portante et qui limite considérablement la quantité de tissu et ainsi le nombre de cellules disponibles [97].

Par ailleurs, l'une des principales limites à l'utilisation des chondrocytes est leur instabilité phénotypique lors de leur culture en monocouche. En effet, les chondrocytes, après un temps de culture prolongé en monocouche, perdent l'expression de marqueurs chondrocytaires comme le collagène de type II et l'agrécanne principalement [98]. Cette perte de phénotype est accompagnée par une transposition vers un phénotype fibroblastique caractérisé par une nette augmentation de l'expression du collagène de type I et l'adoption d'un aspect fusiforme spécifique des fibroblastes [99]. Cependant, ce processus de dédifférenciation est réversible.

Les chondrocytes dédifférenciés en monocouche, une fois placés dans un environnement tridimensionnel, recouvrent leurs capacités de cellules différenciées [100, 101]. Les chondrocytes « arthrosiques » ont également été étudiés puisqu'ils représentent potentiellement une source de chondrocytes plus accessible en recherche, bien qu'ils présentent des altérations métaboliques pouvant induire une réponse plus faible à des facteurs d'induction environnementaux [102]. Une période de culture en 3D *in vitro* peut rétablir un phénotype chondrocytaire normal [103]. Toutefois, davantage d'études doivent être menées afin de conclure quant à la possible utilisation des chondrocytes arthrosiques en ingénierie du cartilage.

#### a) *Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)*

Afin de contourner tous ces problèmes posés par l'utilisation des chondrocytes autologues, les recherches actuelles se tournent vers les cellules souches adultes et leurs potentialités de différenciation chondrogénique. Cette alternative permettrait de disposer d'une quantité suffisante de cellules capables de synthétiser une matrice extracellulaire chondrogénique et ainsi d'obtenir un biomatériau fonctionnalisé pour la réparation des lésions du cartilage. Les cellules souches mésenchymateuses, dites « multipotentes », sont en effet aptes à se différencier en un panel de cellules dérivant du feuillet mésodermique tels que les chondrocytes, les adipocytes ou encore les ostéoblastes sous l'influence de facteurs de croissance spécifiques et de suppléments ajoutés dans le milieu de culture [104].

Les CSM sont caractérisées par leur capacité d'adhésion au plastique, leur phénotype (CD73+, CD90+, CD105+, CD14- ou CD11b-, CD19- ou CD79 $\alpha$ -, CD34-, CD45- and HLA-DR-) et leur potentiel de différenciation [105]. Les CSM ne forment pas de tératome après réimplantation par comparaison avec d'autres sources cellulaires, comme les cellules souches embryonnaires. De plus, elles présentent des propriétés immunosuppressives et immunomodulatrices importantes dans la modification de la relation hôte-greffon lors de la transplantation [106].

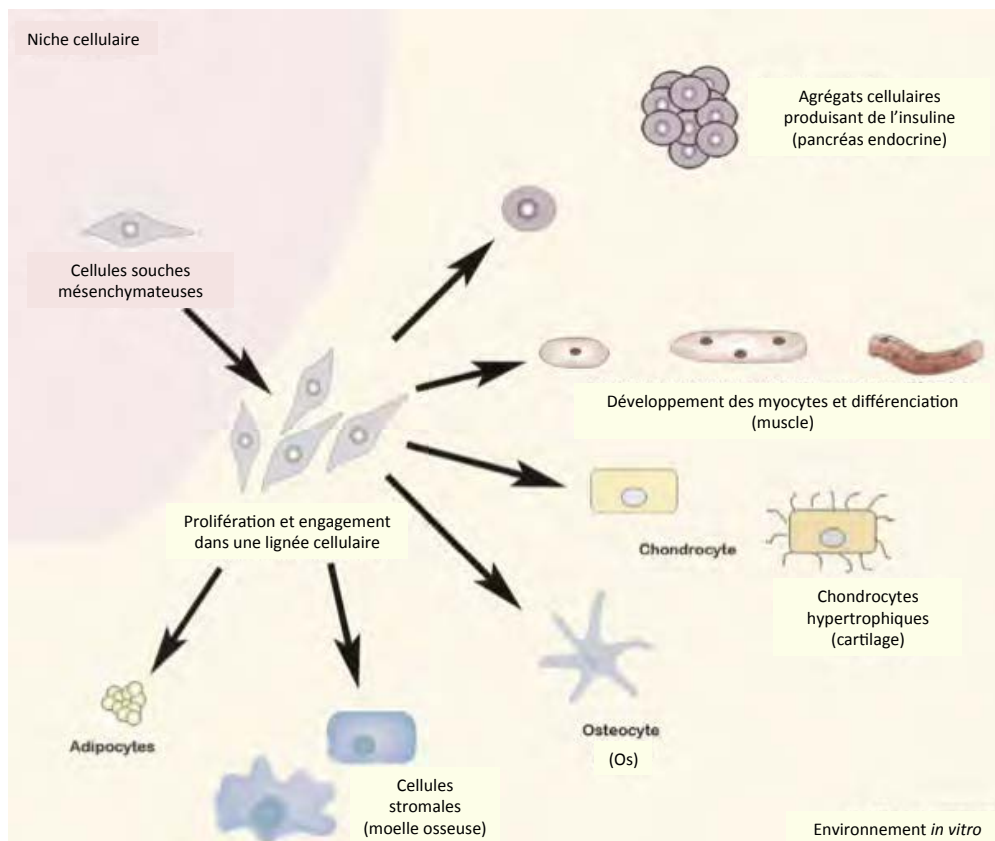
Les CSM sont une source intéressante de cellules pour l'ingénierie du cartilage en raison leur facilité d'accès par rapport aux chondrocytes et de leur grande capacité

d'expansion *in vitro*. Elles sont principalement isolées à partir de la moelle osseuse ou du tissu adipeux mais d'autres CSM provenant d'origines différentes ont également été étudiées comme les CSM de la membrane synoviale, du périoste, de la veine du cordon ombilical, de la gelée de Wharton... [107, 108].

### (1) Les CSM issues de la moelle osseuse

La moelle osseuse contient deux types de cellules souches : les cellules souches hématopoïétiques à l'origine des cellules sanguines et les CSM capables de se différencier en cellules du cartilage, de l'os, du ligament, du tendon et du muscle (**Figure 6**). Ces dernières sont sélectionnées par leur propriété d'adhérence au plastique des flasques de culture contrairement aux cellules souches hématopoïétiques. Les CSM provenant de la moelle osseuse sont considérées comme une alternative intéressante en ingénierie cellulaire et tissulaire car le prélèvement de moelle osseuse consiste en une procédure peu invasive représentant un très faible risque infectieux (ponction de moelle osseuse).

En ingénierie du cartilage, beaucoup de travaux ont été menés sur les CSM ostéomédullaires, en raison de leur capacité accrue de prolifération et de leur faculté à maintenir leur potentiel de différenciation même après un nombre de passage important *in vitro* [109].



**Figure 6.** Lignées résultant du processus de différenciation cellulaire des cellules souches mésenchymateuses [106].

Une étude clinique de phase I a été réalisée par une équipe iranienne en 2012 consistant en l'injection de CSM ostéomédullaires autologues amplifiées *in vitro* dans



l'articulation du genou de 6 patients atteints d'arthrose. Ce travail a montré une amélioration de la douleur et une régénération du cartilage détérioré par la maladie puisque l'évaluation IRM prouve une augmentation de l'épaisseur du cartilage et une diminution de l'œdème sous-chondral après 6 mois. Une légère diminution de l'amélioration est observée au bout d'un an suggérant la nécessité de renouveler l'injection de CSM 6 mois après la première administration intra-articulaire [110]. D'autres études sont en cours.

## (2) Les CSM d'origine synoviale

La membrane synoviale représente une excellente source de cellules souches mésenchymateuses. Deux types cellulaires constituent ce tissu : les synoviocytes « macrophagiques » de type A et les synoviocytes « fibroblastiques » de type B constituant le pool de CSM de la membrane synoviale. Les synoviocytes B ou cellules souches synoviales (CSSs) sont sélectionnés suite à leur capacité à être décollés par l'action d'une protéinase lors du premier passage en culture cellulaire et à se différencier [111].

Les CSM provenant de la moelle osseuse demeurent les plus étudiées actuellement. Cependant, Sakaguchi, en 2005, dans une étude *in vitro*, a comparé les propriétés des CSM isolées à partir de moelle osseuse, membrane synoviale, périoste, muscle squelettique et tissu adipeux. [112] Un grand nombre d'études ont démontré les grandes capacités d'expansion des CSM issues de la moelle osseuse mais cette étude a prouvé que le potentiel d'expansion des CSM d'origine synoviale était comparable à celui des CSM de la moelle osseuse [112].

## (3) Les CSM d'origine adipeuse

Le tissu adipeux est une source de CSM adultes. Il est facilement prélevé suite à une liposuction. Les CSM peuvent être isolées du tissu par digestion enzymatique. Elles sont sélectionnées par leur capacité d'adhésion au plastique des flasques de culture. En présence de facteur de croissance chondro-inducteur et d'un environnement 3D, ces CSM adipeuses sont capables de synthétiser les composants matriciels spécifiques du cartilage tels que les GAG sulfatés et le collagène II [113].

Bien que les CSM adipeuses constituent un contingent cellulaire intéressant, il a été démontré qu'elles possédaient un potentiel chondrogénique moindre que les CSM ostéomédullaires [114]. Paradoxalement, Ansar, en 2012, a également avancé l'hypothèse que les CSM adipeuses pouvaient synthétiser une matrice plus riche en agrécannes que celle produite par des chondrocytes articulaires [115].

Des essais cliniques de phase I, coordonnés par Christian Jorgensen, CHU de Montpellier, sont en cours sur le traitement de l'arthrose chez 86 patients volontaires et faisant intervenir 12 partenaires français et étrangers (comprenant des hôpitaux, des laboratoires, des universités et des PME). Ce projet, nommé AdipoA, repose sur l'injection intra-articulaire de CSM adipocytaires dans le genou dans le but de vérifier l'innocuité et la tolérance du traitement chez l'Homme, de réparer le cartilage endommagé par l'arthrose et de calmer la douleur. L'étude se poursuit, les résultats n'ont pas encore été publiés sous forme d'article. Le début de la deuxième phase doit avoir lieu en 2014 et doit être mené sur une centaine de personnes [116].

## (4) Les CSM issues de la gelée de Wharton

Le cordon ombilical contient deux artères et une veine qui sont entourées par un tissu conjonctif muqueux appelé gelée de Wharton. Cette gelée est constituée de protéoglycannes

(particulièrement d'acide hyaluronique) et de cellules stromales de type fibroblastique. Ces cellules présentent à leur surface des marqueurs spécifiques des CSM. [117]

Les CSM de la gelée de Wharton possèdent, tout comme les autres CSM, des capacités de différenciation chondrogénique, ostéogénique, adipogénique et neurogénique. [118]. Un environnement tridimensionnel et l'addition de facteurs de croissance adaptés permettent d'induire leur différenciation chondrogénique [91-119]. Ces CSM ont démontré des capacités de prolifération accrues et un fort potentiel de synthèse de collagène II et de protéoglycannes en comparaison avec les chondrocytes [120], des CSM adipeuses [121] et pouvant aussi surpasser les CSM ostéomédullaires dans le cadre de la régénération du cartilage hyalin [122].

Les CSM provenant de la gelée de Wharton présentent également l'avantage d'être très peu immunogènes et sont bien tolérées dans le cadre d'une transplantation allogénique ou xenogénique [123].

#### (5) Les autres types de cellules souches

Les cellules souches embryonnaires (CSEs), dérivées de la masse interne de l'embryon au stade blastocyste, possèdent la capacité unique de se renouveler indéfiniment tout en maintenant leur potentiel de différenciation en tous les types cellulaires du corps humain.

Ces cellules sont très prometteuses en médecine régénérative mais les CSEs humaines expriment des molécules immunogènes qui peuvent causer des rejets et présentent une forte instabilité génomique [124]. Les CSEs, ensemencées dans un gel de collagène, sont capables de synthétiser un tissu cartilagineux chez le rat en condition physiologique dans le but d'induire une régénération ostéochondrale [125]. Cependant, les CSEs font l'objet d'une controverse éthique concernant leur origine et leur utilisation.

En 2007, deux équipes ont publié simultanément des protocoles pour créer un type de cellules souches humaine de « type embryonnaire » à partir de fibroblastes matures [126, 127]. Les iPS ou cellules souches pluripotentes induites partagent des caractéristiques similaires avec les CSEs mais sont générées par reprogrammation de cellules somatiques via l'expression forcée de facteurs de transcription spécifiques de la pluripotence tels que Oct-3/4, Sox2, c-Myc et Klf-4 [128, 129, 130].

Les iPS constituent un contingent cellulaire prometteur en médecine régénérative et en ingénierie tissulaire. Des iPS de sources tissulaires différentes peuvent potentiellement s'engager dans divers processus de différenciation, en particulier chondrogénique [131, 132, 133]. Cependant, il paraît plus avantageux d'induire, dans un premier, la différenciation des iPS vers un phénotype mésenchymateux avant d'induire leur différenciation chondrogénique [134].

### 3. Induction de la chondrogenèse en ingénierie du cartilage

Le maintien et la récupération du phénotype des chondrocytes ainsi que la différenciation chondrogénique des CSM nécessite un environnement tridimensionnel et l'ajout d'additifs adéquats.

#### *a) Intérêt de la pré-orientation des cellules en monocouche*

L'ensemencement en biomatériau nécessite généralement un nombre de cellules important en raison des phénomènes de fuite et mort cellulaires lors de la période d'adaptation des cellules à la structure tridimensionnelle choisie. L'expansion cellulaire est donc une étape déterminante. Elle implique également l'utilisation de suppléments de culture pour maintenir ou induire la différenciation chondrogénique.

#### (1) Famille des FGFs : Fibroblast Growth Factors

Deux membres de la famille des FGFs (Facteur de croissance fibroblastique) ont été étudiés pour leur implication dans l'homéostasie du cartilage : FGF-2 et FGF-18, le plus étudié étant le FGF-2.

Dans le cartilage, le FGF-2 ou FGF basique (bFGF) est retrouvé abondamment au niveau de la matrice péri-cellulaire. Chez l'Homme, le FGF-2 en se fixant à son récepteur déclenche la phosphorylation de ce dernier activant ainsi des voies de signalisation favorisant la dégradation du cartilage [135]. Le rôle du FGF-2 dans le cartilage chez l'Homme semble totalement différent à celui observé dans plusieurs modèles animaux. En effet, Chia, en 2009, a démontré, chez des souris KO pour le gène du FGF-2, l'apparition d'une arthrose accélérée après avoir réalisé une lésion méniscale comparativement aux témoins. Dans le groupe opéré, une administration sous-cutanée de FGF-2 réduit l'arthrose à un degré similaire au groupe témoin [136]. Une étude plus récente a prouvé que l'utilisation d'une faible dose de FGF-2 aidait à la réparation de lésions cartilagineuses chez le lapin [137]. Le succès de l'utilisation de FGF-2 seul ou en combinaison avec d'autres additifs a été démontré chez plusieurs espèces animales [138, 139, 140]. Cependant, l'injection intra-articulaire de FGF-2 semble conduire à une inflammation et à la formation d'ostéophytes chez le lapin [141] et ne semble pas aider la réparation des lésions cartilagineuses chez le mouton [142].

Néanmoins, le rôle du FGF-2 sur les chondrocytes adultes est principalement mitogène. De même, les CSM humaines cultivées en monocouche dans un milieu supplémenté en FGF-2 prolifèrent plus rapidement et démontrent, ultérieurement, des capacités de différenciation chondrogénique accrues en culture tridimensionnelle. [143, 144]. Il existe peu d'articles dans la littérature concernant le FGF-18 et son implication dans l'homéostasie du cartilage mais apparaît prometteur dans la réparation du cartilage lésé [145].

#### (2) La dexaméthasone : glucocorticoïde de synthèse

La dexaméthasone est connue pour son implication dans la différenciation des chondrocytes et le maintien de l'intégrité de la matrice cartilagineuse dans des cultures primaires de chondrocytes [146, 147, 148, 149] et des lignées cellulaires chondrogéniques [150, 151, 152]. Elle potentialise les facultés de différenciation chondrogénique des cellules progénitrices et la synthèse des protéoglycannes du cartilage.

Récemment, il a été démontré *in vitro* que la dexaméthasone permet de protéger la matrice cartilagineuse des changements résultant d'une dégénérescence post-traumatique du cartilage à la fois en supprimant les activités cataboliques et en maintenant la synthèse matricielle. La dexaméthasone inhiberait le catabolisme des protéoglycannes en modulant l'activité protéolytique des agrécannases au sein du cartilage [153]. La dexaméthasone n'est pas utilisée en clinique pour le traitement du cartilage lésé.

### (3) Vitamine C ou Acide ascorbique

En absence de vitamine C, les cellules des tissus conjonctifs dont les chondrocytes synthétisent des collagènes dont l'hydroxylation est altérée et présentent un défaut de sécrétion de ces collagènes [154]. L'ajout d'ascorbate à des cultures d'explants de cartilage articulaire améliore la synthèse de collagènes et d'agrécannes en agissant au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel [155, 156]. Il a également été montré que les cellules traitées avec de l'acide ascorbique produisent une matrice plus abondante et présentent une inhibition de la dégradation des collagènes due à l'effet antioxydant de la vitamine [157].

Dans le cadre de l'ingénierie du cartilage, Ronzière *et coll.* ont également démontré l'importance de l'acide ascorbique dans la régulation du développement de chondrocytes bovins et la formation de leur matrice au sein d'un système poreux tridimensionnel (éponge de collagène). Dans ces conditions, l'ascorbate, utilisé comme unique supplément de culture, a stimulé la prolifération des chondrocytes mais n'a pas dynamisé la synthèse matricielle après un mois de culture et semble même altérer progressivement le phénotype des cellules [158]. Plus récemment, il a été prouvé que la supplémentation du milieu de culture en acide ascorbique uniquement s'avère suffisante pour induire la différenciation de cellules ATDC5 (lignée cellulaire chondrocytaire murine). L'ascorbate tient un rôle critique dans la synthèse des protéines matricielles au cours de stades précoces du processus de signalisation modulant la chondrogenèse de ces cellules [159].

### (4) Les acides aminés : cas de la proline

Le développement d'un néocartilage souffre d'une limitation en nutriments, apportés aux cellules uniquement par le milieu de culture, conduisant à une diminution du contenu en collagènes. La synthèse protéique de différents types cellulaires est généralement stimulée par l'augmentation de la concentration en acides aminés du milieu [160]. De plus, il a été démontré que l'addition d'acides aminés en excès dans le milieu de culture favorisait le transport et l'incorporation par les chondrocytes de ces acides aminés dans les protéines néosynthétisées [161]. Ces travaux ont été confirmés par Ng *et coll.* en 2006 qui ont montré une synthèse plus importante du contenu collagénique avec une supplémentation du milieu de culture avec des acides aminés essentiels [162].

La plupart des résidus hydroxyproline contenus dans les collagènes proviennent d'un acide aminé : la proline. Il existe néanmoins au sein des molécules de collagène des résidus lysine également hydroxylés [163]. Une supplémentation en proline s'avère intéressante dans le cadre de l'ingénierie du cartilage afin de stimuler la synthèse de collagènes au sein de la matrice synthétisée par les cellules.

### (5) Association des différents additifs pour la culture en monocouche

En ingénierie du cartilage, ces différents suppléments de culture sont préférentiellement utilisés en association lors du dernier passage en monocouche avant

l'ensemencement dans le biomatériau pour pré-orienter les cellules vers un phénotype chondrocytaire et ainsi potentialiser ultérieurement les effets de la culture 3D, des facteurs de croissance ou de la stimulation mécanique sur la chondrogenèse de différents types cellulaires [164, 165, 166, 167, 152, 168, 169, 170].

### b) *Induction de la chondrogenèse en environnement 3D*

L'un des points clés pour entraîner la différenciation des cellules souches est le choix des facteurs de croissance. Un grand nombre de facteurs de croissance et de différenciation régulant le développement et l'homéostasie du cartilage mature a été identifié. Les facteurs les mieux caractérisés sont, entre autres, les Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ s) et des Bone Morphogenic Protein (BMPs). La superfamille des TGF- $\beta$  comprend les TGF- $\beta$ s, les BMPs, les activines et les inhibines. Les TGF- $\beta$  et les BMPs sont les peptides les mieux caractérisés et leur rôle dans la chondrogenèse et l'ostéogenèse est bien documenté [171].

#### (1) La famille des TGF- $\beta$ s

La famille des TGF- $\beta$ s comprend 5 membres (TGF- $\beta$ 1 à TGF- $\beta$ 5) produits par un grand nombre de cellules différentes. En revanche, la concentration de TGF- $\beta$  est cent fois plus importante dans l'os que dans les autres tissus [172]. Le cartilage articulaire contient également de larges quantités de TGF- $\beta$ . Mais bien que présents en petites quantités dans le cartilage normal en conditions physiologiques, les TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 et - $\beta$ 3 sont généralement considérés comme de puissants stimulateurs de la synthèse des protéoglycannes et du collagène de type II par des chondrocytes primaires [173] mais également comme inducteurs de la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses [173, 174].

Cependant, le TGF- $\beta$ 1 semble être le facteur le plus efficace dans l'induction de la différenciation chondrogénique suivi par le TGF- $\beta$ 3 puis le TGF- $\beta$ 2 [175]. Les chondrocytes-like obtenus par différenciation des cellules souches ne présentent pas encore toutes les caractéristiques des chondrocytes. Ces chondrocytes-like synthétisent du collagène de type X, spécifique du cartilage hypertrophique [176]. Le TGF- $\beta$ 1 améliore et accélère la différenciation des CSM ostéomédullaires et des CS synoviales en chondrocytes [177, 178] mais à long terme engage également les CSM vers une différenciation ostéogénique.

#### (2) La famille des BMPs

Les BMPs (Bone Morphogenic Protein) sont de petites glycoprotéines qui font partie de la superfamille de TGF- $\beta$  et comportent plus de 10 types de protéines. Ces protéines sont impliquées non seulement dans le contrôle de la prolifération, la maturation et l'hypertrophie des chondrocytes au cours du développement embryonnaire mais également dans les processus de réparation du tissu osseux et cartilagineux. De nombreuses BMPs (BMP-2, -4, -6, -7, -13 et -14) peuvent stimuler la différenciation chondrogénique des CSM [173, 179, 180] et favorisent la synthèse de collagène de type II et d'agrecannes par les chondrocytes *in vitro* [181, 173]. La BMP-4 potentialise la production de protéoglycannes et collagène de type II lors de la redifférenciation de chondrocytes dédifférenciés [182].

La BMP-2 (Bone Morphogenic Protein 2) peut induire la différenciation chondrogénique des CSM ostéomédullaires [183, 184], des cellules souches synoviales [152-185], des cellules souches adipeuses [186] et des iPS [187]. Cependant, à long terme, l'utilisation de BMP-2 conduit à la différenciation des CSM en cellules ostéoblastiques [188,

**189]** alors que son effet à long terme sur les cellules souches synoviales n'est pas encore documenté comme en témoigne la récente publication de Shintani *et coll.* en 2013 **[185]**.

### c) Teneur en oxygène du milieu environnant

*In vivo*, au sein du cartilage, il existe un gradient hypoxique finement régulé qui varie de 10% d'oxygène en surface jusqu'à une teneur en oxygène de 1% en profondeur dû à la nature avasculaire du tissu **[190, 191]**. Ce gradient est essentiel au maintien des fonctions spécifiques du tissu cartilagineux **[192]**.

La teneur en oxygène est un paramètre essentiel capable de moduler l'activité métabolique des chondrocytes **[193]**. L'hypoxie s'avère donc une condition de culture à tester en ingénierie du cartilage afin de se rapprocher au maximum des conditions physiologiques. Elle a été identifiée comme un promoteur du phénotype différencié **[194]**. De nombreux marqueurs chondrocytaires tels que Sox 9 (facteur de transcription intervenant dans la chondrogenèse), l'agrécanne (protéoglycane majeur du cartilage hyalin), le collagène II (collagène majoritaire du cartilage hyalin) sont augmentés lorsque les chondrocytes sont cultivés en condition hypoxique prouvant ainsi l'effet bénéfique d'une dépression en oxygène sur les fonctions chondrocytaires **[191, 195, 196]**. Cependant, l'hypoxie, lors de la phase d'expansion, ne semble pas avoir d'effet sur les potentialités chondrogéniques des chondrocytes « arthrosiques » **[197]**.

Plusieurs travaux ont démontré que l'hypoxie permettait également de potentialiser la redifférenciation de chondrocytes dédifférenciés par un nombre de passages élevés **[100-101]**. L'hypoxie permet également une potentialisation des capacités chondrogéniques des CSM. Lors de l'étape d'expansion, l'effet d'un appauvrissement en oxygène du milieu de culture semble stimuler l'étape ultérieure de différenciation chondrogénique en 3D des CSM d'origines tissulaires différentes **[198, 199]**. De plus, en culture tridimensionnelle, l'expression des gènes d'intérêt du cartilage (Sox 9, collagène II et agrécane) ainsi que la synthèse matricielle de protéoglycannes et de collagènes sont stimulées par l'hypoxie dans les CSM ostéomédullaires **[200]**, dans les CSM dérivées de tissu adipeux **[201]** et dans les cellules souches dérivées de tissu synovial fœtal humain **[202]**.

Par ailleurs, la culture en hypoxie réprimerait la différenciation hypertrophique et ostéogénique des CSM de la moelle osseuse **[203]** en régulant l'expression de RunX2 (facteur de transcription induit lors de l'ostéogénèse précoce) **[204]**, des CSM provenant de la graisse **[205]** et des CS synoviales **[206]**.

## E. MODELES EXPERIMENTAUX EN INGENIERIE DU CARTILAGE

Le but de l'ingénierie du cartilage est l'implantation chirurgicale chez l'Homme en site lésionnel. Le processus de conception d'un implant fonctionnalisé achevé et la qualité de la MEC néo-synthétisée *in vitro* évaluée, l'étape suivante consiste en l'implantation chez l'animal du biomatériau issu de l'ingénierie tissulaire. Les études chez l'animal représentent toujours un outil essentiel pour comprendre le comportement biologique de l'implant et d'évaluer la qualité du tissu de réparation en condition physiologique. Elles permettent de s'assurer de la faisabilité de la chirurgie et de la biofonctionnalité du tissu de réparation cartilagineux avant toute application clinique du modèle **[207, 208]**.

Les études précliniques *in vivo* doivent être habituellement réalisées sur deux espèces animales différentes, au minimum, une espèce « rongeur » et une espèce « non-rongeur ». Un modèle animal idéal devrait présenter une anatomie et une physiologie similaire à l'Homme et une taille appropriée permettant la chirurgie. Dans le domaine ostéo-articulaire, les animaux les plus utilisés sont la souris, le rat, le lapin, la chèvre, le mouton, le chien, le porc et le cheval.

## 1. Les animaux de petite taille

Les modèles de rongeur sont les animaux les plus utilisés et servent de liens entre les expérimentations *in vitro* et les études précliniques menées sur des modèles plus coûteux d'animaux de grande taille. La chondrogenèse a principalement été étudiée sur des modèles murins d'implantations sous-cutanée [209], intramusculaire [210] et intra-articulaire [211] de divers biomatériaux et cellules.

### (1) La souris

Le modèle murin offre de grands avantages dans un grand nombre d'études *in vivo* en raison de la disponibilité actuelle de nombreuses souches athymiques, transgéniques et knock-out (KO), de leur faible coût et des facilités d'achat, d'hébergement et de reproduction de l'espèce. En revanche, la petite taille de l'articulation et l'épaisseur minimale du cartilage articulaire constituent les principaux désavantages du modèle. Bien que la disponibilité de souris immunodéprimées donne l'opportunité d'étudier des cellules et des tissus d'origine allogénique et exogénique, la petite taille de l'articulation et la finesse du cartilage remettent en question la faisabilité et la pertinence d'évaluer la réparation du cartilage à l'aide d'implants issus de l'ingénierie tissulaire.

Vacanti *et coll.* ont initié les études d'ingénierie du cartilage sur des souris athymiques en implantant des biomatériaux contenant des chondrocytes humains en sous-cutané afin de générer à nouveau du cartilage hyalin [212]. A ce jour, le modèle murin est couramment utilisé pour étudier *in vivo* la chondrogenèse en site ectopique. Les travaux utilisant des cellules souches mésenchymateuses ont montré des résultats contrastés puisque tous les implants ne produisent pas un cartilage stable en site ectopique alors que les études employant des chondrocytes ont prouvé le maintien du phénotype chondrogénique *in vivo* [213, 214, 215]. La formation *in vivo* d'un tissu cartilagineux obtenu par ingénierie du cartilage est fortement dépendante du type de biomatériau employé, du temps d'induction de la chondrogenèse *in vitro* et du maintien du phénotype chondrogénique. En effet, une fois mis en place dans l'organisme, les implants sont placés dans un environnement propice à l'apport de facteurs existant dans le tissu sous-cutané mais absent dans le cartilage natif et à l'apport de vascularisation conduisant à la métaplasie osseuse de l'implant.

Cependant, des injections intra-articulaires de CSM adipeuses ont été effectuées chez la souris. Ces études ont démontré la faisabilité et l'innocuité de l'injection de CSM adipeuses dans l'articulation pour le traitement des maladies rhumatismales [216]. Les CSM adipeuses possèdent également la capacité de réduire la dégradation du cartilage de 65% 14 jours après l'injection et de 35 % après 42 jours lorsque l'arthrose a été induite chez la souris [217].

### (2) Le rat

Les rats (oncins) présentent des avantages économiques similaires au modèle murin. En revanche, ce modèle, possédant une articulation de plus grande taille, permet de réaliser des études d'évaluation de la réparation cartilagineuse après création d'une lésion. Il a été

démontré qu'il est possible de réaliser des lésions cartilagineuses de taille importante par rapport au volume du cartilage [218]. Tout comme la souris, le rat peut être utilisé pour les études préliminaires portant sur l'efficacité de la biodégradation de nouveaux biomatériaux et polymères. L'implantation *in vivo* d'une structure PEG-Genipin altère les capacités de dégradation de l'implant au sein d'une lésion ostéocondrale si la concentration en PEG est modifiée [219]. Bien que de taille supérieure à celle du modèle murin, le rat souffre tout de même de limitation similaire toujours en raison de la taille de l'articulation, de la finesse du cartilage et la possibilité de réparation spontanée du cartilage.

Le cartilage de faible épaisseur est plus facilement dommageable et peut être plus facilement réparé en comparaison avec le cartilage articulaire humain. L'estimation de la réparation de la lésion par des techniques d'imagerie est généralement difficile à réaliser en raison de la taille de l'articulation. Cependant, la réparation du cartilage patellaire chez le rat a été évaluée avec succès en utilisant la cartographie T2 en IRM 8,5T par notre équipe [220] et prouve la possibilité de différencier un cartilage lésé d'un néo-tissu synthétisé au sein de la lésion par ingénierie tissulaire. Tout comme pour les souris, les rats sont des modèles intéressants en ingénierie du cartilage en raison de l'existence de lignées immunodéprimées permettant l'utilisation de cellules d'origines xénogénique et allogénique. Mais la petite taille de l'articulation et la finesse du cartilage limitent l'extrapolation des résultats obtenus. De plus, ce sont des animaux quadrupèdes.

### (3) Le lapin

Ce modèle présente un coût supérieur à l'achat mais l'hébergement est relativement bon marché. Au début, ce modèle a largement été utilisé dans les études de régénération du cartilage [221, 222]. Par la suite, de grandes capacités de réparation endogène ont été décrites chez le lapin [223]. Shapiro a déterminé l'origine des cellules constituant le tissu de réparation. Ils en ont conclu que la prolifération et la différenciation des CSM issues de la moelle osseuse étaient à l'origine de la réparation sans aucune participation résiduelle du cartilage articulaire adjacent [224]. Contrairement au lapin, les lésions cartilagineuses chez l'Homme, si elles ne sont pas traitées, présentent des capacités limitées de réparation spontanée [225]. Cette divergence entre les deux espèces rend difficile la transposition des résultats observés à l'Homme.

Le lapin possède également un cartilage mince qui limite la faisabilité de larges et profondes lésions. Dans la littérature, la profondeur de la lésion la plus référencée est d'environ 3 mm [226, 227] ce qui représente une épaisseur supérieure à celle du cartilage. La position de l'articulation du lapin constitue également une grande différence de répartition de charge par rapport à l'Homme ou à des modèles animaux de plus grande taille. Le lapin est principalement utilisé pour étudier la réparation ostéocondrale à l'aide d'implants fonctionnalisés issus de l'ingénierie tissulaire [228, 229, 230]. Ce modèle apparaît pratique dans les études préliminaires en ingénierie du cartilage pour des raisons économiques et de facilité de procédure expérimentale inhérentes à une articulation de taille supérieure. Cependant, ce modèle est de plus en plus délaissé car le cartilage du lapin possède un fort potentiel de réparation spontanée, des dissemblances avec l'Homme et une épaisseur réduite.

Le lapin est également largement étudié dans la régénération du cartilage auriculaire. Des implants contenant des CSM adipeuses et des chondrocytes ont permis de favoriser la réparation du cartilage auriculaire lésé [231, 232].



## 2. Les animaux de grande taille

### a) *Le chien*

Ce modèle a été fortement étudié dans les travaux portant sur la réparation du cartilage car, tout comme l'Homme, le chien ne possède pas de capacité de réparation intrinsèque du cartilage et peut souffrir des mêmes maladies cartilagineuses que l'Homme (arthrose, ostéochondrite disséquante). Dans les espèces de moyenne et grande taille, l'épaisseur du cartilage est comprise entre 0,95 et 1,3 mm [233] ce qui permet de réaliser des lésions partielles du cartilage et étudier son potentiel de réparation. En revanche, les lésions produites chez le chien demeurent plus petites en taille (4 mm) que celles survenant spontanément en clinique chez l'Homme [47].

Le modèle canin offre certains avantages telle que la possibilité de réaliser des études longues impliquant des protocoles de réhabilitation ou d'exercices (tapis roulant, ...) ainsi que la docilité des animaux pour les différents soins (bandages, attelles, ...) [234]. Ce modèle est moins en vogue, le chien possédant un statut particulier pour l'Homme puisqu'il est considéré comme un animal de compagnie, donc source d'anthropomorphisme. Il reste cependant très utilisé chez les collègues canadiens (labrador).

### b) *La chèvre*

Ce modèle est communément utilisé pour l'étude du cartilage [235, 236]. Ses avantages regroupent la taille de l'articulation, l'épaisseur du cartilage et de l'os sous-chondral, l'accessibilité de l'articulation en arthroscopie et la réparation limitée des lésions. Ce modèle possède une articulation de taille supérieure à celle du chien. Des lésions d'un diamètre de 6 mm ne peuvent pas se réparer spontanément [237, 233]. Le modèle caprin a été étudié avec succès dans l'évaluation des traitements des lésions ostéochondrales à l'aide d'implants [238, 239, 240, 241]. L'épaisseur du cartilage de la chèvre est comprise entre 0,8 à 2 mm autorisant la création de lésions, d'un point de vue volumique, inférieures en taille à celles observées chez l'Homme.

### c) *Le porc*

D'un point de vue de la taille de l'articulation, de l'épaisseur du cartilage et de la répartition des charges, le modèle porcin se rapproche des conditions humaines. Bien que présentant de nombreux avantages, ce modèle est peu utilisé en raison de la taille importante des animaux et de leur agressivité [242]. L'emploi de souche de mini-porc peut contourner un grand nombre de limitations. Les porcs miniatures sont plus dociles, maintiennent une taille et un poids adulte comparable à celui de l'Homme adulte et présentent des capacités de réparation limitée du cartilage. Les articulations des mini-porcs sont plus petites que chez l'Homme, pourtant des lésions chondrales et ostéochondrales d'un diamètre de 6 à 8 mm, voire supérieur, peuvent être créées au niveau des condyles fémoraux ou du sillon trochléaire [208].

Afin de limiter la réparation spontanée, il est important d'utiliser des animaux avec un squelette mature [243]. Les porcs miniatures tels que les mini-porcs de Gottingen (GMP) atteignent leur maturité squelettique entre 18 à 22 mois et présentent des caractéristiques histomorphométriques similaires à l'Homme. Kaab *et coll.* ont également démontré par analyse en microscopie électronique que l'arrangement de fibre de collagène du cartilage

articulaire porcin était très proche du cartilage humain [244]. L'épaisseur du cartilage (1,5mm) [245] est un autre avantage de ce modèle car cette épaisseur permet la création de lésions partielles ou totales. De plus, l'évaluation arthroscopique de l'articulation est possible [246, 247].

Gottenbarm *et coll.* ont montré que les lésions chondrales et ostéochondrales d'un diamètre de 6,3 à 8 mm ne se réparent pas spontanément chez les différentes souches de mini-porcs confirmant l'intérêt de ces animaux pour étudier la qualité de la réparation du cartilage par ingénierie cellulaire [248] et ingénierie tissulaire [249, 208, 250, 251]. Ces travaux encourageants mettent en évidence la faisabilité et l'utilité du modèle de mini-porcs dans les études de régénération et réparation des lésions partielles et ostéochondrales en se rapprochant des tailles des lésions retrouvées chez l'Homme.

---

#### d) *Le cheval*

Ce modèle offre de nombreux avantages dans l'étude du cartilage. Comme l'Homme, le cheval souffre de nombreux problèmes articulaires d'origine cartilagineuse. Le traitement des lésions chondrales et ostéochondrales est particulièrement développé du fait de l'importance de l'industrie hippique [252]. Le cartilage chez le cheval montre des capacités limitées de réparation spontanée comme chez l'Homme puisque des lésions de 21 mm ne se réparent pas spontanément [253]. La taille et la profondeur des lésions créées chez le cheval se rapprochant de celle observées chez l'Homme [254, 255, 233]. Ce modèle est très avantageux pour étudier l'efficacité des différentes techniques de réparation du cartilage articulaire. Les dimensions de l'articulation du cheval permettent également l'exploration par arthroscopie. Les CSM ostéomédullaires équinés possèdent elles aussi un potentiel chondrogénique intéressant rendant légitime leur utilisation en ingénierie du cartilage [256] puisqu'elles permettent la stimulation de la chondrogenèse au sein de lésions articulaires [257]. Bien qu'une transposition à l'Homme reste possible, ce modèle présente de nombreux inconvénients d'un point de vue économique, d'hébergement, de soins vétérinaires et de difficultés des procédures chirurgicales.

---

### 3. Choix de l'espèce

De nombreux facteurs doivent être pris en considération dans la sélection d'un modèle animal approprié à l'étude réalisée. Le coût engendré par l'achat et l'hébergement des animaux entre en compte dans toute l'étude. En règle générale, le coût augmente proportionnellement avec la taille de l'animal. Pour cette raison, les recherches sont principalement conduites sur des petits animaux tels que les rongeurs et les lapins pour les études de faisabilité. Cependant, l'application clinique à l'Homme n'autorise pas la seule étude de petits animaux et nécessite d'effectuer des travaux plus poussés sur des animaux de grande taille. Les articulations des petits animaux présentent des dimensions réduites et une épaisseur de cartilage très fine ne permettant pas de créer des lésions de dimensions équivalentes à celle observées chez l'Homme [245].

Cependant, l'utilisation d'animaux de grande taille nécessite des locaux d'hébergement et des soins vétérinaires spécifiques coûteux ainsi que des personnels qualifiés chargés des animaux. Ceci peut constituer un frein à la réalisation de ces travaux. Le chien, la chèvre/le mouton, le porc et le cheval appartiennent à la catégorie des animaux de grande taille pouvant être utilisés pour l'étude du cartilage. Il est possible, pour chaque espèce, de créer des lésions cartilagineuses dont la taille ne permet pas de réparation spontanée.

Cependant, seul le cheval permet la réalisation de dommages similaires à ceux rencontrés chez l'Homme [233]. Les lésions causées chez le chien avoisinent généralement les 4 mm, 6 mm chez la chèvre, 8 mm chez le porc mais demeurent plus petites que celles observées chez l'Homme dont le diamètre est le plus souvent supérieur à 10mm. D'après les recommandations de l'ICRS (International Cartilage Repair Society), la chèvre, le mouton et le cheval sont les modèles les plus adaptés pour l'étude du cartilage [258]. De plus, la chèvre et le mouton peuvent être utilisés pour les études du cartilage par IRM car la taille de l'articulation permet de réaliser une exploration IRM sur des imageurs haut champ bien que leurs genoux soient plus petits et de géométrie différente au genou humain. Ceci rend difficile l'utilisation d'antenne utilisée pour l'Homme et nécessite le développement d'antennes dédiées [259]. Aucun modèle animal n'est idéal pour les études de réparation du cartilage mais le choix du ou des modèles utilisés doit avoir été mûrement réfléchi dans le protocole étudié.

## **F. METHODES D'IMAGERIE DU CARTILAGE**

De par son caractère avasculaire, le cartilage présente des capacités de réparation très limitées voire inexistantes. De plus, étant non innervé, ces lésions sont souvent asymptomatiques. Lorsque les premiers symptômes apparaissent, les dommages cartilagineux s'avèrent étendus et les traitements reposent principalement sur des thérapeutiques médicamenteuses et dans les cas les plus graves conduisent à des procédures chirurgicales invasives. Le diagnostic précoce des lésions du cartilage est un enjeu majeur dans le domaine ostéo-articulaire. Dans cet objectif, de nombreuses techniques d'imagerie ont été adaptées pour la visualisation indirecte ou directe du cartilage. Les différentes techniques disponibles sont la radiographie, le scanner, l'échographie, la Tomographie à Emission de Positons (TEP) ou encore l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).

### **1. La radiographie**

Son principe repose sur l'absorption des rayons X par le tissu traversé, donc tributaire de la densité de ces tissus. Les os, très denses, apparaissent donc en clair alors que les tissus moins denses apparaissent plus sombres. La radiographie représente l'examen de routine clinique principal utilisé pour l'évaluation indirecte du cartilage. Elle permet de mettre en évidence des particularités osseuses telles que des ostéophytes, une sclérose sous-chondrale ou encore des géodes sous-chondrales qui peuvent être associées à des pathologies cartilagineuses résultant de l'aggravation des lésions comme l'arthrose. Le cartilage étant radio-transparent, la mesure de l'interligne articulaire est considérée comme le critère majeur de la progression radiologique des lésions du cartilage [260].

Cependant, la mesure de l'interligne articulaire n'est pas une technique infaillible car peu précise et n'est pas toujours en corrélation avec la gravité des lésions cartilagineuses existantes [261] ni avec l'évaluation du grade du cartilage en histologie après pose de prothèse [262]. De plus, il a été démontré que des altérations méniscales pouvaient également provoquer des pincements de l'interligne [263]. Cette technique présente de nombreuses limitations dont le manque de sensibilité lors de la mesure de l'interligne (minimum de détection : 0,2 mm), le bon positionnement de l'articulation pendant l'acquisition, le manque de spécificité et l'obtention d'images en 2D [264].

---

## **2. Le scanner et l'arthroscanner**

Le scanner ou tomodensitométrie est un examen radiographique qui utilise les rayons X couplé ou non à l'utilisation de produit de contraste pour réaliser des images en coupes axiales et fines du corps avec une meilleure résolution que la radiographie. Le scanner n'a pas vraiment d'application pour le diagnostic des lésions précoces du cartilage. Pourtant, il permet une imagerie d'excellente qualité en trois dimensions de l'os illustrant la morphologie articulaire et qui pourrait être utile pour prédire la progression et le développement des dommages articulaires. Cependant, son rôle dans la détection des lésions cartilagineuses est limité.

L'arthroscanner conduit à une appréciation plus précise des lésions du cartilage avec une haute résolution anatomique multi-planaire et un contraste important entre les différentes structures de l'articulation (espace intra-articulaire, cartilage et os sous-chondral) permettant une meilleure reproductibilité de la mesure inter-observateur [265]. Bien que considérée comme une technique de caractérisation des lésions superficielles du cartilage, il a été démontré qu'elle s'avérerait efficace en clinique pour l'évaluation de la qualité du cartilage en estimant son contenu en glycosaminoglycannes [266]. Toutefois, cet examen est invasif et irradiant.

---

## **3. L'échographie**

L'échographie est basée sur l'émission d'ultrasons et la réception de l'écho par une sonde unique émettrice-réceptrice. Quand les ultrasons sont émis, ils pénètrent les tissus jusqu'à ce qu'ils rencontrent une structure entraînant leur réflexion : les ultrasons sont en partie absorbés par les éléments qui composent la dite structure et en partie réfléchis. L'écho donne des informations sur la position et la densité des tissus rencontrés. L'imagerie par ultrasons permet l'obtention d'images multi-planaires en temps réel sans irradiation et à un coût moindre. Elle permet une évaluation fiable des anomalies structurales dans l'articulation sans administration d'agent de contraste [267]. Les inconvénients de cette technique d'imagerie sont son caractère opérateur-dépendant et tout particulièrement la capacité limitée des ultrasons à atteindre des régions plus profondes de l'articulation et ainsi à produire des images de qualité [268].

---

## **4. L'IRM**

L'Imagerie par Résonance Magnétique est une méthode d'acquisition multi-planaire avec une bonne résolution. Elle présente l'avantage d'être non irradiante et permet d'obtenir des informations sur l'ensemble des structures de l'articulation. Cependant, l'accès à l'IRM en France est limité car onéreux avec un long délai d'attente.

Le principe et les applications de l'IRM en ingénierie du cartilage seront exposés dans le chapitre suivant.

## G. L'IRM

### 1. Généralités sur l'IRM

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est une méthode non invasive qui, dans le contexte médical, permet d'identifier et de caractériser les tissus pathologiques et les lésions. L'énergie utilisée en Résonance Magnétique Nucléaire dans le domaine des radiofréquences est environ  $10^9$  fois inférieure à celle des photons utilisés en radiologie X conventionnelle (Figure 7). Par conséquent, l'IRM est considérée comme une technique non-agressive, n'affectant pas les tissus biologiques. Elle représente donc une alternative intéressante aux méthodes développées dans les paragraphes précédents quand les tissus à explorer sont sensibles aux rayonnements ionisants.

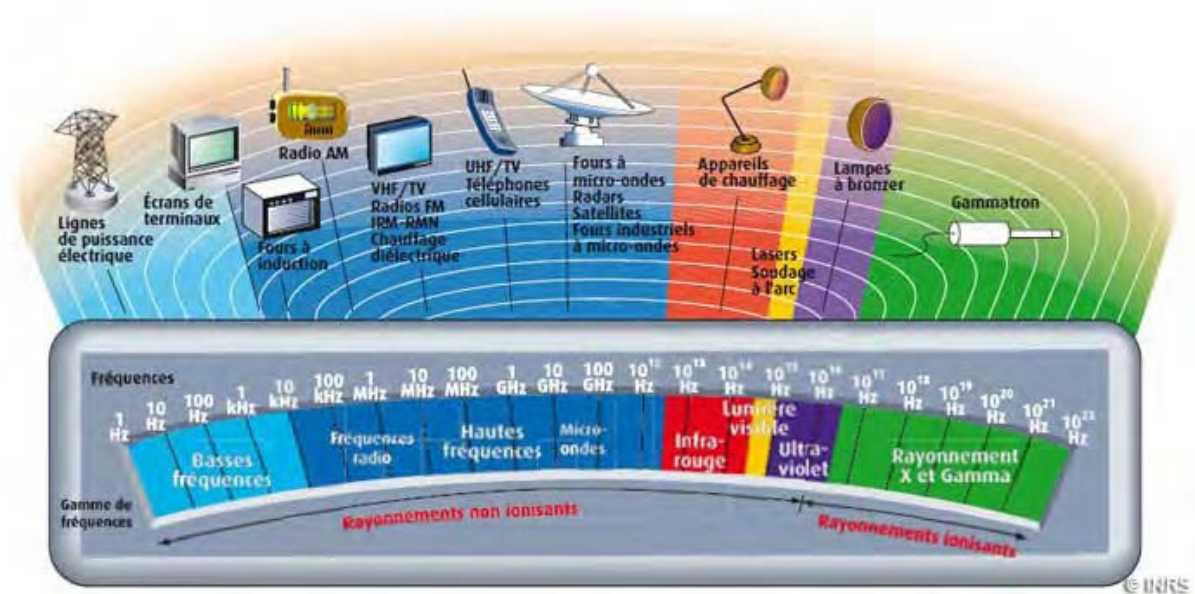


Figure 7. Spectre électromagnétique.

<http://www.inrs.fr>

#### a) Principe de l'IRM

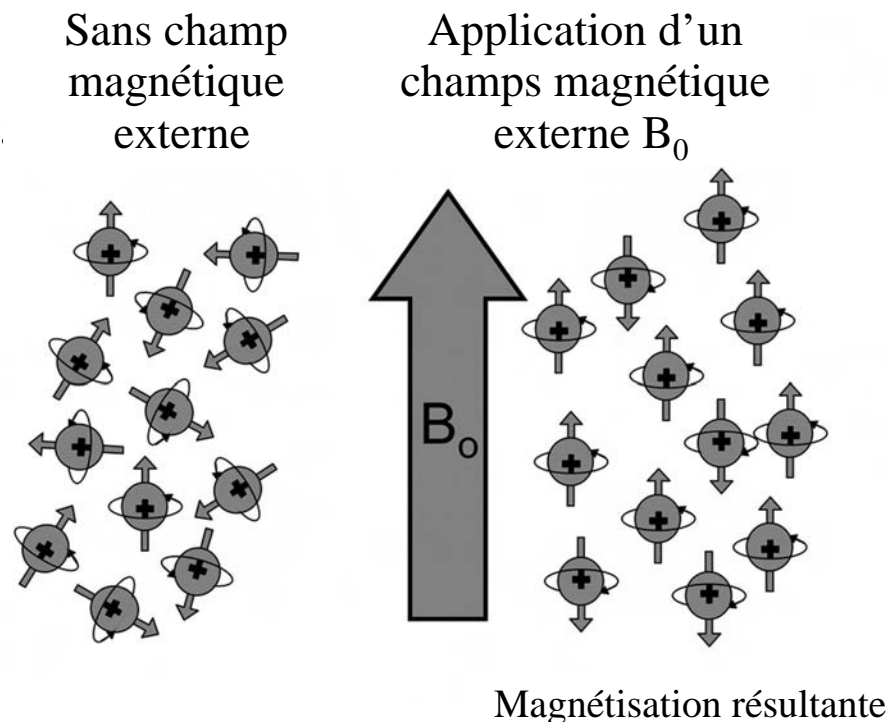
La résonance magnétique nucléaire (RMN) consiste à étudier l'évolution de l'aimantation qui apparaît pour certaines substances sous l'effet d'un champ magnétique statique  $B_0$ . Un noyau est composé de protons et de neutrons à l'exception de l'atome d'hydrogène dont le noyau comprend seulement un proton. L'hydrogène est l'atome le plus abondant du corps humain puisque le corps est composé à 60% d'eau. L'IRM du proton ( $H^+$ ) est classiquement la plus utilisée. Cependant, l'IRM du phosphore ou du sodium ou encore d'autres noyaux sont également réalisables.

Le principe du codage spatial de cette technique est basé sur l'application de gradients de champ magnétique dans les trois directions de l'espace. Le signal dépend de la concentration locale en proton et de leur cinétique de relaxation caractérisée par des temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$ . Les processus de relaxation des protons des molécules d'eau dépendent de leur environnement et varient donc selon les tissus. Des modulations de l'intensité de l'image

sont attendues selon la nature tissulaire des différents organes. Cette modalité possède le potentiel de fournir des images à haute résolution spatiale des tissus mous, permettant ainsi la visualisation anatomique et la détermination des pathologies. L'IRM est la seule technique capable de visualiser directement et simultanément l'ensemble des constituants de l'articulation. Comparée à la radiographie, elle présente plusieurs avantages : l'individualisation du cartilage, ses capacités d'acquisition multi-planaires, l'excellent contraste entre les différents tissus. En outre, il est communément admis que l'IRM est plus sensible que la radiographie et l'arthroscopie pour la détection d'anomalies de type arthrosique, et qu'elle est absolument indispensable pour l'évaluation des modifications des tissus mous.

### (1) Le moment magnétique nucléaire

Certains noyaux possèdent un moment magnétique qui tourne sur lui-même, appelée spin. En absence de champ magnétique les spins s'orientent aléatoirement et la résultante magnétique de l'ensemble est nulle. En présence d'un champ magnétique  $B_0$ , les spins s'orientent dans la direction du champ mais pas obligatoirement dans le même sens (Figure 8).



**Figure 8 : Alignement des protons sur le champ magnétique  $B_0$ .** En absence de champ magnétique, les protons s'orientent aléatoirement. En présence d'un champ magnétique  $B_0$ , les protons s'orientent dans l'axe du champ [269].

La proportion de spins dans le même sens que  $B_0$  est supérieure à celle des spins antiparallèles (orientés dans le sens contraire au champ). Cet écart de population est proportionnel à l'amplitude du champ magnétique principal. Cette différence crée une aimantation macroscopique. Bien que faible, c'est sur cette différence que se base le principe de l'IRM. Leur mouvement de l'aimantation macroscopique autour de l'axe  $B_0$  forme un cône, c'est le mouvement de précession. La fréquence de précession de l'aimantation est appelée la fréquence de Larmor. Elle augmente avec l'intensité du champ (Figure 9.a).

## (2) Principe de l'excitation et de l'acquisition du signal

En l'IRM, l'énergie est apportée par une onde radiofréquence (RF). Pour que le système entre en résonance, il faudra que cette onde ait exactement la même fréquence que la fréquence de Larmor. La mise en résonance se traduit une bascule de l'aimantation dans le plan transverse à la direction du champ magnétique  $B_0$ . Il va y avoir deux phases : une phase d'excitation durant laquelle l'onde sera émise, puis après l'arrêt de l'onde, une phase de relaxation et de retour à l'état d'équilibre que l'on peut mesurer et qui correspond au signal RMN.

### (A) LA PHASE D'EXCITATION

La phase d'excitation se fait à l'aide d'un champ radiofréquence  $B_1$  dont la fréquence est égale à la fréquence de précession des spins. Il est appliqué sous la forme d'une courte impulsion et est généré par l'application d'un courant sinusoïdal dans une bobine dont le champ  $B_1$  est perpendiculaire à  $B_0$ . Les impulsions les plus couramment utilisées sont les impulsions d'angles à  $90^\circ$  et à  $180^\circ$ .

Avec une onde RF dont la fréquence est celle de Larmor, la résultante de l'aimantation tissulaire (somme de tous les moments magnétiques) bascule. L'angle de cette bascule dépend de l'intensité et de la durée du champ magnétique  $B_1$ . On peut décomposer l'aimantation tissulaire en une composante longitudinale (selon l'axe Z, aligné sur  $B_0$ ) et une composante transversale.

La phase d'excitation génère une bascule qui se traduit par une diminution de l'aimantation longitudinale, et l'apparition d'une aimantation transversale. Cette aimantation va repousser pour retrouver son état d'équilibre (*Figure 9.b*).

### (A) LA PHASE DE RELAXATION

Le système retourne à son état d'équilibre en restituant l'énergie sous la forme d'un signal RF (sinusoïde amortie) recueilli par une antenne bobine dans le plan xOy (*Figure 9.c*).

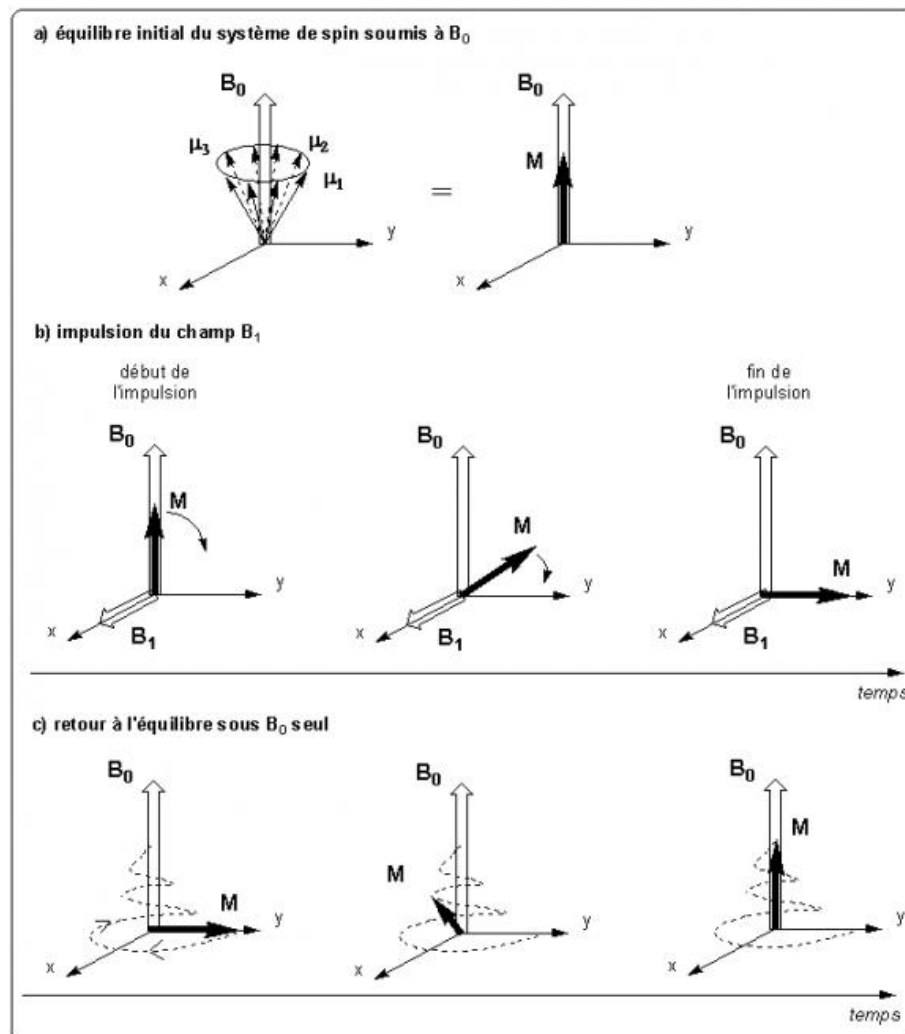
Pour la relaxation, il convient de différencier les composantes longitudinales et transversales.

La repousse longitudinale correspond au retour à l'état d'équilibre de l'aimantation macroscopique. Cette recroissance du vecteur d'aimantation longitudinale se fait selon une loi exponentielle croissante caractérisée par le temps T1 (temps de relaxation longitudinal ou spin-réseau). Le T1 est le temps au bout duquel un tissu a regagné 63% de son aimantation maximale après une impulsion à  $90^\circ$ .

La relaxation transversale est due au déphasage des spins entre eux c'est-à-dire à la perte de synchronisation des spins induite après l'onde RF. Cette chute de l'aimantation transversale suit une courbe décroissante caractérisée par le temps T2 (Temps de relaxation transversal ou spin-spin). Le T2 est le temps au bout duquel un tissu a perdu 63% de son aimantation transversale maximale.

Le T1 est dû à un transfert d'énergie entre le proton et le milieu dans lequel il se trouve. Il est donc caractéristique du tissu où sont engagés les atomes d'hydrogène dont les protons ont été excités. Le T2 est dépendant aussi du tissu dans lequel le proton se trouve. Le déphasage des spins est dû à des interactions spins-spins. Le T1 sera toujours supérieur au T2

(généralement 10 fois), quel que soit le milieu. Le contraste en IRM est dû à la différence entre ces deux temps.



**Figure 9. Phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire.** a) Système à l'équilibre. Les spins s'orientent dans l'axe de  $B_0$  et réalisent un mouvement de précession formant un cône autour de l'axe  $B_0$  et caractérisés par des moments magnétiques  $\mu$ . Le vecteur  $M$  représente la somme des moments magnétiques  $\mu$ . b) Excitation par un champ  $B_1$ . L'application d'une impulsion induit une bascule de du vecteur  $M$  (sur cette figure à  $90^\circ$ ). c) Phase de relaxation. A la fin de l'impulsion RF, les spins retournent à l'état d'équilibre progressivement en fonction du temps.

<http://culturesciences.chimie.ens.fr>

### (3) Construction des images IRM

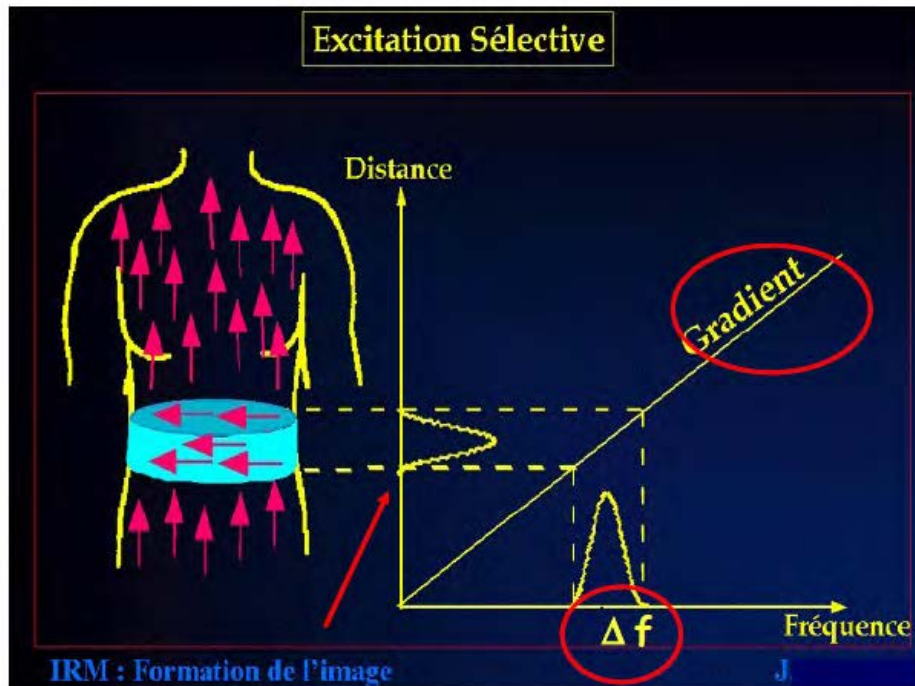
Pour réaliser une image, il est nécessaire de recueillir un signal et de situer ce signal dans l'espace. Mais, le signal recueilli lors du retour à l'équilibre des spins sera la représentation de l'ensemble des spins de la structure contenue dans l'aimant sans individualisation possible des différentes régions anatomiques. L'application de gradients (variations linéaires de l'intensité du champ magnétique) dans les trois plans de l'espace permet d'individualiser des éléments de volume (voxels) et ainsi d'obtenir des informations spatiales. Le signal peut alors être localisé dans chaque voxel de l'image.



Trois types de gradients sont combinés pour permettre l'acquisition de l'image : le gradient de sélection de coupe, le gradient de codage de phase et le gradient de codage de fréquence. Les gradients utilisés sont linéaires et symétriques. La fréquence de rotation des spins étant dépendante du champ magnétique, un gradient de champ induit alors un gradient de fréquence de la précession des aimantations.

(A) GRADIENT DE SELECTION DE COUPE

Ce gradient est appliqué en même temps que les impulsions RF. Le phénomène de résonance se produit lorsque la fréquence de précession des protons est égale à la fréquence de l'onde RF émise. Les protons possédant une vitesse de rotation plus rapide ou plus lente n'entrent pas en résonance. L'application de ce gradient permet la sélection d'une zone anatomique. L'épaisseur de la coupe réalisée est choisie à l'aide d'une bande passante (« gamme » de fréquence appliquée). Seuls les protons dont la fréquence est encadrée par la bande passante vont entrer en résonance. Les variations de bande passante ou d'intensité de gradient conditionnent l'épaisseur de la coupe (Figure 10). Une réduction de la bande passante ou une augmentation du gradient permettent une diminution de l'épaisseur de coupe par exemple.



**Figure 10. Sélection de l'épaisseur de coupe.** L'épaisseur d'une coupe est déterminée par la bande passante ( $\Delta f$ ) et l'intensité de gradient.

<http://integrationenphysique.blogspot.fr/2011/03/le-role-des-gradients-dans-lacquisition.html>

## (B) GRADIENT DE CODAGE DE PHASE

---

Au sein d'une coupe, l'identification spatiale s'effectue selon deux axes : y pour le codage de phase et x pour le codage de fréquence ou de lecture. Le gradient de phase permet de différencier chaque ligne de la coupe sélectionnée par le gradient de coupe. Après application du gradient, les fréquences de rotation des protons sont alors modifiées, créant des lignes de protons ayant la même vitesse de précession. Il en résulte un déphasage qui persiste même lorsque le gradient de codage de phase est interrompu. Ce déphasage est enregistré sous forme d'un signal recueilli par l'antenne. Ce gradient est appliqué après les impulsions RF, donc après le gradient de coupe et avant le gradient de lecture.

## (C) GRADIENT DE CODAGE DE FRÉQUENCE

---

Ce gradient est appliqué pendant le recueil du signal, c'est pourquoi il est appelé gradient de lecture. Il permet d'individualiser chaque voxel de chaque rangée de la coupe. Il consiste en l'application dans l'autre direction du plan du gradient de codage de phase (axe x). Ceci conduit à la modification des fréquences de précession des protons créant des colonnes de protons possédant la même vitesse de précession. Cette fréquence est enregistrée par l'antenne. La coupe, une fois sélectionnée en fonction de l'intensité et l'orientation du gradient, est analysée voxel par voxel (unité de volume représentant un cube formé par l'association d'un pixel et de l'épaisseur de la coupe). Dans le plan, chaque pixel (unité de surface) est localisé selon la ligne et la colonne. Les informations spatiales sont obtenues par association du codage de phase et du codage de fréquence. Pour obtenir toutes les informations de l'ensemble de la coupe, il est nécessaire d'appliquer à nouveau ces gradients (détermination du temps de répétition ou TR).

## (D) L'ESPACE DE FOURIER

---

Le signal capté par l'antenne est traduit en données mathématiques qui vont s'ordonner dans un espace mathématique, nommé espace K ou espace de Fourier. Cet espace K contient toutes les informations nécessaires à la formation de l'image. L'image est modélisée à partir de l'espace K à l'aide d'une transformée de Fourier. Ce processus permet la construction d'une image en deux dimensions. Les coupes peuvent ensuite être superposées pour obtenir une image en trois dimensions.

## (E) LA RESOLUTION SPATIALE

---

La résolution spatiale sert à déterminer la dimension du plus petit détail observable, elle dépend donc directement de la taille du voxel. Plus le voxel est petit et plus la résolution spatiale est bonne. Le voxel étant conditionné par la taille du pixel et la profondeur de coupe, la résolution spatiale va dépendre de 3 paramètres : l'épaisseur de coupe, la taille du champ de vue (FOV) et la taille de la matrice (nombre de pixels de l'image numérique). Si l'épaisseur de coupe augmente la résolution spatiale diminue. De même, si le FOV est plus élevé avec une matrice fixe, la résolution spatiale perd en qualité. En revanche, une augmentation de la matrice avec un FOV fixe permet une amélioration de la résolution spatiale. Plus la taille du voxel sera petite, meilleure sera la résolution spatiale, mais le rapport signal sur bruit sera diminué.

(F) LE RAPPORT SIGNAL SUR BRUIT (SNR)

Le rapport signal sur bruit est le paramètre principal conditionnant la qualité de l'image. Il correspond au rapport entre le signal du tissu étudié et le bruit de fond (fluctuation du signal d'un voxel à l'autre de l'image). Il influence la résolution spatiale et le contraste. En effet, le contraste entre deux points de l'image sera significatif lorsque la différence d'intensité des signaux entre ces deux points est supérieure au bruit.

(G) LE NOMBRE D'EXCITATION (NEX)

Le NEX se définit par le nombre de répétition de l'acquisition IRM. C'est un indicateur du nombre de fois que chaque ligne de l'espace K est enregistrée. L'accumulation d'excitation améliore nettement le rapport signal sur bruit de l'image mais a pour inconvénient de prolonger la durée d'acquisition de la séquence.

## 2. IRM du cartilage

### a) Séquences IRM

Une séquence IRM est définie par l'ensemble des paramètres déterminant les impulsions de champ magnétique et les caractéristiques des mesures effectuées en IRM. Une séquence est caractérisée par deux paramètres principaux, le temps d'échos et le temps de répétition.

#### (1) Le temps d'écho ou TE

Il représente le temps, en millisecondes, séparant le début de la séquence (application de l'impulsion) et l'apparition du signal IRM. Les variations de TE permettent de modifier la pondération des images. Pour des temps d'écho courts, le signal est dépendant de la relaxation longitudinale et les images seront pondérées en T1. En revanche, si de longs TE sont paramétrés, le signal est peu dépendant de T1 mais dépend fortement de la relaxation transversale, les images seront alors pondérées T2.

#### (2) Le temps de répétition ou TR

Il correspond à l'intervalle de temps qui sépare le début d'une séquence du début de la séquence suivante. Après stimulation de radiofréquence avec un temps de répétition court, les atomes d'hydrogène n'ont pas le temps de revenir en position d'équilibre. Un TR court pondère alors les images en T1 puisque la repousse longitudinale est incomplète. Réciproquement, un TR long permet aux atomes de retrouver leur état fondamental d'énergie faible produisant ainsi des images pondérées en T2.

#### (3) Pondération en T1

Les images pondérées en T1 sont obtenues en utilisant des TE et TR courts. Un TE court permet de s'assurer de la minimisation de la pondération en T2 de l'image. Elles permettent une évaluation dite « anatomique » et une appréciation précise de la taille et de la forme des différentes structures anatomiques étudiées. Cependant, les images pondérées en T1 n'offrent pas un excellent contraste entre les surfaces cartilagineuses et les épanchements

de liquide synovial, limitant ainsi leur utilisation pour la détection des lésions focales du cartilage.

#### (4) Pondération en T2

Une évaluation structurale est réalisable grâce à ce type de pondération. L'utilisation de TE (120 ms) et TR longs permet de pondérer les images IRM en T2. Un TE long permet d'obtenir un contraste en T2 et un TR long est nécessaire pour détruire la contribution du T1. Mais un allongement du TR augmente d'autant plus le temps d'acquisition. Les images présentent un bon contraste les surfaces cartilagineuse et le liquide synovial et permettent la détection de lésions focales du cartilage.

#### (5) Pondération en densité de protons

Cette densité protonique correspond aux valeurs des vecteurs d'aimantation à l'équilibre. Une image pondérée en densité de protons est obtenue avec un TE court et un TR long et de ce fait, n'est ni pondérée en T1 ni pondérée en T2. Un TR long permet une repousse complète de l'aimantation à l'équilibre exprimant ainsi la densité protonique. Elles permettent de détecter les lésions superficielles du cartilage mais également des anomalies de composition du cartilage.

## H. IRM MORPHOLOGIQUE ET STRUCTURALE DU CARTILAGE

### 1. Etudes morphologiques

#### a) *Aspect du cartilage*

La séquence Spin-Echo est considérée comme la séquence de base en IRM. Il existe des séquences spin-écho pondérée en T1 ou en T2. Les séquences en écho de spin pondérées T1 sont utilisables en pratique clinique et permettent d'obtenir des images anatomiques de bonne qualité (bon rapport signal sur bruit et bonne résolution). Cependant, le contraste entre le cartilage et le liquide synovial est mauvais. Elles sont principalement utilisées pour le diagnostic de lésions articulaires graves (stade IV) et pour évaluer l'état de l'os sous-cortical inévitablement touché à ce stade. Pour les séquences spin-écho pondérées T2, l'utilisation de TR longs est nécessaire, limitant leur usage en routine.

Les séquences en double écho permettent d'associer une imagerie en densité de protons et en T2. Les images obtenues présentent un meilleur contraste pour l'imagerie du cartilage. Les séquences Spin-Echo standard sont délaissées au profit de séquences plus rapides, les séquences Fast Spin-Echo ou Turbo Spin-Echo, par exemple. Elles permettent de réduire le temps d'acquisition tout en conservant une qualité d'images intéressante. Ces séquences nécessitent néanmoins le réglage de paramètres conduisant à une suppression du signal de la graisse afin d'augmenter le contraste entre les différentes structures anatomiques. Au sein de l'articulation, cela permet d'accentuer le contraste entre le cartilage et l'eau et entre le cartilage et le tissu osseux.

*b) Evaluation du volume du cartilage*

(1) Séquences en écho de gradient trois dimensions

Les séquences 3D SPGR (Spoiled gradient-echo) et FLASH (Fast low-angle shot) sont deux types de séquences fondées sur l'écho de gradient couramment utilisées pour l'évaluation quantitative de la morphologie du cartilage. Avec ces séquences pondérées en T1, le cartilage apparaît en hypersignal et le liquide synovial apparaît sombre. Elles sont généralement associées à une suppression du signal de la graisse afin d'augmenter le contraste.

Il a été démontré que ces séquences permettaient la détection de lésions du cartilage mises en évidence par arthroscopie. Elles peuvent s'avérer utiles pour l'estimation de l'épaisseur et du volume du cartilage dans l'évaluation des lésions mais également dans l'appréciation des réparations des lésions. Leurs limites résident principalement dans le manque de contraste entre les surfaces cartilagineuses et le fluide synovial pouvant être une entrave à la détection de lésions cartilagineuses superficielles. De plus, le temps d'acquisition de ces séquences est long pouvant conduire à des artefacts de mouvements [270].

(2) Segmentation du cartilage

Afin d'obtenir le volume du cartilage, des segmentations des différentes surfaces de l'articulation du genou sont nécessaires. La segmentation est une opération de traitement d'image des pixels ou voxels entre eux suivant des critères prédéfinis. Ils vont être regroupés en régions créant ainsi une partition de l'image traitée. Elle constitue une étape clé dans les analyses quantitatives des informations contenues dans une image. Il existe différentes méthodes de segmentation de l'image en IRM applicables à l'évaluation du cartilage (lasso, point par point, région, segmentation automatique).

(3) Mesure volumique du cartilage

Le calcul du volume du cartilage est obtenu à l'aide d'une intégration numérique à partir du nombre de pixels/voxels attribués au cartilage durant l'étape de segmentation. Plus le nombre de pixels/voxels décrivant le cartilage est important et plus le calcul du volume sera précis. La qualité de l'acquisition est donc primordiale dans l'estimation du volume du cartilage.

(4) Quantification de l'épaisseur du cartilage

Le calcul du volume global du cartilage, développé précédemment, constitue l'une des étapes d'évaluation morphologique du cartilage. Elle peut être complétée d'autres approches géométriques telles que la mesure de l'épaisseur du cartilage ou le calcul de courbure des surfaces articulaires ou l'aire des zones de contact articulaire [271]. Le calcul de ces paramètres doit être idéalement effectué sur des coupes 3D (coupes jointives) afin de s'affranchir de l'influence de l'orientation des coupes sur les mesures d'épaisseur [272].

*c) Etudes structurales*

Le cartilage hyalin est composé d'un réseau macromoléculaire constitué principalement des collagènes et des protéoglycannes. L'organisation du réseau collagénique et de l'eau est responsable du transfert de magnétisation et des artefacts dus aux angles magiques (les molécules d'eau au contact des fibres de collagènes structurées présentent des

interactions dipolaires qui diminuent leur temps de relaxation T2). Les protéoglycannes présentent des charges négatives et certains ions mobiles (sodium ou des agents de contraste chargés) peuvent se distribuer dans le cartilage en fonction de la concentration en protéoglycannes de ce dernier. Ces deux réseaux sont considérés comme les reflets de l'intégrité du cartilage. L'évaluation de sa composition par IRM se focalise essentiellement sur les concentrations de ces deux types moléculaires.

### (1) dGEMRIC

Le changement de la concentration en GAGs lors de la dégradation du cartilage est corrélé avec la densité de charges fixées par le tissu (FCD). Ce changement de densité de FCD est dû à la perte du contenu en protéoglycannes et peut être détecté à l'aide de la fixation d'un agent de contraste chargé négativement comme le Gd-DTPA<sup>2-</sup> (gadolinium diethylenetriamine-penta-acetic acid). L'utilisation d'une séquence dGEMRIC (Delayed Contrast-Enhanced MRI of Cartilage) s'avère intéressante pour étudier le contenu en protéoglycannes et sa répartition dans l'articulation. Si le cartilage est intact, l'agent de contraste est rejeté par les charges négatives des GAGs. En revanche, si le cartilage est lésé, le Gd-DTPA sera absorbé par le tissu. La concentration de Gd-DTPA est calculée en fonction du T1 du tissu [273]. Une cartographie T1 du cartilage conduit à l'obtention d'image reflétant la distribution des GAGs au sein du tissu. Le terme « delayed » qui signifie « différé » se réfère au temps requis pour que le gadolinium pénètre dans toute l'épaisseur du cartilage [274].

### (2) IRM du Sodium

Le sodium (Na<sup>+</sup>) est un exemple d'ion, autre que le proton H<sup>+</sup>, qui peut être utilisé pour l'imagerie par résonance magnétique du cartilage. Cependant, le noyau de sodium présente des caractéristiques différentes de celui d'hydrogène (fréquence de Larmor, fréquence de résonance, concentration et T2). De ce fait, l'imagerie du sodium nécessite des équipements adaptés qui ne sont pas toujours disponibles sur des systèmes cliniques d'imagerie. De plus, afin d'obtenir un ratio signal sur bruit intéressant, les temps d'acquisition sont relativement longs.

Les atomes de <sup>23</sup>Na peuvent s'associer avec les charges négatives des chaînes latérales des GAGs et des groupes sulfatés et carboxylés des protéoglycannes dans la matrice extracellulaire. La perte de protéoglycannes lors de la dégradation du cartilage résulte en une diminution du contenu en Na<sup>+</sup> du tissu et peut être détectée par IRM du sodium dès les plus petits changements. Cette imagerie s'avérerait utile non seulement pour l'évaluation physiologique du cartilage mais également pour l'évaluation du tissu de réparation tant dans des modèles animaux qu'en clinique [275].

### (3) Cartographie T<sub>1</sub> rhô (T<sub>1</sub>ρ)

Le T<sub>1</sub>ρ représente le temps de relaxation des spins soumis à un champ de radiofréquence constant. L'imagerie du T<sub>1</sub>ρ semble être une technique encourageante pour l'imagerie du cartilage, du tissu lésionnel et du tissu de réparation car sensible aux changements précoces du contenu en protéoglycannes et à l'orientation du réseau collagénique. Bien qu'il ait été démontré que le T<sub>1</sub>ρ semblerait plus efficace que le T2 dans la détection des lésions cartilagineuses [276], des études portant sur l'évaluation *in vitro* et *in vivo* du cartilage s'avèrent nécessaires.

#### (4) Le transfert de magnétisation

Le transfert de magnétisation est trouvé dans la zone radiale du cartilage, au niveau de la transition cartilage/os. Il ne peut être utilisé seul pour l'étude du cartilage car peu efficace pour différencier un cartilage lésionnel et un tissu de réparation. Cet outil est principalement utilisé en association avec d'autres techniques pour augmenter le contraste entre les surfaces cartilagineuses et le liquide synovial et de ce fait améliore la détection des lésions superficielles.

#### (5) Cartographie T2

Un des premiers changements physiologiques intervenant dans la dégradation du cartilage est l'augmentation de la perméabilité de la matrice extracellulaire conduisant à l'accumulation de molécules d'eau au sein du tissu et donc à l'augmentation de leur mobilité. Cette perméabilité matricielle induit un phénomène de stress au sein du cartilage dont la résultante est une dégradation des contenus en collagènes et en protéoglycannes. Le T2 est fonction de la composition en eau, en protéoglycannes, en collagène et de l'orientation des fibres collagéniques. Dans une matrice cartilagineuse saine riche en protéoglycannes et en collagènes, les protons de l'eau sont immobilisés entraînant une diminution du T2 avec un signal de faible intensité sur les séquences pondérées en T2 alors que le liquide synovial, dans lequel les protons sont mobiles, apparaît en hypersignal. Avec la diminution de la concentration de protéoglycannes et de collagènes, la proportion d'eau dans le cartilage et donc la mobilité des protons augmentent conduisant à une augmentation du signal.

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* (modèles animaux) ont été menées afin d'examiner la relation entre le temps de relaxation transversale T2 et la composition biochimique du cartilage [277, 278, 279, 280]. Les augmentations de T2 dans le cartilage ont été associées avec des détériorations de la matrice en particulier une perte de l'intégrité du réseau collagénique [281]. Une cartographie T2 pourrait être utilisée afin de détecter les changements précoces au sein du cartilage et également représenté un outil intéressant pour suivre la progression des anomalies cartilagineuses [277].

#### (6) L'imagerie de diffusion

Comme mentionné dans les paragraphes précédents, l'eau est abondante dans le cartilage et la diffusion des protons de l'eau peut être suivie par IRM. La diffusion des molécules d'eau peut se faire dans toutes les directions (fluides) ou préférentiellement dans une direction précise (direction des fibres). Dans un cartilage sain, les composants extracellulaires (collagènes, protéoglycannes) forment une matrice abondante qui limite la mobilité des molécules d'eau au sein du cartilage. Le coefficient de diffusion apparent (ADC) reflète la mobilité de l'eau. Si elle est réduite, l'ADC est faible.

De ce fait dans un cartilage endommagé, les molécules d'eau diffusent plus facilement, l'ADC sera donc plus élevé. L'imagerie de diffusion va permettre de cartographier les variations des valeurs d'ADC au sein du cartilage ou d'un autre tissu. Il a été démontré que la variation des valeurs d'ADC pouvait être corrélée avec l'intégrité de la matrice cartilagineuse et en particulier avec les contenus en protéoglycannes et en collagènes [282 -283-284]. Nous avons également démontré que l'imagerie du tenseur de diffusion et la cartographie T2 pouvaient être appliquées sur un imageur clinique (3T) pour caractériser la microstructure du cartilage articulaire du genou de porc [285].

### 1. Suivi *in vivo* des cellules souches par l'imagerie

Le suivi post-implantatoire ou « tracking » des cellules issues des techniques de thérapie cellulaire est primordial car il permet de suivre l'évolution des cellules administrées au patient. Ce suivi est souvent effectué à l'aide d'analyses histologiques qui nécessitent le sacrifice de l'animal. C'est pourquoi, les techniques d'imagerie, basées sur l'utilisation de nanoparticules, ont récemment été développées pour un suivi des cellules injectées. Pour les modèles animaux de type murin, différentes techniques de suivi cellulaire sont disponibles : la tomographie par émission de positons (TEP) ou Tomographie d'Emission monophotonique (TEMP) (les radiomarqueurs, les quantum dots ou le suivi de gène rapporteur) ainsi que l'IRM et la microtomographie sont couramment utilisées. Actuellement chez l'Homme, la détection des cellules réimplantées est réalisée par IRM, scintigraphie et FDG-PET, la microtomographie venant prochainement compléter cette liste [286].

La TEP et la TEMP avec des radio-nucléides permettent de localiser des cellules marquées par ces éléments et de visualiser leurs interactions avec les processus biochimiques chez l'animal vivant. Par exemple, ces méthodes permettent de visualiser la biodistribution d'hépatocytes marqués à l'Indium 111 administrés par voie IV (voie intraveineuse) chez l'animal [287]. En thérapie cardiaque chez l'Homme, les techniques de TEP et TEMP sont classiquement employées pour suivre les cellules souches injectées par voie IV ou transmyocardique dans le tissu lésé lors d'infarctus du myocarde. Un marquage de cellules issues de la moelle osseuse par un radio-nucléide tel que le [<sup>18</sup>F]-FDG (2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose) permet de visualiser si ces cellules se dirigent effectivement vers le site de l'infarctus [288].

Il existe également des systèmes de marquages particuliers artificiels tels que les Quantum Dots, qui se présentent sous la forme de nanocristaux semi-conducteurs avec des capacités de fluorescence importantes et une très grande stabilité mais possiblement cytotoxiques [289]. Bien que la TEP et la TEMP soient des techniques très sensibles capables de détecter des processus physiologiques à de très faibles concentrations et que la quantité minimale de radiotracer administrée n'ait pas d'impact sur les processus biologiques, le marquage peut se dégrader fortement durant les 24 heures suivant l'injection du marqueur radioactif en raison de sa courte demi-vie.

C'est pourquoi dans la perspective d'un suivi à long terme des cellules implantées au niveau du lieu d'infarctus du myocarde, les SPIOs s'imposent comme des marqueurs plus efficaces [290]. Cao *et coll.* (2006), ont également démontré l'utilité de l'imagerie par bioluminescence pour le suivi des cellules souches embryonnaires (survie et prolifération) suite à leur injection cardiaque chez le rat. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un gène rapporteur tel que la luciférase de luciole. Néanmoins, la bioluminescence permettrait une meilleure détection dans le cadre d'une étude de la survie de cellules indifférenciées (cellules souches embryonnaires) et de cellules différenciées (cellules endothéliales) *in vivo* tandis que l'IRM serait préférentiellement utilisée comme une technique de détection à haute résolution pour la localisation post-implantatoire des cellules [291].

La microtomographie renseigne sur la localisation des cellules marquées et permet une visualisation tridimensionnelle de leur distribution. En effet, la microtomographie à rayons X permet de détecter des cellules souches mésenchymateuses marquées par des particules



d'oxyde de fer superparamagnétiques dans les muscles squelettiques de souris dystrophiques après transplantation intra-artérielle [292]. Mais, pour le moment, l'utilisation de cette technique chez l'Homme n'est pas encore possible.

Actuellement, l'enjeu est de pouvoir effectuer ce suivi par des méthodes non invasives et répétables telles que l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). L'IRM, moins sensible que la TEP, TEMP ou les techniques d'imagerie par bioluminescence, présente pourtant des avantages considérables en terme de résolution spatiale [293] et nécessite un marquage des cellules par des produits de contraste afin d'améliorer la sensibilité de la technique. Les agents de contraste, habituellement utilisés en IRM, sont des médicaments qui augmentent artificiellement le contraste et permettent ainsi de visualiser des structures anatomiques ou pathologiques naturellement peu ou non contrastées.

## 2. Les agents de contraste en IRM

Un choix judicieux des paramètres instrumentaux permet d'optimiser le contraste mais pour élaborer un diagnostic médical rapide et précis, des agents de contraste facilitant la distinction entre les tissus sains et pathologiques sont utilisés. Ces substances doivent être non toxiques, biocompatibles et efficaces à faible dose (typiquement, 100  $\mu$ moles par kg de poids corporel). Leur rôle est de « catalyser » la relaxation nucléaire. Le contraste peut être rehaussé par l'accélération des deux phénomènes gouvernant la relaxation des protons: celle de la relaxation longitudinale augmente l'intensité du signal (agent positif, effet  $T_1$ ) et celle de la relaxation transverse  $T_2$  diminue l'intensité du signal (agent négatif, effet  $T_2$ ). Ces produits sont répertoriés selon leurs propriétés magnétiques en agents paramagnétiques et superparamagnétiques.

### (1) Les agents paramagnétiques

Ces agents acquièrent une magnétisation proportionnelle à l'intensité du champ et doivent leur paramagnétisme à la présence d'électrons non appariés. Ce sont notamment l'oxygène, les nitroxydes, les métaux de transition et les lanthanides. Ils possèdent un ou plusieurs électrons libres dont le moment magnétique est 657 fois plus grand que celui du proton. Le gadolinium présentant 7 électrons libres, possède les propriétés magnétiques les plus importantes et est devenu, de ce fait, l'agent de contraste le plus utilisé en IRM. Le gadolinium est cependant très toxique sous sa forme hydratée  $[\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_8]^{3+}$  car, *in vivo*, il entre en compétition avec les ions calcium. Sa complexation avec un ligand organique réduit considérablement sa toxicité sans neutraliser sa relaxivité.

En raison de leur coût, de leur bonne tolérance et de la possibilité de les employer quasiment pour tous les examens, les produits de contraste les plus utilisés en IRM sont les chélates de gadolinium extracellulaire non-spécifiques. Cet agent de contraste a une distribution extracellulaire de sorte qu'une synchronisation entre son injection et l'acquisition des images est importante. Ce produit est éliminé par les reins : 80% de la dose initiale est excrétée par cette voie dans les 6 heures qui suivent l'injection. Sur les séquences pondérées en  $T_1$ , l'accumulation de contraste dans une lésion se manifeste comme un hypersignal. Cet hypersignal (par rapport au tissu de voisinage) va rendre la lésion plus visible.

## (2) Les agents superparamagnétiques

Les produits superparamagnétiques s'aimantent plus fortement en présence d'un champ magnétique sans effet de rémanence. Ils sont généralement composés de particules de fer assemblées en structures cristallines et entourées de dextran dont l'épaisseur conditionne la taille de la molécule. Selon leur taille, on distingue les SPIOs (Small Particles of Iron Oxid), dont le diamètre global est supérieur à 50 nm et les USPIOs (UltraSmall Particles of Iron Oxid) dont le diamètre se situe entre 10-50 nm. Ces particules affectent de manière prépondérante la relaxation transverse des protons de l'eau et agissent donc en tant qu'agents de contraste négatifs. Les SPIOs, d'un diamètre supérieur à 50nm, présentent un meilleur niveau d'internalisation que les USPIOs dans différentes lignées cellulaires [294 -295].

Ces produits de contraste sont surtout utilisés dans la détection/caractérisation des lésions hépatiques. Ces particules à base d'oxyde de fer vont être phagocytées par les macrophages du foie. Le parenchyme hépatique, sur les séquences pondérées en T2, sera en hyposignal. Toutes les lésions hépatiques (ntamment l'hyperplasie nodulaire focale), qui contiennent des macrophages, auront un signal similaire au parenchyme hépatique normal. A l'inverse, des lésions bénignes ou des tumeurs métastatiques, qui ne sont pas ou peu infiltrées par des macrophages, auront un comportement de signal différent du parenchyme hépatique normal. Elles apparaîtront en hypersignal en T2 (alors que le foie sain est fortement hypointense) et en hyposignal en T1.

### **3. Marquage des CSM par des particules ferromagnétiques et suivi IRM**

Les agents paramagnétiques à base de gadolinium pour un marquage cellulaire ont tendance à diminuer la prolifération cellulaire et à augmenter la production d'espèces activées de l'oxygène (ROS). De plus, de fortes concentrations de gadolinium, de l'ordre de 50 à 500  $\mu\text{M}$ , sont nécessaires pour permettre une visualisation *in vivo* des cellules par IRM [296]. Pour ces raisons, les agents de contraste les plus couramment utilisés pour la détection de cellules *in vivo* sont les particules de fer superparamagnétiques (SPIOs). Ils produisent un contraste plus important que les particules paramagnétiques et leur enrobage par des dextrans améliore leur biocompatibilité et la biodégradabilité. Plusieurs études ont prouvé l'efficacité des SPIOs dans le but d'un suivi post-implantatoire. Ces particules de fer sont détectées par IRM à de faibles concentrations et le marquage persiste entre 4 et 7 semaines [297-298].

#### *a) Principe du marquage des CSM par les SPIOs*

Le marquage par les SPIOs induit une diminution des temps de relaxation T2 et T2\* en IRM se traduisant par un hyposignal au niveau des zones dans lesquelles les SPIOs sont présentes. La faible concentration nécessaire, de l'ordre de la nanomole, à leur détection s'avère un atout supplémentaire [299]. De ce fait, le marquage cellulaire s'effectue par un simple phénomène d'endocytose des particules par les cellules pouvant être facilité par l'utilisation d'un agent de transfection tel que la Poly-L-Lysine (PLL) par exemple [300].

#### *b) Marquage des CSM par les SPIOs et chondrogenèse*

Cependant, l'influence de ces SPIOs sur les fonctions cellulaires reste encore mal connue. En particulier, dans le contexte d'ingénierie tissulaire du cartilage, quelques études publiées à ce sujet ne parviennent pas à déterminer si l'internalisation des SPIOs par les CSM

influe sur leur capacité de différenciation en chondrocytes. Kostura *et coll* ont montré qu'une concentration de 25 µg Fe/mL de particules ferromagnétiques inhibe la différenciation chondrocytaire des CSM et en particulier, conduisent à une diminution du collagène II [301]. Ces résultats contredisent ceux obtenus par d'autres équipes qui montrent que la chondrogenèse n'est pas affectée par une dose plus élevée de SPIOs (50 µg Fe/mL), la synthèse de protéoglycannes, collagène II et collagène X étant similaire entre cellules marquées et cellules non marquées [302-303].

D'autres travaux réalisés avec de l'Endorem® infirment également l'existence d'une influence des SPIOs sur l'expression des gènes de Sox9 et du collagène X par des CSM, placées en milieu chondrogénique, pour une concentration de 6,25 µg Fe/mL [298]. Une étude réalisée en 2010 affirme de nouveau l'effet chondro-inhibiteur des SPIOs à une dose de 100 µg Fe/mL en particulier sur la synthèse des protéoglycannes matriciels [304]. Néanmoins, ces études s'accordent sur le fait que les SPIOs ne perturbent en rien la viabilité des CSM ou leur activité de prolifération, et n'affectent pas leurs capacités de différenciations ostéogénique et adipogénique.



## IV. TRAVAUX REALISES

### A. CSM ET CHONDROGENESE: ROLES DU SITE, DE L'EXPANSION ET DE L'HYPOXIE

#### 1. Acquis de l'équipe

Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage, le choix d'un contingent cellulaire capable de synthétiser une matrice cartilagineuse de bonne qualité au sein d'un biomatériau approprié et cultivé selon des conditions adaptées est un enjeu majeur. De nombreuses études ont été effectuées sur les capacités des chondrocytes humains à maintenir leur phénotype lorsqu'ils sont ensemencés après une courte période de culture en monocouche dans une structure tridimensionnelle et sur les potentialités chondrogéniques des cellules souches mésenchymateuses humaines lorsque les conditions de culture sont optimisées.

Lors de travaux antérieurs de l'équipe dans le cadre du projet ANR CESOMIC (*CESOMIC, JC05-51629*) managé par Astrid PINZANO, les conditions de culture et d'expansion des CSM humaines (facteurs de croissance, teneur en oxygène), ainsi que les conditions d'ensemencement dans les biomatériaux (alginate et éponge de collagène) ont été mises au point. La pré-orientation des CSM en monocouche par des suppléments chondrogéniques (Proline, Ascorbate et Dexaméthasone : PAD) avant la mise en biomatériau s'est avérée une étape favorisant la différenciation chondrogénique des CSM en 3D dans le biomatériau. Le temps de culture nécessaire pour obtenir une synthèse matricielle intéressante au sein de l'éponge a été également déterminé à 28 jours de culture en 3D.

#### 2. Objectifs de notre travail

L'objectif de ce travail vise à étudier les capacités de différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse et de la membrane synoviale au sein d'une structure tridimensionnelle sous forme d'éponge de collagène après 28 et 56 jours de culture en fonction du nombre de passage effectué lors de l'expansion et de la teneur en oxygène lors des cultures.

Pour cela, après 28 et 56 jours de culture des éponges, nous avons étudié la viabilité des cellules, l'expression des gènes d'intérêt du cartilage en fonction des différentes conditions de culture, dosé la concentration en glycosaminoglycannes synthétisés par les cellules et réalisé des observations histologiques et immunohistochimiques.

#### 3. Matériels et Méthodes

##### a) *Isolation et expansion des cellules*

##### (1) Isolation des CSM de la moelle osseuse

Les CSM ont été obtenues lors de la mise en place de prothèses totales de hanche dans le Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (CHU Nancy, Prs D. Mainard – L. Galois) en partenariat avec l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus (CHU Nancy, Pr D.

Bensoussan) dans le cadre de don pour la banque d'os. La moelle osseuse est prélevée dans une solution héparinée supplémentée en antibiotiques. La moelle est centrifugée à 1500 tours/min pendant 5 min et après numération, le culot est repris dans du milieu DMEM 1g/L de glucose (Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal), 2 mM de Glutamine, 100 µg/mL de Streptomycine et 100 U/mL de Pénicilline et 1 ng/mL de bFGF (Miltenyi, France). Les cellules sont ensuiteensemencées dans des flasques 75 cm<sup>2</sup> (à raison de 3,75.10<sup>6</sup> cellules par flasque) et placées dans un incubateur à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Les CSM sont isolées simplement par leur propriété d'adhésion au plastique des flasques de culture. Le milieu est changé après 48 heures afin d'éliminer les cellules hématopoïétiques.

#### (2) Isolation des cellules souches synoviocytaires (CSSs)

Le tissu synovial est obtenu lors de la mise en place de prothèse totale de genou dans le Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (CHU Nancy, Pr D. Mainard – Collaboration : Pr L. Galois) en partenariat avec l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus (UTCT, CHU Nancy, Dr D. Bensoussan) dans le cadre de la banque d'os. La membrane synoviale qui entoure le genou est prélevée à sec dans un pot stérile. Elle est ensuite digérée dans une solution à 2 mg/mL de collagénase B (Roche, France) supplémentée en antibiotiques sous agitation « overnight » à 37°C. Une fois la digestion réalisée, les cellules sont comptées. La solution est centrifugée à 1400 tours/min pendant 5 min et le culot est repris dans du milieu DMEM 1g/L de glucose (Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de Glutamine, 100 µg/mL de Streptomycine et 100 U/mL de Pénicilline et 1 ng/mL de bFGF (Miltenyi, France). Les cellules sont ensuiteensemencées dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> (à raison de 1.10<sup>6</sup> cellules par flasque) et placées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu est changé après 48 heures.

#### (3) Milieux de culture utilisés pour l'expansion des CSM et des CSSs

Le milieu de culture utilisé pour l'expansion des CSM et des CSSs de passage 0 à 2 (P0-P2) ou de passage 0 à 6 (P0 à P6) est un milieu DMEM à 1 g/l de glucose (Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de Glutamine, 100 µg/mL de Streptomycine et 100 U/mL de Pénicilline et 1 ng/mL de bFGF (Miltenyi, France).

Lors du dernier passage P3 ou P7, avant l'ensemencement en éponges, les cellules sont cultivées avec notre milieu de pré-différenciation chondrogénique : DMEM 4,5g/L de glucose (Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de Glutamine, 100 µg/mL de Streptomycine et 100 U/mL de Pénicilline, du pyruvate (110 µg/mL), de la proline (40 µg/mL), du L-acide-ascorbique-2-Phosphate (50 µg/mL), de la dexaméthasone (100 nM) et 1 ng/mL de bFGF (R&D, France). Les milieux sont changés deux à trois fois par semaine.

#### (4) Expansion cellulaire

Lorsque les cellules arrivent à environ 80% de confluence, elles sont amplifiées selon le protocole suivant : Après un lavage au PBS, 2 mL de trypsine-EDTA (0,05%, 1X, Gibco, France) sont ajoutés dans la flasque. Les flasques sont placées pendant 5 à 10 min à 37°C. L'action de la trypsine est ensuite neutralisée par deux volumes de milieu complet. La suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée à 1400 tours/min (CSM et CSSs) pendant 5 min. Le culot est ensuite repris dans du milieu complet. Un comptage en cellule de Malassez est réalisé afin de déterminer le nombre de cellules et de les répartir de façon homogène. Les

cellules sont à nouveauensemencées à raison de 500 000 cellules/flasque de 75 cm<sup>2</sup> pour les CSM et les CSSs.

*b) Ensemencement des biomatériaux*

(1) Ensemencement des biomatériaux avec les CSM et CSSs

Les biomatériaux utilisés pour la différenciation chondrogénique des CSM de la moelle osseuse et des CSSs sont des éponges de collagène de type I et III (95% de collagène I) de 5 mm de diamètre et de 2 mm d'épaisseur fabriquées par la Société Symatèse Biomatériaux (Chaponost, France). Les éponges sont préparées etensemencées avec une densité cellulaire par éponge de 500 000 cellules. Les éponges sont placées unitairement dans une plaque 96 puits. Elles sont ensuiteensemencées avec des CSM ostéomédullaires ou des cellules souches synoviales en P4 et en P8 par réhydratation de l'éponge avec 50 µl de suspension cellulaire pour obtenir 500 000 cellules par éponge.

Un milieu DMEM 4,5 g/L de glucose supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF), 2 mM de Glutamine, 100 µg/mL de Streptomycine et 100 U/mL de Pénicilline et 110 µg/mL de pyruvate de sodium auxquels ont été ajoutés du PAD (Proline (40 µg/mL) – Acide ascorbique-2-phosphate (50 µg/mL) – Dexaméthasone (100 nM)) est utilisé pour l'ensemencement.

Après un temps d'adhésion des cellules au biomatériau, évalué à 4-5h, les éponges contenant les CSM sont placées unitairement dans les plaques 48 puits et cultivées pendant 24h avec le milieu ayant servi à l'ensemencement.

(2) Milieux de culture testés

Après 1 jour d'adaptation au biomatériau, 2 conditions sont testées sur les éponges :

- **ITS 1%** (ITS+premix, BD, France) : supplément de milieu de culture essentiel lors des cultures sans sérum. Il est composé d'insuline recombinante, de transferrine et de sélénium.
- **ITS 1% + TGF-β1** (10ng/mL, Miltenyi Biotec, France) : le TGF-β1 est un facteur chondro-inducteur.

Les éponges soumises à ces deux conditions et cultivées durant 28 et 56 jours et sont placées parallèlement en conditions normoxique (21% O<sub>2</sub>) et hypoxique (5% O<sub>2</sub>). Les milieux de culture doivent être changés trois fois par semaine puisqu'ils s'appauvrissent et perdent leurs qualités nutritives. La première semaine, les éponges sont changées de plaque afin d'éviter la création d'une monocouche au fond des puits due à une fuite cellulaire possible pendant cette période.

Après 28 et 56 jours de culture, les éponges ont été recueillies afin de procéder à l'évaluation des paramètres de viabilité (MTT, Hoechst), d'expression de gènes (RT-PCRq) et de qualité matricielle (dosage des glycosaminoglycannes par la méthode de Goldberg, histologie, immunohistochimie) par les différents tests décrits dans les sections suivantes.

## c) Analyses

### (1) Activité mitochondriale

L'activité mitochondriale est mesurée grâce au MTT (Bromure de 3 - [4,5 - diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl-tétrazolium) qui est réduit par la succinate déshydrogénase, enzyme mitochondriale, en cristaux bleus de formazan. Les éponges sont placées dans une plaque de 96 puits à raison d'une éponge par puits. 20 µL de MTT sont ajoutés à 80 µL de milieu complet dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> pendant 4 heures. Le surnageant est éliminé afin de lyser les cellules avec 100 µL de SDS-DMF (80 g de sodium dodecyl sulfate, 200 mL de diméthylformamide, 200 mL d'H<sub>2</sub>O, pH 4,7) pendant 24 heures à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. L'absorbance est mesurée à 550 nm grâce à un spectrophotomètre Multiskan (Multiskan Ex, ThermoLabsystems) (Annexes).

### (2) Dosage de l'ADN

Ce dosage s'effectue avec un intercalant de l'ADN : le Hoechst (Molecular Probes, 33258). Ce test nous permet de déterminer la quantité de cellules vivantes dans les éponges et ainsi de normaliser le test MTT (afin de relier une augmentation de l'activité mitochondriale à une prolifération cellulaire ou une augmentation de l'activité de synthèse) (Annexes).

### (3) Extraction des ARN totaux

Les éponges sont placées 4 heures à 37°C dans 500 µL d'une solution de collagénase (2mg/mL) de façon à libérer les cellules de leur environnement matriciel (éponge + matrice néosynthétisée). Après centrifugation à 10000 tours/min pendant 30 secondes du surnageant, les culots cellulaires sont congelés jusqu'à l'extraction. L'extraction des ARN se fait ensuite grâce à un kit d'extraction des ARN (RNeasy mini kit, Qiagen) en suivant le protocole indiqué par le fournisseur. Les ARN sont élués des colonnes par 25 µL d'eau RNase-DNase free (Annexes).

### (4) Transcriptase Inverse (RT)

La transcriptase inverse est une enzyme catalysant la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc), elle utilise le brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADNc. La transcription inverse (RT) s'effectue grâce à un kit de chez BIO-RAD : iScript™ cDNA Synthesis Kit. La spécificité de cette réaction réside dans l'utilisation d'amorces polydT qui se fixent sur les queues polyA des ARNm permettant ainsi d'obtenir leurs ADNc. La RT est préparée en utilisant 15µL de solution d'ARN, 1µL d'enzyme et 4µL de tampon puis placée selon les recommandations du fournisseur: 5min à 37°C ; 30min à 42°C ; 5min à 85°C (Annexes).

### (5) PCRq

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode permettant l'amplification génique *in vitro* qui se déroule en trois étapes : dénaturation, hybridation, élongation. Cette technique permet de faire une quantification relative de gènes d'intérêt dans des échantillons donnés par rapport à un gène de référence (RP29) dont l'expression ne varie pas en fonction des conditions expérimentales. En parallèle, une gamme est réalisée, afin de pouvoir quantifier l'expression des différents gènes (de 10<sup>-3</sup> à 10<sup>-6</sup> µg d'ADN/mL de chaque ADNc correspondant) (Annexes).



Les gènes étudiés dans notre étude sont les gènes codant pour :

- Des **collagènes** : type I, type II total, de type IIB, et de type X
- Des **protéoglycannes** : Agrécanne, Versican
- Un **facteur de transcription** : Sox 9
- Une **protéine matricielle** : COMP
- Des **marqueurs de différenciation osseuse** : Ostéocalcine, RunX2
- Une protéine de référence : RP 29

Les amorces utilisées sont répertoriées en **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

Le **collagène I** est retrouvé dans le fibrocartilage tandis que le collagène II est spécifique du cartilage hyalin. Le **collagène X** est exprimé par les chondrocytes hypertrophiques.

Le facteur de transcription **Sox 9** permet l'activation d'un gène codant pour la synthèse de collagène de type II démontrant son important rôle dans la chondrogenèse. La Cartilage Oligomeric Matrix Protein (**COMP**), glycoprotéine extracellulaire du cartilage, a un rôle dans l'assemblage de la matrice.

L'**agrécanne** est un composé majeur du cartilage hyalin. Le **versican**, au contraire, donne un caractère fibreux à la structure.

L'**ostéocalcine** et **runX2** sont deux marqueurs de la différenciation osseuse. Le premier est une protéine spécifique des tissus osseux, sécrétée par les ostéoblastes et favorisant la fixation du calcium à la substance fondamentale. Le second est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation ostéoblastique.

#### (6) Dosage des GAGs

Le dosage des GAGs est effectué sur les surnageants de digestion des éponges selon le test colorimétrique reposant sur la méthode de Goldberg [305], une gamme étalon de 0 à 100 µg/mL est réalisée à partir d'une solution de Chondroïtine-6-Sulfate de 1 mg/mL. Dans chaque puits, 20 µL d'échantillon dilués au dixième dans du tampon Tris (Tris, Sigma, France, pH = 8) sont déposés et 250 µL d'une solution de DMB (1,9-Diméthylméthylène Blue). L'absorbance est mesurée à 525 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Lecteur de plaques MR 5000 Dynatech, France) (Annexes).

#### (7) Histologie

Après 28 et 56 jours de culture, les éponges de collagène sont fixées dans du paraformaldéhyde (PFA 4% dans du PBS, pH 7.4) pendant 4 heures, déshydratées puis inclus en paraffine. Des coupes de 5 µm sont réalisées au microtome (Leica RM 2135, France). Différentes colorations sont effectuées : Les lames sont ensuite colorées puis montées à l'aide d'une résine synthétique (Pertex (N00811)). Les lames sont ensuite visualisées sur un microscope (DMD 108, Leica, France) (Annexes).

Les différentes colorations réalisées sont les suivantes :

- **Hématoxyline-Erythrosine-Safran (HES)** : coloration trichromique utilisée pour étudier la morphologie et l'aspect des cellules.
- **Bleu Alcian (BA)** : Le bleu Alcian colore en bleu les mucopolysaccharides acides.

- **Rouge Sirius (RS)** : Cette coloration met en évidence le contenu en collagène.
- **Rouge alizarine (RA)** : Cette coloration permet de mettre en évidence les dépôts calciques.

#### (8) Immunohistochimie

Après déparaffinage et réhydratation des coupes, une digestion enzymatique est réalisée avec une solution de pepsine (0,4% (w/v)) durant 30 min à température ambiante. Après lavage au PBS, les peroxydases endogènes sont bloquées avec de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 3% (LSAB®+système-HRP, Dako France) durant 5 min. Ensuite, les épitopes non spécifiques sont bloqués par une solution de BSA (Sérum-Albumine Bovine, 2%) pendant 10 min. Les coupes sont alors incubées avec le premier anticorps anti-collagène de type II (LABvision, souris) dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans 2% de BSA durant 1 heure à température ambiante. Puis le second anticorps (anticorps universel fourni par le kit LSAB®+système-HRP, Dako France) est laissé durant 45 min à température ambiante. La streptavidine-peroxydase (LSAB®+système-HRP, Dako France) est appliquée durant 30 min. Enfin, un substrat de la peroxydase, le chromogène DAB (diaminobenzidine, (LSAB®+système-HRP, Dako France) est appliqué sur les coupes. Les lames sont contre-colorées au bleu de Prusse et à l'hématoxyline. Les coupes sont déshydratées et montées avec la résine Eukitt. Les lames sont ensuite visualisées sur un microscope (DMD 108, Leica, France) (Annexes).

#### (9) Statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (SEM). Un test ANOVA, 2 facteurs est utilisé pour déterminer la significativité entre les différentes conditions, suivi d'un test *a posteriori* de Bonferroni pour réaliser des comparaisons multiples au sein des groupes. Ces analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad (GraphPad Prism 4.0c Software MacKiev © GraphPad Software, Inc.). Une différence statistique significative est déterminée par une valeur \* :  $p < 0,05$ .

L'ensemble des analyses a été mené en triplicat (pour les analyses MTT, Hoechst, biologie moléculaire) et en quintuplat (histologie et immunohistologie) sur au minimum 2 patients.

## 4. Résultats

### a) *Les cellules souches ostéomédullaires*

#### (1) Activité mitochondriale

L'activité mitochondriale par cellule a été déterminée à l'aide d'un test colorimétrique au MTT ramené à la quantité d'ADN par cellule.

Nos résultats montrent une bonne adaptation des cellules aux biomatériaux, aucune mort cellulaire n'ayant été détectée. En condition chondrogénique (TGF- $\beta$ 1) ou non (ITS 1%), l'activité mitochondriale augmente entre J28 et J56 quels que soient le passage et la teneur en oxygène du milieu ( $p < 0,05$ ). Aucune différence significative n'est observée entre les éponges cultivées en normoxie et celles cultivées en hypoxie (Figure 11).

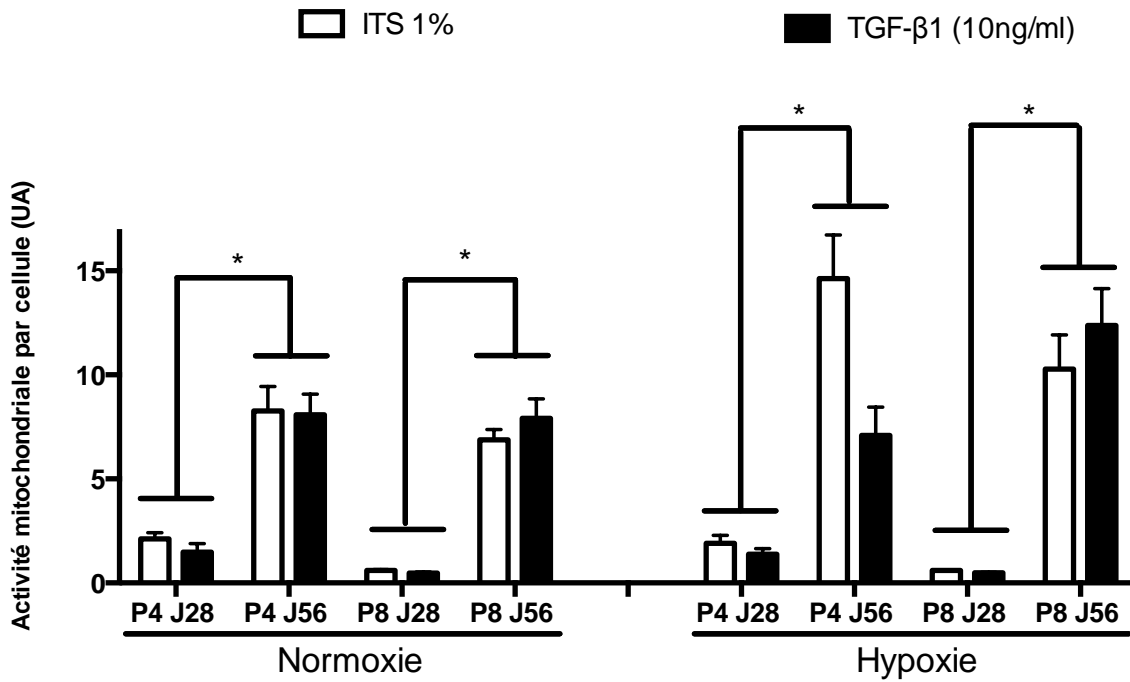


Figure 11. Activité mitochondriale par cellule dans les éponges de collagène colonisées par des CSM ostéomédullaires humaines en fonction du passage (P4 et P8) après 28 et 56 jours de culture 3D en condition normoxique ou hypoxique. La différenciation chondrogénique a été induite par addition de TGF-β1 à 10 ng/mL. La condition ITS 1% fait preuve de témoin. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

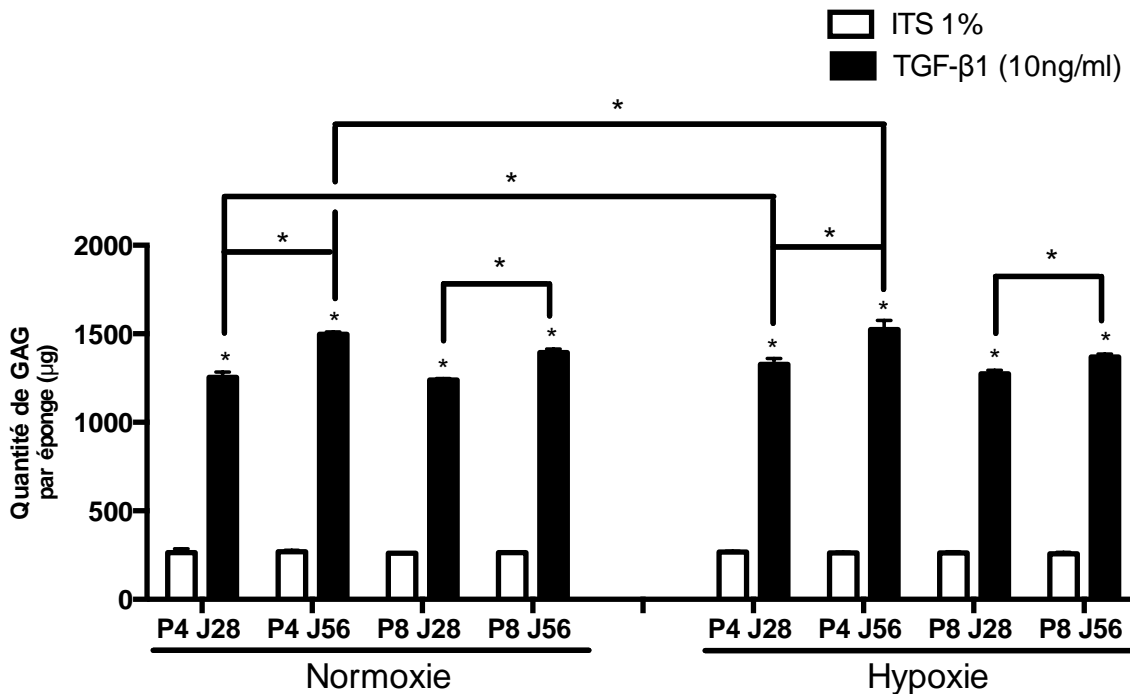


Figure 12. Quantité de GAGs synthétisés dans les éponges de collagène colonisées par des CSM ostéomédullaires humaines en fonction du passage (P4 et P8) après 28 et 56 jours de culture 3D en condition normoxique ou hypoxique. La différenciation chondrogénique a été induite par addition de TGF-β1 à 10 ng/mL. La condition ITS 1% fait preuve de témoin. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

### (1) Quantité de GAGs synthétisés au sein des biomatériaux

Le dosage des GAGs a été effectué à l'aide d'un test colorimétrique de Goldberg. En condition ITS 1%, la quantité de GAGs en microgramme contenue dans une éponge reste basale quelles que soient les conditions de culture. L'ajout de TGF- $\beta$ 1 induit une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la synthèse de GAGs globalement d'environ 3 fois pour toutes les conditions.

En milieu chondrogénique (TGF- $\beta$ 1), la quantité de GAGs est significativement plus élevée à J56 par rapport à J28 pour un passage 4 et 8 tant en normoxie qu'en hypoxie ( $p < 0,05$ ). Les CSM différenciées produisent également une quantité plus importante de GAGs en condition hypoxique à un passage 4 par comparaison avec la normoxie ( $p < 0,05$ ) (Figure 12).

### (2) Etude de l'expression des gènes d'intérêt du cartilage

Pour l'ensemble des gènes, l'expression génique dans les CSM cultivées en milieu chondrogénique (TGF- $\beta$ 1) est rapportée à l'expression des gènes en condition ITS 1% (témoin).

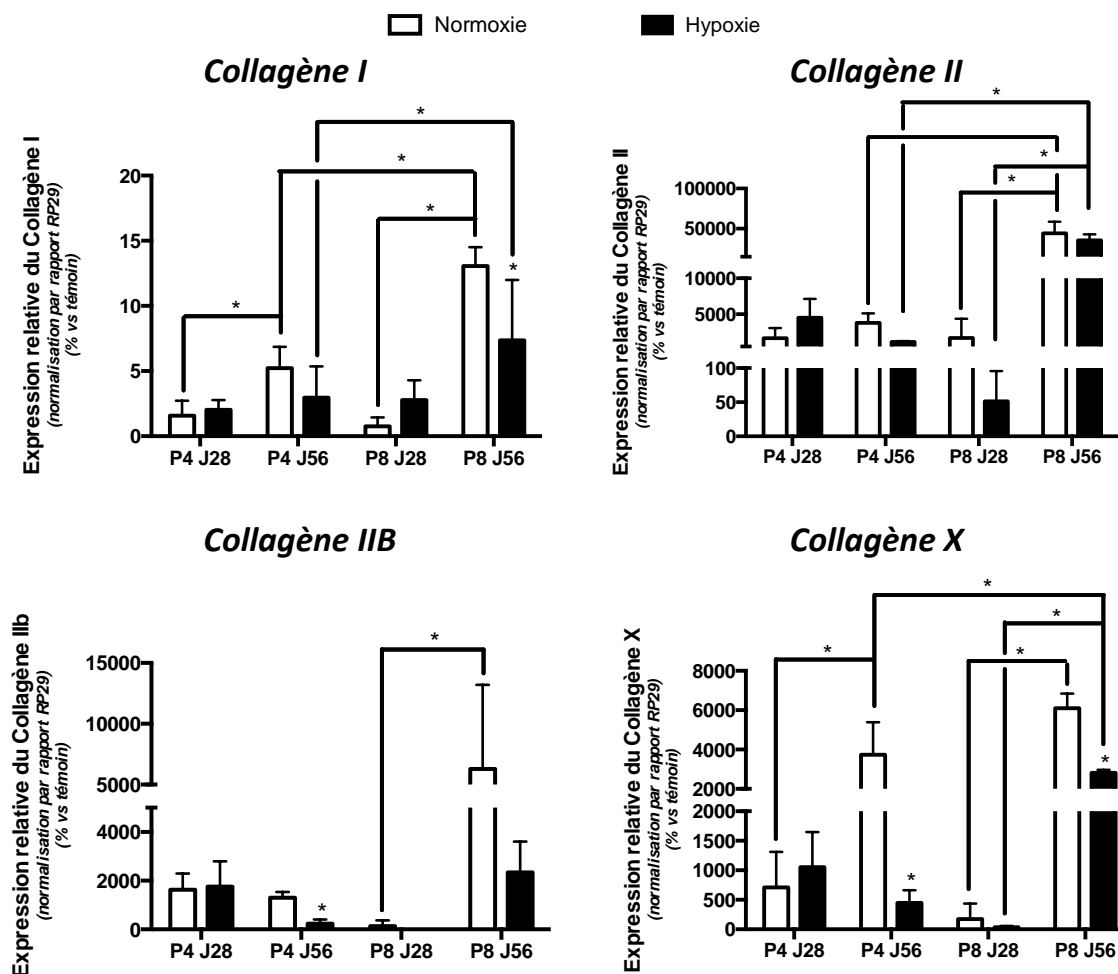
L'addition de TGF- $\beta$ 1 a induit une stimulation de l'expression génique en comparaison avec la condition témoin (ITS 1%) pour tous les gènes.

#### (A) LES COLLAGENES

A un passage plus précoce (P4), il n'existe pas de différence significative dans l'expression des collagènes II et IIb entre J28 et J56 quelle que soit la teneur en oxygène du milieu environnant. En revanche, à P8 après 56 jours d'induction chondrogénique, les expressions des collagènes II et IIb tendent à augmenter par rapport à J28 ( $p < 0,05$ ) (Figure 13).

Les collagènes I et X sont exprimés plus faiblement à J28 qu'à J56 quel que soit le passage (Figure 13).

L'hypoxie n'a que peu d'effet sur l'expression des gènes des collagènes spécifiques du cartilage hyalin mais réprime significativement l'expression du collagène X après 56 jours de culture à P4 et P8 et du collagène I pour le même temps à P8 ( $p < 0,05$ ) (Figure 13).



**Figure 13.** Expression génique des collagènes de type I, II, IIB et X dans les CSM humaines issues de la moelle osseuse ensemencées dans les éponges de collagène en fonction du passage (P4 et P8) après 28 et 56 jours d'induction chondrogénique en 3D en conditions normoxique et hypoxique. Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage RP29. L'expression des gènes dans les CSM différenciées (TGF- $\beta$ 1) est rapportée à celle dans les CSM cultivées en condition témoin non chondrogénique (ITS 1%). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

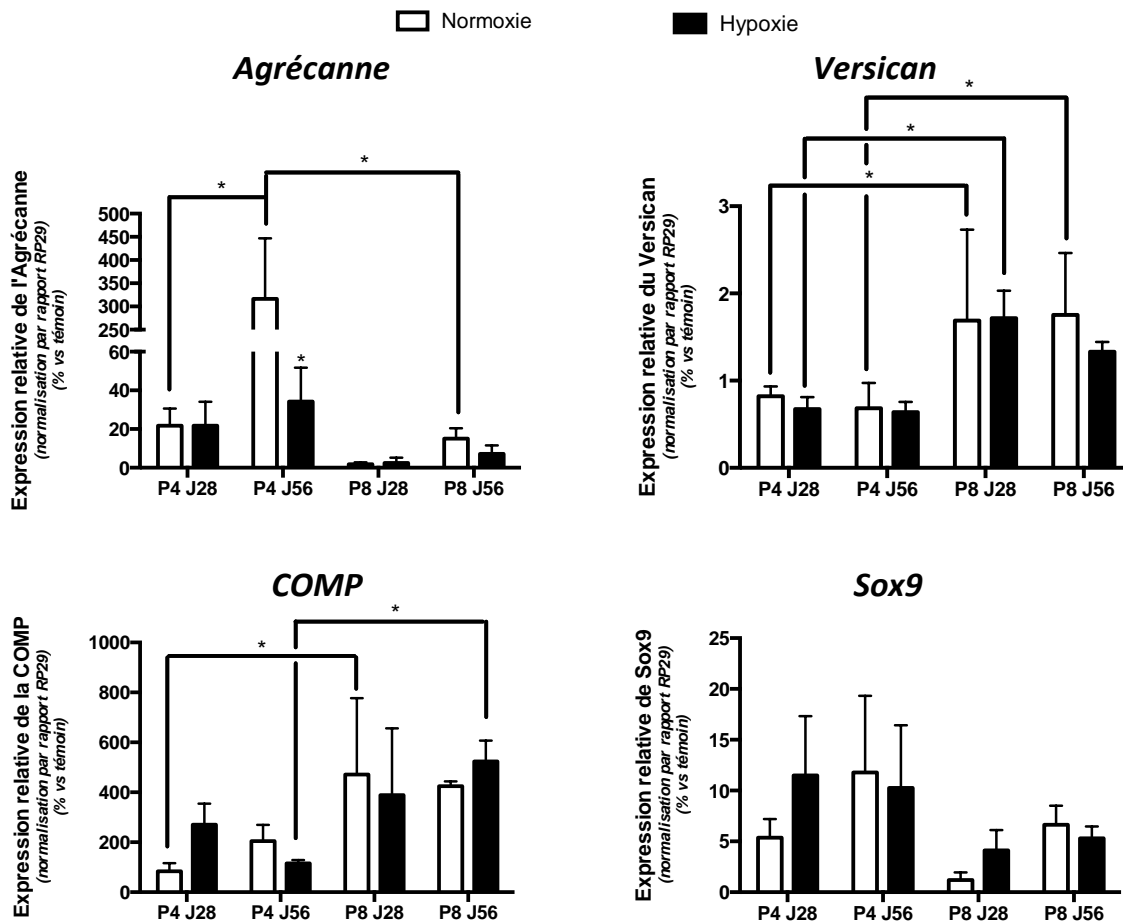
#### (B) PROTEOGLYCANNES, FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET PROTEINE MATRICIELLE

Dans les CSM ostéomédullaires, le gène de l'agrécane, protéoglycane majeur du cartilage, est plus exprimé à J56 à passage plus précoce (P4) par comparaison avec le J28 et est très faiblement exprimé à passage tardif (P8) contrairement au gène du versican dont l'expression est plus élevée à P8 quel que soit le temps d'induction (Figure 14).

Le taux d'ARNm de la COMP est plus important à passage tardif sans effet notable du temps d'induction (aucune différence significative entre J28 et J56 à P4 et P8) (Figure 14).

L'expression de Sox9 ne varie pas de manière significative quelles que soient les conditions testées (Figure 14).

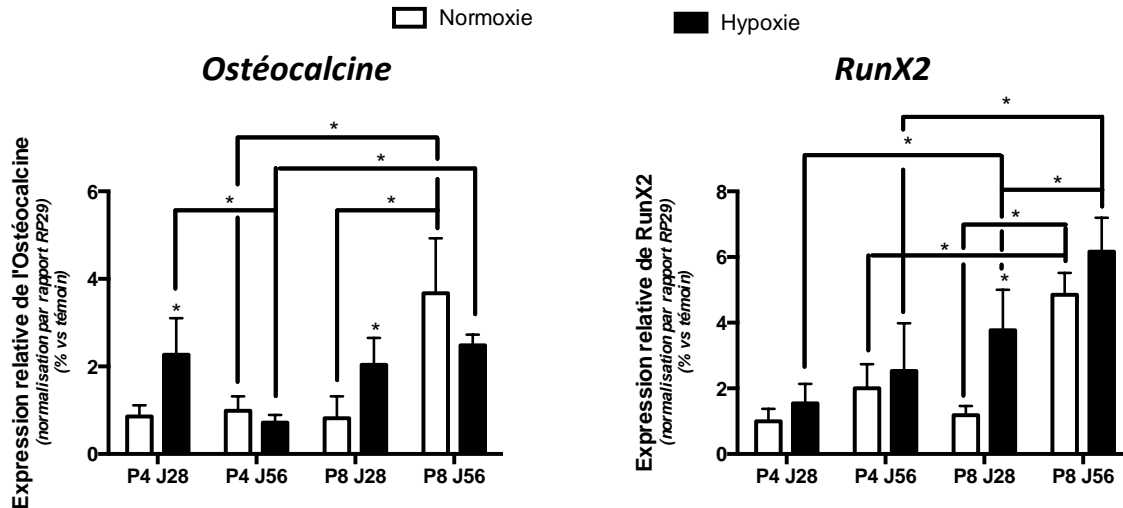
Une restriction en oxygène du milieu n'a que peu d'effet sur l'expression de ces gènes à l'exception de l'agrécane dont l'expression est significativement plus faible en hypoxie à P4 J56 (Figure 14).



**Figure 14.** Expression génique de l'Agrécane, du Versican, de la COMP et de Sox9 dans les CSM humaines issues de la moelle osseuse ensemencées dans les éponges de collagène en fonction du passage (P4 et P8) après 28 et 56 jours d'induction chondrogénique en 3D en conditions normoxique et hypoxique. Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage RP29. L'expression des gènes dans les CSM différenciées (TGF- $\beta$ 1) est rapportée à celle dans les CSM cultivées en condition témoin non chondrogénique (ITS 1%). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

### (C) LES MARQUEURS OSTEOGENIQUES

Un milieu chondrogénique contenant du TGF- $\beta$ 1 induit une augmentation de l'expression des marqueurs osseux (ostéocalcine et RunX2) quel que soit le passage ou le temps de culture en 3D. Il est important de préciser que, bien qu'augmentée en présence de TGF- $\beta$ 1, l'expression de ces gènes par les CSM demeurerait faible (Figure 15). C'est à P4 que le taux d'induction de ces gènes apparaît le plus faible. L'hypoxie potentialise l'effet du TGF- $\beta$ 1 en augmentant le niveau d'expression des marqueurs osseux après 28 jours de culture 3D à P4 et à P8 alors qu'à J56 aucun effet de l'hypoxie n'est noté.



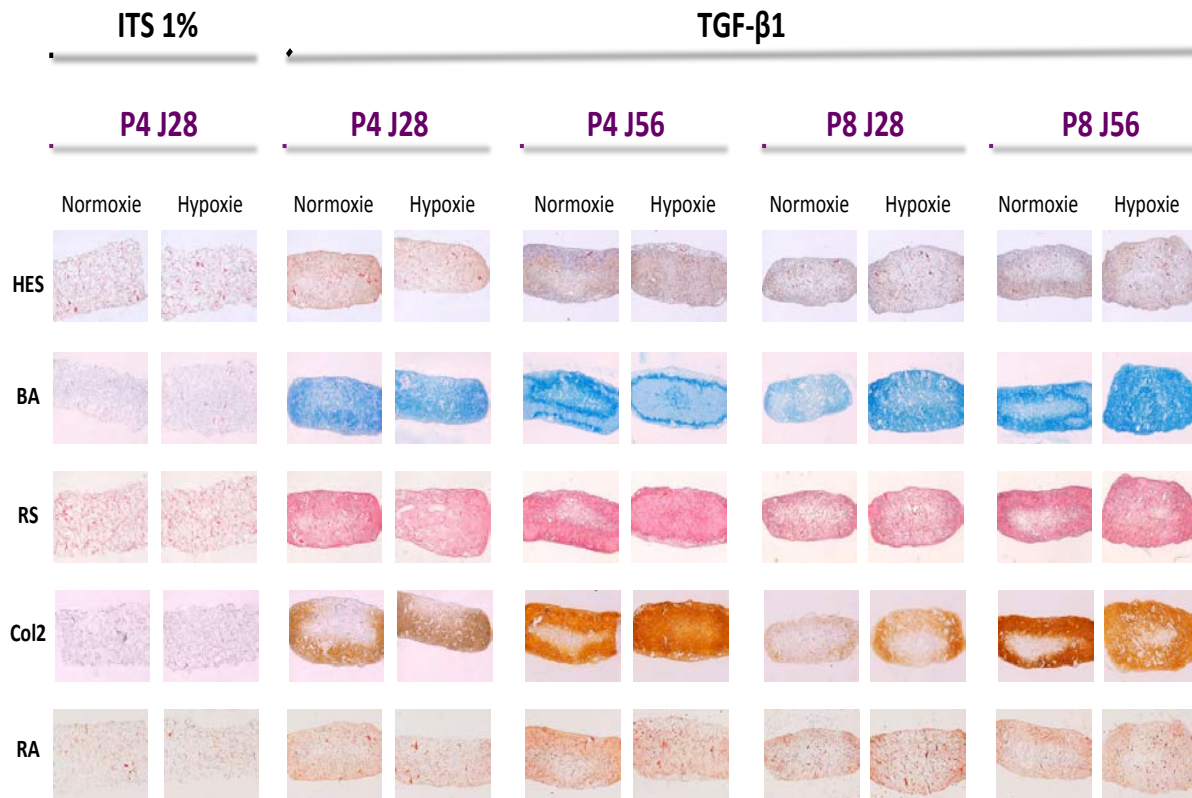
**Figure 15.** Expression génique des marqueurs ostéogéniques : Ostéocalcine et RunX2 dans les CSM humaines issues de la moelle osseuse ensemencées dans les éponges de collagène en fonction du passage (P4 et P8) après 28 et 56 jours d'induction chondrogénique en 3D en conditions normoxique et hypoxique. Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage RP29. L'expression des gènes dans les CSM différenciées (TGF- $\beta$ 1) est rapportée à celle dans les CSM cultivées en condition témoin non chondrogénique (ITS 1%). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

#### (D) EVALUATION DE LA QUALITE DE LA SYNTHESE MATRICIELLE PAR HISTOLOGIE ET IMMUNOHISTOCHEMIE

Pour les éponges témoins (ITS 1%), seule la condition P4 J28 en normoxie est présentée car quelque soit le passage, le temps de culture tridimensionnel et la teneur en oxygène du milieu, les éponges présentent le même aspect.

En condition ITS 1%, la densité cellulaire au sein du biomatériau est faible contrairement aux éponges traitées avec du TGF- $\beta$ 1 et les éponges présentent une forme irrégulière reflétant une synthèse matricielle faible et de mauvaise qualité. L'addition de TGF- $\beta$ 1 permet la production d'une matrice extracellulaire dense et riche en protéoglycannes (Figure 16 : BA) et en collagènes (Figure 16 : RS), indépendamment du nombre de passage lors de l'expansion ou du temps de culture en biomatériau. De ce fait, les éponges sont plus régulières et présentent une forme plus arrondie (Figure 16). Les synthèses de protéoglycannes (Figure 16 : BA) et de collagène II (Figure 16 : Col2) sont particulièrement affectées par un passage tardif (P8) à J28 alors qu'à J56, cet effet est beaucoup moins marqué.

L'hypoxie ne provoque pas de réelles modifications du contenu en protéoglycannes au sein des éponges à P4 contrairement au passage tardif à J28 et J56 où une augmentation du contenu en protéoglycannes est notée. L'hypoxie a également un effet bénéfique sur la production du collagène de type II au sein des éponges indépendamment du nombre de passage et du temps de culture. L'immunomarquage est intensifié en hypoxie et plus homogène au sein de l'éponge. Aucun dépôt calcique n'est observé en rouge alizarine quelles que soient les conditions (Figure 16).



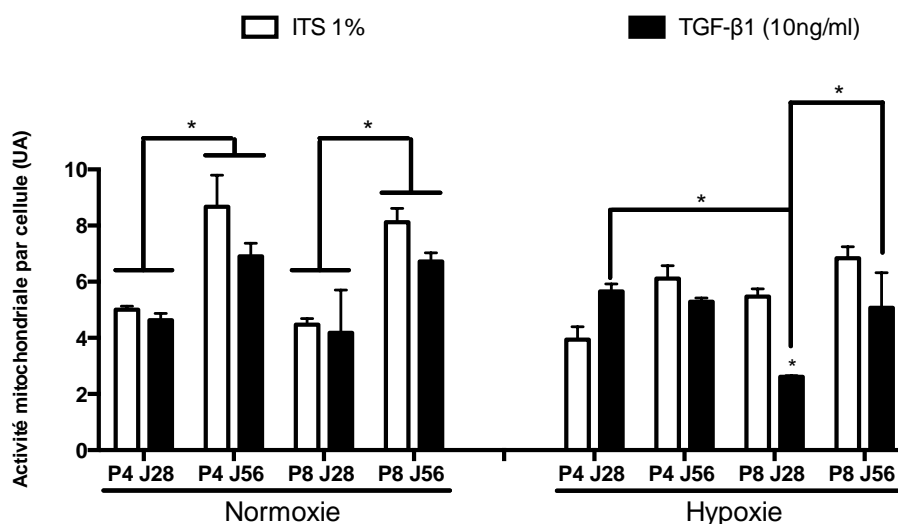
*Figure 16. Analyses histologiques (Hématoxyline-Erythrosine-Safran (HES), Bleu Alcian (BA), Rouge Sirius (RS), Rouge Alizarine (RA)) et immunohistochimiques (collagène II (Col2)) sur des éponges contenant des cellules souches mésenchymateuses ostéomédullaires humaines à différents passages (P4 et P8) après 28 et 56 jours d'induction chondrogénique ou non en 3D en conditions normoxique et hypoxique. La coloration bleu Alcian met en évidence un contenu riche en protéoglycannes en présence de TGF- $\beta$ 1 quel que soit le passage ou le temps de culture 3D. Le contenu en collagène II est plus abondant en condition TGF- $\beta$ 1. L'hypoxie a un effet bénéfique sur la synthèse de collagène II. Les CSM sont affaiblies par un passage tardif (P8) et produisent des quantités moindres de protéoglycannes en normoxie et de collagène II quelle que soit la teneur en oxygène du milieu environnant. Les éponges ne présentent aucune calcification peu importe la condition observée.*

## b) Les cellules souches synoviales

### (1) Activité mitochondriale

Les cellules souches d'origine synoviale se sont bien adaptées à l'éponge de collagène puisque aucune mort cellulaire n'est observée. En condition chondrogénique (TGF- $\beta$ 1), l'activité mitochondriale des cellules augmente entre J28 et J56 en normoxie quel que soit le passage et en hypoxie essentiellement à passage tardif (P8) (Figure 17). Tout comme pour les CSM ostéomédullaires, l'hypoxie ne présente que peu d'effet sur l'activité mitochondriale des CSSs.

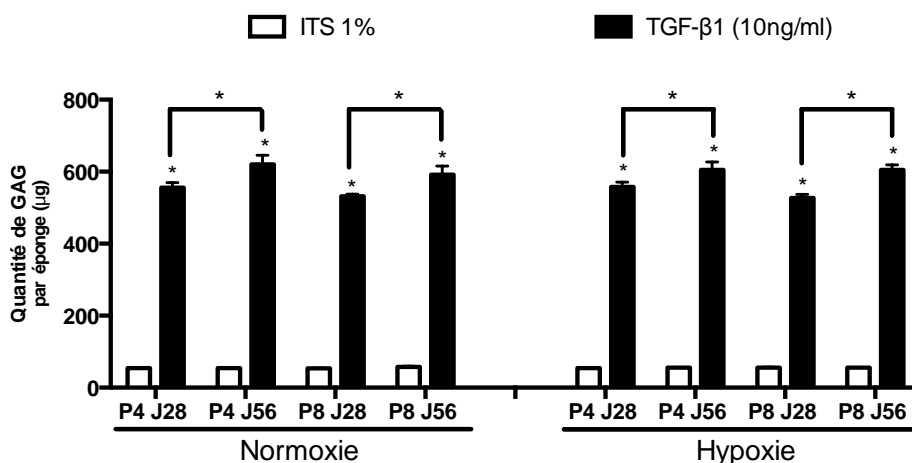




**Figure 17.** *Activité mitochondriale par cellule dans les éponges de collagène colonisées par des cellules souches d'origine synoviale (CSSs) humaines en fonction du passage (P4 et P8) après 28 et 56 jours de culture 3D en conditions normoxique ou hypoxique. La différenciation chondrogénique a été induite par addition de TGF-β1 à 10 ng/mL. La condition ITS 1% fait preuve de témoin. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .*

## (2) Dosage des GAGs synthétisés au sein de l'éponge

En condition non chondrogénique (ITS 1%), la quantité de GAGs synthétisés par les CSSs non différenciées reste basale et faible pour toutes les conditions étudiées. L'addition de TGF-β1 permet une synthèse de GAGs plus abondante d'environ 90% au sein de l'éponge pour l'ensemble des conditions ( $p < 0,05$ ). La quantité de GAGs est légèrement plus importante à J56 par rapport à J28 quel que soit le temps d'expansion en monocouche ou la teneur en oxygène ( $p < 0,05$ ). L'hypoxie n'a aucun effet sur la production de GAGs par les CSSs dans les éponges (Figure 18).



**Figure 18.** *Quantité de GAGs synthétisés dans les éponges de collagène colonisées par des cellules souches d'origine synoviale (CSSs) humaines en fonction du passage (P4 et P8) après 28 et 56 jours de culture 3D en conditions normoxique ou hypoxique. La différenciation chondrogénique a été induite par addition de TGF-β1 à 10 ng/mL. La condition ITS 1% fait preuve de témoin. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .*

### (3) Expression des gènes d'intérêt du cartilage

Tout comme pour les CSM ostéomédullaires, l'addition de TGF- $\beta$ 1 conduit à une augmentation de l'expression de l'ensemble des gènes analysés.

#### (A) LES COLLAGENES

Les collagènes II et IIb présentent des profils d'expression similaires. Nous n'observons aucune différence significative pour l'expression de ces gènes entre J28 et J56 pour les deux passages (P4 et P8) et les deux teneurs en oxygène (normoxie et hypoxie). Ces gènes sont plus exprimés à P4 et moins exprimés à P8 en normoxie alors que leur expression est moins élevée à P4 qu'à P8 en hypoxie (Figure 19). Le taux d'ARNm du collagène I diminue entre J28 et J56 à passage plus précoce (P4) mais augmente entre J28 et J56 à passage tardif (P8) en condition normoxique. L'hypoxie permet le maintien d'un taux d'expression du collagène I basale et faible pour toutes les conditions testées. D'un point de vue général, le collagène X est plus exprimé en normoxie et particulièrement à P4 après un temps d'induction chondrogénique plus long (56 jours) ( $p < 0,05$ ). En hypoxie, le taux d'expression du gène reste bas pour un passage 4 pour les deux temps de culture (J28 et J56) et à passage tardif (P8) après 28 jours de culture puis augmente légèrement de manière non significative à J56 (Figure 19).

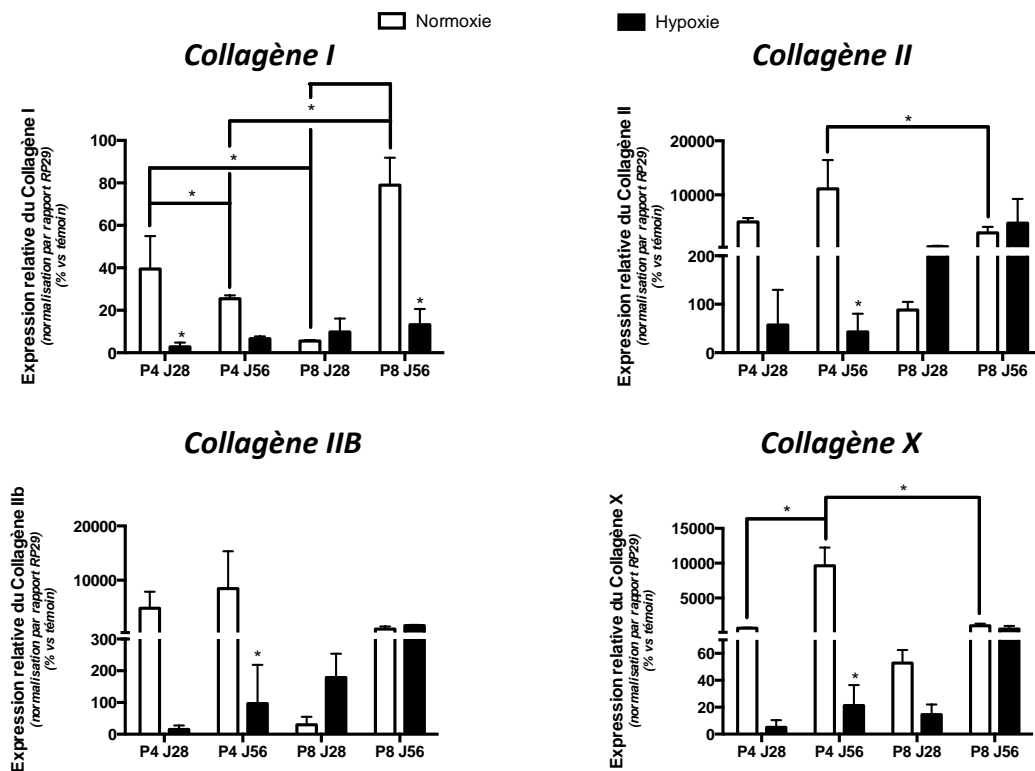
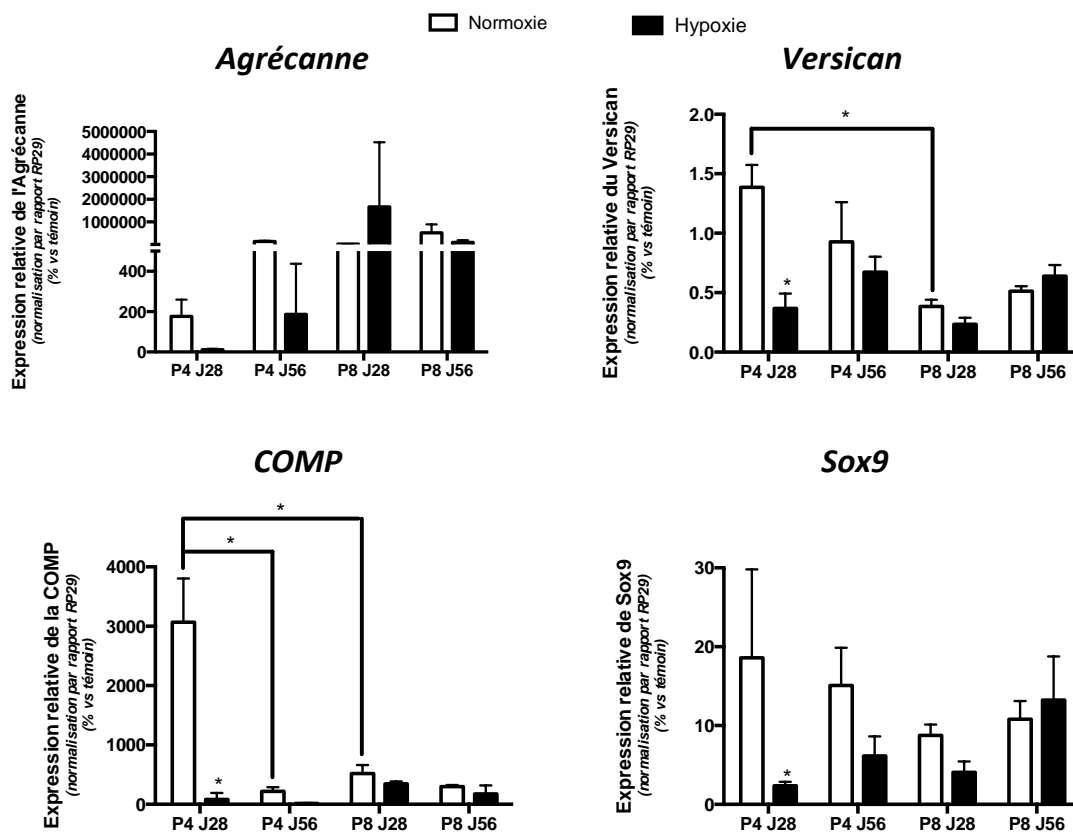


Figure 19. Expression génique des collagènes de type I, II, IIb et X dans les CSSs humaines ensemencées dans les éponges de collagène en fonction du passage (P4 et P8) après 28 et 56 jours d'induction chondrogénique en 3D en conditions normoxique et hypoxique. Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage RP29. L'expression des gènes dans les CSSs différenciées (TGF- $\beta$ 1) est rapportée à celle dans les CSSs cultivées en condition témoin non chondrogénique (ITS 1%). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

## (B) PROTEOGLYCANNES, FACTEUR DE TRANSCRIPTION ET PROTEINE MATRICIELLE

Les résultats montrent que l'expression de l'agrécane et du facteur de transcription Sox9, bien qu'induite par l'ajout de TGF- $\beta$ 1, ne change pas de manière significative entre les différentes conditions testées. (Figure 20). Le versican est près de 3 fois plus exprimé à passage précoce (P4) après 28 jours de culture en normoxie par comparaison au même temps de culture à passage 8 ( $p < 0,05$ ). Placer les éponges en hypoxie pendant l'étape de différenciation des CSSs permet de réduire significativement l'expression du versican à un passage précoce pour un temps de culture 3D court (P4 J28 ;  $p < 0,05$ ). Ce gène est tout de même faiblement exprimé pour toutes les conditions. (Figure 20)

Le taux d'ARNm de la COMP est basal sauf pour la condition P4 J28 en normoxie pour laquelle l'expression de la COMP est 14 fois plus élevée qu'à un temps de culture plus long (P4 J56), près de 6 fois plus importante que le même temps de culture à passage tardif (P8 J28) et environ 38 fois plus élevée qu'en hypoxie pour le même passage et le même temps (P4 J28) ( $p < 0,05$ ) (Figure 20).



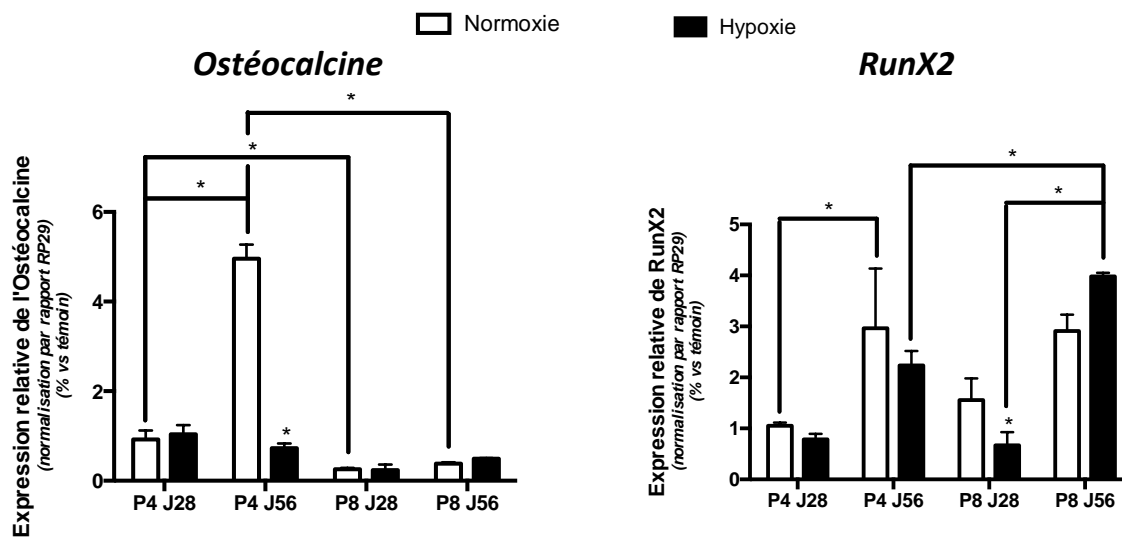
**Figure 20.** Expression génique de l'Agrécane, du Versican, de la COMP et de Sox9 dans les CSSs humainesensemencées dans les éponges de collagène en fonction du passage (P4 et P8) après 28 et 56 jours d'induction chondrogénique en 3D en conditions normoxique et hypoxique. Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage RP29. L'expression des gènes dans les CSSs différenciées (TGF- $\beta$ 1) est rapportée à celle dans les CSSs cultivées en condition témoin non chondrogénique (ITS 1%). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

### (C) LES MARQUEURS OSTEOGENIQUES

Bien que l'ajout de TGF- $\beta$ 1 conduise à une augmentation de l'expression de l'ostéocalcine et de RunX2, ces deux gènes étaient exprimés à des taux faibles par les cellules souches synoviales.

L'ostéocalcine est 5 fois plus exprimée à J56 qu'à J28 à P4 en normoxie. A passage tardif, l'expression de l'ostéocalcine est significativement diminuée par rapport à P4 et reste basse sans aucune différence entre les deux temps de culture 3D (J28 et J56). L'hypoxie permet le maintien à un taux faible de son expression quel que soit le passage et le temps d'induction chondrogénique (Figure 21).

L'expression de RunX2 est plus élevée à J56 par comparaison avec 28 jours de culture pour les deux passages (P4 et P8). L'hypoxie diminue l'expression de RunX2 à passage tardif après 28 jours de culture 3D mais cette expression est accrue à J56 (Figure 21).



**Figure 21.** Expression de 2 marqueurs ostéogéniques : l'Ostéocalcine et RunX2 dans les CSSs humaines ensemencées dans les éponges de collagène en fonction du passage (P4 et P8) après 28 et 56 jours d'induction chondrogénique en 3D en conditions normoxique et hypoxique. Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage RP29. L'expression des gènes dans les CSSs différenciées (TGF- $\beta$ 1) est rapportée à celle dans les CSSs cultivées en condition témoin non chondrogénique (ITS 1%). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

### (D) SYNTHÈSE MATRICIELLE

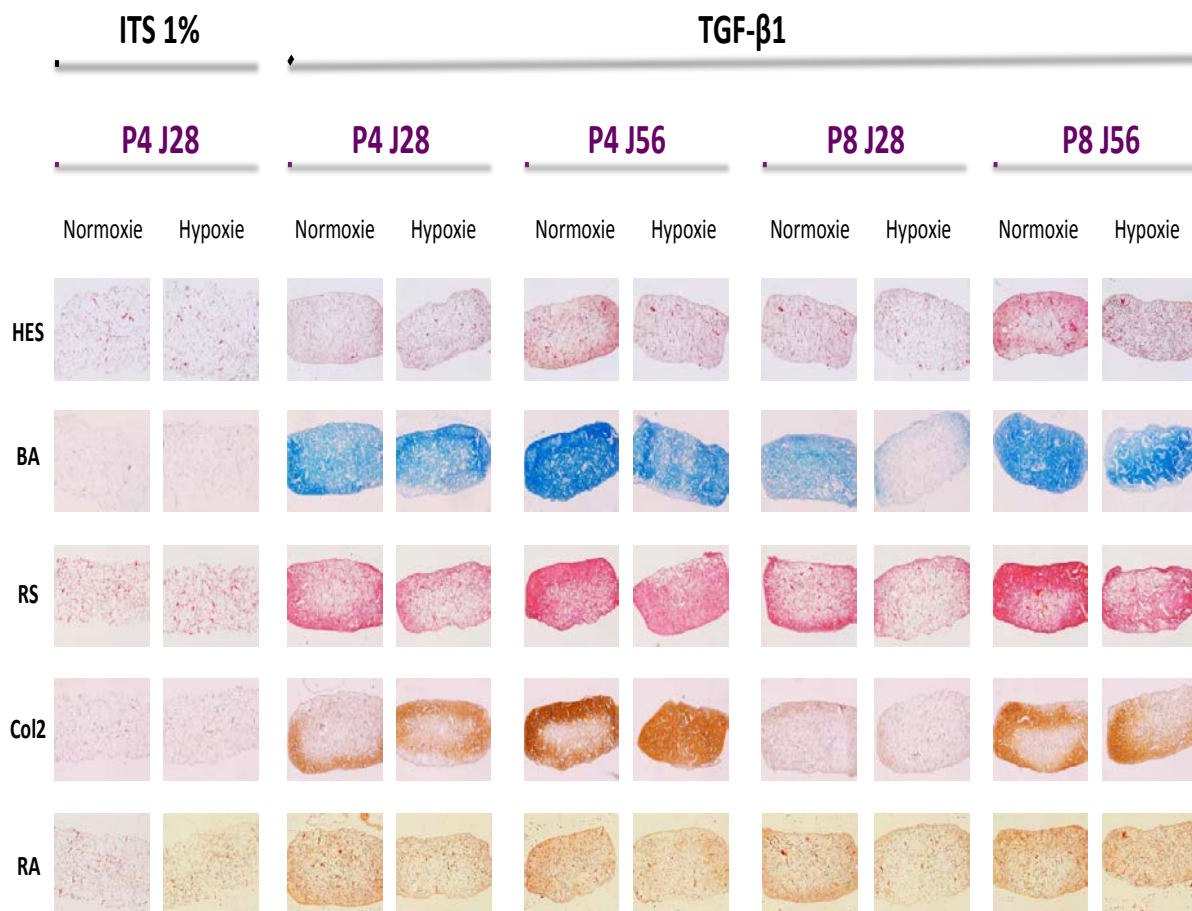
Les éponges témoins (ITS 1%) sont présentées à P4 J28 car nous n'avons observé aucune différence pour les différentes colorations réalisées entre les différentes conditions.

Comparativement aux témoins, le TGF- $\beta$ 1 induit la synthèse d'une matrice de meilleure qualité par les cellules souches synoviales au sein de l'éponge. La synthèse matricielle apparaît plus riche en protéoglycannes et en collagènes à un passage précoce (P4) comme le prouvent les colorations en bleu Alcian (Figure 22 : BA) et en rouge Sirius (Figure 22 : RS). Le contenu en collagène de type II est également plus abondant à P4 en particulier après 56 jours de culture en milieu chondrogénique (Figure 22 : Col2).

A P8 J28, la synthèse en protéoglycannes et en collagènes est fortement diminuée et le contenu en collagène II est quasiment inexistant. En revanche, un temps de culture prolongé (J56) en présence de TGF- $\beta$ 1 permet la production d'une matrice de meilleure qualité dans l'éponge (Figure 22).

L'hypoxie est bénéfique pour la synthèse de collagène II principalement à passage précoce (P4) et n'a aucun effet à passage tardif par rapport à la normoxie (Figure 22 : Col2).

Aucune calcification n'a été observée lorsque les CSSs sont utilisées au passage 4 quel que soit le temps d'induction chondrogénique ou la teneur en oxygène. En revanche, quelques dépôts calciques épars apparaissent avec les CSSs à P8 en normoxie et en hypoxie. (Figure 22)



**Figure 22.** Analyses histologiques (Hématoxyline-Eosine-Safran (HES), Bleu Alcian (BA), Rouge Sirius (RS), Rouge Alizarine (RA)) et immunohistochimiques (collagène II (Col2)) sur des éponges contenant des CSSs humaines à différents passages (P4 et P8) après 28 et 56 jours d'induction chondrogénique ou non en 3D en conditions normoxique et hypoxique. L'addition de TGF- $\beta$ 1 induit la synthèse d'une matrice contenant des protéoglycannes et du collagène II. L'utilisation des cellules au passage 4 est plus propice à une synthèse plus abondante des composants essentiels de la matrice cartilagineuse. L'hypoxie a un effet bénéfique sur la synthèse de collagène II uniquement au passage précoce P4. Quelques calcifications sont observées à P8 J28 et P8 J56.

## 5. Discussion

Le cartilage est un tissu conjonctif avasculaire ce qui lui confère des capacités de réparation limitées. De ce fait, lorsqu'il est lésé, le tissu cicatriciel résultant s'avère le plus souvent de mauvaise qualité. Une des voies thérapeutiques développées, l'ingénierie tissulaire, se propose de promouvoir la régénération *in situ* d'un néo-tissu le plus semblable possible au cartilage natif en apportant, au sein de la lésion, à la fois un biomatériau « tuteur » et un contingent cellulaire susceptible de synthétiser des composants matriciels.

L'objectif du projet de l'équipe consiste à réaliser un biomatériau hybride fonctionnalisé à l'aide de cellules souches mésenchymateuses humaines possédant des capacités chondro-inductrices. Deux types cellulaires ont été étudiés au cours de ce travail : les CSM issues de la moelle osseuse et de la membrane synoviale. Nous nous sommes intéressés à l'effet du passage (P4 et P8) lors de l'étape d'expansion, du temps de culture en environnement tridimensionnel (28 et 56 jours) et de la teneur en oxygène du milieu sur les potentialités chondrogéniques de ces cellules souches.

Dans un premier temps, nous prouvons qu'aucune des conditions que nous avons testées n'avait d'influence sur la viabilité cellulaire au sein du biomatériau. Nos résultats montrent que l'activité mitochondriale n'est pas réellement affectée par le passage, le temps de culture ou l'hypoxie pour les CSM ostéomédullaires et les CSSs. Plusieurs études ont montré qu'une diminution de l'activité mitochondriale pourrait être liée au processus de différenciation de ces cellules [306, 307]. Dans notre étude, l'activité mitochondriale des CSM et CSSs après 28 jours de culture en condition chondrogénique était diminuée pour les deux passages (P4 et P8) par rapport à J56 ce qui laisserait présager d'une meilleure différenciation pour le temps de culture 3D de 28 jours. Cependant, la condition témoin et la condition chondrogénique présentent des résultats similaires, ce qui limite toute interprétation quant à la différenciation des deux types cellulaires.

L'étude de l'expression des gènes d'intérêt du cartilage par RT-PCR quantitative confirme que le TGF- $\beta$ 1 induit la chondrogenèse des CSM ostéomédullaires [175] et de la membrane synoviale [206]. Un passage plus précoce (P4) est mieux adapté à la différenciation chondrogénique des deux types cellulaires (CSM et CSSs). En effet, cette condition permet une expression importante des marqueurs cartilagineux tels que le collagène II, IIB, l'agrécanne, la COMP et Sox9 tout en limitant l'expression du collagène I. Bien que l'expression du collagène X (spécifique du cartilage hypertrophique) demeure élevée pour l'ensemble des conditions, les marqueurs ostéogéniques restent faiblement exprimés dans les deux types cellulaires.

L'hypoxie n'induit que peu ou pas de modification de l'expression des gènes étudiés par rapport à une culture en milieu normoxique en ce qui concerne les CSM ostéomédullaires. En revanche, les CS synoviales sont plus sensibles à l'appauvrissement du milieu en oxygène. L'hypoxie réduit considérablement l'expression des gènes d'intérêt du cartilage comme le collagène II et IIB, de l'agrécanne, de la COMP et de Sox9 pour un passage 4. Pour un passage tardif, l'hypoxie n'a pas réellement d'effet sur l'expression de ces gènes par comparaison avec la condition normoxie. De même, l'hypoxie conduit à une diminution importante de l'expression du collagène I, X et du versican à P4 principalement pour les CSM et les CSSs alors qu'à un passage tardif, ces gènes ainsi que l'ostéocalcine et RunX2 sont généralement plus exprimés. Ces résultats démontrent qu'un passage 8 est moins approprié pour induire une différenciation chondrogénique des CSM et CSSs au sein de nos éponges.

De plus, alors que l'hypoxie n'a que peu d'influence sur l'expression génique des CSM, l'hypoxie ne potentialise pas l'expression des gènes d'intérêt du cartilage par les CSSs dont la différenciation est induite par le TGF- $\beta$ 1. Concernant les CSM, nos résultats confirment ceux obtenus par Merceron, en 2009, qui n'a démontré aucune influence de l'hypoxie sur le taux de transcrits de l'agrécanne et du collagène de type II à 28 jours de culture en pellets de CSM dérivées du tissu adipeux [308]. En revanche, plusieurs groupes ont démontré l'effet bénéfique de l'hypoxie sur l'expression de gènes d'intérêt du cartilage. En 2010, Markway a montré une augmentation de l'expression de l'agrécanne et Sox9 par les CSM ostéomédullaires après 14 jours de culture en pellets [200].

Plus récemment, il a été prouvé qu'une phase d'expansion en hypoxie suivie d'une période de différenciation en normoxie semblait potentialiser la différenciation chondrogénique des CSM en augmentant l'expression du collagène de type II, de Sox9, de la COMP et de l'agrécanne [199, 201]. Cependant, Müller a également précisé qu'une phase d'expansion mais également de différenciation en hypoxie favorisait l'expression de gènes spécifiques du cartilage [309]. Suzuki *et coll* ont montré que les cellules souches synoviales dont la différenciation a été induite par combinaison de BMP-7 et TGF- $\beta$ 3 exprimaient le collagène II, la COMP et l'agrécanne de manière plus abondante en normoxie que les cellules non différenciées [310]. Néanmoins, ce groupe n'a pas placé les CSSs en hypoxie afin de comparer l'effet de la teneur en oxygène sur l'expression des gènes d'intérêt du cartilage.

Afin de compléter les résultats obtenus en biologie moléculaire des analyses histologiques et immunohistochimiques ont été réalisées. En effet, ces techniques permettent une visualisation de la morphologie et de la répartition cellulaires ainsi que de la quantité de matrice extracellulaire synthétisée au sein du biomatériau. La synthèse de collagène de type II a été mise en évidence par immunohistochimie. Pour les deux types cellulaires, le nombre de cellules contenu dans les éponges cultivées en ITS seul (ITS 1%) est bien inférieur à celui observé dans les éponges cultivées en milieu chondrogénique (TGF- $\beta$ 1). De plus, les éponges témoins ITS 1% présentent une synthèse matricielle très faible et de mauvaise qualité, ne contenant pas de protéoglycannes (coloration en bleu Alcian) et de très faible quantité de collagènes (coloration en rouge Sirius) et en particulier une synthèse inexistante de collagène de type II (immunohistochimie du collagène II).

Ces résultats confirment ceux obtenus en biologie moléculaire et traduisant que l'ITS seul n'est en aucun cas un supplément chondrogénique. Concernant les CS synoviales, Pei, en 2009, avait déjà démontré l'effet chondro-inducteur du TGF- $\beta$ 1 sur des pellets de CSS de porc après 15 jours de culture [206]. Cependant, nos résultats vont à l'encontre de ceux obtenus par Shintani en 2007 et en 2013 et Rui en 2010 qui affirmaient que le TGF- $\beta$  seul ne permettait pas une bonne différenciation des CSSs. Leurs pellets ne présentaient qu'une faible quantité de protéoglycannes et de collagène II voire aucune synthèse de collagène II [311, 312, 313, 185]. Cependant, notre système 3D est difficilement comparable à leur système de pellet. Nos éponges sont des structures poreuses à base de collagène et non simplement une structure tridimensionnelle cellulaire.

Plusieurs études ont mis en évidence que l'utilisation conjointe de BMP (BMP-2 ou BMP-7) avec du TGF- $\alpha/\beta$  (TGF- $\beta$ 1 ou  $\beta$ 3 ou  $\alpha$ 3) semblerait plus favorable à une différenciation chondrogéniques des CS synoviales ; l'addition de TGF- $\beta$  seul ne permettant pas l'obtention d'une matrice de qualité dans leurs conditions de culture [185, 313, 314, 315, 316, 317]. Néanmoins, ces études ont été menées sur des CSSs provenant d'origines différentes (Homme, lapin, souris) principalement cultivées en pellets et non dans des

biomatériaux, ce qui pourrait expliquer les différences observées entre leurs résultats et ceux que nous avons obtenus.

L'apport de TGF- $\beta$ 1 dans le milieu de culture est essentiel à une synthèse plus abondante, au sein du biomatériau, de constituants matriciels du cartilage hyalin, tels que les protéoglycannes (bleu Alcian) et les collagènes (rouge Sirius) pour les CSM ostéomédullaires et synoviales. Pour les deux types cellulaires, la synthèse matricielle est de meilleure qualité à un passage plus précoce (P4) puisque la synthèse de protéoglycannes est importante au sein des éponges comme en atteste la coloration en bleu Alcian et apparaît plus homogène pour les CSM que pour les CSS.

L'utilisation des cellules souches en médecine régénérative dépend fortement de leur habilité à proliférer *in vitro* sans perdre leur potentiel de différenciation avant d'avoir atteint un nombre de cellules approprié pour leur application clinique. Pour atteindre une certaine densité cellulaire, un nombre de passage important s'avère parfois indispensable. Quelques travaux se sont intéressés à l'effet du passage en monocouche sur les CSM essentiellement. Entre 7 et 15 passages, les CSM humaines perdent leur forme fibroblastique, leurs capacités de prolifération ainsi que leurs potentialités de différenciation au cours du temps [318, 319, 320, 321]. Il semblerait que les passages précoces des CSM soient plus propices à l'induction d'une différenciation ostéogénique, les passages intermédiaires favoriseraient la différenciation chondrogéniques et les cellules ne conserveraient seulement que leurs capacités de différenciation adipogéniques à passage tardif [322]. Cette dernière hypothèse apparaît plausible car, à passage 8, dans nos expérimentations, les CSM et plus particulièrement les CSSs perdent partiellement leurs potentialités chondrogéniques alors qu'un passage 4 est favorable à leur différenciation.

L'hypoxie ne joue pas un rôle essentiel dans la production de protéoglycannes. En revanche, la synthèse de collagène de type II est influencée par la teneur en oxygène du milieu. L'hypoxie favorise la formation de collagène II pour les CSM à passages précoce et tardif et seulement à P4 pour les CSSs. Un temps plus long (J56) d'exposition au milieu chondrogénique (TGF- $\beta$ 1) potentialise les synthèses de protéoglycannes et de collagène II par les deux types cellulaires.

A passage tardif (P8) après 28 jours de culture, les contenus en protéoglycannes et en collagène II sont assez faibles pour les CSM en normoxie. Les CSSs, quant à elles, synthétisent une matrice pauvre en protéoglycannes en condition normoxique et dépourvue de protéoglycannes en hypoxie. Que cela soit en normoxie ou en hypoxie, les CSSs ne produisent pas de collagène II à P8 J28. Pour un temps de culture plus long (56 jours), les CSM et les CSSs sont capables de rétablir la synthèse d'une matrice riche et homogène en protéoglycannes et contenant du collagène II mais principalement à la périphérie de l'éponge.

D'autres études ont également prouvé l'effet bénéfique de l'hypoxie sur la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses ostéomédullaires et adipeuses capables de synthétiser certains constituants de la matrice cartilagineuse tels que des protéoglycannes et du collagène II. Adesida et son équipe ont mis en évidence que la culture des CSM ostéomédullaires dont la différenciation chondrogénique a été induite en pellet par ajout de TGF- $\beta$ 1 en condition hypoxique conduisait à une augmentation de l'expression des gènes de l'agrécane, du collagène II et de la COMP tout en réduisant celle des collagènes I et X et permettait une synthèse protéique plus abondante de GAGs et collagène de type II après 21 jours. Ils précisent également qu'une culture en hypoxie durant la phase d'expansion potentialise l'effet de l'hypoxie durant la période de différenciation.



[199]. Un autre groupe a démontré qu'un milieu restrictif en oxygène induisait une expression génique plus importante de Sox9 et du collagène II et une synthèse plus abondante de GAGs par des CSM adipeuses tant lors de leur différenciation au sein d'une membrane de collagène I/II qu'en pellets après 28 jours [323]. L'hypoxie éviterait aussi la différenciation terminale des CSM en inhibant partiellement l'expression des gènes du collagène X et de Runx2 via l'activation de la voie des MAPKinases (PI3K/Akt/FoxO) responsable de l'inactivation des caspases 3 et 8 [324]. Ces deux caspases sont fortement impliquées dans le phénomène d'apoptose accompagnant la différenciation endochondrale des chondrocytes [325, 326].

Il est également intéressant de noter qu'une teneur en oxygène de 5% dans le milieu environnant semble inhiber ou du moins retarder les différenciations hypertrophique et ostéogénique des CSM, étapes ultérieures à la différenciation chondrogénique de ces cellules [204, 327, 328]. Nous ne pouvons pas confirmer ces résultats car aucune des éponges ne s'est calcifiée peu importe le passage utilisé après 28 ou 56 jours d'induction chondrogénique que cela soit en normoxie ou en hypoxie pour les CSM. Cependant, les CSSs à passage tardif (P8) produisent des calcifications au sein des éponges en normoxie et en hypoxie. Dans nos conditions de culture, la teneur en oxygène n'a aucun effet sur l'apparition de dépôts calciques au sein des éponges *in vitro*. Par contre, Vinardell *et coll* ont prouvé que des gels d'agaroseensemencés avec des CSSs ne présentent pas de calcification en rouge alizarine après avoir été cultivés durant 21 jours en condition chondrogénique [329]. Nos résultats vont à l'encontre de leurs observations. En effet, pour les CSSs nous avons observé quelques dépôts calciques ponctuels et essentiellement périphériques lorsque les cellules sont cultivées en monocouche pendant une période plus longue (P8) avant d'être placés en environnement chondrogénique sans différence notable entre les conditions normoxique et hypoxique.

## 6. Conclusion

Les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse et de la membrane synoviale présentent donc des capacités de différenciation chondrogénique intéressantes. L'optimisation du passage auquel sontensemencées les CSM et les CSSs au sein du biomatériau, du temps de culture en trois dimensions et de la teneur en oxygène idéale de l'environnement apparaît comme une étape majeure dans le but de créer d'un implant fonctionnalisé de qualité. Une phase d'expansion durant 3 passages en monocouche avec une étape de pré-orientation chondrogénique au cours du troisième passage est le meilleur compromis entre le nombre de cellules nécessaire et le maintien de leur capacité de différenciation chondrogénique.

Les cellules sont ensuite placées dans un environnement tridimensionnel au quatrième passage et cultivées en présence de TGF- $\beta$ 1 pendant 28 jours, selon notre protocole. D'autres mises au point des conditions de culture des CSSs pourraient être utiles afin d'obtenir une synthèse plus homogène au sein de l'éponge. L'enjeu est ensuite de s'assurer que les cellules n'entrent pas dans un stade de différenciation hypertrophique voire ostéogénique. Nos résultats semblent encourageants puisque les éponges contenant les CSM ostéomédullaires et celles contenant les CSSs ne présentaient pas de calcification à P4 J28 (3 passages en monocouche, pré-orientation pendant le 3<sup>e</sup> passage, 28 jours de culture en éponge en milieu chondrogénique) et à P4 J56.



## B. REDIFFERENCIATION CHONDROCYTAIRE: ROLES DE L'EXPANSION ET DE L'HYPOXIE

### 1. Objectifs

L'objectif de ce travail est d'évaluer les capacités de redifférenciation des chondrocytes dédifférenciés par un nombre de passages élevé. Les chondrocytes perdent rapidement (dès le premier passage) leur phénotype chondrocytaire en monocouche. Cependant, la création d'implants fonctionnalisés à base de chondrocytes nécessite un nombre important de cellules, nombre difficile à atteindre à de très faibles passages (P1 ou P2). Il a été démontré que les chondrocytes pouvaient se redifférencier s'ils étaient placés dans un environnement tridimensionnel ou lorsqu'ils étaient cultivés en milieu chondrogénique. Or ces cellules dédifférenciées sont-elles capables de se redifférencier en chondrocytes et de synthétiser les composants matriciels spécifiques du cartilage ?

### 2. Matériels et méthodes

#### a) *Isolation et expansion des chondrocytes*

##### (1) Isolation des chondrocytes articulaires

Les prélèvements de cartilage sont obtenus lors de la mise en place de prothèses totales de genou dans le Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (COT) (CHU Nancy, D. Mainard & L. Galois) en partenariat avec l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus (UTCT, CHU Nancy, D. Bensoussan) dans le cadre de don pour la banque d'os. Le genou est prélevé puis placé dans un pot stérile. Le cartilage articulaire est alors découpé en petits fragments, qui sont rincés dans une solution de PBS supplémentée en antibiotiques (Invitrogen, France).

Après 2 rinçages, le cartilage est à nouveau fragmenté afin d'obtenir des morceaux de cartilage de plus petite taille qui sont placés, pour digestion, dans une solution de pronase (Pronase (Sigma, France, 1,5 mg/mL dans du sérum physiologique supplémenté en Pénicilline/Streptomycine) pendant 2 heures à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Après 2 rinçages avec du PBS, le cartilage est ensuite digéré pendant la nuit à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> dans une solution de collagénase B (Collagenase B (Roche, France), 2mg/mL dans du milieu DMEM 1 g/L de glucose sans SVF supplémenté en Pénicilline/Streptomycine). Après numération de la suspension cellulaire obtenue, elle est centrifugée à 1300 trs/min pendant 5 min.

Le culot est suspendu dans du milieu DMEM 1g/L de glucose (Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de Glutamine, 100 µg/mL de Streptomycine et 100 U/mL de Pénicilline et 1 ng/mL de bFGF (Miltanyi, France). Les cellules sont ensemencées à la densité de  $1,5 \cdot 10^6$  cellules/flasque de 75 cm<sup>2</sup>. Le milieu utilisé pour la phase d'expansion est décrit ci-dessous.

##### (2) Milieu de culture pour l'expansion des chondrocytes

Le milieu est changé deux à trois fois par semaine. Pour l'expansion en monocouche des chondrocytes de passage 0 à 2 et 0 à 6 (P0-P2 ou de P0- P6) en normoxie c'est un milieu

DMEM à 1 g/l de glucose (Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de Glutamine, 100 µg/mL de Streptomycine et 100 U/mL de Pénicilline et 1 ng/mL de bFGF (Miltenyi, France).

Lors du dernier passage P3 ou P7, avant l'ensemencement en éponges, les cellules sont cultivées avec notre milieu de pré-orientation chondrogénique : DMEM 4,5g/L de glucose (Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de Glutamine, 100 µg/mL de Streptomycine et 100 U/mL de Pénicilline, pyruvate (110 µg/mL), proline (40 µg/mL), L-acide-ascorbique-2-Phosphate (50 µg/mL), dexaméthasone (100 nM) et 1 ng/mL de bFGF (Miltenyi, France) afin de reproduire les mêmes conditions chondrogènes que pour les CSM ostéomédullaires et les CSSs. Les milieux sont changés deux à trois fois par semaine.

### (3) Expansion cellulaire

Lorsque les cellules arrivent à environ 80% de confluence, elles sont amplifiées selon le protocole suivant : Après un lavage au PBS, 2 mL de trypsine-EDTA (0,05%, 1X, Gibco, France) sont ajoutés dans la flasque. Les flasques sont placées pendant 5 à 10 min à 37°C. L'action de la trypsine est ensuite neutralisée par deux volumes de milieu complet. La suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée à 1200 tours/min pendant 5 min. Le culot est ensuite repris dans du milieu complet. Un comptage en cellule de Malassez est réalisé afin de déterminer le nombre de cellules et de les répartir de façon homogène. Les cellules sont à nouveau ensemencées à raison de 500 000 cellules/flasque de 75 cm<sup>2</sup>.

#### b) Ensemencement des biomatériaux

##### (1) Ensemencement des éponges avec les chondrocytes dédifférenciés

Les biomatériaux utilisés pour le redifférenciation des chondrocytes dédifférenciés par nombre de passages élevés, sont des éponges de collagène de type I et III (95% de collagène I) de 5 mm de diamètre et de 2 mm d'épaisseur fabriquées par la Société Symatèse Biomateriaux (Chaponost, France). Les éponges sont placées unitairement dans une plaque 96 puits. Les chondrocytes sont ensemencés à deux passages différents : P4 et P8, par réhydratation de l'éponge avec 50 µl de suspension cellulaire afin d'obtenir 500 000 cellules par éponge.

Un milieu DMEM 4,5 g/L de glucose supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF), 2 mM de Glutamine, 100 µg/mL de Streptomycine et 100 U/mL de Pénicilline et 110 µg/mL de pyruvate de sodium auxquels ont été ajoutés du PAD (Proline (40 µg/mL) – Acide Ascorbique 2-phosphate (50 µg/mL) – Dexaméthasone (100 nM)) est utilisé pour l'ensemencement. Après un temps d'adaptation des cellules au biomatériau, évalué à 4-5h, les éponges contenant les chondrocytes sont placées unitairement dans les plaques 48 puits et cultivées pendant 24h avec le milieu ayant servi à l'ensemencement.

##### (2) Milieux de culture testés

Après 1 jour d'adaptation au biomatériau, 2 conditions sont testées sur les éponges :

- **ITS 1%** (ITS+premix, BD, France)
- **ITS 1% + TGF-β1** (10ng/mL, Miltenyi, France)

Les éponges soumises à ces deux conditions, cultivées durant 28 et 56 jours, sont placées parallèlement en conditions normoxique (21% O<sub>2</sub>) et hypoxique (5% O<sub>2</sub>). Les milieux de culture doivent être changés trois fois par semaine puisqu'ils s'appauvrissent et perdent leurs qualités nutritives. La première semaine, les éponges sont changées de plaque afin d'éviter la création d'une monocouche au fond des puits due à une fuite cellulaire possible pendant cette période. Après 28 et 56 jours de culture, les éponges ont été recueillies afin de procéder à l'évaluation des paramètres de viabilité (MTT, Hoechst), d'expression de gènes (RT-PCRq) et de qualité matricielle (dosage des glycosaminoglycannes par la méthode de Goldberg, histologie, immunohistochimie) par les différents tests décrits dans les annexes.

### c) Analyses

#### (1) Activité mitochondriale

L'activité mitochondriale des chondrocytes a été déterminée après 28 et 56 jours de culture 3D en normoxie et hypoxie sur les éponges contenant des chondrocytes différenciés ensemencés à P4 et P8 à l'aide d'un test colorimétrique MTT dont le protocole est décrit dans la partie Annexes.

#### (2) Dosage de l'ADN

Le dosage de l'ADN après 28 et 56 jours de culture 3D en normoxie et hypoxie sur les éponges contenant des chondrocytes différenciés ensemencés à P4 et P8 à l'aide du réactif de Hoechst permettant de normaliser les résultats de l'activité mitochondriale est détaillé en Annexes.

#### (3) Extraction des ARN totaux

Le principe d'extraction des ARN totaux des éponges est décrit dans la partie Annexes. Les ARN ont été extraits après 28 et 56 jours de culture 3D en normoxie et hypoxie sur les éponges contenant des chondrocytes différenciés ensemencés à P4 et P8.

#### (4) Reverse Transcriptase (RT)

L'obtention des ADNc par transcription inverse est détaillée en Annexes.

#### (5) PCRq

L'analyse de l'expression des gènes par RT-PCRq repose sur le principe décrit dans la partie Annexes.

Les gènes étudiés dans notre étude sont les gènes codant pour :

- Des **collagènes** : type I, type II total, de type IIB, et de type X
- Des **protéoglycannes** : Agrécanne, Versican
- Un **facteur de transcription** : Sox 9
- Une **protéine matricielle** : COMP
- Des **marqueurs de différenciation osseuse** : Ostéocalcine, RunX2
- Une protéine de référence : RP 29

Les amorces utilisées sont répertoriées en Annexes.

#### (6) Dosage des GAGs

Le dosage des GAGs est effectué après 28 et 56 jours de culture 3D en normoxie et hypoxie sur les surnageants de digestion des éponges contenant des chondrocytes différenciés ensemencés à P4 et P8 selon le test colorimétrique reposant sur la méthode de Goldberg. Le protocole est retrouvé en Annexes.

#### (7) Histologie

Après 28 et 56 jours de culture 3D en normoxie et hypoxie, la synthèse matricielle dans les éponges contenant des chondrocytes différenciés ensemencés à P4 et P8 est évaluée à l'aide de colorations histologiques selon le protocole décrit en Annexes.

Les différentes colorations réalisées sont les suivantes :

- **Hématoxyline-Erythrosine-Safran (HES)** : coloration trichromique utilisée pour étudier la morphologie et l'aspect des cellules.
- **Bleu Alcian (BA)** : Le bleu Alcian colore en bleu les mucopolysaccharides acides.
- **Rouge Sirius (RS)** : Cette coloration met en évidence le contenu en collagène.
- **Rouge alizarine (RA)** : Cette coloration permet de mettre en évidence les dépôts calciques.

#### (8) Immunohistochimie

La détection du collagène de type II au sein de la matrice synthétisée après 28 et 56 jours de culture 3D en normoxie et hypoxie dans les éponges contenant des chondrocytes différenciés ensemencés à P4 et P8 est réalisée par immunohistochimie selon le protocole décrit en Annexes.

#### (9) Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (SEM). Un test ANOVA, à 2 facteurs est utilisé pour déterminer la significativité entre les différentes conditions, suivi d'un test *a posteriori* de Bonferroni pour réaliser des comparaisons multiples au sein des groupes. Ces analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad (GraphPad Prism 4.0c Software MacKiev © GraphPad Software, Inc.). Une différence statistique significative est déterminée par une valeur \* :  $p < 0,05$ .

L'ensemble des analyses a été mené en triplicat (pour les analyses MTT, Hoechst, biologie moléculaire) et en quintuplat (histologie et immunohistologie) sur au minimum 2 patients.

### 3. Résultats

#### a) Activité mitochondriale des chondrocytes

Les chondrocytes se sont bien adaptés au biomatériau puisqu'aucune mort cellulaire n'a été constatée. Peu de variations de l'activité mitochondriale sont détectées. En effet, il n'existe pas de différence significative de l'activité mitochondriale entre les chondrocytes cultivés en milieu ITS 1% et les chondrocytes cultivés en présence de TGF- $\beta$ 1 à l'exception de la condition P4 J28 en normoxie pour laquelle l'ajout de TGF- $\beta$ 1 entraîne une diminution de moitié de l'activité mitochondriale ( $p < 0,05$ ). L'hypoxie n'a pas d'effet sur ce paramètre (Figure 23).

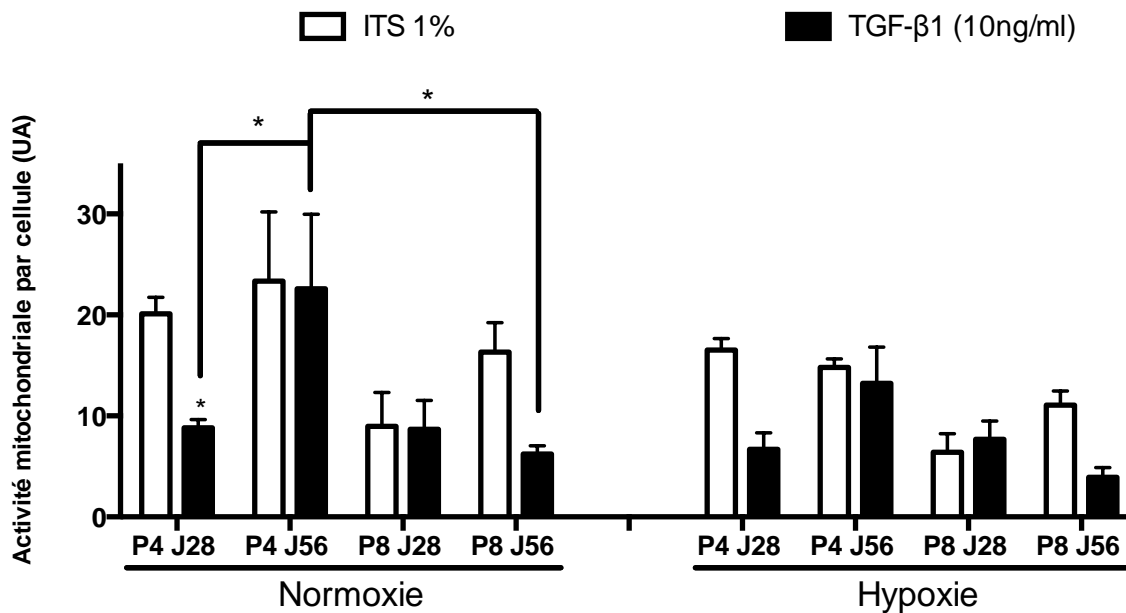
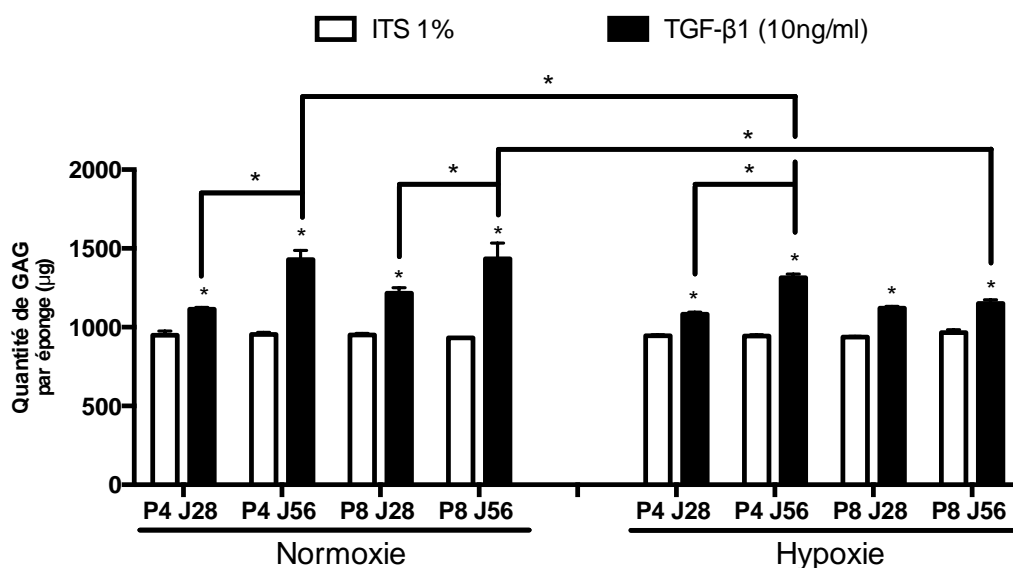


Figure 23. Activité mitochondriale par cellule dans les éponges de collagèneensemencées avec des chondrocytes dédifférenciés humains en fonction du passage (P4 et P8) après induction ou non de la redifférenciation par le TGF- $\beta$ 1 pendant 28 et 56 jours de culture 3D en condition normoxique ou hypoxique. La différenciation chondrogénique a été induite par addition de TGF- $\beta$ 1 à 10 ng/mL. La condition ITS 1% fait preuve de témoin. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \*:  $p < 0,05$ .

#### b) Dosage des GAGs

Tout comme pour les CSM et les CSSs, l'addition de TGF- $\beta$ 1 permet une synthèse plus abondante de glycosaminoglycannes au sein des éponges par les chondrocytes pour toutes les conditions testées ( $p < 0,05$ ). La quantité de GAGs produite est plus importante après 56 jours de culture en milieu chondrogénique à P4 et P8 en normoxie mais seulement à un passage plus précoce (P4) en hypoxie. Le temps d'expansion en monocouche (passage) n'a pas d'impact sur la production de GAGs par les cellules. Lorsque les chondrocytes sont soumis à l'action du TGF- $\beta$ 1 pendant un temps de culture prolongé (56 jours), l'hypoxie induit une légère diminution de la synthèse de GAGs (Figure 24).



**Figure 24.** *Quantité de GAGs synthétisés dans les éponges de collagèneensemencées avec des chondrocytes dédifférenciés humains en fonction du passage (P4 et P8) après induction ou non de la redifférenciation par le TGF-β1 pendant 28 et 56 jours de culture 3D en condition normoxique ou hypoxique. La différenciation chondrogénique a été induite par addition de TGF-β1 à 10 ng/mL. La condition ITS 1% fait preuve de témoin. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .*

### c) *Etude de l'expression des gènes d'intérêt du cartilage*

La présence de TGF-β1 dans le milieu de culture des éponges entraîne une augmentation, même faible, de l'expression de l'ensemble des gènes étudiés quelles que soient les conditions testées.

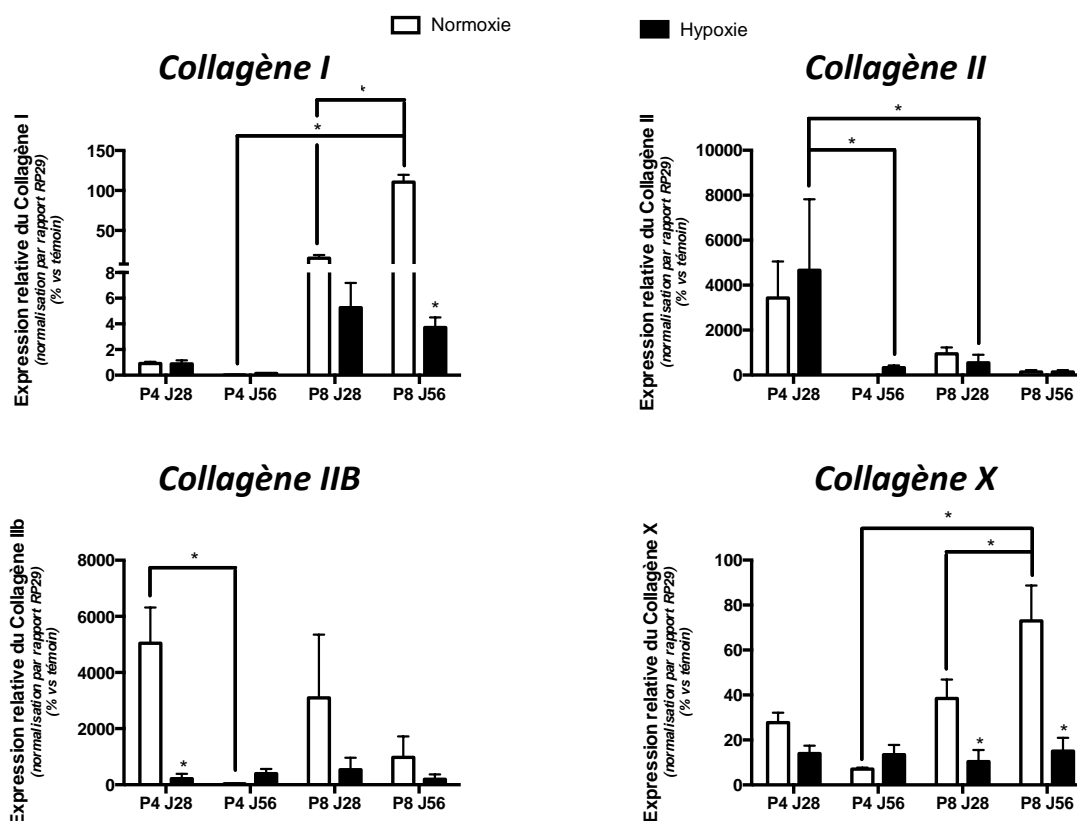
#### (1) Les collagènes

Le collagène II est fortement exprimé à un passage 4 pour un temps de culture de 28 jours. Au-delà de 28 jours de culture 3D, l'expression du collagène II est plus faible (P4 J56 normoxie : 568 fois inférieure et en hypoxie : 14 fois inférieure,  $p < 0,05$ ). Cette expression est également diminuée près de 4 fois en normoxie et d'environ 9 fois en hypoxie à passage tardif (P8 J28) par rapport à P4 J28 ( $p < 0,05$ ).

Les chondrocytes expriment davantage le collagène IIb à J28 en normoxie quel que soit le temps d'expansion préalable en monocouche. L'hypoxie inhibe l'expression des collagènes II et IIb pour presque toutes les conditions par comparaison avec la normoxie (*Figure 25*).

Les expressions des collagènes I et X sont plus élevées à passage tardif (P8) par rapport à P4 pour les deux temps d'induction chondrogénique (J28 et J56). De plus, une teneur en oxygène de 21% (normoxie) favorise l'expression de ces deux gènes à P8 ( $p < 0,05$ ).





**Figure 25 :** Expression génique des collagènes de type I, II, IIb et X dans les chondrocytes différenciés humains ensemencés dans les éponges de collagène en fonction du passage (P4 et P8) après induction de la redifférenciation par le TGF- $\beta$ 1 pendant 28 et 56 jours de culture 3D en condition normoxique et hypoxique. Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage RP29. L'expression des gènes dans les chondrocytes redifférenciés (TGF- $\beta$ 1) est rapportée à celle dans les chondrocytes cultivés en condition témoin non chondrogénique (ITS 1%). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \*:  $p < 0,05$ .

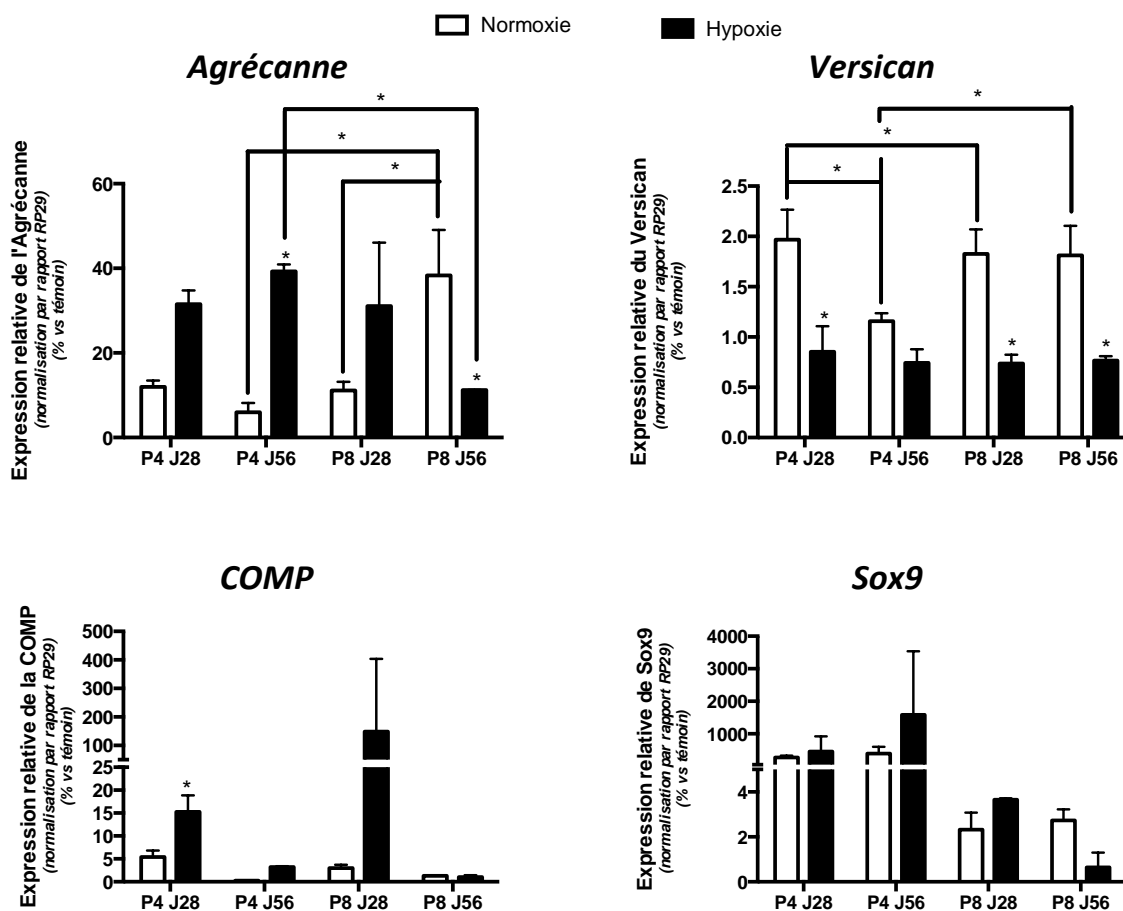
## (2) Protéoglycannes, facteur de transcription et protéine matricielle

De manière générale, l'agrécane est plus fortement exprimé en hypoxie à passage 4 pour les deux temps de culture (J28 et J56) mais significativement pour la condition P4 J56 par rapport la normoxie ( $p < 0,05$ ) (Figure 26).

L'hypoxie maintient l'expression du versican à un niveau de base plus faible que l'expression du gène en normoxie ( $p < 0,05$ ). Son taux d'expression demeure faible pour toutes les conditions (Figure 26).

Le taux d'ARNm de la COMP est plus important en hypoxie à J28 peu importe le passage auquel les chondrocytes ont été ensemencés dans l'éponge ( $p < 0,05$ ) (Figure 26).

L'absence de significativité pour l'expression de Sox9 ne permet pas de conclure à un quelconque effet des paramètres étudiés (passage, temps de culture 3D et teneur en oxygène) sur les chondrocytes (Figure 26).

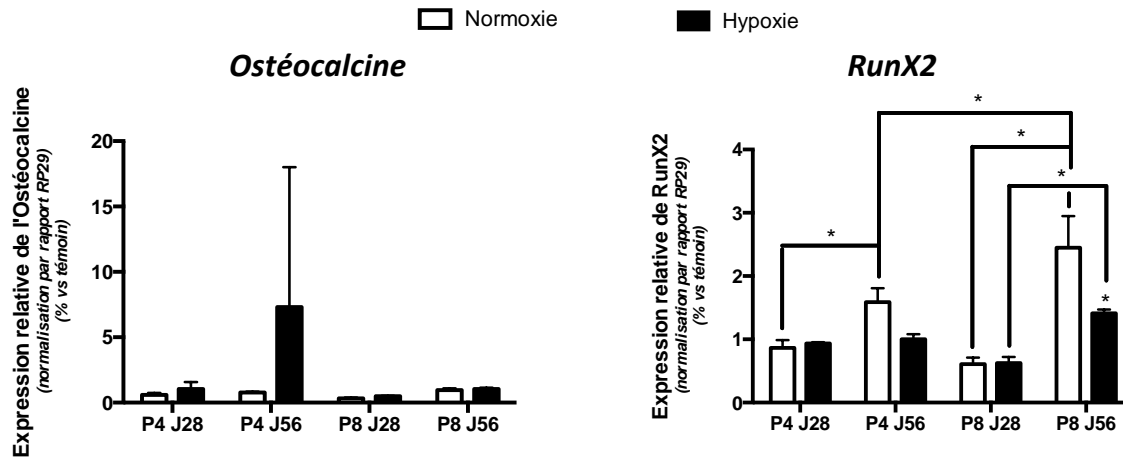


**Figure 26.** Expression génique de l'Agrécanne, du Versican, de la COMP et de Sox9 dans les chondrocytes dédifférenciés humains ensemencés dans les éponges de collagène en fonction du passage (P4 et P8) après induction de la redifférenciation par le TGF- $\beta$ 1 pendant 28 et 56 jours de culture 3D en condition normoxique et hypoxique. Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage RP29. L'expression des gènes dans les chondrocytes redifférenciés (TGF- $\beta$ 1) est rapportée à celle dans les chondrocytes cultivés en condition témoin non chondrogénique (ITS 1%). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

### (3) Les marqueurs ostéogéniques

L'ostéocalcine est exprimée à des taux faibles quelles que soient les conditions étudiées et aucune différence significative n'est observée entre les passages, les temps de culture ou les teneurs en oxygène (Figure 27).

Un temps d'induction prolongé (J56) induit une augmentation de l'expression de RunX2 en normoxie pour les deux passages (P4 et P8), et l'expression est d'autant plus importante à P8 J56 ( $p < 0,05$ ). En revanche, en hypoxie, l'expression de RunX2 reste relativement constante quel que soit le passage ou le temps de culture (Figure 27).



**Figure 27. Expression génique des marqueurs ostéogéniques : Ostéocalcine et RunX2 dans les chondrocytes différenciés humains ensemencés dans les éponges de collagène en fonction du passage (P4 et P8) après induction de la redifférenciation par le TGF- $\beta$ 1 pendant 28 et 56 jours de culture 3D en condition normoxique et hypoxique.** Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage RP29. L'expression des gènes dans les chondrocytes redifférenciés (TGF- $\beta$ 1) est rapportée à celle des chondrocytes cultivés en condition témoin non chondrogénique (ITS 1%). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

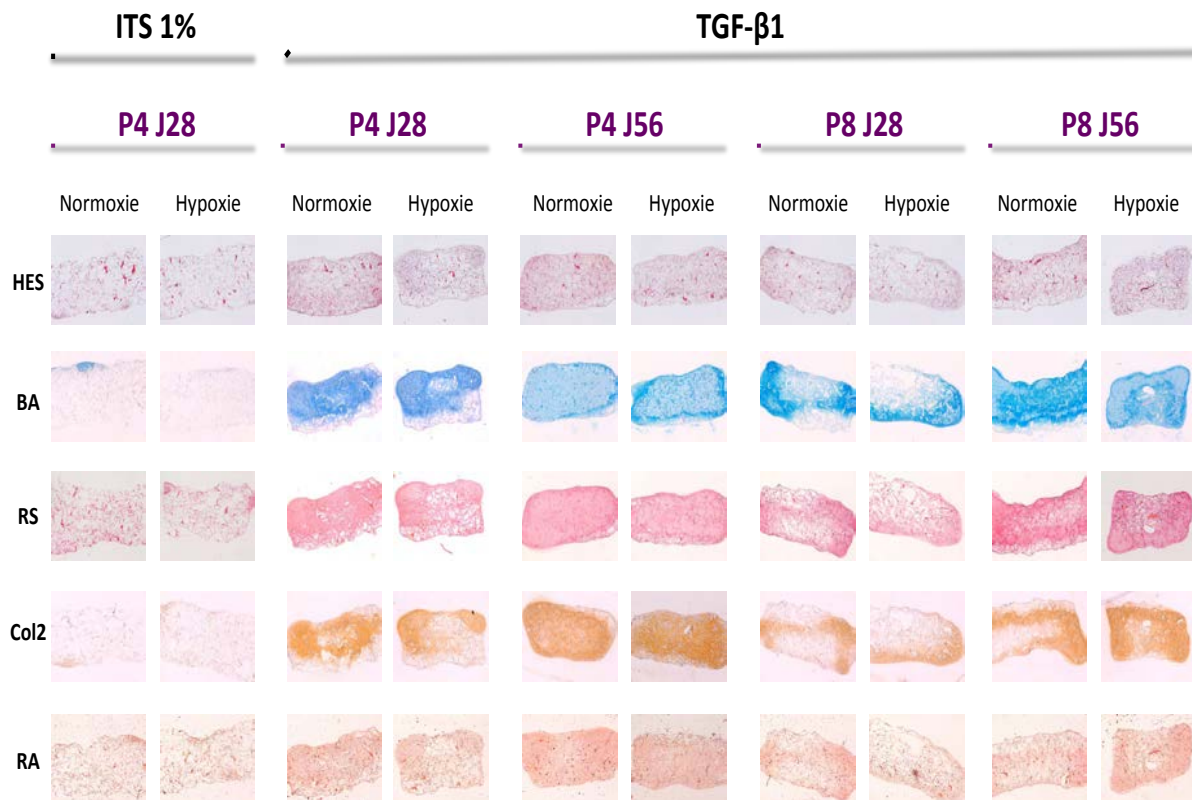
#### d) Evaluation de la qualité de la synthèse matricielle

Seule la condition P4 J28 est présentée pour les éponges témoins (ITS 1%), ces dernières présentant une synthèse matricielle similaire pour toutes les conditions étudiées.

Les éponges cultivées en milieu chondrogénique à passage précoce (P4) présentent une synthèse matricielle plus abondante et plus homogène riche en protéoglycannes (Figure 28 : BA) et en collagène de type II (Figure 28 : Col2) particulièrement à P4 J56. Pour ce passage, une teneur en oxygène de 21% (normoxie) est légèrement plus favorable à la synthèse de collagène II.

L'expansion des chondrocytes à un passage plus tardif produit une matrice de moindre qualité. En effet, les synthèses de protéoglycannes et de collagènes notamment de type II semblent affectées puisque la production de ces composants se limite à la périphérie de l'éponge à P8, à J28 en normoxie et hypoxie. La synthèse de collagène II est restreinte également au niveau des bords du biomatériau à P8, à J56 en normoxie. En condition hypoxique, un temps de culture plus long (P8 J56) permet de restaurer la production de protéoglycannes et induit un regain du contenu en collagène II (Figure 28 : BA et Col2).

La coloration en rouge alizarine met en évidence la présence de quelques calcifications dispersées au sein de l'éponge en condition hypoxique quel que soit le passage ou le temps de culture 3D (Figure 28 : RA).



**Figure 28.** Analyses histologiques (Hématoxyline-Erythrosine-Safran (HES), Bleu Alcian (BA), Rouge Sirius (RS), Rouge Alizarine (RA)) et immunohistochimiques (collagène II (Col2)) sur des éponges contenant des chondrocytes dédifférenciés humains à différents passages (P4 et P8) après induction ou non de la redifférenciation par le TGF- $\beta$ 1 pendant 28 et 56 jours de culture 3D en condition normoxique et hypoxique. A P4, les chondrocytes redifférenciés produisent une matrice riche en protéoglycannes (BA) et en collagènes (RS) en particulier en collagène II (Col2). A P8, les chondrocytes synthétisent moins de protéoglycannes et de collagène II. Quelques calcifications sont observées en condition chondrogénique (TGF- $\beta$ 1) en hypoxie pour toutes les conditions.

#### 4. Discussion

Le cartilage articulaire présente des capacités de réparation limitées et le traitement des lésions s'avère nécessaire pour restaurer les fonctions de l'articulation. L'ingénierie tissulaire fait partie des traitements potentiels des lésions cartilagineuses. Cependant, la limite principale d'une telle technique est la faible quantité de chondrocytes autologues obtenus. Afin d'accroître le nombre de chondrocytes, les cellules peuvent être multipliées par une culture en monocouche mais cette étape conduit à un phénomène connu de dédifférenciation cellulaire. Les chondrocytes perdent leur forme arrondie, deviennent fibroblastiques et la production de collagène de type I se fait aux dépens du collagène II [330]. Les chondrocytes se dédifférencient rapidement en monocouche. En général, entre un passage 1 et 4, ils perdent partiellement leur potentialité de redifférenciation et sont incapables de réexprimer un phénotype chondrocytaire en moyenne à partir d'un passage 5 [331, 332].

La redifférenciation peut être induite par une culture tridimensionnelle seule des cellules dédifférenciées par un nombre de passages élevés ou par l'association de cette culture 3D avec l'addition de facteurs de croissance. Les membres de la famille du TGF- $\beta$  sont impliqués dans le maintien du phénotype chondrocytaire ainsi que dans la redifférenciation des chondrocytes dédifférenciés [333, 334].

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence que les chondrocytes dédifférenciés dont la redifférenciation a été induite par le TGF- $\beta$ 1 s'adaptent bien aux biomatériaux puisque la viabilité cellulaire n'était pas altérée.

Nous nous sommes intéressés également à l'expression des gènes d'intérêt du cartilage. L'association de la culture tridimensionnelle en éponge de collagène et de l'addition de TGF- $\beta$ 1 permet une redifférenciation partielle et variable des chondrocytes dédifférenciés par 4 ou 8 passages. L'expression des gènes spécifiques du cartilage hyalin (collagène II, IIb, agrécanne, COMP et Sox9) est augmentée en 3D avec ajout de TGF- $\beta$ 1 pour toutes les conditions testées et particulièrement à passage 4. Plusieurs études avaient déjà mis en évidence l'effet bénéfique de la culture 3D [335, 336], de l'addition de facteur de croissance [337, 338] et l'association de ces deux paramètres [76, 339, 340, 341, 342] sur l'expression des gènes du collagène II et de l'agrécanne particulièrement. Parallèlement, à P4, l'expression du collagène X (marqueur hypertrophique), du collagène I et de RunX2 (marqueurs osseux) est diminuée voire presque nulle dans le cas du collagène I.

Dans notre étude, à passage 4, une restriction en oxygène influence positivement la transcription de l'agrécanne et de la COMP, permet la réduction de l'expression du versican mais n'a pas d'effet sur les autres gènes étudiés par rapport à la condition normoxique. Plusieurs auteurs ont démontré qu'un environnement hypoxique favorisait l'expression du collagène II, de l'agrécanne [197, 343, 344, 345] et de Sox9 [346] par des chondrocytes sains ou arthrosiques tout en limitant l'expression du collagène X, du versican (fibrocartilage) et des marqueurs ostéogéniques (collagène I, ostéocalcine, RunX2). Il a également été démontré que les cellules placées en condition hypoxique dès la phase d'expansion en monocouche et ensuite durant la phase de différenciation en 3D produisaient une matrice cartilagineuse plus dense et en quantité plus importante que les cellules cultivées en normoxie durant l'expansion et la différenciation ou cultivées consécutivement en normoxie puis hypoxie ou inversement [347, 348].

A un passage plus tardif (P8), nous avons montré que les gènes caractéristiques du cartilage étaient réprimés (collagène II, agrécanne, COMP) alors que les collagènes I et X étaient surexprimés particulièrement en normoxie. Nos résultats démontrent également que les chondrocytes redifférenciés après 4 passages et 28 jours de culture en 3D sécrètent une matrice riche en protéoglycannes et en collagènes notamment de type II. Cette matrice apparaît plus homogène et plus dense en protéoglycannes après 56 jours de culture en condition chondrogénique. A P4, la production de collagène II est légèrement plus faible en hypoxie quel que soit le temps de culture en milieu chondrogénique. A passage plus tardif (P8), les synthèses de protéoglycannes et de collagène II sont majoritairement localisées à la périphérie de l'éponge.

Plusieurs études ont montré que les chondrocytes cultivés en présence d'une isoforme du TGF- $\beta$  en pellets ou dans des biomatériaux à base de collagène ou d'alginate pouvaient produire une matrice riche en collagène II et en protéoglycannes après des périodes d'expansion comprises entre P1 et P3 [339, 349, 350]. Markway a observé une accumulation de protéoglycannes, en condition hypoxique, dans la matrice synthétisée par des chondrocytes humains sains et arthrosiques cultivés en pellets en présence de TGF- $\beta$ 1 [345]. Babur a également mis en évidence une synthèse matricielle plus riche en protéoglycannes et en collagène II et plus pauvre en collagène I et X dans un milieu appauvri en oxygène par comparaison avec la normoxie pour des chondrocytes dédifférenciés par 3 passages en monocouche [101].

En s'appuyant sur ces résultats répertoriés dans la littérature, l'hypoxie semble être un facteur primordial favorisant le processus de redifférenciation des chondrocytes via la régulation de facteurs de transcription de la famille HIF (Hypoxia Inducible Factor) : HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  impliqués dans l'inhibition de l'expression des gènes du collagène I et X [197, 346, 345]. Cependant, nos observations diffèrent partiellement de celles retrouvées dans la littérature. La diversité des résultats répertoriés s'explique par la disparité d'origine des chondrocytes (humaine, porcine, rongeurs, lagomorphes,...), l'origine du prélèvement des cellules (articulaire, nasal), du cocktail de facteurs de croissance utilisés (TGF- $\beta$ , BMP,...), du type de culture 3D (pellets, biomatériau de nature différente), du passage auquel les chondrocytes sont employés ou encore de temps de culture en condition chondrogénique. La majorité des travaux a été menée sur des pellets et des biomatériaux à base d'alginate avec des chondrocytes utilisés à des passages inférieurs à P5. Contrairement à notre travail, en 2005, Mukaida concluait qu'une éponge collagénique ne constituait pas un environnement adapté à la redifférenciation des chondrocytes car ils exprimaient faiblement le collagène II et Sox9 et fortement le collagène X [351].

Deux biomatériaux différents ensemencés avec les mêmes chondrocytes peuvent conduire à des résultats divergents [352]. Yang et coll ont utilisé des hydrogels de densités de charges différentes pour l'induction de la redifférenciation de chondrocytes articulaires humains ; ils ont démontré que le potentiel de redifférenciation des cellules différait en fonction des propriétés du biomatériau [336]. Caron a comparé les capacités de redifférenciation de chondrocytes humains cultivés en pellet et en gel d'alginate. Les pellets sécrètent davantage de collagène de type II que les chondrocytes ensemencés dans l'alginate. En revanche, ces derniers synthétisent plus de collagène I [342]. La nature du système 3D employé a donc une influence sur la redifférenciation des chondrocytes dédifférenciés.

---

## 5. Conclusions

Les chondrocytes, uniques cellules du cartilage, sont hautement différenciées. Cependant, elles perdent rapidement leur phénotype dès les premiers passages (P1-P2) lors de leur culture en monocouche rendant leur utilisation en ingénierie du cartilage plus complexe. Les chondrocytes dédifférenciés en monocouche sont capables de se redifférencier lorsqu'ils sont placés dans un environnement 3D et/ou en présence de facteurs de croissance pro-chondrogénique. Les chondrocytes retrouvent leur capacité de synthèse d'une matrice de type cartilagineux après 4 passages en monocouche puis un temps de culture de 28 jours en 3D en présence de TGF- $\beta$ 1. Ils conservent ses capacités après un nombre de passage tardif (P8) mais en de moindre proportion puisque les synthèses de protéoglycannes et de collagène II sont plus faibles. La mise au point des conditions d'expansion et de différenciation s'avère nécessaire pour obtenir un implant fonctionnalisé de qualité à partir de chondrocytes.

D'autres mises au point des conditions de culture des chondrocytes seraient utiles pour synthétiser une matrice plus homogène au sein de l'éponge. Tout comme pour les autres types cellulaires, il est important de vérifier que les cellules ne deviennent pas des chondrocytes hypertrophiques et ne dérivent pas par la suite vers un phénotype osseux. Paradoxalement, nous mettons en évidence la présence de quelques dépôts calciques en condition hypoxique quel que soit le passage ou le temps de culture en 3D utilisé alors que les chondrocytes sont originellement dans un environnement hypoxique au sein du cartilage articulaire. Cependant, les calcifications observées sont peu nombreuses dans les différentes conditions de culture étudiées.

## C. MARQUAGE DES CSM ET DIFFERENCIATION CHONDROGENIQUE : SUIVI IRM

En ingénierie du cartilage, l'objectif est de produire un implant fonctionnalisé transplantable en site lésionnel et capable de constituer un support pour la synthèse d'un nouveau tissu dont les caractéristiques se rapprochent au mieux de celles du tissu natif: le cartilage. Le suivi post-implantatoire du biomatériau fonctionnalisé et plus précisément le devenir des cellules synthétisant la néo-matrice cartilagineuse de manière non invasive est un défi d'actualité. Dans ce but, les cellules peuvent être marquées par des agents de contraste permettant la détection des cellules *in vivo*. Cependant leur impact sur la capacité de différenciation chondrogénique des cellules doit être étudié.

L'imagerie par résonance magnétique ou IRM s'avère une technique prometteuse à la fois pour l'évaluation de la bio-fonctionnalité et de la bio-intégration du biomatériau mais également pour le suivi des cellules par l'utilisation d'agents de contraste telles que les particules d'oxyde de fer. Dans cette étude, nous avons déterminé, par Imagerie par Résonance Magnétique, les concentrations de SPIOs qui pourraient être utilisées dans le cadre d'un suivi post-implantatoire de notre biomatériau fonctionnalisé et avons évalué la qualité de néosynthèse matricielle réalisée au sein d'un biomatériau colonisé par des cellules souches mésenchymateuses, dont la différenciation chondrogénique a été induite par l'addition de TGF- $\beta$ 1 et marquées ou non par SPIOs.

### 1. Objectifs

Dans ce travail, notre **premier objectif** était de s'assurer, dans un premier temps, que l'internalisation des SPIOs par des CSM ostéomédullaires humaines n'avait pas d'effet cytotoxique et, dans un second temps, de déterminer *in vitro* l'influence du marquage des CSM par les SPIOs sur la différenciation chondrogénique.

Notre **second objectif** était de vérifier, par IRM clinique (3T) et à haut champ (7T), la persistance du marquage des CSM, *in vitro*, par des particules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIOs) après 28 jours de culture afin de déterminer une ou plusieurs concentrations de SPIOs permettant un marquage persistant des cellules souches mésenchymateuses au sein de nos éponges, et une détection de ces particules sans affecter la différenciation chondrogénique des CSM marquées.

### 2. Matériels et Méthodes

#### a) *Etude de la toxicité des SPIOs sur les CSM en monocouche*

##### (1) Isolation et expansion des CSM ostéomédullaires

Les CSM sont isolées selon le protocole décrit précédemment dans les parties : **IV. Résultats - A. CSM et chondrogenèse: rôles du site, de l'expansion et de** - **3. Matériels et Méthodes - a) Isolation et expansion des cellules - (1) Isolation des CSM de la moelle osseuse.**

## (2) Marquage des CSM par les SPIOs et mise en culture

Le milieu est changé deux à trois fois par semaine. Le milieu de culture utilisé pour l'expansion en monocouche des CSM de passage 0 à 2 en normoxie est un milieu DMEM à 1 g/l de glucose (Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de Glutamine, 100 µg/mL de Streptomycine et 100 U/mL de Pénicilline et 1 ng/mL de bFGF (R&D, France).

Lors du dernier passage P3, avant l'ensemencement en éponges, les cellules sont cultivées avec notre milieu de pré-orientation chondrogénique : DMEM 4,5g/L de glucose (Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de Glutamine, 100 µg/mL de Streptomycine et 100 U/mL de Pénicilline, du pyruvate (110 µg/mL), de la proline (40 µg/mL), du L-acide-ascorbique-2-Phosphate (50 µg/mL), de la dexaméthasone (100 nM) et 1 ng/mL de bFGF (Miltenyi, France). Les milieux sont changés deux à trois fois par semaine.

## (3) Expansion cellulaire

Lorsque les cellules arrivent à environ 80% de confluence, elles sont amplifiées selon le protocole suivant : Après un lavage au PBS, 2 mL de trypsine-EDTA (0,05%, 1X, Gibco, France) sont ajoutés dans la flasque, alors placées pendant 5 à 10 min à 37°C. L'action de la trypsine est ensuite neutralisée par 2 volumes de milieu complet. La suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée à 1400 tours/min pendant 5 min. Le culot est ensuite repris dans du milieu complet. Un comptage en cellule de Malassez est réalisé afin de déterminer le nombre de cellules et de les répartir de façon homogène. Les cellules sont à nouveauensemencées à raison de 500 000 cellules/flasque de 75 cm<sup>2</sup>.

## (4) Marquage des CSM par les SPIOs

Durant le dernier passage (P3, étape de pré-orientation chondrogénique) avant leur ensemencement en biomatériau, les CSM sont marquées ou non pendant 24 heures avec des SPIOs commercialisées sous le nom d'Endorem® (Guerbet, France). Elles se présentent sous la forme d'un noyau d'oxyde de fer enrobé de dextran dont la taille est comprise entre 120 et 180 nm et dont la concentration en fer est de l'ordre de 11,2 µg/mL. Les CSM vont les internaliser par endocytose et l'ajout d'un agent de transfection, la poly-L-lysine (3,75 µL/mL ; Sigma, France) facilite cette internalisation.

Différentes concentrations en fer sont testées : 0 - 12,5 - 25 - 50 - 100 - 200 - 400 - 800 et 1600 µg de fer/mL de milieu de culture. Chaque lot cellulaire est ensuite ensemencé en monocouche:

- En plaque 96 puits : pour le suivi de l'activité mitochondriale (à raison de 2000 cellules/puits),
- En plaque 24 puits (10 000 cellules/puits) : pour le suivi de l'activité LDH et pour la visualisation des particules de Fer en cytologie,
- En plaque 12 puits : pour déterminer la quantité de NO et de PGE<sub>2</sub> dans le surnageant (à raison 20 000 cellules/puits).

## (5) Dosage de l'activité LDH

Cette technique permet de mesurer l'intégrité membranaire : les cellules dont la membrane a été rompue libèrent leur contenu cytosolique, et notamment la Lactate Déshydrogénase (LDH), dans le milieu extracellulaire. La quantité de LDH relarguée dans le milieu de culture est proportionnelle à la mort cellulaire. La mesure de l'activité LDH est effectuée par un dosage enzymatique colorimétrique à l'aide du kit Cytotoxicity Detection Kit



(Roche, France). Les résultats sont exprimés en pourcentage de toxicité par rapport au témoin positif. Le protocole détaillé se trouve en Annexes.

(6) Dosage des nitrites

La production de nitrites a été évaluée par la méthode de Griess- Saltzman [353, 354] dans les surnageants de culture. Le protocole détaillé se trouve en Annexes.

(7) Dosage des PGE<sub>2</sub>

La concentration en PGE<sub>2</sub> a été mesurée dans les surnageants de culture par une méthode de type ELISA par compétition (Parameter<sup>TM</sup>, R&D systems, France). Il s'agit d'une technique faisant appel à la compétition entre la PGE<sub>2</sub> à doser et une PGE<sub>2</sub> marquée par la peroxydase de Raifort, vis-à-vis d'un anticorps monoclonal murin (anti-PGE<sub>2</sub>) immobilisé sur les parois des puits de la microplaque. Le protocole détaillé se trouve en Annexes.

(8) Cytologie

Les CSM exposées ou non à des concentrations de SPIOs croissantes (0 – 12,5 – 25 – 50 – 100 – 200 – 400 – 800 – 1600 µg de Fe/mL) cultivées sur des lamelles en plaque 24 puits sont fixées avec du PFA 4% pendant 15 min puis colorées à l'aide d'une coloration en bleu de prusse ou coloration de Perls mettant en évidence les complexes insolubles contenant du fer puis contre-colorées à l'Hématoxyline.

(9) Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (SEM). Un test ANOVA à 2 facteurs est utilisé pour déterminer la significativité entre les différentes conditions, suivi d'un test *a posteriori* de Bonferroni pour réaliser des comparaisons multiples au sein des groupes. Ces analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad (GraphPad Prism 4.0c Software MacKiev © GraphPad Software, Inc.). Une différence statistique significative est déterminée par une valeur \* :  $p < 0,05$ .

L'ensemble des analyses a été mené en triplicat (pour le dosage de la LDH, des nitrites et des PGE<sub>2</sub>) et en quintuplat (cytologie) sur au minimum 2 patients.

*b) Influence des SPIOs sur la différenciation chondrogénique des CSM en 3D*

(1) Isolation et expansion des CSM ostéomédullaires

Les CSM sont isolées et cultivées selon le protocole décrit dans la partie précédente :  
*a) Etude de la toxicité des SPIOs sur les CSM en monocouche - (I) Isolation et expansion des CSM ostéomédullaires*

(2) Marquages des CSM par les SPIOs

Durant le dernier passage (P3, étape de pré-orientation chondrogénique) avant leur ensemencement en biomatériau, les CSM sont marquées ou non pendant 24 heures avec des SPIOs commercialisées sous le nom d'Endorem® (Guerbet, France). Elles se présentent sous la forme d'un noyau d'oxyde de fer enrobé de dextran dont la taille est comprise entre 120 et 180 nm et dont la concentration en fer est de l'ordre de 11,2 µg/mL. Les CSM vont les

internaliser par endocytose et l'ajout d'un agent de transfection, la poly-L-lysine (3,75 µL/mL ; Sigma, France) a permis de faciliter cette internalisation.

Différentes concentrations en fer sont testées : 0 - 12,5 - 25 - 50 - 100 et 200 µg de fer/mL de milieu de culture. Chaque lot cellulaire est ensuiteensemencé dans les éponges de collagène.

### (3) Ensemencement des biomatériaux avec les CSM marquées ou non par les SPIOs

Les biomatériaux utilisés sont des éponges de collagène de type I et III (95 % de type I) fabriquées par la société Symatèse Biomatériaux (Chaponost, France). Elles sont de forme cylindrique et mesurent environ 5 mm de diamètre sur 2 mm d'épaisseur.

Après 3 passages (P3), les CSM sontensemencées par réhydratation de l'éponge avec 50 µL de suspension cellulaire à raison de 500 000 cellules par éponge. Le milieu de culture utilisé est un milieu DMEM 4,5 g/L de glucose (41965, Invitrogen) supplémenté en SVF 10%, pyruvate (110 µg/mL), proline (40 µg/mL), L-acide ascorbique-2-Phosphate (50 µg/mL), dexaméthasone (100 nM) supplémenté en Pénicilline/Streptomycine.

### (4) Milieux de culture testés

Après 1 jour d'adaptation au biomatériau, 2 conditions sont testées sur les éponges :

- **ITS 1%** (ITS + premix, BD, France)
- **ITS 1% + TGF-β1** (10ng/mL, Miltenyi, France).

### (5) Entretien des cultures

Les milieux de culture doivent être changés trois fois par semaine puisqu'ils s'appauvrissent et perdent leurs qualités nutritives. La première semaine, les éponges sont changées de plaque afin d'éviter la création d'une monocouche au fond des puits due à la fuite cellulaire importante pendant cette période. Après 28 jours de culture, les éponges ont été recueillies afin de procéder à l'évaluation des paramètres de viabilité (MTT, Hoechst), de l'expression de gènes (RT-PCRq) et de la qualité matricielle (histologie, immunohistochimie) par les différents tests décrits dans les sections suivantes.

### (6) Activité mitochondriale

L'activité mitochondriale des CSM a été déterminée après 28 jours de culture 3D en normoxie sur les éponges contenant des CSMensemencées à P4 marquées ou non par les SPIOs à l'aide d'un test colorimétrique MTT dont le protocole est décrit dans la partie Annexes.

### (7) Dosage de l'ADN

Le dosage de l'ADN après 28 jours de culture 3D en normoxie sur les éponges contenant des CSMensemencés à P4 marquées ou non par les SPIOs à l'aide du réactif de Hoechst permettant de normaliser les résultats de l'activité mitochondriale est détaillé en Annexes.

#### (8) Extraction des ARN totaux

Le principe d'extraction des ARN totaux des éponges est décrit dans la partie Annexes. Les ARN ont été extraits après 28 jours de culture 3D en normoxie sur les éponges contenant des CSMensemencées à P4 marquées ou non par les SPIOs.

#### (9) Reverse Transcriptase (RT)

L'obtention des ADNc par transcription inverse est détaillée en Annexes.

#### (10) PCRq

L'analyse de l'expression des gènes par RT-PCRq repose sur le principe décrit dans la partie Annexes. Les gènes étudiés dans notre étude sont les gènes codant pour :

- Des *collagènes* : type I, type II total, de type IIB, et de type X
- Des *protéoglycannes* : Agrécanne, Versican
- Un *facteur de transcription* : Sox 9
- Une *protéine matricielle* : COMP
- Des *marqueurs de différenciation osseuse* : Ostéocalcine, Phosphatase Alcaline
- Une protéine de référence : RP 29

Les amorces utilisées sont répertoriées en Annexes.

#### (11) Dosage des GAGs

Le dosage des GAGs est effectué après 28 jours de culture 3D en normoxie sur les surnageants de digestion des éponges contenant des CSMensemencées à P4 marquées ou non par les SPIOs selon le test colorimétrique reposant sur la méthode de Goldberg. Le protocole est retrouvé en Annexes.

#### (12) Histologie

Après 28 jours de culture 3D en normoxie, la synthèse matricielle dans les éponges contenant des CSMensemencées à P4 marquées ou non par les SPIOs est évaluée à l'aide de colorations histologiques selon le protocole décrit en Annexes. Les différentes colorations réalisées sont les suivantes :

- **Hématoxyline-Erythrosine-Safran (HES)** : Coloration trichromique utilisée pour étudier la morphologie et l'aspect des cellules.
- **Bleu Alcian (BA)** : Il colore en bleu les mucopolysaccharides acides.
- **Rouge Sirius (RS)** : Cette coloration met en évidence le contenu en collagène.
- **Perls (bleu de Prusse)** : Mise en évidence des complexes insolubles contenant du fer.

#### (13) Immunohistochimie

La détection du collagène de type I et du collagène de type II a été réalisée par un anticorps primaire anti-collagène I (Interchim, lapin) et II (Labvision, souris) au sein de la matrice synthétisée après 28 jours de culture 3D en normoxie dans les éponges contenant des CSMensemencées à P4 marquées ou non par les SPIOs est réalisée par immunohistochimie selon le protocole décrit en Annexes.

## (14) Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (SEM). Un test ANOVA, à 2 facteurs est utilisé pour déterminer la significativité entre les différentes conditions, suivi d'un test *a posteriori* de Bonferroni pour réaliser des comparaisons multiples au sein des groupes. Ces analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad (GraphPad Prism 4.0c Software MacKiev© GraphPad Software, Inc.). Une différence statistique significative est déterminée par une valeur \* :  $p < 0,05$ .

L'ensemble des analyses a été mené en triplicat (pour les analyses MTT, Hoechst, biologie moléculaire) et en quintuplat (histologie et immunohistologie) sur au minimum 2 patients.

---

### **3. Résultats**

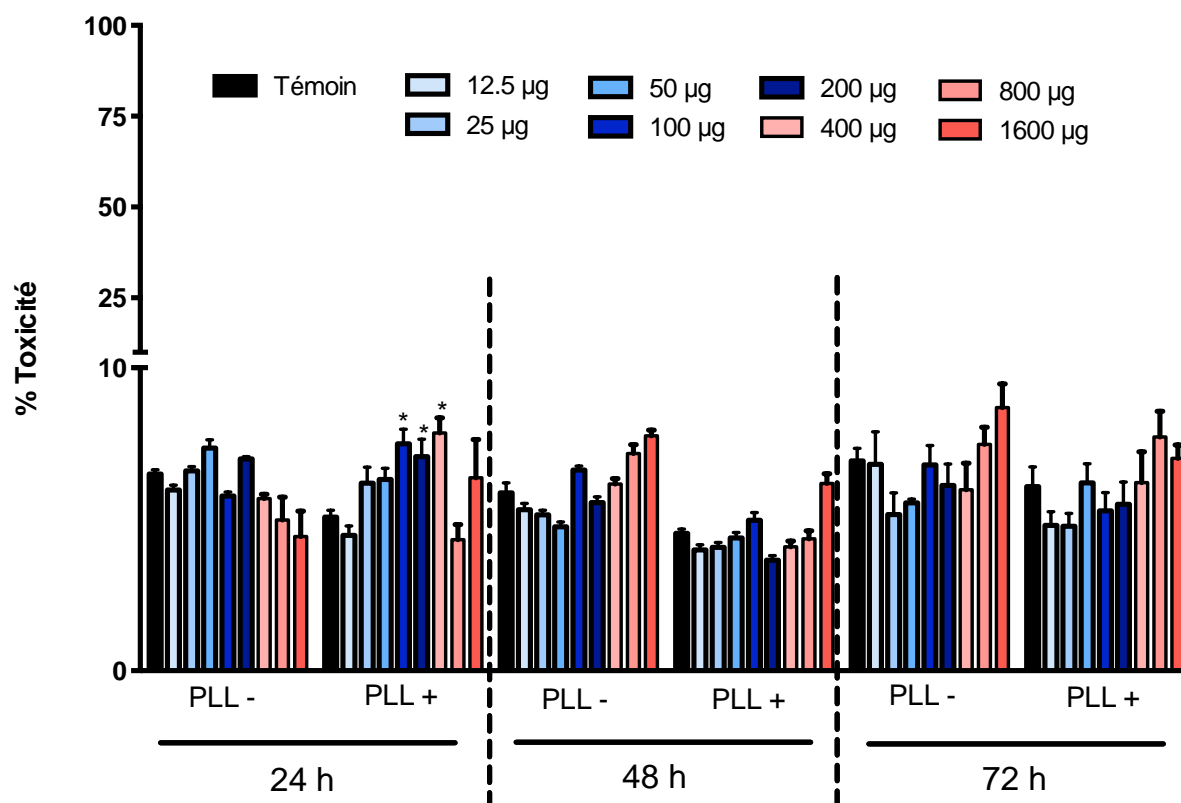
#### *a) Etude de la toxicité des SPIOs sur les CSM en monocouche*

##### (1) Activité de la lactate déshydrogénase (LDH)

L'activité de la LDH a été évaluée par un test colorimétrique réalisé sur le surnageant de culture à 0, 24, 48 et 72 heures après le début du traitement par les différentes doses d'Endorem® testées.

Aucune variation de l'activité LDH n'est observée lorsque les CSM en monocouche sont traitées avec la poly-L-lysine seule (Figure 29). Après 24h d'exposition aux différentes concentrations d'Endorem®, nous notons une augmentation significative du pourcentage de toxicité de 1,5 fois, 1,4 fois et 1,5 fois respectivement pour les doses de 100 ( $p < 0,05$ ), 200 ( $p < 0,05$ ) et 400  $\mu\text{g Fe/mL}$  ( $p < 0,05$ ) avec PLL en comparaison avec le témoin sans marquage.

A 48h et 72h, avec ajout ou non de PLL dans le milieu de culture à T0, aucune variation significative de l'activité lactate déshydrogénase n'est démontrée entre les différentes concentrations de SPIO testées. A 24h cependant, la toxicité observée n'excède pas les 10% indépendamment de l'addition de PLL quelle que soit la concentration de SPIO (0 à 1600  $\mu\text{g Fe/mL}$ ) à laquelle les cellules ont été exposées (Figure 29).



**Figure 29.** Test de cytotoxicité par mesure du taux de lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant de culture de CSM ostéomédullaires humaines en monocouche à 24, 48 et 72 heures après exposition aux différentes concentrations de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200-400-800-1600 µg Fe/mL) en présence ou non de PLL. Les résultats sont présentés en pourcentage de toxicité (moyenne  $\pm$  écart-type). Le pourcentage de toxicité reste inférieur à 10% quelle que soit la concentration de SPIOs. L'addition de PLL (Poly-L-Lysine), afin d'améliorer l'internalisation des SPIOs par les cellules, n'affecte pas l'activité LDH. Analyses statistiques ANOVA à 2 facteurs suivies d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

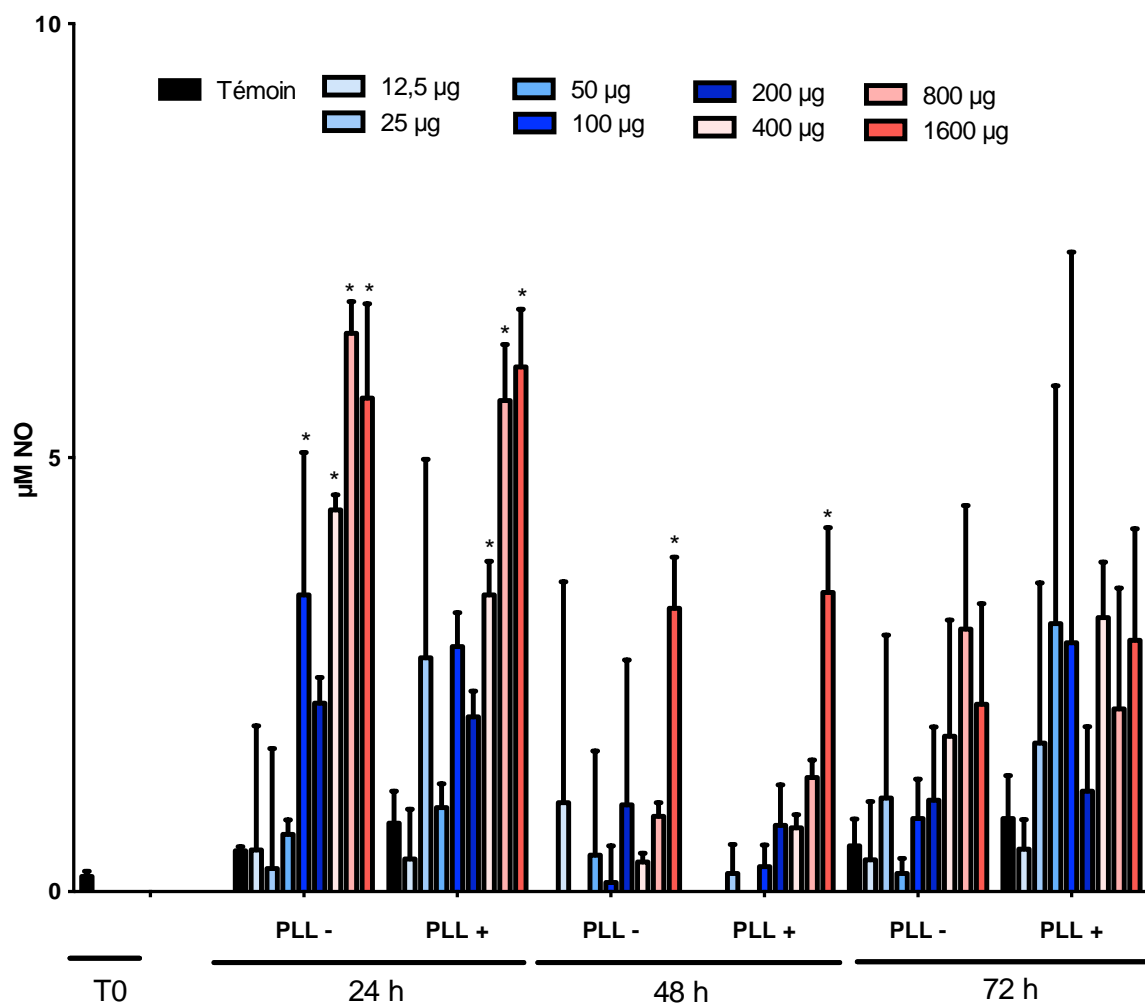
## (2) Dosage des nitrites

Pour les plus fortes concentrations d'Endorem®, la production de nitrites augmente de manière significative de 7,3 fois pour 100 µg/mL ( $p < 0,05$ ), 9,3 fois pour 400 µg/mL ( $p < 0,05$ ), de 13,7 fois pour 800 µg/mL ( $p < 0,05$ ) et de 12,1 fois pour 1600 µg/mL ( $p < 0,05$ ), 24 heures après exposition aux SPIOs sans ajout de PLL.

En présence de PLL, après 24h, la production de nitrite est plus élevée de 4,3 fois à 400 µg/mL, de 7,2 fois à 800 µg/mL et de 7,7 fois à 1600 µg/mL.

A 48 heures, seule la hausse de nitrites (supérieure à 3 fois) pour la dose de 1600 µg Fe/mL est restée significative ( $p < 0,05$ ) en présence ou non de PLL.

A 72 heures, aucune augmentation de la production de nitrites n'est observée quelle que soit la dose de SPIOs (**Figure 30**).

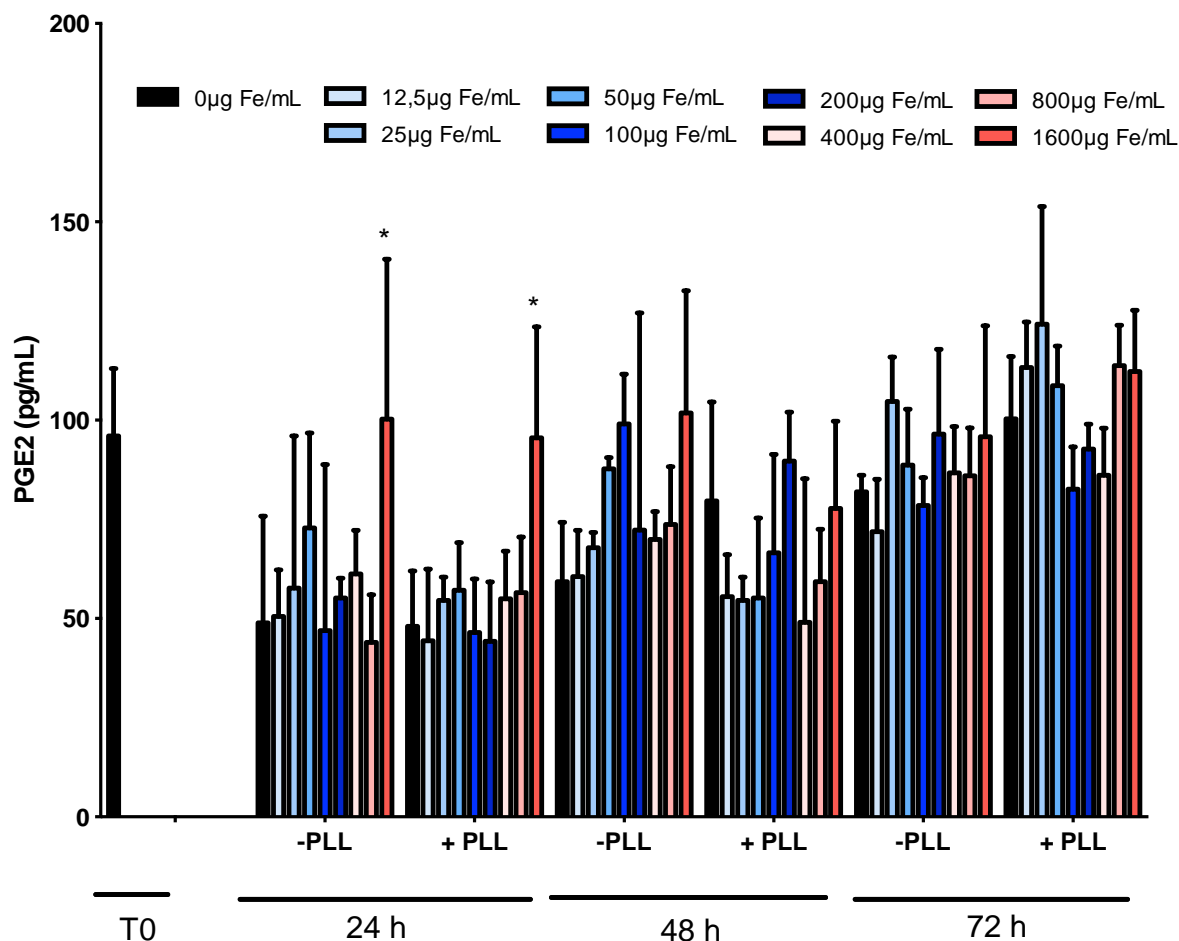


**Figure 30.** Dosage des nitrites dans le surnageant de culture de CSM ostéomédullaires humaines en monocouche à 24, 48 et 72 heures après exposition aux différentes concentrations de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200-400-800-1600 µg Fe/mL) en présence ou non de PLL. Les résultats (moyenne ± écart-type) montrent que la production de nitrites par les CSM est significativement augmentée essentiellement aux fortes doses de SPIOs à 24 heures. A 48 heures, cette hausse persiste significativement à la plus forte dose par contre à 72 heures cette production n'est plus significative. La concentration de nitrites dans nos surnageants est largement inférieure à la production de nitrites obtenue en condition pro-inflammatoire. Analyses statistiques ANOVA à 2 facteurs suivies d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

### (3) Dosage des prostaglandines E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)

La quantité de prostaglandines E<sub>2</sub> produites par les CSM non marquées ne varie pas significativement au cours de temps. Après 24h d'exposition à une concentration de 1600 µg Fe/mL, en présence ou non de PLL, les CSM produisent une quantité de PGE<sub>2</sub> près de 2 fois plus importante que celle synthétisée par les CSM non marquées en revanche pour les autres concentrations aucune variation significative de la production de PGE<sub>2</sub> n'est notée (Figure 31).

A 48h et 72h, ni la présence de PLL ni le marquage par les concentrations croissantes de SPIOs n'influencent la synthèse de PGE<sub>2</sub>. L'ensemble des conditions présente des concentrations en PGE<sub>2</sub> comprise entre 50 et 100 pg/mL (Figure 31).

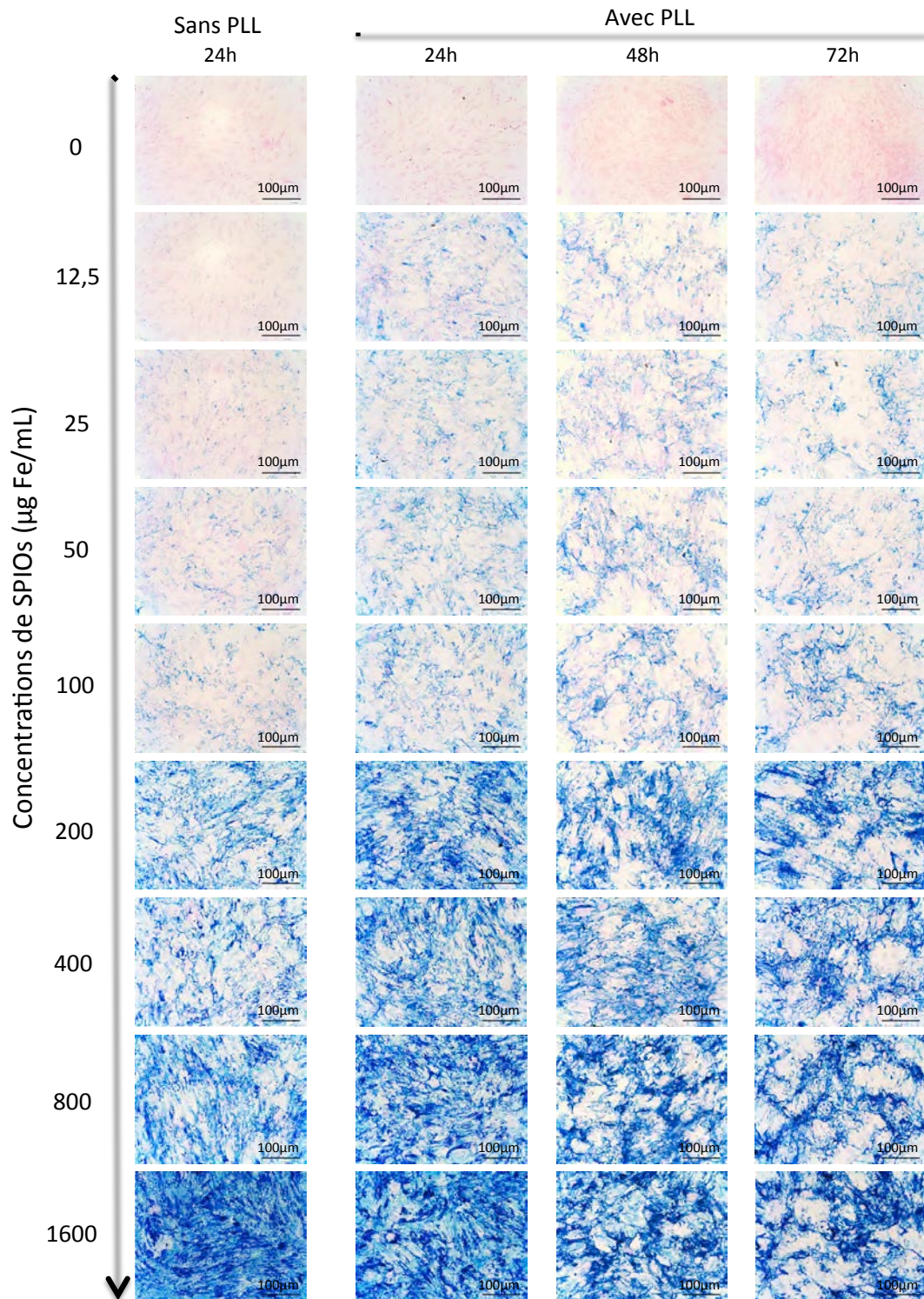


**Figure 31.** Dosage des PGE<sub>2</sub> dans le surnageant de culture de CSM ostéomédullaires humaines en monocouche à 24, 48 et 72 heures après exposition aux différentes concentrations de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200-400-800-1600 µg Fe/mL) en présence ou non de PLL. Les résultats (moyenne ± écart-type) montrent une hausse de la production de PGE<sub>2</sub> après 24h d'exposition à une concentration d'Endorem® de 1600 µg Fe/mL cependant il n'existe pas de variation significative de la production de PGE<sub>2</sub> après marquage par les autres concentrations à ce temps de même que pour toutes les concentrations à 48h et 72h. Analyses statistiques : ANOVA à 2 facteurs suivies d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

#### (4) Coloration de Perls sur les CSM en monocouche

L'internalisation des SPIOs par les CSM en monocouche a été visualisée à 24, 48 et 72 heures après exposition en utilisant la coloration de Perls (Figure 32). Dès la plus faible concentration (12,5µg Fe/mL), les particules de fer ont pénétré dans les CSM que l'on ajoute ou non de la poly-L-lysine. Cette internalisation est proportionnelle à la concentration testée ; plus la concentration est élevée plus les cellules sont marquées. A 48 et 72 heures, les cellules présentent toujours un marquage intracellulaire.

L'ajout de Poly-L-Lysine favorise l'endocytose des SPIOs par les cellules. En effet pour les faibles concentrations de SPIOs (12,5 ; 25 ; et 50 µg de Fe/mL), ce phénomène est facilement visualisable. Il se traduit par un marquage plus intense en cytologie en présence de PLL (Figure 32).



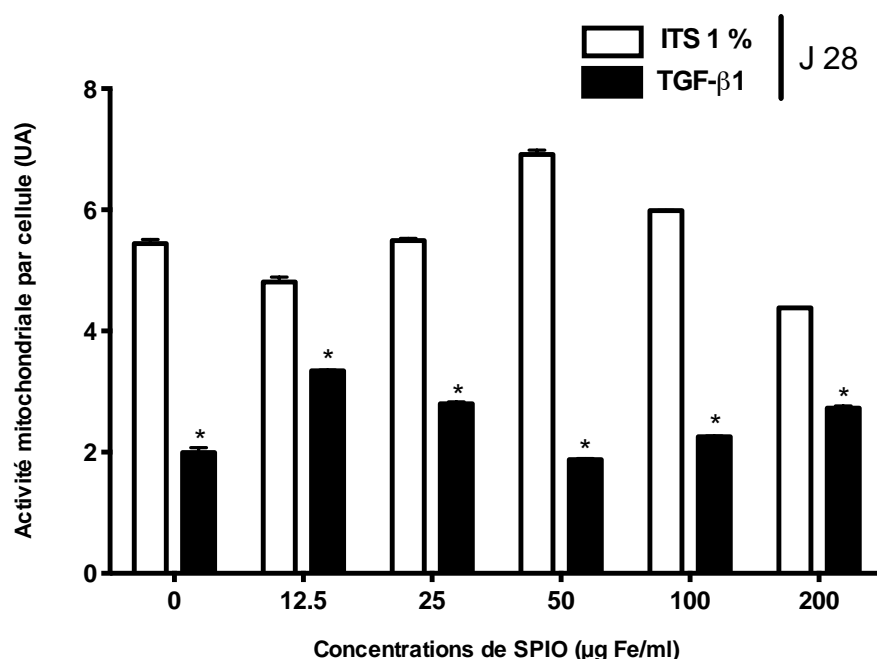
**Figure 32. Coloration au Bleu de Prusse des CSM ostéomédullaires humaines en monocouche à 24, 48 et 72 heures après exposition aux différentes concentrations de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200-400-800-1600 µg Fe/mL) en présence ou non de PLL.** La coloration au Bleu de Prusse a été réalisée sur la monocouche de cellules souches mésenchymateuses après 24h, 48h et 72h de marquage ou non par différentes concentrations de SPIOs. Plus la concentration de SPIOs est élevée, plus la quantité de SPIO internalisée par les CSM est importante. L'ajout de Poly-L-Lysine (PLL) a potentialisé l'internalisation des SPIO dans les CSM.



b) *SPIO et différenciation chondrogénique des CSM en 3D*

(1) Activité mitochondriale

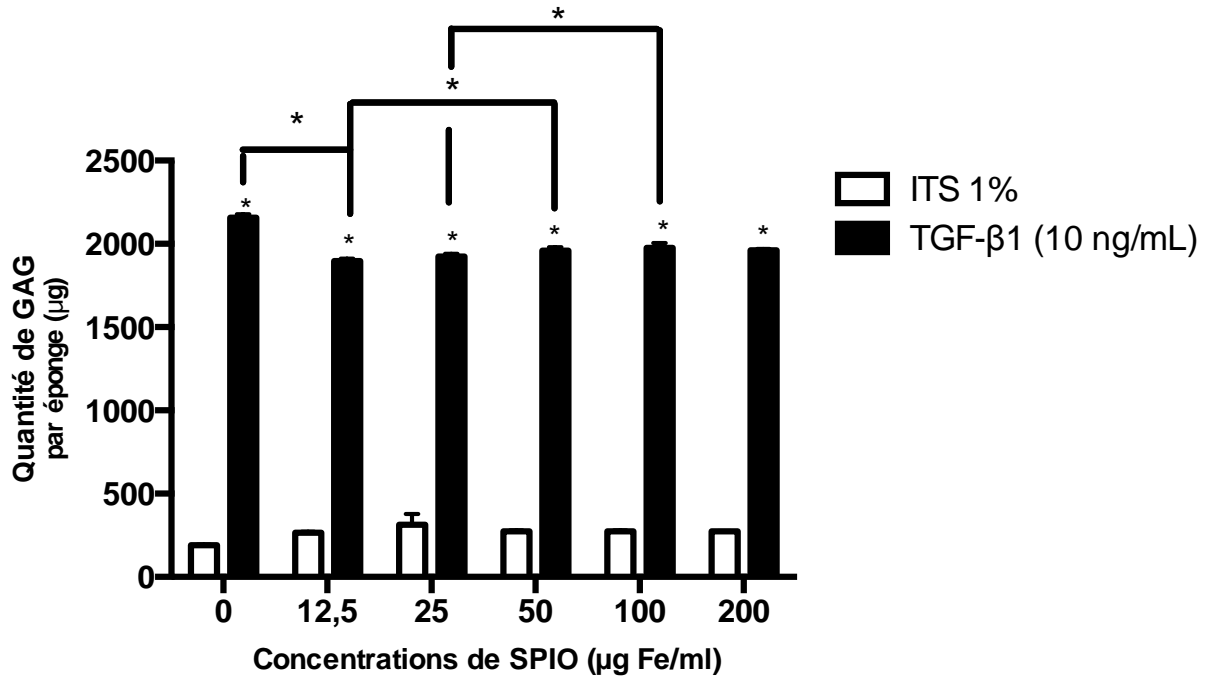
Les résultats obtenus mettent en évidence une bonne adaptation des cellules au biomatériau ainsi qu'aux différents traitements (ITS, TGF- $\beta$ 1 et SPIOs) puisqu'aucune toxicité n'a été observée au bout de 28 jours de culture. Avec le TGF- $\beta$ 1, en comparaison avec le témoin négatif ITS 1%, une diminution significative d'approximativement 63% de l'activité mitochondriale des cellules sans SPIOs ( $p < 0,05$ ) est observée (Figure 33). Le marquage des cellules par les particules de fer n'affecte pas l'activité mitochondriale que cela soit pour les cellules indifférenciées (ITS) ou pour les cellules différenciées (TGF- $\beta$ 1).



**Figure 33.** *Activité mitochondriale par cellule dans les éponges de collagèneensemencées en P4 avec des CSM ostéomédullaires humaines exposées à des concentrations croissantes de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200  $\mu\text{g Fe/mL}$ ) en présence de PLL après induction ou non de la différenciation par le TGF- $\beta$ 1 pendant 28 jours de culture 3D en condition normoxique. La différenciation chondrogénique a été induite par addition de TGF- $\beta$ 1 à 10 ng/mL. La condition ITS 1% fait preuve de témoin. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .*

(2) Synthèse des GAGs dans l'éponge

En condition ITS 1%, les CSM non différenciées produisent une quantité de GAGs basale et faible que les cellules soient marquées ou non et sans différence entre les différentes concentrations de SPIOs. Les CSM non marquées, en milieu chondrogénique, synthétisent environ 11,3 fois plus de GAGs que pour la condition ITS 1% et 0  $\mu\text{g Fe/mL}$  ( $p < 0,05$ ). Le marquage par 12,5  $\mu\text{g Fe/mL}$  de SPIOs induit une diminution significative de la production de GAGs de près de 12% ( $p < 0,05$ ). La quantité de GAGs augmente à nouveau légèrement à partir de 50  $\mu\text{g Fe/mL}$  tout en demeurant significativement inférieure à la quantité de GAGs synthétisée par les CSM différenciées (TGF- $\beta$ 1) non marquées (0  $\mu\text{g Fe/mL}$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figure 34).



**Figure 34.** *Quantité de GAGs synthétisés dans les éponges de collagèneensemencées en P4 avec des CSM ostéomédullaires humaines exposées à des concentrations croissantes de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200 µg Fe/mL) en présence de PLL après induction ou non de la différenciation par le TGF-β1 pendant 28 jours de culture 3D en condition normoxique. La différenciation chondrogénique a été induite par addition de TGF-β1 à 10 ng/mL. La condition ITS 1% fait preuve de témoin. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* : p < 0,05.*

### (3) Etude de l'expression génique

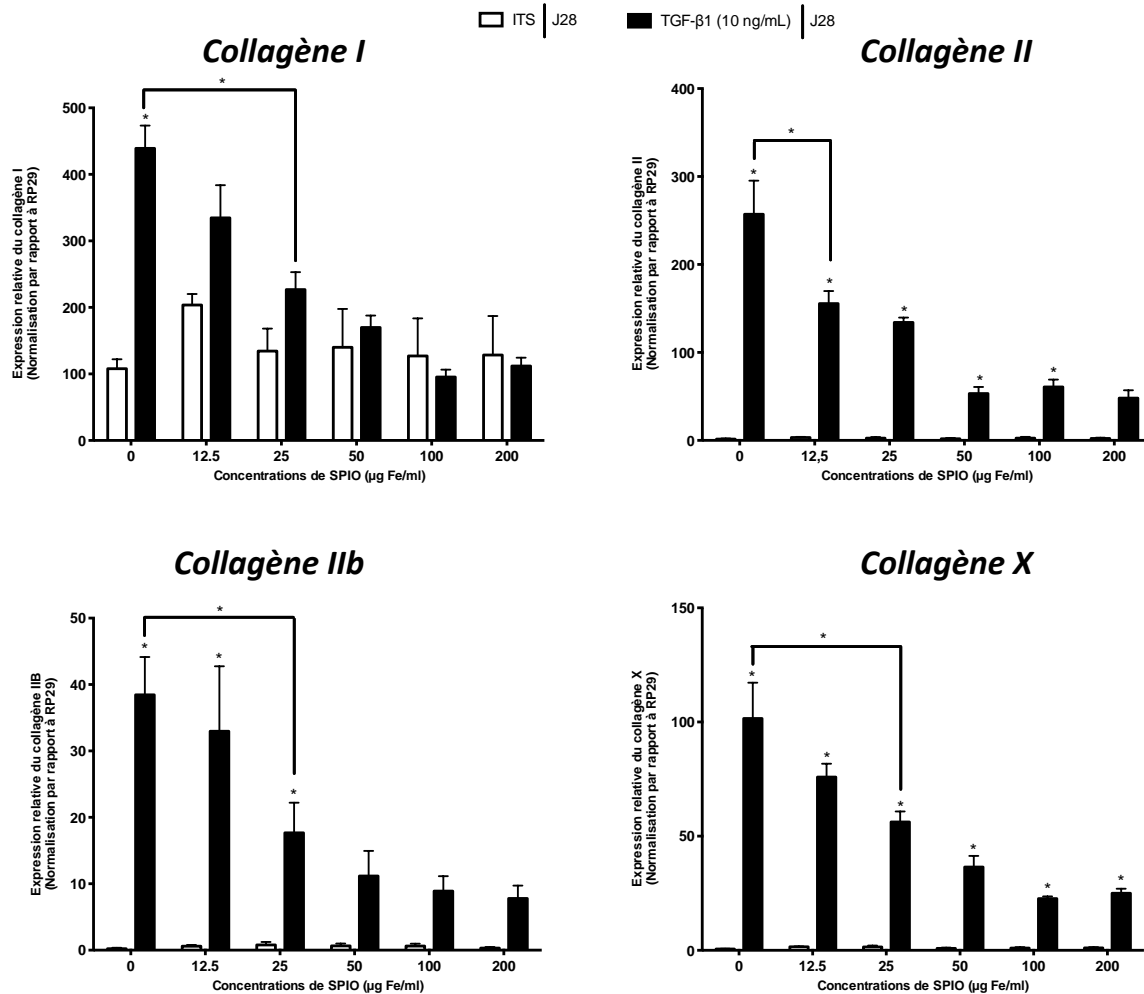
#### (A) LES COLLAGENES

Les expressions des collagènes de type I, II total, IIB et X ont été étudiées (**Figure 35**).

En absence de marquage par les particules de fer, les CSM indifférenciées (condition ITS 1%) présentent une expression basale et faible des collagènes de type I, II et X. En revanche, pour les CSM dont la différenciation chondrogénique a été induite par addition du TGF- β1 à 10 ng/mL, nous observons une augmentation importante du taux d'expression des gènes du collagène I (x 4), du collagène II (x 180), du collagène IIB (x 172) et du collagène X (x 208) (**Figure 35**).

Le marquage des CSM indifférenciées (ITS 1%) par les SPIOs n'a pas induit de variation significative de l'expression des gènes des différents collagènes étudiés. En effet, leur expression est maintenue à un niveau de base. En revanche, lors de la différenciation chondrogénique, l'ajout de particules de fer induit une diminution significative de l'expression des gènes du collagène II (40% ; p < 0,05) à partir de la plus faible concentration de 12,5 µg/mL et des collagènes I (48% ; p < 0,05), IIB (54% ; p < 0,05), et X (45% ; p < 0,05) dès 25 µg Fe/mL (**Figure 35**).

L'inhibition de l'expression des différents collagènes montre un effet dose-dépendant des particules de fer sur la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses ostéomédullaires humaines.



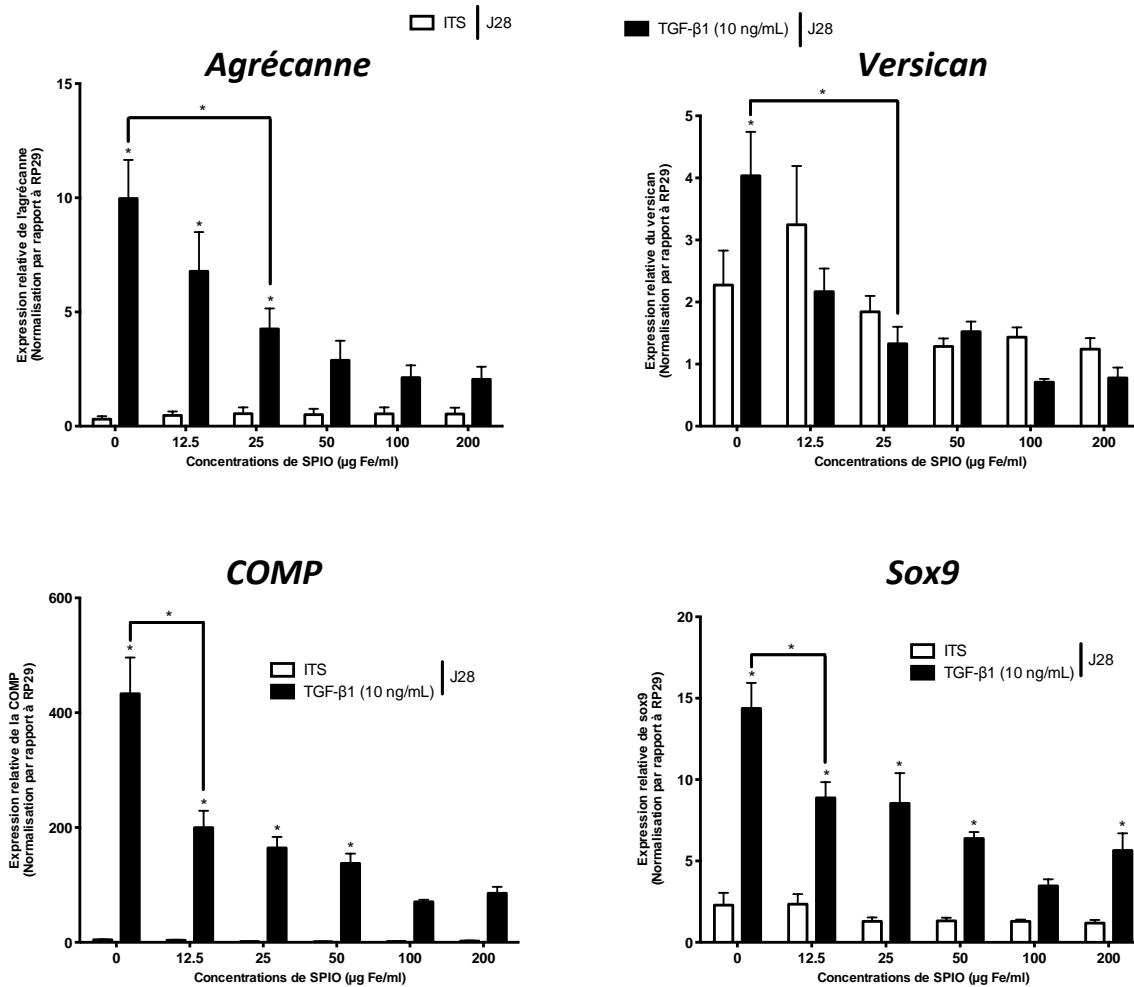
**Figure 35.** Expression génique des collagènes de type I, II, IIb et X dans les CSM ostéomédullaires humaines ensemencées en P4 dans les éponges de collagène exposées à des concentrations croissantes de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200 µg Fe/mL) en présence de PLL après induction ou non de la différenciation par le TGF-β1 pendant 28 jours de culture 3D en condition normoxique. Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage RP29. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \*:  $p < 0,05$ .

(B) PROTEOGLYCANES, FACTEUR DE TRANSCRIPTION ET PROTEINE MATRICIELLE

Tout comme pour l'expression des gènes des différents collagènes, les cellules cultivées en conditions ITS 1% ne présentent aucune variation de l'expression des gènes de l'agrécanne et du versican (**Figure 36**). Cependant, la différenciation des cellules non marquées induites par le TGF-β1 provoque une hausse significative de l'expression de l'agrécanne ( $\times 32$ ;  $p < 0,05$ ) alors que l'expression du versican bien qu'augmentée reste faible ( $p < 0,05$ ) (**Figure 36**).

L'internalisation des SPIOs par les cellules non induites (ITS 1%) n'affecte en rien l'expression de l'agrécanne et du versican. Cependant, lorsque la différenciation chondrogénique a été induite par le TGF-β1, l'addition de particules de fer conduit à une diminution significative de l'expression du gène de l'agrécanne (57%;  $p < 0,05$ ) à partir de 25 µg Fe/mL (**Figure 36**).

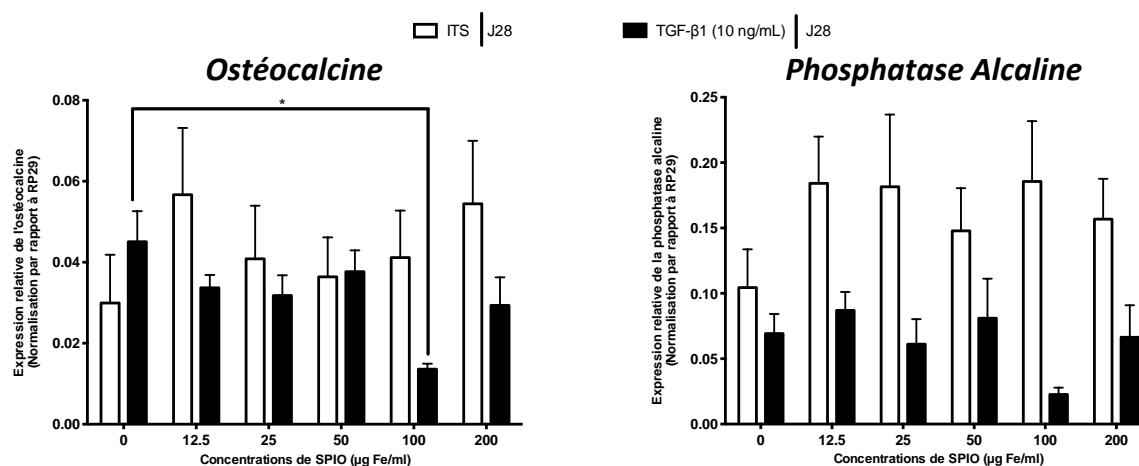
Les cellules non différenciées présentent des expressions faibles et basales des gènes de Sox 9 et de la COMP qui ne sont pas affectées par le marquage par les particules de fer, quelle que soit la concentration utilisée. L'induction de leur différenciation par le TGF- $\beta$ 1 a conduit à une augmentation de l'expression de ces gènes d'un facteur 6 ( $p < 0,05$ ) pour Sox 9 et d'un facteur 98 ( $p < 0,05$ ) pour la COMP. En présence de TGF- $\beta$ 1, le marquage par les SPIOs provoque une diminution significative, dès la concentration la plus faible (12,5  $\mu\text{g Fe/mL}$ ), des gènes de Sox 9 et de la COMP et ces gènes présentent une inhibition respective de 38% ( $p < 0,05$ ) et 54% ( $p < 0,05$ ) (Figure 36).



**Figure 36.** Expression génique de l'Agrécanne, du Versican, de la COMP et de Sox9 dans les CSM ostéomédullaires humaines ensemencées en P4 dans les éponges de collagène exposées à des concentrations croissantes de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200  $\mu\text{g Fe/mL}$ ) en présence de PLL après induction ou non de la différenciation par le TGF- $\beta$ 1 pendant 28 jours de culture 3D en condition normoxique. Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage RP29. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

### (C) MARQUEURS OSTEOGENIQUES

Le taux d'expression des marqueurs osseux était très faible indépendamment de l'état de différenciation des CSM (ITS 1% ou TGF- $\beta$ 1 à 10 ng/mL). Aucun effet des SPIOs n'a été observé sur l'expression de la PA (Phosphatase Alcaline) et de l'ostéocalcine (Figure 37).

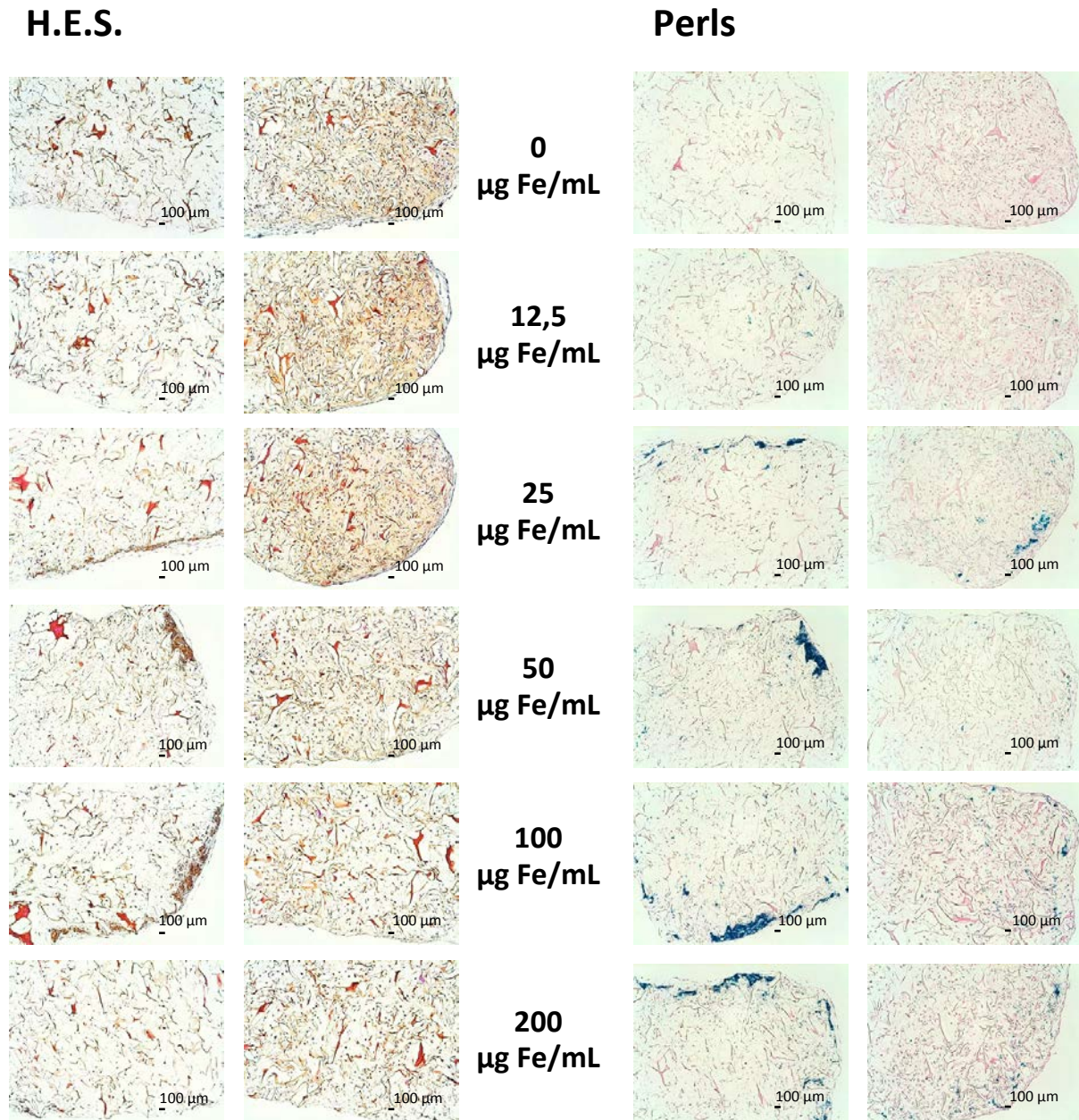


**Figure 37.** Expression génique de marqueurs ostéogéniques : *Ostéocalcine* et *Phosphatase Alcaline* dans les CSM ostéomédullaires humaines ensemencées en P4 dans les éponges de collagène exposées à des concentrations croissantes de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200 µg Fe/mL) en présence de PLL après induction ou non de la différenciation par le TGF-β1 pendant 28 jours de culture 3D en condition normoxique. Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression d'un gène de ménage RP29. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

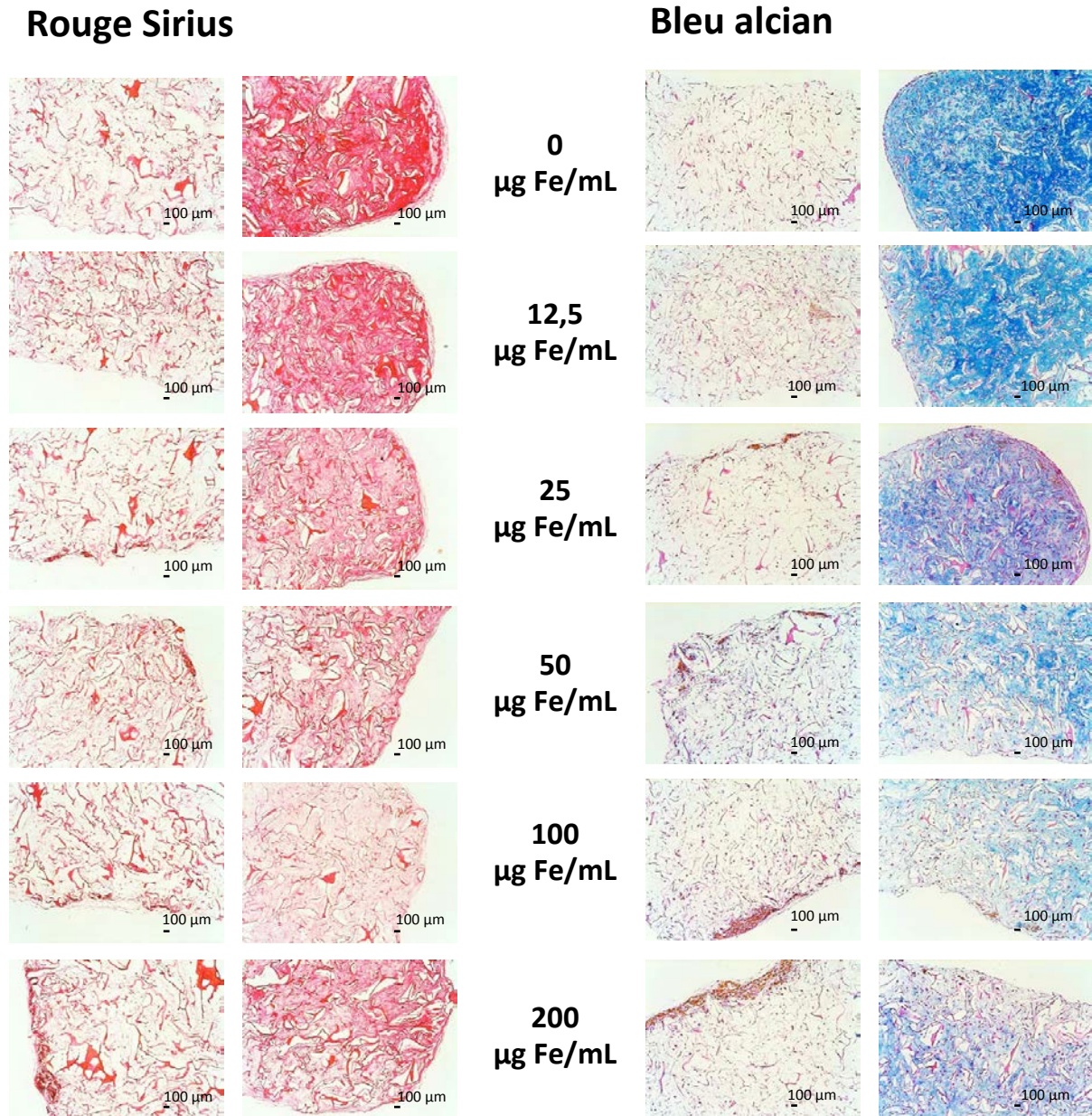
#### (4) Evaluation de la qualité de la synthèse matricielle

Les éponges contenant les CSM non différenciées présentent des irrégularités de surface qui peuvent être expliquées par la faible synthèse de matrice conduisant à une structure lâche du biomatériau. La répartition des cellules au sein de l'éponge était différente dans les éponges contenant des CSM différenciées. En effet, les cellules situées sur les bords de l'éponge apparaissent plus longues et forment des assises cellulaires à la périphérie du biomatériau. Les cellules au centre présentent une forme plus arrondie. Le nombre de cellules dans les éponges cultivées en condition TGF-β1 est également largement plus élevé que dans les éponges cultivées dans un milieu ITS 1%. De plus, dans les biomatériaux cultivés en condition chondrogénique (ITS 1% + TGF-β1 à 10 ng/mL), les CSM synthétisent une matrice extracellulaire dense et répartie de façon homogène au sein de l'éponge (Figure 38 : HES).

La coloration au Bleu de Prusse (Figure 38 : Perls) permet de visualiser les particules de fer internalisées par les CSM après 28 jours de culture dans notre système 3 dimensions : l'éponge de collagène. Aucun marquage n'est détecté dans les éponges ensemencées avec des cellules non marquées, que ces cellules aient subi un traitement chondrogénique ou non. Plus la concentration en SPIOs augmente et plus le marquage s'intensifie. L'accumulation des SPIOs dans les éponges apparaît proportionnelle à la concentration de particules de fer utilisée. Après observation à un plus fort grossissement, nous avons remarqué que plus de 95% des CSM différenciées ou non sont marquées avec une concentration de 200 µg Fe/mL. Quand les cellules sont marquées, les CSM présentent une persistance du marquage intracellulaire durant au moins 4 semaines dans les éponges de collagène.

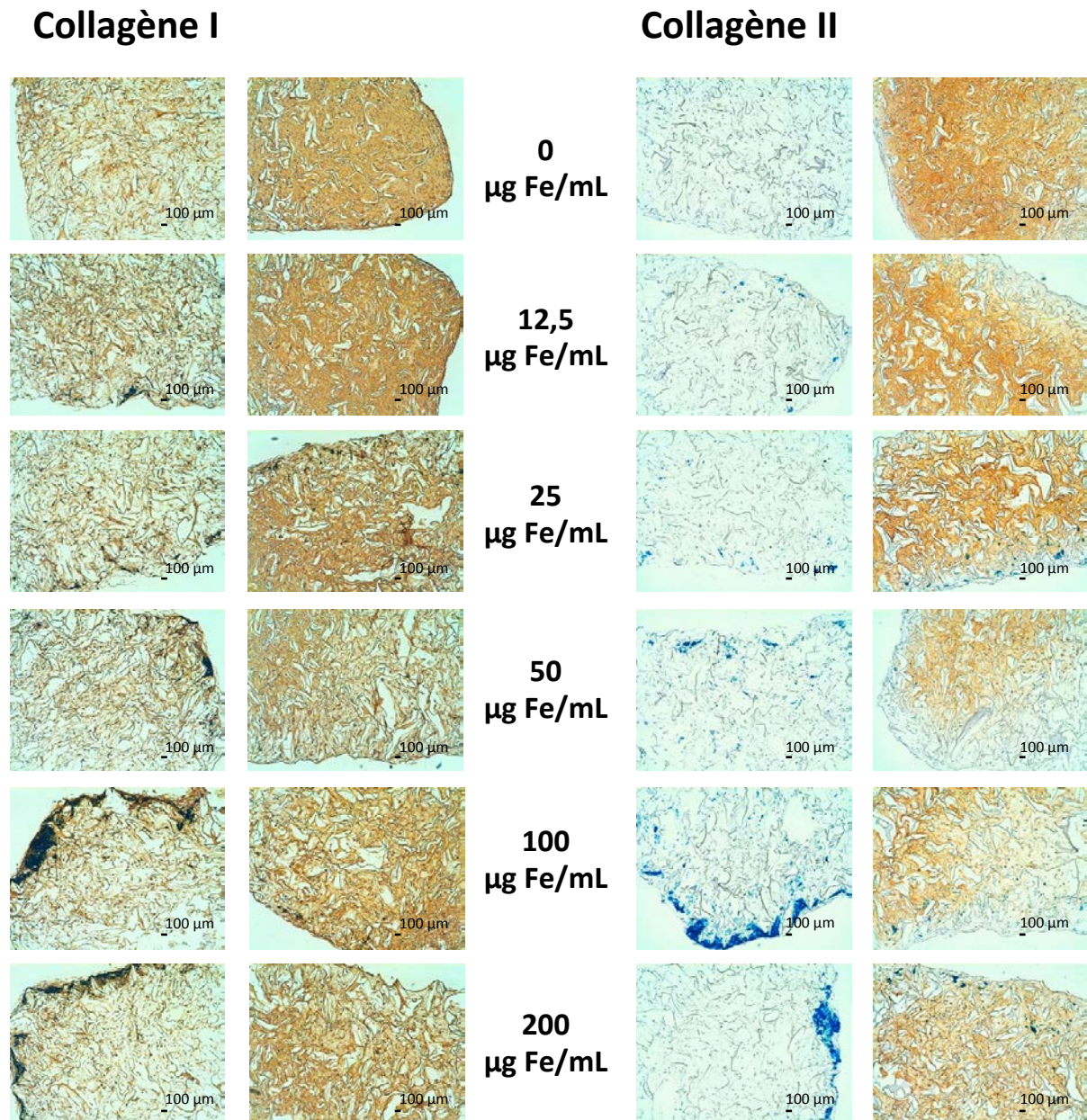


**Figure 38.** Analyses histologiques (HES et Perls) sur des éponges contenant des CSM ostéomédullaires humaines exposées à des concentrations croissantes de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200 µg Fe/mL) en présence de PLL après induction ou non de la différenciation par le TGF-β1 pendant 28 jours de culture 3D en condition normoxique. La coloration HES (Hématoxyline-Erythrosine-Safran) permet de visualiser l'aspect de l'éponge et des cellules ainsi que la répartition des cellules au sein du biomatériau. La coloration de Perls (ou Bleu de Prusse) met en évidence la présence de complexe ferreux. Les éponges en condition chondrogénique ont un aspect plus régulier et arrondi et contiennent une densité cellulaire plus importante (HES). Le marquage cellulaire par les SPIOs augmente en fonction de la concentration de particules ferromagnétiques.



**Figure 39.** Analyses histologiques (Bleu Alcian et Rouge Sirius) sur des éponges contenant des CSM ostéomédullaires humaines exposées à des concentrations croissantes de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200 µg Fe/mL) en présence de PLL après induction ou non de la différenciation par le TGF-β1 pendant 28 jours de culture 3D en condition normoxique. La coloration Bleu Alcian permet de mettre en évidence un contenu riche en protéoglycannes. La coloration Rouge Sirius renseigne sur le contenu en collagènes. En condition chondrogénique (TGF-β1), la synthèse de protéoglycannes diminue de manière concentrations de SPIOs-dépendante (Bleu Alcian). Le contenu en collagène est également affecté par la présence de SPIOs en fonction de leur concentration (Rouge Sirius).

La coloration Bleu Alcian (Figure 39 : Bleu Alcian) a été utilisée afin de mettre en évidence la présence de protéoglycannes à l'intérieur de notre biomatériau. En condition chondrogénique et sans marquage, la synthèse de protéoglycannes est très abondante et homogène. En revanche, l'ajout de SPIOs conduit à la diminution de cette synthèse dès la concentration de 25 µg Fe/mL et s'accroît avec l'augmentation des concentrations de SPIOs. Pour une concentration de 200 µg Fe/mL, la quantité de protéoglycannes synthétisée dans les éponges est faible en particulier au niveau des zones où les SPIOs se concentrent.



**Figure 40. Analyses immunohistochimiques (Collagène I et II) sur des éponges contenant des CSM ostéomédullaires humaines exposées à des concentrations croissantes de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200 µg Fe/mL) en présence de PLL après induction ou non de la différenciation par le TGF-β1 pendant 28 jours de culture 3D en condition normoxique. Les concentrations croissantes de SPIOs induisent une inhibition partielle de la synthèse des contenus en collagènes I et II.**

La coloration Rouge Sirius (Figure 39 : Rouge Sirius) donne des renseignements sur le contenu en collagènes dans les éponges après 28 jours de culture. En présence de TGF-β1, les cellules synthétisent une abondante matrice collagénique en comparaison avec la matrice produite par les CSM en condition ITS 1%. Le marquage par les SPIOs conduit à une inhibition partielle de la synthèse matricielle de collagènes par les CSM dont la différenciation chondrogénique a été induite par le TGF-β1 à partir de la concentration de 50 µg Fe/mL et s'accroît avec l'augmentation des concentrations en SPIOs.



Les études immunohistochimiques nous ont permis de vérifier que l'addition de TGF- $\beta$ 1 induit une expression protéique élevée de collagène de type II alors qu'aucune synthèse n'est observée en condition ITS 1%. L'internalisation des particules de fer par les CSM conduit à une diminution de la synthèse de collagène II en condition chondrogénique à partir de 50  $\mu$ g Fe/mL s'aggravant avec les concentrations croissantes de SPIOs. (Figure 40 : Collagène II) La synthèse de collagène I est abondante dans les éponges et s'affaiblit avec le marquage par les SPIOs (Figure 40 : Collagène I).

#### 4. Suivi *in vitro* par IRM 7T et 3T des CSM marquées

##### a) Matériels et Méthodes

###### (1) Isolation et expansion des CSM

Les CSM sont isolées selon le protocole décrit précédemment dans les parties : **IV. Résultats - A. CSM et chondrogenèse: rôles du site, de l'expansion et de** - **3. Matériels et Méthodes - a) Isolation et expansion des cellules - (I) Isolation des CSM de la moelle osseuse.**

###### (2) Marquage des CSM par les SPIOs

Le protocole de marquage des CSM est développé dans la partie : C. Marquage des CSM et différenciation chondrogénique : suivi IRM – 2. Matériels et Méthodes – b) Influence des SPIOs sur la différenciation chondrogénique des CSM en 3D – (2) Marquages des CSM par les SPIOs

Différentes concentrations en fer sont testées : 0 - 12,5 - 25 - 50 - 100 et 200  $\mu$ g de fer/mL de milieu de culture. Chaque lot cellulaire est ensuiteensemencé dans les éponges de collagène.

###### (3) Ensemencement des biomatériaux pour l'acquisition par IRM

###### (A) ENSEMENCEMENT DES BIOMATERIAUX AVEC LES CSM MARQUEES OU NON PAR LES SPIOs A 7T

Les biomatériaux utilisés sont des éponges de collagène de type I et III (95 % de type I) fabriquées par la société Symatèse Biomateriaux (Chaponost, France). Elles sont de forme cylindrique et mesurent environ 5mm de diamètre sur 2 mm d'épaisseur.

Les éponges sont placées unitairement dans les puits d'une plaque 48 puits. Les CSM sont ensemencées en P3 par réhydratation de l'éponge avec 50  $\mu$ L de suspension cellulaire à raison de 500 000 cellules par éponge. Le milieu de culture utilisé est un milieu DMEM 4,5 g/L de glucose (41965, Invitrogen) supplémenté en pyruvate (110  $\mu$ g/mL), proline (40  $\mu$ g/mL), L-acide ascorbique-2-Phosphate (50  $\mu$ g/mL), dexaméthasone (100 nM).

Après 28 jours de culture, les éponges ont été recueillies afin de procéder à l'évaluation de la synthèse matricielle par IRM.

(B) ENSEMENCEMENT DES BIOMATERIAUX AVEC LES CSM MARQUEES OU NON PAR LES SPIOs A 3T

---

Les biomatériaux utilisés sont des éponges de collagène de type I et III (95 % de type I) fabriquées par la société Symatèse Biomatériaux (Chaponost, France). Elles sont de forme cylindrique et mesurent environ 1 cm de diamètre sur 4 mm d'épaisseur.

Les éponges sont placées unitairement dans les puits d'une plaque 48 puits. Les CSM sont ensemencées en P3 par réhydratation de l'éponge avec 400  $\mu$ L de suspension cellulaire à raison de 2 millions de cellules par éponge. Le milieu de culture utilisé est un milieu DMEM 4,5 g/L de glucose (41965, Invitrogen) supplémenté en pyruvate (110  $\mu$ g/mL), proline (40  $\mu$ g/mL), L-acide ascorbique-2-Phosphate (50  $\mu$ g/mL), dexaméthasone (100 nM).

Après 28 jours de culture, les éponges ont été recueillies afin de procéder à l'évaluation de la synthèse matricielle par IRM.

(C) EXPLORATION IRM DES SYSTEMES DE CULTURE EN 3D : EPONGES DE COLLAGENE DE TYPE I

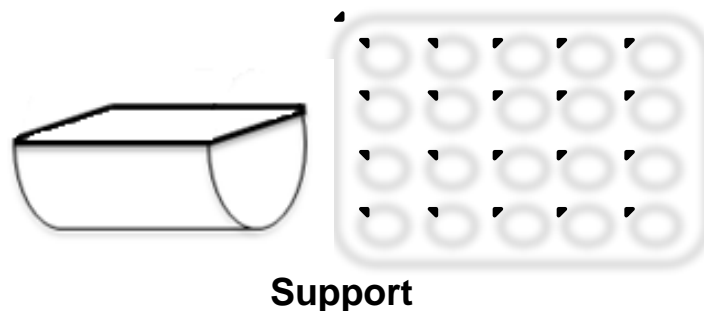
---

En raison de la différence de résolution spatiale entre les deux imageurs, des éponges d'un diamètre de 5 mm et d'une épaisseur de 2 mm et des éponges de 1 cm de diamètre et de 4 mm d'épaisseur ont été utilisées respectivement pour l'exploration IRM à 7 Teslas et à 3 Teslas.

(D) PROTOCOLE IRM A 7T

---

Après 28 jours, les éponges ensemencées avec des CSM humaines marquées ou non avec différentes concentration de Endorem® (0 - 12.5 - 25 - 50 - 100 and 200  $\mu$ g Fe/mL) et cultivées en milieu ITS 1% et en milieu 1% ITS + TGF- $\beta$ 1 (10 ng/mL) ont été placées dans un support conçu spécifiquement pour l'exploration IRM de nos biomatériaux. Ce support était constitué de 20 puits pouvant contenir plusieurs éponges. Les éponges ont été réparties selon leur groupe dans 8 puits du support.



**Figure 41. Représentation schématique du support utilisé pour visualiser les éponges de collagène fonctionnalisées sur un imageur 7T.**

L'exploration IRM a ensuite été réalisée afin de déterminer les valeurs de T2 à 7T de la matrice synthétisée au sein du biomatériau sur un imageur dédié au petit animal (Biospec 7T Imager, Bruker Biospin MRI GmbH, Ettlingen, Allemagne) avec un gradient de force de 0,4 T/m. Les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'une antenne volumique à quadrature de 32 mm : RAPID (Biomedical GmbH, Rimpfing, Allemagne).

Les acquisitions IRM ont été conduites selon les paramètres suivants: séquence de cartographie T2 multi-coupes multi-échocs (angle de bascule de 180°), TR/TE : 2500/10 ms, 16 échocs (de 10 à 160 ms (mettre les 8 échocs)), FOV (Champ de vue) : 3 cm, matrice de 256 x 256, épaisseur de coupe : 1 mm, NEX : 4, bande passante : 151515 Hz et temps d'acquisition : 32 min. Les valeurs de T2 sur les images IRM des biomatériaux fonctionnalisés ont été déterminées en utilisant des tailles adaptées de régions d'intérêt (ROI) et un logiciel Paravision 5.1 (Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Allemagne).

#### (E) PROTOCOLE IRM A 3T

Après 28 jours de culture, les éponges contenant les CSM marquées ou non par des concentrations croissantes de SPIO (0 - 12.5 - 25 - 50 - 100 and 200 µg Fe/mL) et cultivées en milieu ITS 1% et en milieu 1% ITS + TGF-β1 (10 ng/mL) ont été placées dans des plaques 24 puits. Les éponges ont été transférées unitairement dans une plaque 24 puits dans laquelle 1 à 1,5 ml d'agarose à 4% ont été coulés préalablement afin de réaliser des puits dont le diamètre ne permettait que peu de mouvements du biomatériau dans le but de limiter le bruit de fond généré par le mouvement des éponges dans le milieu de culture lors des acquisitions IRM.

L'imagerie par résonance magnétique des cellules transplantées dans les éponges a été effectuée sur un imageur clinique à 3T (General Electric) en utilisant une séquence de cartographie T2 multi-coupes multi-échocs (angle de bascule de 180°). Les images IRM ont été acquises à l'aide des paramètres suivants pour pouvoir acquérir le signal de chaque éponge sur un seul champ: TR/TE : 1500/10 ms, 8 échocs (de 10 à 160 ms mettre les 8 échocs), FOV : 12 cm, matrice : 256 x 256, épaisseur de coupe : 1 mm, NEX : 3 et temps d'acquisition 20 min. Les régions d'intérêt ont été sélectionnées à l'aide du logiciel FuncTool (FuncTool Software, GEMS) qui a ainsi permis de déterminer les valeurs de T2 moyen au sein des échantillons.

#### (4) Statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (SEM). Un test ANOVA à 2 facteurs est utilisé pour déterminer la significativité entre les différentes conditions, suivi d'un test *a posteriori* de Bonferroni pour réaliser des comparaisons multiples au sein des groupes. Ces analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad (GraphPad Prism 4.0c Software MacKiev © GraphPad Software, Inc.). Une différence statistique significative est déterminée par une valeur \* :  $p < 0,05$ .

L'ensemble des analyses a été mené en triplicat (pour les acquisitions réalisées sur l'imageur à 3T) et en sextuplat (pour les acquisitions réalisées sur l'imageur à 7T) sur au minimum 2 patients.

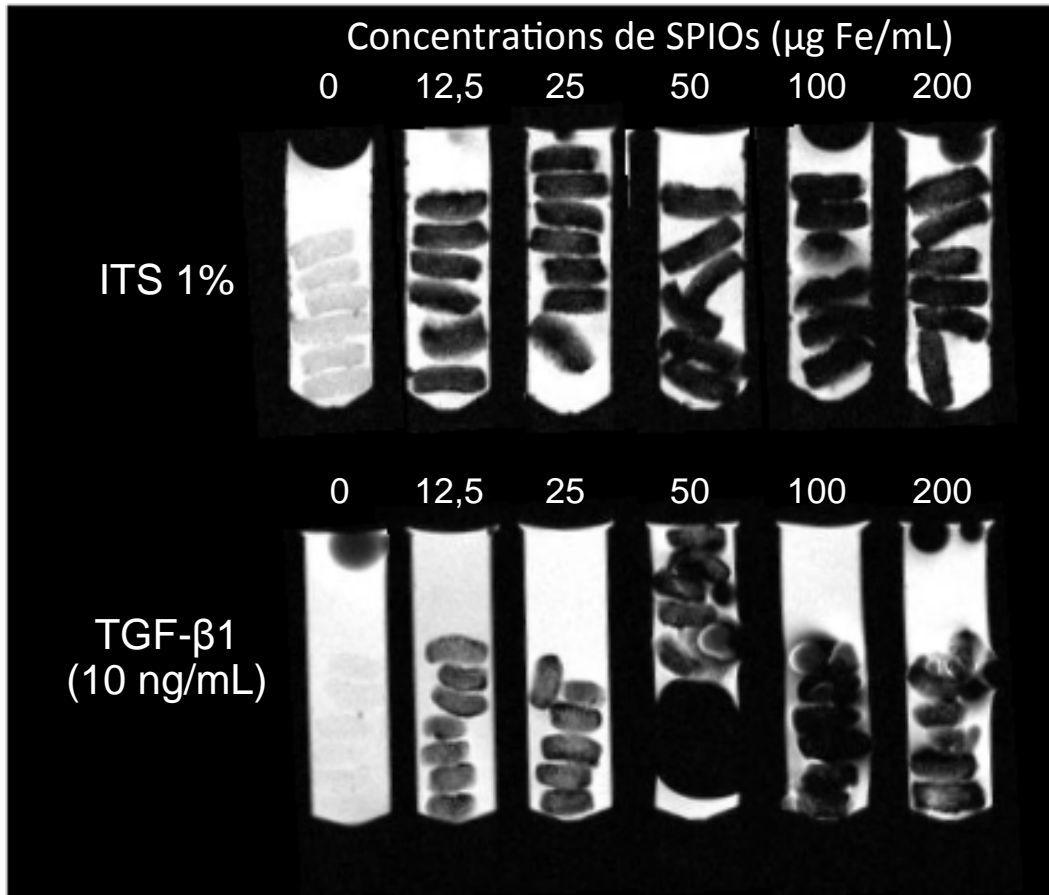
#### b) Résultats

##### (1) Evaluation de la persistance du marquage sur un IRM 7T

#### (A) ACQUISITION DES IMAGES EN IRM 7T EN PONDERATION T2

Les images obtenues sur l'imageur haut champ montrent que, par comparaison avec le témoin non marqué de chaque condition (ITS 1% et TGF-β1), l'addition de SPIOs conduit

à une réduction du signal (hyposignal) dès la plus faible concentration de 12,5  $\mu\text{g Fe/mL}$  et est accentuée avec l'augmentation des concentrations de SPIOs. La distribution des particules ferromagnétiques est homogène au sein du biomatériau. Les cercles sombres à la surface des tubes et dans le tube TGF- $\beta$ 1 50  $\mu\text{g Fe/mL}$  sont attribués à la présence de bulles d'air difficiles à éviter (Figure 42).



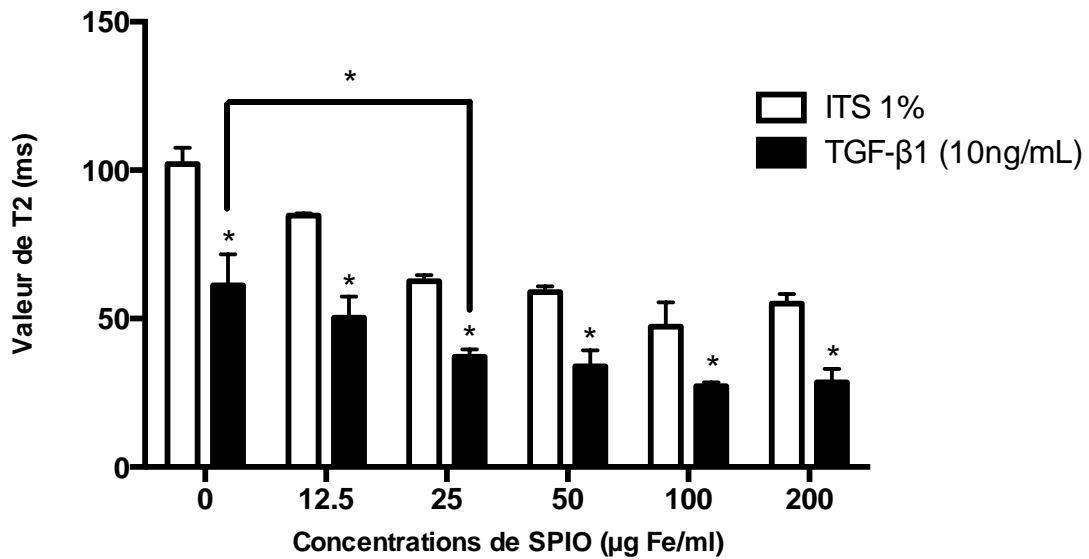
**Figure 42.** Images pondérées T2 à 7T des éponges de collagène colonisées par des CSM ostéomédullaires marquées ou non par des concentrations croissantes de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200  $\mu\text{g Fe/mL}$ ) cultivées pendant 28 jours dans un milieu chondrogénique (TGF- $\beta$ 1) ou non (ITS 1%).

(B) MESURE DU T2 MOYEN DANS LES EPONGES A 7T

Les constatations visuelles sur les images obtenues en IRM 7T sont confirmées par le calcul du T2 moyen. A 7T, en absence de SPIOs, les valeurs de T2 moyen des éponges du groupe TGF- $\beta$ 1 sont significativement diminuées de 40% par rapport aux valeurs du groupe ITS 1%. La valeur de T2 moyen des biomatériaux non marqués de la condition ITS 1% pour laquelle les cellules demeurent indifférenciées ( $T_2 = 102,10$  ms) est réduite de façon significative de 17% dès la concentration de 12,5  $\mu\text{g Fe/mL}$  ( $T_2 = 84,70$  ms).

En condition chondrogénique (TGF- $\beta$ 1), l'addition de SPIOs conduit à une diminution significative de 39,3% de la valeur de T2 moyen à partir de 25  $\mu\text{g Fe/mL}$  ( $T_2 = 37,15$  ms) par rapport aux valeurs calculées pour les éponges non marquées ( $p < 0,01$ ). Les

valeurs de T2 moyen sont diminuées à mesure que la concentration en SPIOs augmente pour les éponges contrôles (ITS 1%) et les éponges traitées par ajout de TGF- $\beta$ 1 (Figure 43).



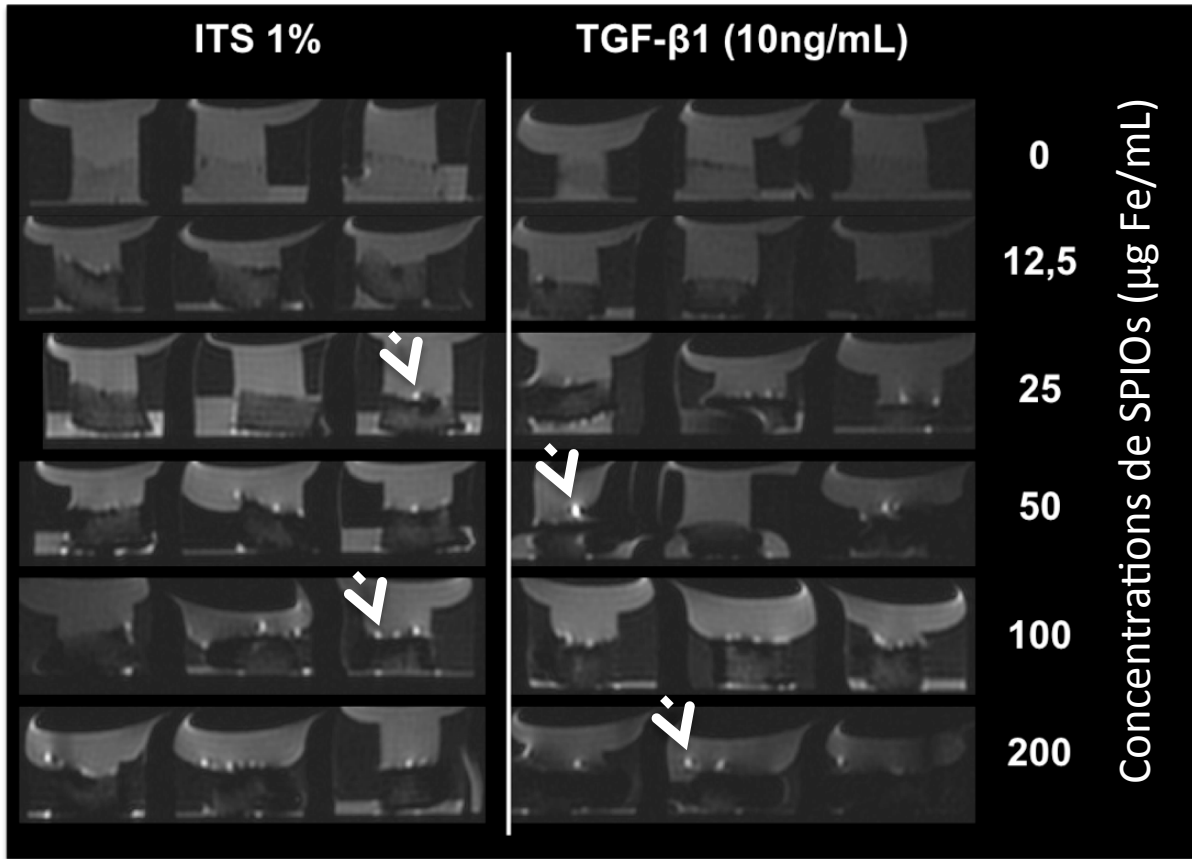
**Figure 43.** Valeurs du T2 moyen des éponges de collagène colonisées par des CSM ostéomédullaires marquées ou non par des concentrations croissantes de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200  $\mu\text{g Fe/mL}$ ) cultivées pendant 28 jours dans un milieu chondrogénique (TGF- $\beta$ 1) ou non (ITS 1%). La différenciation chondrogénique a été induite par addition de TGF- $\beta$ 1 à 10 ng/mL. La condition ITS 1% fait preuve de témoin. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \*:  $p < 0,05$ .

## (2) Evaluation de la persistance du marquage sur un IRM 3T

### (A) ACQUISITION DES IMAGES PODEREES T2 EN IRM 3T

Les images obtenues sur l'imageur clinique montrent que, par comparaison avec le témoin non marqué de chaque condition (ITS 1% et TGF- $\beta$ 1), l'addition de SPIOs conduit à une réduction du signal (hyposignal) dès la plus faible concentration de 12,5  $\mu\text{g Fe/mL}$  et est accentuée avec l'augmentation des concentrations de SPIOs.

Les particules d'oxyde de fer sont réparties majoritairement à la périphérie de l'éponge mais l'ensemble de l'éponge apparaît en hyposignal démontrant également la présence de SPIOs au centre de l'éponge. Les point blancs (hypersignal) présents dans certains des puits à partir d'une concentration de 25  $\mu\text{g Fe/mL}$  sont dus à la saturation du signal (flèches blanches) (**Figure 44**).

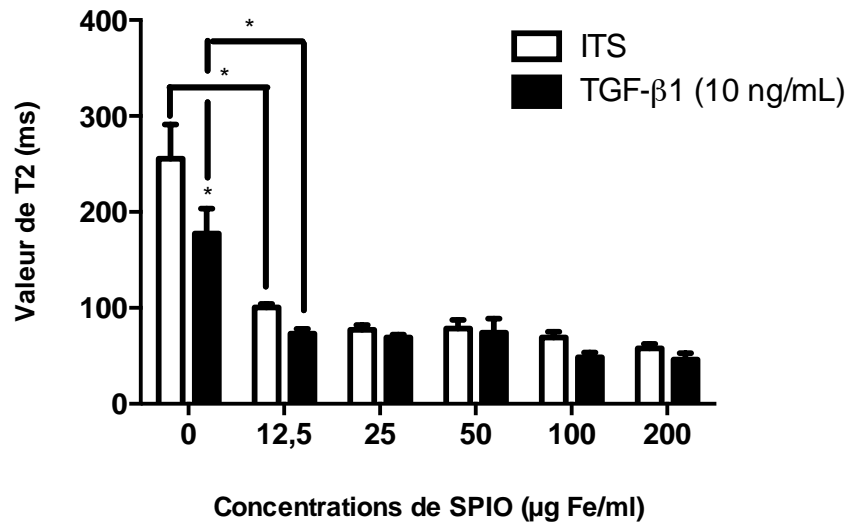


**Figure 44.** Images pondérées en T2 à 3T des éponges de collagène colonisées par des CSM ostéomédullaires marquées ou non par des concentrations croissantes de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200 µg Fe/mL) cultivées pendant 28 jours dans un milieu chondrogénique (TGF-β1) ou non (ITS 1%).

(B) MESURE DU T2 MOYEN DANS LES EPONGES A 3T

Les constatations visuelles sur les images obtenues en IRM 3T sont confirmées par le calcul du T2 moyen. A 3T, en absence de SPIOs, les valeurs de T2 moyen des éponges du groupe TGF-β1 sont significativement inférieures d'environ 31% par rapport aux valeurs du groupe ITS 1% ( $p < 0,05$ ). La valeur de T2 moyen des biomatériaux non marqués de la condition ITS 1% pour laquelle les cellules demeurent indifférenciées ( $T2 = 255,64$  ms) est diminuée significativement de 60,7% dès la concentration de 12,5 µg Fe/mL ( $T2 = 100,45$  ms) ( $p < 0,05$ ).

En condition chondrogénique (TGF-β1), l'addition de SPIOs entraîne une réduction significative d'environ 58,7% de la valeur de T2 moyen à partir de 12,5 µg Fe/mL ( $T2 = 73,22$  ms) par rapport aux valeurs calculées pour les éponges non marquées en présence de TGF-β1 ( $p < 0,05$ ). Les valeurs de T2 des éponges en milieu chondrogénique (TGF-β1) et non chondrogénique (ITS 1%) diminuent après un marquage par une concentration de 12,5 µg Fe/mL puis les valeurs se stabilisent pour les concentrations plus élevées de SPIOs (Figure 45).



**Figure 45.** Valeurs du T2 moyen des éponges de collagène colonisées par des CSM ostéomédullaires marquées ou non par des concentrations croissantes de SPIOs (0-12,5-25-50-100-200 µg Fe/mL) cultivées pendant 28 jours dans un milieu chondrogénique (TGF-β1) ou non (ITS 1%). La différenciation chondrogénique a été induite par addition de TGF-β1 à 10 ng/mL. La condition ITS 1% fait preuve de témoin. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

## 5. Discussion

Les études réalisées en ingénierie tissulaire permettent d'envisager l'utilisation d'un biomatériau fonctionnalisé par des cellules souches mésenchymateuses dans la perspective d'une alternative aux traitements actuels. L'élaboration d'une méthode de marquage des CSM s'avère indispensable pour pouvoir effectuer un suivi post-implantatoire non invasif en routine. Ce marquage ne doit pas avoir d'effets délétères sur les CSM ni sur leurs potentialités de différenciation afin que l'implant tissulaire reste fonctionnel. Le choix de ce traceur s'est porté sur les particules de fer superparamagnétiques (SPIOs ; Endorem®), déjà utilisées en clinique comme agent de contraste en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Ces particules sont facilement internalisées dans les CSM par simple mécanisme d'endocytose.

L'objectif de notre travail était d'évaluer l'influence d'une gamme de concentrations croissantes de SPIOs sur les fonctions biologiques et la différenciation chondrogénique des CSM humaines cultivées en éponge de collagène et d'examiner la persistance du marquage après 28 jours.

Dans un premier temps, nous avons étudié le comportement des CSM ostéomédullaires humaines après 24h, 48h et 72h de marquage par des concentrations graduelles de SPIOs comprises entre 0 et 1600 µg Fe/mL. Ni toxicité, ni mort cellulaire (résultats non présentés) n'est observée après addition de SPIOs. En effet, nous n'observons pas de production importante de NO ou PGE2 et les pourcentages de toxicité restent très faibles même pour la plus forte concentration de 1600 µg Fe/mL. Les travaux similaires dans la littérature mettent en évidence également cette absence de toxicité des SPIOs sur les CSM humaines ou de rat pour des doses variant de 0 à 100 µg Fe/mL [355], de 0 à 1000 µg Fe/mL [299] ou encore de 0 à 1600 µg Fe/mL [304]. Le pourcentage de viabilité cellulaire est comparable entre les cellules marquées par les SPIOs et les cellules non marquées (94%) [301]. De même, en 2011, van Buul et coll ont montré que des doses, allant de 0 à 25 µg

Ferumoxide/cm<sup>2</sup>, ne présentent pas d'effet négatif sur la viabilité de CSM ostéomédullaires humaines [356]. Le travail d'une autre équipe concernant la dose-réponse (0 à 100 µg Fe/ml de SPIOs) de CSM humaines immortalisées n'a mis en évidence aucun phénomène d'apoptose ni aucune synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) ou de métalloprotéinases (MMPs) suite au marquage des cellules [357]. La viabilité des chondrocytes n'est également pas affectée par un marquage par des concentrations de SPIOs comprise entre 0 et 168,75 µg Fe/ml [358].

Nous avons confirmé l'intérêt d'utiliser de la poly-L-Lysine (PLL) comme agent de transfection lors du marquage afin de faciliter l'internalisation des SPIOs dans les CSM. La PLL augmente l'efficacité du marquage et ne montre aucune toxicité sur les CSM. La PLL, comme d'autres agents de transfection (la protamine sulfate par exemple), fixe les particules d'oxyde de fer enrobées de dextran via des interactions électrostatiques et facilite leur internalisation par déstabilisation de la membrane plasmique des cellules. Ces agents de transfection augmentent de manière significative le marquage par les SPIOs [359]. De plus, Babic, en 2008, a prouvé que le pourcentage de cellules marquées augmente proportionnellement à la concentration de PLL utilisée [300].

Dans notre étude, nous avons montré que des CSM humaines d'origine médullaire peuvent internaliser de grandes quantités de particules de fer. La coloration au bleu de Prusse est accentuée avec l'augmentation des concentrations de SPIOs. Le marquage est toujours présent 72h après exposition aux SPIOs bien que la coloration de Perls soit moins intense par rapport à la condition 24h. Cependant, ce phénomène résulte de la dilution progressive au cours du temps des SPIOs dans les cellules en raison de la poursuite de la prolifération cellulaire.

Dans un second temps, les CSM ont été exposées aux SPIOs durant une période de 24 heures, avant leur ensemencement dans des éponges de collagène avec des concentrations d'Endorem® s'échelonnant de 0 à 200 µg/mL et ont été cultivées pendant 28 jours dans un milieu contenant de l'ITS 1% (cellules indifférenciées) ou de l'ITS 1% + TGF-β1 (chondrogenèse : cellules différenciées). Aucune toxicité des SPIOs n'est constatée. En l'absence de SPIOs, une nette diminution de l'activité mitochondriale dans les cellules différenciées (induites par le TGF-β1) en comparaison avec les cellules indifférenciées (ITS) est remarquée à 28 jours.

Ceci confirme l'effet chondro-inducteur du TGF-β1 qui favorise la différenciation cellulaire aux dépens de la prolifération. En revanche, les SPIOs n'altèrent pas la viabilité cellulaire, mais empêche la diminution de l'activité mitochondriale induite normalement par le TGF-β1 lors de la différenciation. En effet, dès la concentration de 12,5 µg Fe/mL nous n'avons plus de différences significatives entre l'activité mitochondriale des cellules différenciées et celles des cellules indifférenciées.

L'étude de l'expression des gènes d'intérêt du cartilage par RT-PCR quantitative confirme que le TGF-β1 induit bien la chondrogenèse des CSM [173]. En effet, l'augmentation de l'expression des gènes du collagène II, de Sox 9, de la COMP et de l'agrécane prouve l'effet chondro-inducteur du TGF-β1. De plus, les marqueurs ostéogéniques (ostéocalcine et phosphatase alcaline) sont peu ou pas exprimés prouvant ainsi que les CSM ne se sont pas différenciées au-delà du stade chondrocytaire. Pour les cellules indifférenciées après 28 jours de culture (témoin négatif = ITS 1%), l'expression des gènes d'intérêt du cartilage est très faible. En effet, l'ITS n'est absolument pas un supplément chondrogénique contrairement au TGF-β1.



L'internalisation des SPIOs dans ces cellules indifférenciées n'induit pas de modifications de l'expression des gènes étudiés. En revanche, elle induit une inhibition dose-dépendante des gènes spécifiques du cartilage lorsque la différenciation chondrogénique a été induite par le TGF- $\beta$ 1 (témoin positif = cellules différenciées). En effet, le marquage réduit significativement l'expression des gènes de l'agrécane, de Sox9 et de la COMP à partir de 25  $\mu$ g Fe/mL, tandis que l'effet chondro-inducteur du TGF- $\beta$ 1 reste significatif jusqu'à 50  $\mu$ g Fe/mL pour le collagène II total. Ces résultats laissent présager qu'une faible dose de SPIOs, telles que les concentrations de 12,5 et 25  $\mu$ g Fe/mL, pourraient être utilisées pour tracer les CSM *in vivo*, une fois le biomatériau implanté, sans pour autant induire une inhibition majeure de la chondrogenèse.

Afin de compléter les résultats obtenus en biologie moléculaire, attestant d'une inhibition dose-dépendante de la chondrogenèse par les SPIOs, des analyses histologiques et immunohistochimiques se sont avérées nécessaires. Dans le but de confirmer l'effet dose-dépendant des SPIOs observé en biologie moléculaire, il est indispensable de pouvoir détecter les particules de fer dans l'éponge de collagène et ainsi associer leur présence à différentes concentrations avec leur action chondro-inhibitrice. La coloration de Perls nous a permis de rendre compte d'une parfaite internalisation des particules au sein des cellules en monocouche, qui est dépendante de la concentration utilisée, et surtout d'une conservation lors du passage en système 3D du marquage.

A l'intérieur du biomatériau, les SPIOs paraissent moins bien réparties à partir d'une concentration de 50  $\mu$ g/mL avec une densité supérieure en périphérie de l'éponge. Ce phénomène n'est pas lié à un ensemencement initial hétérogène mais plutôt à une organisation particulière des cellules au cours du processus de différenciation chondrogénique, à l'instar de ce qui est observé sur le cartilage articulaire. Cette hypothèse est confortée par l'observation d'éponges dès le premier jour après l'ensemencement (répartition parfaitement homogène) jusqu'à 28 jours de culture avec du TGF- $\beta$ 1 (répartition des cellules plus périphériques).

L'apport de TGF- $\beta$ 1 dans le milieu de culture est essentiel à la synthèse de constituants matriciels du cartilage hyalin, tels que les protéoglycannes (coloration au bleu Alcian) et les collagènes (coloration au rouge Sirius). L'analyse immunohistochimique montre également la présence de collagène de type II au sein des éponges contenant les cellules différenciées (TGF- $\beta$ 1). L'effet des SPIOs sur la chondro-induction tend à conforter les résultats d'expression de gènes du cartilage, à savoir une légère diminution du contenu en protéoglycannes et en collagène de type II dès les plus faibles concentrations qui s'intensifient à partir de 50  $\mu$ g Fe/mL. Cependant cet effet des SPIOs sur la qualité de la matrice synthétisée n'exclut en rien l'utilisation de faibles doses (12,5 et 25  $\mu$ g Fe/mL) puisqu'à ces concentrations sa qualité paraît largement acceptable.

Actuellement de nombreuses études sont disponibles dans la littérature sur l'effet des particules d'oxyde de fer superparamagnétiques sur la chondrogenèse et présentent des résultats contradictoires. Nos résultats confirment ceux obtenus par Kostura qui démontrent l'effet inhibiteur d'une concentration de 25  $\mu$ g Fe/mL des SPIOs sur la chondrogenèse des CSM se traduisant par une diminution du contenu en protéoglycannes et en collagène II [301]. Pour lui, les potentialités de différenciation en adipocytes ou en ostéoblastes ne sont pas affectées par le marquage. Aucun résultat avec d'autres concentrations de SPIOs n'est présenté mais l'auteur précise que cette inhibition de la chondrogenèse est dose-dépendante.

D'autres groupes ont publié des résultats divergents, les SPIOs n'affectant pas les capacités de différenciation des CSM d'origine diverse. Arbab et Jing, respectivement en 2004-2005 et 2008, ont testé une concentration de 50  $\mu$ g Fe/ml et n'ont remarqué aucun effet

des particules de fer sur la différenciation chondrogénique de CSM ostéomédullaires [302, 303, 355]. Farrell *et coll.*, en 2008, ont obtenu des résultats similaires avec une concentration de 6,25 µg Fe/ml [298]. Or, dans notre étude, la plus faible concentration testée était de 12,5 µg Fe/ml ayant un effet inhibiteur de la différenciation léger par rapport aux concentrations plus élevées. Il semble donc légitime que Farrell n'ait pas observé d'effet inhibiteur des SPIOs sur la chondrogenèse des CSM. Le même groupe a également analysé l'impact des particules de fer sur le comportement de chondrocytes humains différenciés par deux passages. Les potentialités chondrogéniques des chondrocytes ne semblaient pas perturbées par l'addition de concentrations de SPIOs comprises entre 0 et 168,75 µg Fe/ml [298]. Cependant, le chondrocyte est une cellule hautement différenciée contrairement aux CSM. Bien que différenciés par 2 passages, le niveau de différenciation des chondrocytes n'est pas équivalent à celui des CSM. Le niveau d'expression des gènes spécifiques du cartilage est réduit mais demeure supérieur à celui retrouvé pour les CSM.

Récemment, Saha a analysé l'effet de l'incorporation des SPIOs sur différentes lignées cellulaires (CSM ostéomédullaires adultes, chondrocytes humains adultes et chondrocytes humains néonataux) à différents temps [360]. En accord avec la littérature, les cellules présentaient une bonne viabilité après addition de SPIOs. L'expression génique de Sox9 et du collagène II était diminuée au cours du temps alors que l'expression de l'agrécane demeurait inchangée. Le profil d'expression des gènes précédents apparaissait totalement opposé pour les chondrocytes néonataux.

Le choix des SPIOs testées est également déterminant. En effet, des Chitosan-SPIO n'induisent pas d'inhibition de l'ensemble des voies de différenciation alors que les SPIOs Resovist® n'ont pas d'effet sur la différenciation ostéogénique ou adipogénique mais font preuve d'un fort impact inhibiteur sur la différenciation chondrogénique des CSM ostéomédullaires humaines [304]. En 2008, Heymer avait également démontré que des VSOPs (Very Small superparamagnetic iron Oxide Particles) n'avaient aucune influence sur la viabilité, la prolifération ou le potentiel de différenciation des CSM humaines vers les voies adipogénique, chondrogénique et ostéogénique [294].

La comparaison des résultats de la littérature est une tâche complexe du fait de la diversité des protocoles mis en place par les différentes équipes reposant sur des types cellulaires différents (CSM, chondrocytes, ...) d'origines différentes (CSM ostéomédullaires, adipocytaires...) provenant d'espèces variées (Homme, rat, etc) cultivés dans des systèmes tridimensionnels divers (gel d'alginate, éponges, pellets) et utilisant des inducteurs chondrogéniques différents (TGF-β, BMP).

---

## 6. Conclusion

En conclusion, les résultats obtenus à l'issue de cette étude démontrent qu'il est possible de marquer les CSM par les SPIOs avec de faibles concentrations (12,5µg Fe/mL ou 25 µg Fe/mL) et d'utiliser la PLL comme agent de transfection sans modifier la viabilité, la prolifération et en limitant le risque d'inhibition de la chondrogenèse des CSM par les particules de fer superparamagnétiques (plus marquée avec les fortes concentrations de SPIOs testées). Ceci laisse la possibilité de les utiliser en ingénierie du cartilage à de faibles doses. L'étape suivante va donc être d'évaluer *in vivo* le marquage de ces biomatériaux en IRM afin de déterminer si les faibles doses vont pouvoir être détectées en IRM au sein du biomatériau après implantation et si ce marquage va persister suffisamment longtemps pour pouvoir faire un suivi de ces cellules en domaine ostéoarticulaire.

## D. IMPLANTATION HETEROTOPIQUE DES BIOMATERIAUX (SOURIS NUDE)

### 1. Objectifs

Une fois les conditions de culture optimisées pour l'obtention d'un biomatériau fonctionnalisé de qualité, nous l'avons implanté en sous-cutané chez la souris immunodéprimée. Dans les modèles *in vitro*, les conditions de culture sont sous le contrôle de l'expérimentateur, ce qui permet de limiter les apports du milieu environnant et ainsi de réguler le processus de différenciation des cellules à un temps donné. L'implantation *in vivo* s'avère être une étape indispensable afin de suivre le devenir de l'implant en condition physiologique et de s'assurer que l'implant maintient son caractère cartilagineux.

### 2. Matériels et Méthodes

#### a) Préparation des implants fonctionnalisés

Les CSM sont isolées selon le protocole décrit précédemment dans les parties : **IV. Résultats - A.** CSM et chondrogenèse: rôles du site, de l'expansion et de - **3. Matériels et Méthodes - a)** Isolation et expansion des cellules - **(I)** Isolation des CSM de la moelle osseuse.

Après 1 jour d'adaptation au biomatériau, 3 conditions sont testées sur les éponges :

- **ITS 1%** (ITS+premix, BD, France)
- **ITS 1% + TGF- $\beta$ 1** (10ng/mL, Miltenyi Biotec, France)
- **ITS 1% + TGF- $\beta$ 1** (10ng/mL, Miltenyi Biotec, France) + **BMP-2** (100ng/mL, Milteniy Biotec, France) séquentiellement (ITS 1% + TGF- $\beta$ 1 de J1 à J14 puis TS 1% + BMP-2 de J15-28)

Nous avons choisi les conditions **ITS 1% + TGF- $\beta$ 1** (10ng/mL) et **ITS 1% + TGF- $\beta$ 1** (10ng/mL) + **BMP-2** (100ng/mL) car ces deux conditions ont donné les meilleurs résultats concernant la différenciation chondrogénique des CSM dans des expériences précédentes testées par notre équipe.

Les éponges sont cultivées durant 28 jours à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> en condition normoxique.

Une partie des éponges est maintenue en culture *in vitro* pendant 1 et 3 mois dans un milieu contenant 10% SVF afin de tenter de mimer les conditions *in vivo*. L'autre partie des éponges est destinée à l'implantation sous-cutanée chez la souris *nude*. Les cultures *in vitro* seront arrêtées en parallèle des sacrifices des souris.

#### b) Implantation ectopique chez la souris nude

Les souris *nude* de souche NMRI *nude* immunodéficientes (RjOrl : NMRI-Foxn1nu/Foxn1<sup>nu</sup> ; Janvier, France), femelle, de 7 semaines (6 semaines + 1 semaine d'acclimatation), sont anesthésiées à l'aide d'un mélange kétamine à 50 mg/kg IP

(Imalgène500®, Merial, France) - acépromazine à 1 mg/kg IP (Vetranquil®, solution injectable 1%, Ceva Santé Animale, France), mélange administré par injection intra-péritonéale à raison de 1 mL/kg. Chaque groupe contient 2 souris et 3 biomatériaux fonctionnalisés sont implantés par souris. Deux incisions d'environ 8 mm au niveau de chaque flanc et une au niveau de la nuque sont réalisées. L'implant fonctionnalisé est inséré en sous-cutané et les plaies sont suturées à l'aide de fils néoprène 5.0 (Ethicon, France). Les souris sont sacrifiées après 1 mois, 2 mois et 3 mois et les implants sont récupérés pour effectuer les analyses histologiques et immunohistochimiques. En parallèle, les implants fonctionnalisés sont cultivés *in vitro*.

Les animaux ont été répartis selon 3 groupes :

- 1) Animaux implantés avec des éponges de collagène fonctionnalisées avec des CSM non différenciées cultivées 28 jours avec un milieu contenant de l'**ITS 1%**.
- 2) Animaux implantés avec des implants fonctionnalisés avec des CSM et traités durant 28 jours avec du **TGF-β1** (10 ng/mL).
- 3) Animaux implantés avec des implants fonctionnalisés avec des CSM et traités avec du **TGF-β1** (10 ng/mL) de J1 à J14 et avec de la **BMP-2** (100 ng/mL) de J15 à J28.

Les souris sont sacrifiées après 1 mois et 3 mois. Les implants sont récupérés pour effectuer les analyses histologiques et immunohistochimiques. Les cultures *in vitro* sont arrêtées en parallèle.

#### c) *Histologie*

Le protocole d'obtention des lames histologiques est décrit en Annexes.

La coloration réalisée est la suivante :

- **Bleu Alcian (BA)** : Le bleu Alcian colore en bleu les mucopolysaccharides acides.

#### d) *Immunohistochimie*

Le contenu en collagène de type II a été évalué à l'aide d'un marquage immunohistochimique dont le principe est décrit dans la partie Annexes.

### 3. Résultats

Les souris ont été sacrifiées après 1 mois et 3 mois d'implantation sous-cutanée des implants fonctionnalisés. Des éponges dénuées de cellules avaient également été implantées mais ne sont plus retrouvées dans la majorité des cas au delà d'un mois d'implantation sous-cutanée, démontrant la biodégradabilité du biomatériau *in vivo*.

En milieu non chondrogénique (ITS 1%), les CSM non différenciées ne sont pas capables de synthétiser un contenu en protéoglycannes, aucune coloration en bleu Alcian n'étant observée *in vitro* après 1 mois et 3 mois. *In vivo*, le contenu en protéoglycannes était inexistant quel que soit le temps post-implantation. Après 1 mois, les implants apparaissent intacts mais présentent des signes de début de dégradation. Au-delà de ce temps, les éponges présentent de nombreux vaisseaux sanguins et se dégradent davantage. L'analyse immunohistochimique montre que les implants contenant des CSM non différenciées (ITS 1%) ne

contiennent pas de collagène II *in vitro*. En revanche, une fois implantés, les biomatériaux fonctionnalisés présentent un léger contenu en collagène II, à 1 mois (Figure 46).

En présence de TGF- $\beta$ 1, les CSM différenciées synthétisent une matrice riche en protéoglycannes dans l'ensemble des éponges après 1 mois de culture *in vitro*. Après 3 mois, la perte de la synthèse de protéoglycannes est principalement localisée en périphérie des biomatériaux. *In vivo*, les implants contiennent une plus faible quantité de protéoglycannes 1 mois après implantation en périphérie. A ce stade, de légères dégradations sont observées sur les bords de l'implant. Au delà de 1 mois, seules des traces de coloration en bleu Alcian sont retrouvées généralement à proximité des parties altérées.

A 3 mois post-implantation, les implants sont dénués de protéoglycannes et sont plus ou moins détruits en fonction des cas. Une apparition de vaisseaux sanguins au sein de l'implant est également observée à ce stade. L'immunomarquage démontre la présence de collagène II après 1 mois *in vivo* en des proportions variables au sein des implants. La majorité des biomatériaux fonctionnalisés sont également dégradés en périphérie. Après 3 mois, le contenu en collagène II est fortement réduit voire nul. La dégradation de l'implant est aussi fortement avancée (Figure 46).

Dans un milieu chondrogénique différent (TGF- $\beta$ 1 + BMP-2), les CSM synthétisent une matrice abondante, riche en protéoglycannes quelque soit le temps de culture *in vitro*. Après 1 mois d'implantation sous-cutanée, il existe une synthèse de protéoglycannes irrégulière dans l'éponge. Aucune coloration en bleu Alcian n'est retrouvée après 3 mois et la totalité de l'implant est dégradée après 3 mois. Les éponges cultivées *in vitro* dévoilent une large synthèse de collagène de type II pour tous les temps de culture. Les résultats observés à 1 mois *in vivo* sont contrastés puisque la moitié des prélèvements présentent un marquage positif au collagène II alors que l'autre moitié est dénuée de marquage. En revanche, au-delà de 1 mois, aucun contenu en collagène II n'est détecté dans les implants qui sont parallèlement fortement dégradés (Figure 46).

---

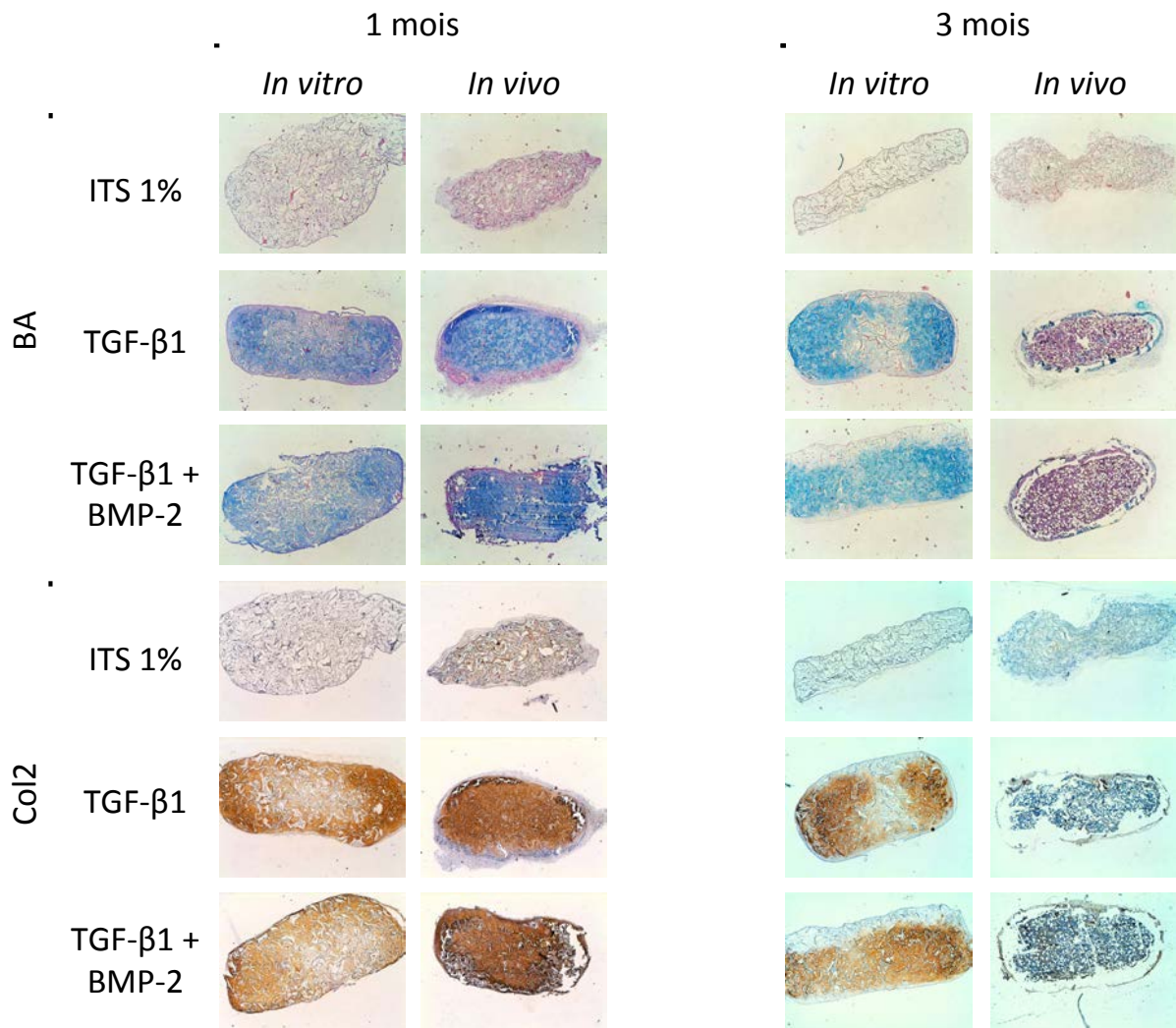
#### 4. Discussion

En ingénierie du cartilage, différents modèles animaux ont été et sont toujours étudiés afin d'évaluer les propriétés biochimiques et biomécaniques des techniques de réparation du cartilage [361]. Dans un premier temps, les modèles ectopiques utilisant des souris immunodéprimées ont été communément établis pour étudier la qualité du tissu de réparation obtenu par ingénierie tissulaire en condition physiologique.

Nos résultats montrent que les implants se dégradent au cours du temps après leur implantation sous-cutanée et qu'ils ne sont pas capables de maintenir un phénotype chondrogénique en site ectopique. Nous avons remarqué l'apparition de nombreux vaisseaux sanguins au sein de l'implant avec une possible ossification des biomatériaux implantés. Ce phénomène a été préalablement documenté dans la littérature. En effet, des CSM dérivées de la membrane synoviale, dont la différenciation chondrogénique avait été induite, avaient échoué à former un cartilage stable après avoir été implantées chez la souris *nude* en intramusculaire et en sous-cutané alors que ces cellules produisaient une matrice riche en protéoglycannes et en collagène de type II *in vitro* [362, 363].

Peltari a également publié que des micromasses à base de CSM ostéomédullaires humaines possédant un phénotype cartilagineux avant implantation se calcifiaient et présentaient des signes d'invasion vasculaire après implantation sous-cutanée chez des souris

SCID [364]. En 2007, un autre groupe a démontré que l'utilisation d'ultrasons de faible intensité pouvait induire une chondrogenèse ectopique sous-cutanée des CSM après 4 semaines d'implantation mais le néocartilage ainsi formé s'ossifiait après 6 semaines post-implantation [365].



**Figure 46.** Analyses histologiques (BA : Bleu Alcian) et immunohistochimiques (Col2 : Collagène II) des implants fonctionnalisés (éponges de collagèneensemencées avec des CSM ostéomédullaires humaines) après 1 mois et 3 mois de culture *in vitro* et *in vivo*. La coloration en bleu Alcian (BA) met en évidence la présence de glycosaminoglycannes au sein de l'implant. En condition non chondrogénique (ITS 1%), Les implants ne contiennent pas de GAGs après 1 ou 3 mois de culture *in vitro* et d'implantation sous-cutanée chez la souris nude. Les CSM synthétisent une matrice riche en GAGs *in vitro* en condition chondrogénique (TGF-β1 et TGF-β1 + BMP-2) et *in vivo*, les cellules sont toujours capables de produire des GAGs après 1 mois alors qu'après 3 mois, les implants sont dépourvus de GAGs. L'immunomarquage du collagène II met en évidence l'absence de marquage en condition ITS 1% et un marquage abondant en condition chondrogénique *in vitro* après 1 et 3 mois et *in vivo* après 1 mois d'implantation. Après 3 mois d'implantaion, la synthèse de collagène II dans l'implant est nulle.

Quelques équipes ont cependant réussi à obtenir des implants dont la chondrogenèse demeurerait stable *in vivo* en site ectopique. Des CSM adipeuses humaines transfectées avec le gène du TGF- $\beta$ 2 humain et cultivées dans des structures d'alginate et PLGA/Alginate (PLGA : copolymère d'Acide Lactique et d'Acide Glycolique) formaient des tissus riches en protéoglycannes et en collagène II *in vivo* après 1 et 3 mois post-implantation. En revanche, les implants à base de PLGA seul et de CSM ne présentaient pas de coloration en bleu Alcian (contenu en GAGs) ni de marquage positif pour le collagène II [214].

Liu, dans une étude similaire à celle menée par Deponi sur les chondrocytes, a confirmé l'influence du temps de différenciation chondrogénique des CSM humaines *in vitro* sur la stabilité du néocartilage issu de l'ingénierie tissulaire *in vivo*. A des temps inférieurs ou égaux à 2 mois de culture *in vitro*, le cartilage formé par induction chondrogénique des CSM par du TGF- $\beta$ 1 s'ossifiait après implantation *in vivo* alors que des structures cartilagineuses stables étaient maintenues 6 mois après implantation ectopique si les implants fonctionnalisés avaient été cultivés 3 mois *in vitro* [366].

De nombreuses publications ont démontré que des chondrocytes matures préalablement différenciés *in vitro* dans une structure 3D gardaient leur phénotype cartilagineux stable après implantation sous-cutanée. En 2005, Moretti *et coll.* ont montré que leurs implants à base d'acide hyaluronique contenant des chondrocytes humains, dont la différenciation a été induite pendant 14 jours par addition de TGF- $\beta$ 1, présentaient de larges zones composées de GAGs et de collagène II après 3 semaines d'implantation sous-cutanée et davantage après 6 et 8 semaines [213]. Une autre équipe a également démontré la possibilité de former un tissu cartilagineux stable *in vivo* en site ectopique en implantant des biomatériaux à base de PLLA (Porous Poly-L-Lactique Acid) ensemencés avec des chondrocytes de lapins après 3 mois [367].

Plus récemment, Deponi *et coll.* ont réalisé une étude sur l'importance le temps de culture *in vitro* sur les capacités de synthèse d'un néotissu de type cartilagineux et pour le maintien du phénotype cartilagineux *in vivo* en site ectopique. Dans leurs conditions et avec leur type d'implants (chondrocytes porcins dans un biomatériau à base de fibrine), un temps de culture *in vitro* d'une semaine semble optimal afin d'obtenir, en sous-cutané chez la souris *nude*, un tissu de morphologie similaire au cartilage natif [215]. Un tissu cartilagineux de type hyalin a été également mis en évidence chez un hôte immunocompétent (lapin) après implantation sous-cutanée d'un biomatériau fonctionnalisé à base d'hydrogel de collagène et de chondrocytes allogéniques [368].

Ces résultats diffèrent de ceux que nous avons obtenus avec des CSM. Cela peut être attribué au fait que les chondrocytes dans ces études ont été utilisés passage précoce (P1 ou P2), conservent donc leur phénotype différencié et sont donc capables de produire un tissu cartilagineux stable en site ectopique, contrairement au CSM qui n'atteignent certainement pas un niveau de différenciation comparable aux chondrocytes natifs.

L'hétérogénéité des résultats référencés dans la littérature prouve que la nature du biomatériau et l'origine tissulaire des cellules utilisés revêtent une importance particulière dans la formation d'un tissu cartilagineux stable *in vivo*. Bien que le chondrocyte semble s'imposer comme meilleur contingent cellulaire pour la conception et le maintien d'un tissu cartilagineux en site ectopique, certaines études ont mis en évidence la capacité des CSM à maintenir un phénotype chondrogénique après implantation. Dans ce processus, le temps d'induction de la différenciation chondrogénique *in vitro* apparaît comme un facteur clé dans le maintien d'un phénotype cartilagineux *in vivo* en site ectopique.

La dérive phénotypique des CSM observée dans la majorité des cas *in vivo* suggère que l'étape d'induction chondrogénique n'a pas abouti à une différenciation complète des CSM. Les CSM tendraient alors à perdre leur phénotype différencié après implantation au sein d'une niche non adaptée. Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que des chondrocytes dédifférenciés peuvent seulement former un tissu fibreux dans un environnement sous-cutané en raison de la perte de leur phénotype avant implantation [369]. De plus, le cartilage natif est un tissu avasculaire donc dans un environnement majoritairement dépourvu en oxygène.

Les CSM différenciées maintiendraient alors un phénotype partiellement indifférencié et, avec l'apport de facteurs et signaux sous-cutanés, s'orienteraient vers un autre phénotype. L'invasion vasculaire est une des étapes cruciales de l'ossification endochondrale durant la formation des os longs [370, 371]. Le cartilage mature peut également être ossifié après l'apparition d'une néovascularisation durant l'arthrose [372]. Le tissu sous-cutané étant richement vascularisé, l'environnement est donc propice à l'apport de facteurs favorisant l'apparition d'une néo-vascularisation au sein de l'implant obtenu par ingénierie tissulaire.

---

## 5. Conclusion

L'étape d'implantation d'un implant fonctionnalisé issu de l'ingénierie tissulaire dans un modèle animal est indispensable pour déterminer le devenir de cet implant dans l'organisme. L'obtention d'un implant présentant, *in vitro*, les caractéristiques du cartilage natif ne constitue en aucun cas la garantie du maintien de ce phénotype *in vivo*. Alors que les CSM donnent des résultats contrastés, l'ingénierie du cartilage à base de chondrocytes matures donne de meilleurs résultats lors de l'implantation en site ectopique, les implants fonctionnalisés à base de CSM donnent des résultats contrastés.

La nature du biomatériau, l'origine des CSM, le type d'induction de leur différenciation mais également le temps d'induction de la différenciation *in vitro* apparaissent comme des facteurs clés pour assurer le maintien d'un phénotype cartilagineux une fois effectuée l'implantation dans l'organisme. L'apparition d'une vascularisation ainsi que de calcifications au sein de l'implant se solde par l'échec de l'obtention d'un tissu cartilagineux stable, les implants dérivant vers un phénotype osseux.

Au vu de ces résultats, nous avons avancé l'hypothèse que si les implants étaient placés dans un environnement hypoxique se rapprochant des conditions physiologiques du cartilage, il serait possible de maintenir le phénotype chondrogénique des implants ou du moins de retarder cette dérive phénotypique et l'invasion vasculaire. Nous avons décidé d'enrober les implants avec un gel d'alginate à 4% afin de reproduire un environnement hypoxique (le cartilage natif étant en hypoxie) et ainsi limiter l'envahissement de l'implant par les vaisseaux sanguins.



## E. ENCAPSULATION EN ALGINATE DES IMPLANTS HETEROTOPIQUES (SOURIS NUDE)

### 1. Objectifs

L'échec du maintien de la différenciation chondrogénique des CSM au sein de l'implant et la probable dérive phénotypique vers un tissu de type osseux sont sans doute dus à l'environnement normoxique. En effet, si les implants étaient en quelque sorte « isolés » de l'environnement sous-cutané et donc placés dans un environnement hypoxique. Cela permettrait de limiter, voire d'inhiber la perte du phénotype chondrogénique des CSM une fois implantés dans l'organisme. Afin de valider cette hypothèse, nous avons choisi d'enrober les implants avec un gel d'alginate avant de les implanter en sous-cutané chez la souris *nude* et d'évaluer la qualité de la synthèse matricielle par analyses histologiques et immunohistochimiques.

### 2. Matériels et Méthodes

#### a) Préparation des implants fonctionnalisés

Les CSM sont isolées selon le protocole décrit précédemment dans les parties : **IV. Résultats - A.** CSM et chondrogenèse: rôles du site, de l'expansion et de - **3. Matériels et Méthodes - a)** Isolation et expansion des cellules - **(I)** Isolation des CSM de la moelle osseuse.

Comme précédemment, les éponges sont cultivées pendant 28 jours à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> en condition normoxique.

Les éponges sont ensuite réparties en 2 lots :

- **Eponges non enrobées:** décrit dans la partie Matériels et Méthodes du chapitre précédent.
- **Eponges enrobées d'alginate :** les éponges sont enrobées d'un gel d'alginate à 4% (Sigma, France).

La moitié des éponges de chaque lot est destinée à l'implantation sous-cutanée chez la souris *nude*. L'autre partie des éponges des 2 lots est maintenue en culture *in vitro* pendant 1, 2 et 3 mois dans un milieu contenant 10% SVF. Les cultures *in vitro* seront arrêtées aux mêmes temps que les cultures *in vivo*.

#### b) Implantation ectopique chez la souris nude

Les souris nude de souche NMRI nude immunodéficiente (RjOrl : NMRI-Foxn1nu/Foxn1<sup>nu</sup> ; Laboratoires Janvier, France), femelle, de 7 semaines (6 semaines + 1 semaine d'acclimatation), sont anesthésiées à l'aide d'un mélange kétamine à 50 mg/kg IP (Imalgène500®, Merial, France) - acépromazine à 1 mg/kg IP (Vetranquil®, solution injectable 1%, Ceva Santé Animale, France), mélange administré par injection intra-péritonéale à raison de 1 mL/kg. Chaque groupe contient 2 souris. Deux incisions d'environ

8 mm au niveau de chaque flanc et une au niveau de la nuque sont réalisées. Un implant fonctionnalisé est inséré en sous-cutané et les plaies sont suturées à l'aide de fils néoprène 5.0 (Ethicon, France).

Les animaux ont été répartis selon 6 groupes :

<b>Eponges non enrobées</b>	<b>Eponges enrobées d'alginate</b>
<p><b>Groupe 1</b></p> <p>Animaux greffés avec les implants cultivés <i>in vitro</i> dans un milieu ITS 1%</p>	<p><b>Groupe 2</b></p> <p>Animaux greffés avec les implants cultivés <i>in vitro</i> dans un milieu ITS 1%</p>
<p><b>Groupe 3</b></p> <p>Animaux greffés avec les implants cultivés <i>in vitro</i> dans un milieu ITS 1% + TGF-β1 (10ng/mL)</p>	<p><b>Groupe 4</b></p> <p>Animaux greffés avec les implants cultivés <i>in vitro</i> dans un milieu ITS 1% + TGF-β1 (10ng/mL)</p>
<p><b>Groupe 5</b></p> <p>Animaux greffés avec les implants cultivés <i>in vitro</i> dans un milieu ITS 1% + TGF-β1 (10 ng/mL) (J3-J14) + BMP-2 (100ng/mL) (J15-J28)</p>	<p><b>Groupe 6</b></p> <p>Animaux greffés avec les implants cultivés <i>in vitro</i> dans un milieu ITS 1% + TGF-β1 (10 ng/mL) (J3-J14) + BMP-2 (100ng/mL) (J15-J28)</p>

Les souris sont sacrifiées après 1 mois, 2 mois et 3 mois et les implants récupérés pour effectuer les analyses histologiques et immunohistologiques.

### c) Histologie

Les différentes colorations réalisées décrites en annexes sont les suivantes :

- **Bleu Alcian (BA)** : Le bleu Alcian colore en bleu les mucopolysaccharides acides.
- **Rouge Alizarine (RA)** : Cette coloration met en évidence les dépôts calciques.

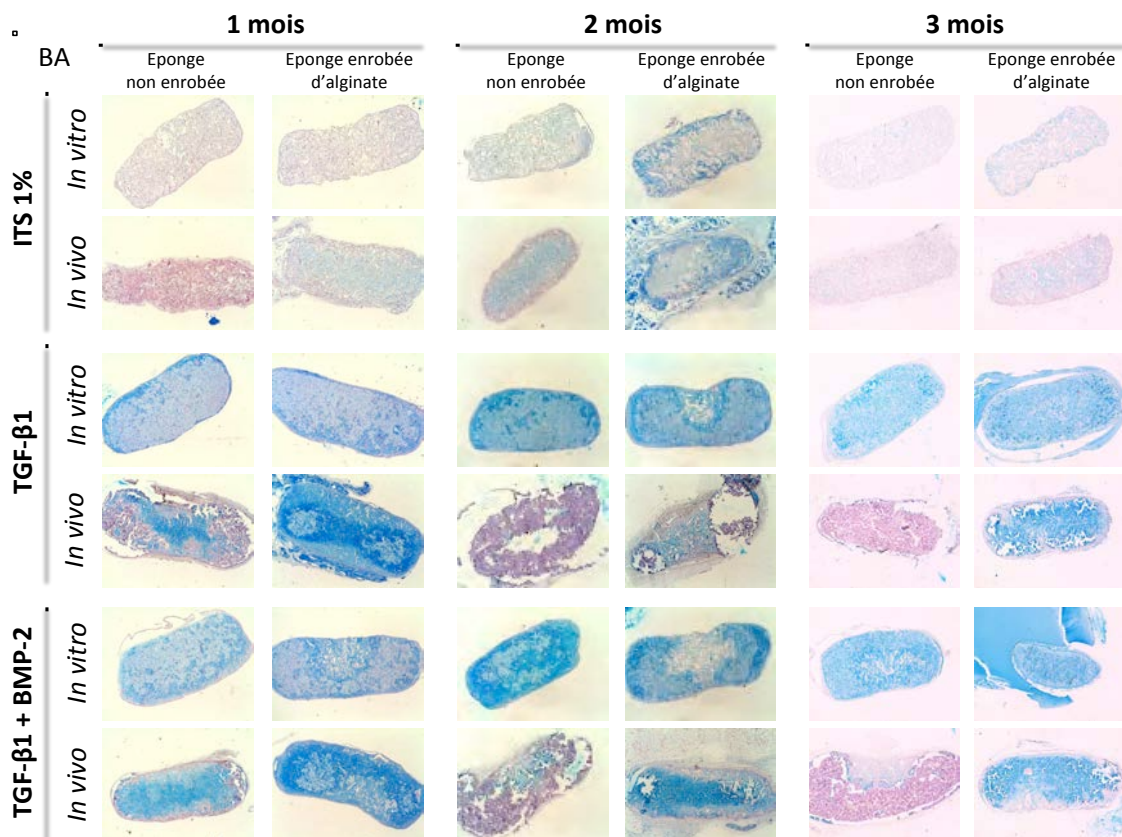
### d) Immunohistochimie

Le contenu en collagène de type II a été évalué à l'aide d'un marquage immunohistochimique dont le principe est décrit dans la partie Annexes.

## 3. Résultats

Les souris ont donc été sacrifiées 1 mois, 2 mois et 3 mois après l'implantation. Des éponges dénuées de cellules avaient également été implantées mais ne sont plus retrouvées dans la majorité des cas après 2 mois et 3 mois post-implantation, démontrant la biodégradabilité du biomatériau *in vivo* (Résultats non présentés).

En condition ITS 1%, le contenu en protéoglycannes et en collagène de type II est inexistant ou très faible après 1 mois *in vitro* et *in vivo*, que les éponges soient entourées ou non d'alginate. Aucun dépôt calcique n'est observé (Figure 49). Après 2 mois d'implantation, les éponges non enrobées en condition *in vitro*, ne présentent pas de coloration en bleu Alcian alors que cette coloration est accentuée mais faible dans les éponges entourées d'alginate. Un léger contenu en protéoglycannes est également observé *in vivo* pour les deux groupes de biomatériau (Figure 47). La présence de collagène II est observée, à ce stade, uniquement dans les éponges entourées d'alginate ayant été implantées chez la souris (Figure 48). De rares dépôts calciques apparaissent dans les deux groupes d'éponges tant lors de la culture *in vitro* que de la greffe *in vivo* (Figure 49). A 3 mois, les CSM humaines indifférenciées produisent une matrice dépourvue de protéoglycannes et de collagène II en règle générale (Figure 47). Seules les éponges non enrobées implantées chez les souris présentent un faible marquage en immunohistochimie (Figure 48). Quelques dépôts calciques sont mis en évidence par la coloration rouge alizarine à 3 mois pour tous les groupes (Figure 49).



**Figure 47.** Analyses histologiques (BA : Bleu Alcian) des implants fonctionnalisés (éponges de collagène ensemencées avec des CSM ostéomédullaires humaines) après 1 mois et 3 mois de culture enrobée ou non *in vitro* et *in vivo*. La coloration bleu Alcian met en évidence la présence de glycosaminoglycannes sulfatés composant les protéoglycannes. Le contenu en protéoglycannes est faible voire inexistant en milieu non chondrogénique quelles que soient les conditions et les temps de culture. En présence de TGF- $\beta$ 1, les éponges cultivées *in vitro* sont remplies d'une matrice abondante riche en protéoglycannes, que les éponges soient entourées ou non d'alginate. *In vivo*, les implants présentent des signes de dégradation et une synthèse en protéoglycannes réduite ou nulle, en particulier lorsque les éponges ne sont pas entourées d'alginate. L'association TGF- $\beta$ 1 et BMP-2 permet une production de protéoglycannes *in vitro* équivalente à celle obtenue avec le TGF- $\beta$ 1 seul. Tout comme avec le TGF- $\beta$ 1 seul, l'alginate retarde le processus de dégradation et de limiter la perte de protéoglycannes.

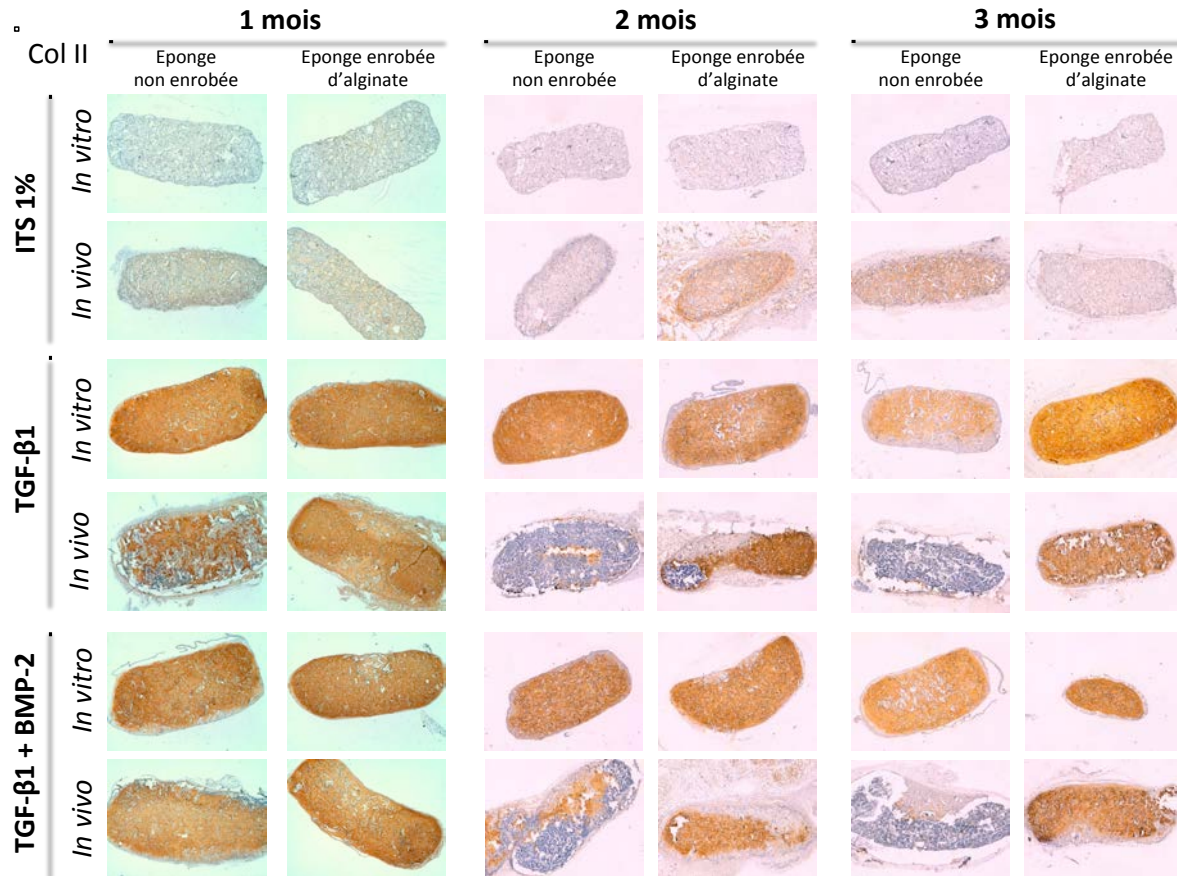
Avec ajout de TGF- $\beta$ 1, les implants fonctionnalisés entourés ou non d'alginate contiennent une matrice riche en protéoglycannes et en collagène II après 1 mois, 2 mois et 3 mois de culture *in vitro* (Figure 47, Figure 48). En revanche, *in vivo*, le contenu en protéoglycannes des éponges seules est fortement réduit dès le premier mois. Après 2 et 3 mois, ces implants ne présentent aucune coloration en bleu Alcian attestant d'une perte de synthèse de protéoglycannes par les CSM humaines différenciées par addition de TGF- $\beta$ 1 (Figure 47). Le marquage du collagène II suit le même profil avec un marquage persistant après 1 mois puis une perte du marquage à 2 et 3 mois (Figure 48). La coloration en rouge alizarine permet de mettre en évidence la présence de nombreux dépôts calciques au sein des éponges non entourées d'alginate dès 1 mois post-implantation (Figure 49). Dès le premier mois, une dégradation partielle de l'implant est observée. Au fil du temps, l'implant semblait dériver vers un phénotype osseux.

Après 1 mois *in vivo*, les CSM induites par le TGF- $\beta$ 1 conservent leurs capacités de synthèse d'une matrice riche en protéoglycannes et en collagène II lorsque l'implant est entouré du gel. En revanche, au-delà d'un mois, les implants présentent une réduction du contenu en protéoglycannes et en collagène de type II mais la présence d'alginate permet de retarder la dégradation de l'implant (Figure 47, Figure 48). Le gel d'alginate entourant les éponges permet de limiter l'apparition de dépôts calciques au sein des éponges après 1 mois *in vivo*, par contre, à 2 mois et 3 mois la coloration en rouge alizarine est fortement accentuée et retrouvée dans l'ensemble de l'implant (Figure 49). La dégradation des implants est également moindre au cours du temps lorsqu'ils sont entourés d'alginate.

En présence de TGF- $\beta$ 1 et BMP-2, les CSM différenciées synthétisent une matrice abondante en protéoglycannes et en collagène II lorsque les éponges sont cultivées *in vitro* pendant 1, 2 et 3 mois (Figure 47, Figure 48). La coloration rouge alizarine met en évidence des dépôts calciques localisés principalement en périphérie de l'éponge pour les implants non entourés d'alginate pour les 3 temps de culture et ceux entourés de gel à 1 mois et 2 mois. Après 3 mois de culture *in vitro*, de nombreux dépôts calciques sont localisés dans l'ensemble de l'implant (Figure 49). *In vivo*, les éponges présentent des contenus en protéoglycannes et en collagène II denses et uniformes après 1 mois post-implantation que les implants soient entourés ou non d'alginate (Figure 47, Figure 48).

En revanche, à 1 mois, les éponges contenant les CSM différenciées (TGF- $\beta$ 1 + BMP-2) implantées seules présentent une coloration très marquée en rouge alizarine démontrant la présence de dépôts calciques dans l'ensemble de l'éponge alors qu'un nombre moins important de dépôts calciques est observé lorsque les éponges sont entourées d'alginate (Figure 49). Au-delà de 1 mois *in vivo*, les CSM différenciées dans les éponges non entourées perdent leurs capacités à synthétiser des protéoglycannes et du collagène II mais de nombreux dépôts calciques sont observés principalement en périphérie de l'implant et au niveau des zones de dégradation de l'éponge.

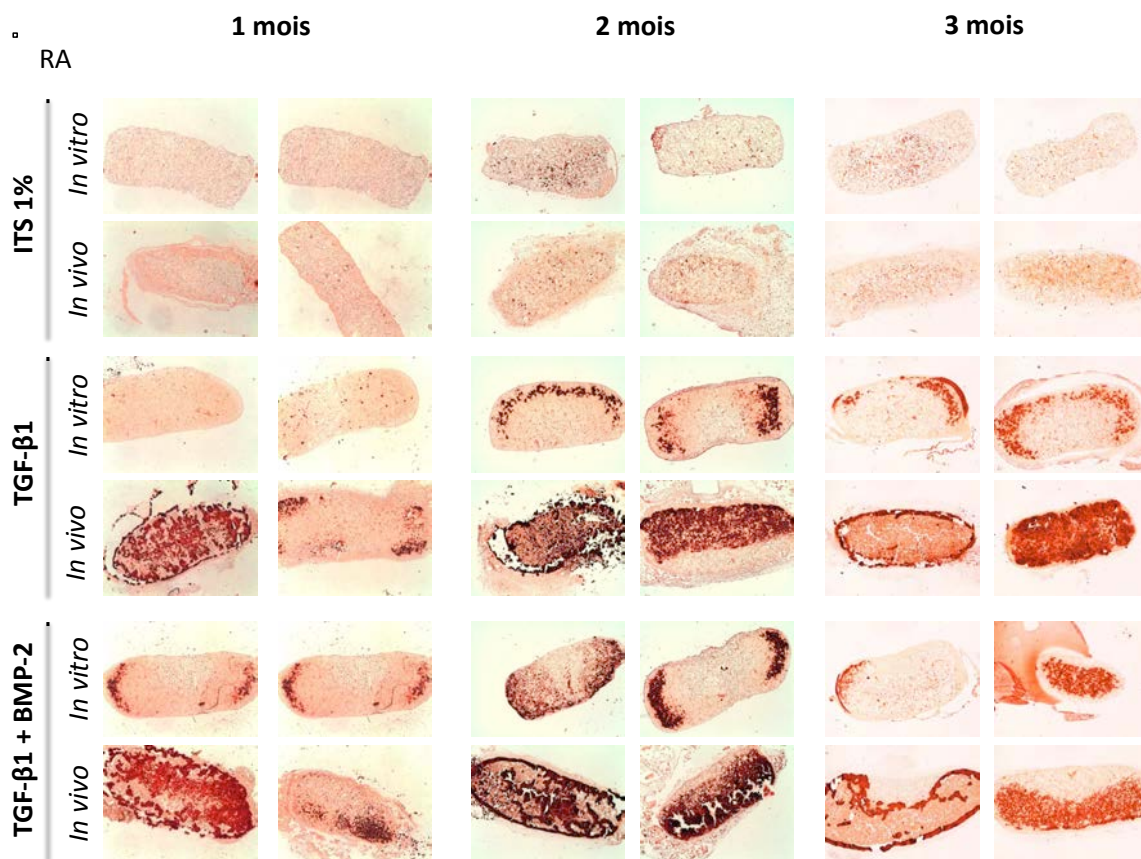
La couche d'alginate ajoutée autour des éponges avant leur implantation permet le maintien de la production de protéoglycannes et de collagène II au sein du biomatériau (Figure 47, Figure 48). Cependant, la synthèse de dépôts calciques est fortement accentuée dans l'ensemble de l'implant présageant une dérive du phénotype vers un phénotype osseux (Figure 49). Tout comme pour les autres conditions, la présence d'alginate autour de l'implant permet de limiter la dégradation de l'implant au cours du temps dans l'organisme.



**Figure 48.** Analyses immunohistochimiques (Col2 : Collagène II) des implants fonctionnalisés (éponges de collagène ensemencées avec des CSM ostéomédullaires humaines) après 1 mois et 3 mois de culture enrobée ou non *in vitro* et *in vivo*. En milieu non chondrogénique (ITS 1%), les CSM non différenciées sont incapables de synthétiser du collagène II *in vitro*. Une légère synthèse est cependant observée *in vivo*. En milieu chondrogénique (TGF-β1 ou TGF-β1 + BMP-2), les implants sont comblés par une matrice riche en collagène II lorsqu'ils sont cultivés *in vitro*. Les implants non entourés d'alginate perdent leur contenu en collagène II et se dégradent fortement *in vivo* dès 1 mois en condition TGF-β1 et à partir de 2 mois en condition TGF-β1 + BMP-2. Dans les 2 cas, l'enrobage d'alginate limite l'ensemble de ces phénomènes.

#### 4. Discussion

Dans cette étude, les résultats ont montré que les éponges non enrobées cultivées *in vitro* et *in vivo* en condition ITS 1%, milieu de base ne permettant pas d'induire une différenciation des CSM, ne présentaient pas une synthèse des composants matriciels du tissu cartilagineux ou en de très faible quantité (protéoglycannes et collagène II). En condition chondrogénique (TGF-β1 et TGF-β1 + BMP-2), les implants contenaient une matrice riche en protéoglycannes et en collagène II *in vitro* même après 3 mois de culture. Comme dans l'expérimentation précédente, les implants non enrobés perdent leur contenu en protéoglycannes et en collagène II et se dégradent rapidement dès le premier mois d'implantation *in vivo* en condition TGF-β1 et après 2 mois en condition TGF-β1 + BMP-2. Ils contiennent également de nombreux vaisseaux sanguins et présentent des signes de calcifications importantes en rouge alizarine.



**Figure 49.** Analyses histologiques (RA : Rouge Alizarine) des implants fonctionnalisés (éponges de collagène ensemencées avec des CSM ostéomédullaires humaines) après 1 mois et 3 mois de culture enrobée ou non *in vitro* et *in vivo*. Cette coloration met en évidence la présence de dépôts calciques. Des calcifications apparaissent au bout de 2 mois pour la condition ITS 1% *in vitro* et *in vivo* et également avec ajout de TGF-β1 *in vitro*. En revanche, des dépôts calciques sont observés dès 1 mois *in vitro* en condition TGF-β1 + BMP-2 et *in vivo* pour les deux conditions (TGF-β1 et TGF-β1 + BMP-2). Les calcifications sont essentiellement retrouvées en périphérie *in vitro* (TGF-β1 et TGF-β1 + BMP-2) alors qu'après implantation chez l'animal, elles ont colonisé l'ensemble de l'éponge. L'enrobage d'alginate retarde l'apparition des dépôts calciques d'environ 1 mois *in vivo*.

En revanche, l'enrobage des implants par un gel d'alginate permet de limiter la dégradation de l'implant et l'apparition d'un caractère osseux du tissu. Il permet également de conserver en partie la synthèse de protéoglycannes et de collagène II pour les conditions TGF-β1 et TGF-β1 + BMP-2. La présence d'alginate ne protège cependant pas l'implant contre l'apparition des dépôts calciques mais retarde tout de même le processus d'apparition de ces calcifications. Ces résultats confirment donc que les CSM dont la différenciation chondrogénique est induite *in vitro* par des facteurs de croissance et un environnement tridimensionnel perdent leurs capacités à maintenir un phénotype chondrogénique en dehors d'une niche appropriée.

L'invasion vasculaire est un phénomène important dans le processus d'ossification et de dégradation du tissu cartilagineux conduisant à une dédifférenciation des CSM et à l'apparition de calcifications au sein des implants. Dans ce mécanisme de vascularisation, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) revêt un rôle essentiel. Le VEGF est connu pour son rôle crucial dans l'ossification endochondrale [373]. L'isoforme A du VEGF (VEGF-A) joue un rôle important dans le processus d'ossification du cartilage issu de l'ingénierie tissulaire utilisant des CSM [374]. Dans l'étude de Liu, en 2008, mentionnée précédemment,

l'expression de VEGF-A était absente des implants quand ces derniers avaient été cultivés durant une période prolongée de 3 mois *in vitro* puis implantés en sous-cutané alors qu'un fort marquage était retrouvé dans les implants à des temps plus courts de culture *in vitro*. L'absence de VEGF-A était corrélée avec une absence de coloration en Azan-Mallory, mettant en évidence la présence de calcifications. Inversement, quand le tissu était ossifié, l'immunomarquage pour le VEGF-A était intensifié [366].

L'apparition d'une néo-vascularisation via l'activation de VEGF-A pourrait être directement liée à la perte du phénotype chondrogénique. Il a été démontré que Sox9, facteur de transcription intervenant dans les stades précoces de la chondrogenèse, était capable de réprimer directement l'expression de VEGF-A en se liant au site SRY du gène du VEGF-A et ainsi agir comme un régulateur négatif majeur de la vascularisation du cartilage [375]. Une autre hypothèse peut être avancée. Les chondrocytes articulaires matures peuvent produire de multiples facteurs anti-angiogéniques tels que la chondromoduline-I, la thrombospondine I ou encore le propeptide N-terminal dérivée du collagène II qui empêcheraient l'apparition de vascularisation au sein du cartilage évitant ainsi l'ossification [376].

Centola et coll ont démontré la possibilité d'inhiber la vascularisation et ainsi d'obtenir un tissu cartilagineux stable *in vivo* par le développement d'un implant délivrant un composant anti-angiogénique [377]. Ceci pourrait expliquer pourquoi les implants à base de chondrocytes peuvent maintenir un phénotype stable dans une niche non chondrogénique. Il est donc raisonnable de supposer que le tissu de type cartilagineux résultant de l'induction chondrogénique de CSM n'est pas assez mature pour produire ces facteurs anti-angiogéniques. Ces informations expliqueraient donc le fait que dans notre étude, l'enrobage de nos implants par un gel d'alginate retarde le « switch » du phénotype cartilagineux vers un phénotype osseux. En effet, l'enrobage ralentit la dédifférenciation puisque les implants contiennent encore des protéoglycannes et du collagène II après 2 mois. En revanche, l'alginate n'est pas complètement imperméable à l'oxygène, car de légères zones dégradées ainsi que des vaisseaux sont retrouvées à la périphérie des éponges. De nombreux dépôts calciques sont également observés au sein des implants.

D'après l'ensemble des travaux recensés dans la littérature, il apparaît nécessaire de réussir à bloquer la différenciation chondrogénique des CSM de façon stable afin d'éviter leur dédifférenciation en site ectopique *in vivo* et ainsi empêcher leur dérive vers un autre phénotype cellulaire, notamment osseux [366, 378].

## 5. Conclusion

La création d'un implant fonctionnalisé de qualité *in vitro* dont les caractéristiques se rapprochent du tissu cartilagineux ne garantit pas le succès du maintien de cette qualité *in vivo*. L'environnement *in vivo* constitue un facteur déterminant dans le maintien ou la dérive du phénotype cartilagineux de l'implant. En sous-cutané, l'implant est placé dans des conditions physiologiques différentes de celles existantes dans le cartilage articulaire. L'apport d'oxygène provenant du tissu sous-cutané constitue un facteur déterminant dans le maintien du phénotype cartilagineux de l'implant. Limiter l'apport en oxygène (par un enrobage de l'implant par exemple) permet de retarder la perte des capacités de synthèse des composants majeurs de la matrice cartilagineuse et limiter l'invasion vasculaire. Afin de tenter de maintenir un tissu cartilagineux stable en site ectopique, les conditions de culture doivent être optimisées en adaptant le temps de culture 3D en milieu chondrogénique *in vitro*, le temps d'implantation *in vivo* ou encore la teneur en oxygène du milieu *in vitro* par exemple.





## F. IMPLANTATION DU BIOMATERIAU EN SITE ARTICULAIRE (RAT NUDE)

### 1. Objectifs

L'implantation *in vivo* est une étape obligatoire dans le processus de vérification de la qualité de l'implant et de son intégration dans l'organisme. Les résultats obtenus lors de l'implantation sous-cutanée ont démontré que notre implant ne conservait pas son phénotype chondrogénique puisqu'au cours du temps il perdait ses capacités à synthétiser les composants essentiels de la matrice cartilagineuse (protéoglycannes et collagène II) et présentait des signes de vascularisation et de calcifications. Cependant, en site ectopique, l'implant n'est pas dans les conditions physiologiques de l'articulation.

C'est pourquoi, il était nécessaire d'implanter notre biomatériau fonctionnalisé à base de CSM différenciées en site articulaire. Nous avons donc réalisé un modèle de lésion focale d'un des condyles fémoraux chez le rat *nude*. La lésion a ensuite été comblée par notre implant. La qualité du tissu de réparation a été évaluée par des analyses histologiques (coloration HES et Safranine O). Une mesure du volume cartilagineux a été réalisée à l'aide d'une séquence 3D haute résolution pondérée T1 sur un IRM haut champs (7 Teslas) chez l'animal vivant anesthésié dans le but de vérifier si la nature du traitement influence le volume du cartilage.

### 2. Matériels et Méthodes

#### a) *Obtention des implants fonctionnalisés*

Les CSM sont isolées selon le protocole décrit précédemment dans les parties : **IV. Résultats - A. CSM et chondrogenèse: rôles du site, de l'expansion et de** - **3. Matériels et Méthodes - a) Isolation et expansion des cellules - (I) Isolation des CSM de la moelle osseuse.**

Après 1 jour d'adaptation au biomatériau, les éponges sont cultivées dans un milieu contenant :

- **ITS 1% + TGF- $\beta$ 1** (10ng/mL, Miltenyi Biotec, France)

Les éponges sont cultivées durant 28 jours à 37°C en atmosphère humide en normoxie.

#### b) *Implantation articulaire chez le rat nude*

Les rats *nude* (Hsd:RH-Foxn1<sup>tmu</sup>, Harlan, France) de 8 semaines (7 semaines + 1 semaine d'acclimatation), sont anesthésiés à l'aide d'un mélange de kétamine 50 mg/kg IP (Imalgène500®, Merial, France) et d'acépromazine 1 mg/kg IP (Vetranquil®, solution injectable 1%, Ceva Santé Animale, France), mélange administré par injection intra-péritonéale à raison de 1 mL/kg. Chaque groupe contient 3 rats.

Le genou est ouvert sur les plans cutané et musculaire. La rotule est luxée. Un forage d'environ 1,3 mm est réalisé sur le condyle fémoral médial à l'aide d'une mini-perceuse. La

taille de l'implant est adaptée à celle de la lésion à l'aide d'un poinçon de 2 mm de diamètre (Biopsy punch, Stiefel, France). L'implant est ensuite inséré dans la lésion. Le plan musculaire est suturé à l'aide de fils résorbables de 3-0 (Vicryl Rapide, Ethicon, France) et le plan cutané à l'aide de fils non résorbables 25 mm (Filapeau, Peters, France).

### *c) Exploration IRM des genoux chez le rat nude vivant anesthésié*

Les rats vivants anesthésiés subissent une exploration IRM sur un imageur dédié petit animal (Brucker, Ettingen, Allemagne) après 7 jours, 14 jours, 28 jours et 120 jours. L'anesthésie est réalisée à l'aide d'isoflurane et maintenue tout au long de l'exploration IRM. L'exploration IRM est effectuée à l'aide d'une antenne 4 canaux spécifiquement développée pour l'acquisition des deux genoux simultanément. Elle permet d'obtenir des images 3D avec une haute résolution spatiale avec une taille de voxel de  $49 \times 49 \times 98 \mu\text{m}^3$  [379].

Afin de pouvoir évaluer le volume cartilagineux, les paramètres d'acquisition optimisés sont les suivants :

- Séquence 3D SPGR haute résolution (high spatial resolution gradient echo fast imaging) avec suppression du signal de la graisse, TR : 50 ms, TE : 3,6 ms, angle de bascule : 25, FOV :  $26 \times 26 \text{ mm}^2$ , matrice de l'image  $512 \times 512$  pixels. Des séquences RARE (Rapid Acquisition with Relaxation-Enhanced) ont été réalisées afin de s'assurer de la position des genoux dans l'antenne et pour aligner les images 3D SPGR HR dans l'axe de flexion antéropostérieur des genoux. Une reconstruction sagittale des données a été choisie car ce plan permet une meilleure visualisation de l'ensemble des compartiments du genou.

### *d) Segmentation fémoro-tibiale*

Les données IRM 3D ont été collectées pour calculer les volumes cartilagineux du fémur et du tibia. Les segmentations ont été faites à l'aide d'un écran interactif tactile dont la matrice est de  $1280 \times 1024$  pixels (Interactive Pen Display PL-720 ; Wacom Europe GmbH, Allemagne). Les traçages manuels et les images qui en découlent ont été réalisés à l'aide du logiciel AMIRA (Amira 6.1 ; Mercury Computer systems SAS, France). Comme pour l'utilisation clinique, l'ensemble du cartilage a été segmenté sur chaque coupe IRM sur lesquelles les bords du cartilage pouvaient être visualisés. Chaque zone segmentée a été attribuée au compartiment cartilagineux correspondant.

### *e) Calcul du volume*

Sur les images (masques) obtenues, une procédure d'intégration est réalisée afin de compter chaque voxel étiqueté. Ce processus donne trois volumes articulaires (fémur, plateau tibial médial et plateau tibial latéral) en multipliant le nombre de voxel étiqueté par les dimensions réelles du voxel (selon le calcul suivant : nombre voxel  $\times 49 \times 49 \times 98 / 1\,000\,000$ ). Une transposition 3D a été obtenue en utilisant également AMIRA pour visualiser les compartiments cartilagineux.

### f) *Histologie*

Les différentes colorations réalisées sont les suivantes :

**Hématoxyline-Erythrosine-Safran (HES)** : coloration trichromique utilisée pour étudier la morphologie et l'aspect des cellules.

**Safranine O (SO) /Fast Green**: La Safranine O colore le cartilage en rouge en mettant précisément en évidence les mucines des mucopolysaccharides acides. Le Fast Green permet de contre-colorer en vert le tissu environnant.

## 3. Résultats

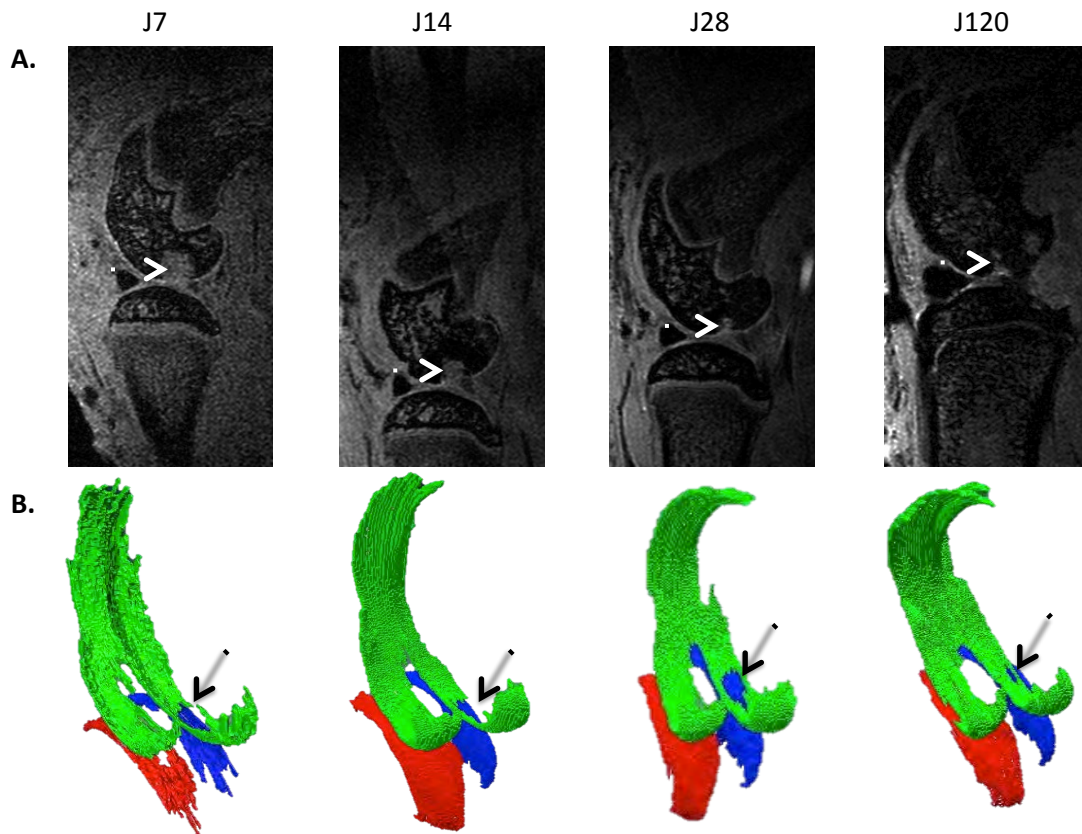
### a) *Acquisition et représentation 3D des genoux*

Les éponges de collagène fonctionnalisées par des CSM ostéomédullaires humaines, dont la différenciation chondrogénique avait été induite par addition de TGF- $\beta$ 1, ont donc été implantées au sein d'une lésion calibrée au niveau du condyle fémoral chez le rat *nude*. Les rats ont été passés en IRM à 7T afin de suivre le tissu de réparation synthétisé au sein de la lésion. Une segmentation du cartilage a été réalisée manuellement afin de mesurer le volume du cartilage et d'obtenir une représentation tridimensionnelle du cartilage de l'animal grâce à une séquence 3D haute définition pondérée en T1(3D SPGR - HR) (Figure 50).

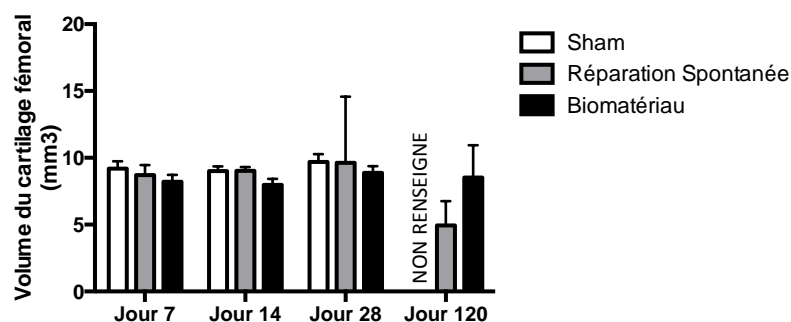
Les images obtenues montrent bien la présence d'une lésion ostéocondrale et son évaluation au cours du temps (Figure 50. A. : flèches blanches) au sein de laquelle nous avons implanté notre biomatériau fonctionnalisé par les CSM humaines différenciées. Au cours du temps, la lésion est comblée par un tissu de réparation puisque le diamètre de cette lésion diminue et un resurfaçage est observé. La région lésée présente un signal plus élevé que le signal observé dans le genou. Le signal du tissu de comblement, plus faible, se rapproche de celui du tissu environnant. Ces observations sont confirmées par les reconstructions 3D obtenues après segmentation manuelle sur les acquisitions 3D haute définition pondérée en T1. Les représentations 3D démontrent également la présence des lésions calibrées réalisées (Figure 50. B. : flèches noires). La taille de cette lésion apparaît réduite au cours du temps et comblée presque totalement par un nouveau tissu après 120 jours d'implantation.

### a) *Mesure du volume du cartilage fémoral*

Le volume du cartilage est calculé à l'aide d'un calcul prenant en compte le volume des voxels composant les parties segmentées image par image du cartilage. (Figure 51) Paradoxalement, aux observations effectuées sur les images IRM et les représentations tridimensionnelles (Figure 50. A. et B.), le volume du cartilage ne varie pas par rapport à la condition contrôle Sham pour laquelle le cartilage n'a subi aucune lésion. En effet, aucune diminution significative du volume du cartilage fémoral n'est notée après la création des lésions. La formation d'un néo-tissu par réparation spontanée ou après implantation de l'implant fonctionnalisé n'induit pas de changement de volume du cartilage fémoral.



**Figure 50.** Acquisitions par IRM à 7T des genoux opérés des rats après 7, 14, 28 et 120 jours d'implantation de l'implant fonctionnalisé à base de CSM ostéomédullaires humaines dont la différenciation a été induite par le TGF- $\beta$ 1. A. Images obtenues à l'aide d'une séquence 3D haute définition pondérée en T1. La lésion calibrée comblée par l'implant fonctionnalisé est visualisable au cours du temps (Flèches blanches). Le diamètre de la lésion diminue dès J14 et un néo-tissu de réparation semble remplir la lésion. Un resurfaçage de cette lésion est également observé au cours du temps. B. Reconstruction 3D du cartilage articulaire des genoux lésés et implantés avec l'éponge fonctionnalisée. Les images ont été obtenues par reconstruction tridimensionnelle après segmentation manuelle du cartilage. Les flèches noires désignent la lésion que nous avons effectuée dont le diamètre est réduit au cours du temps. Comme sur les images en A., les lésions sont comblées par un tissu de réparation.



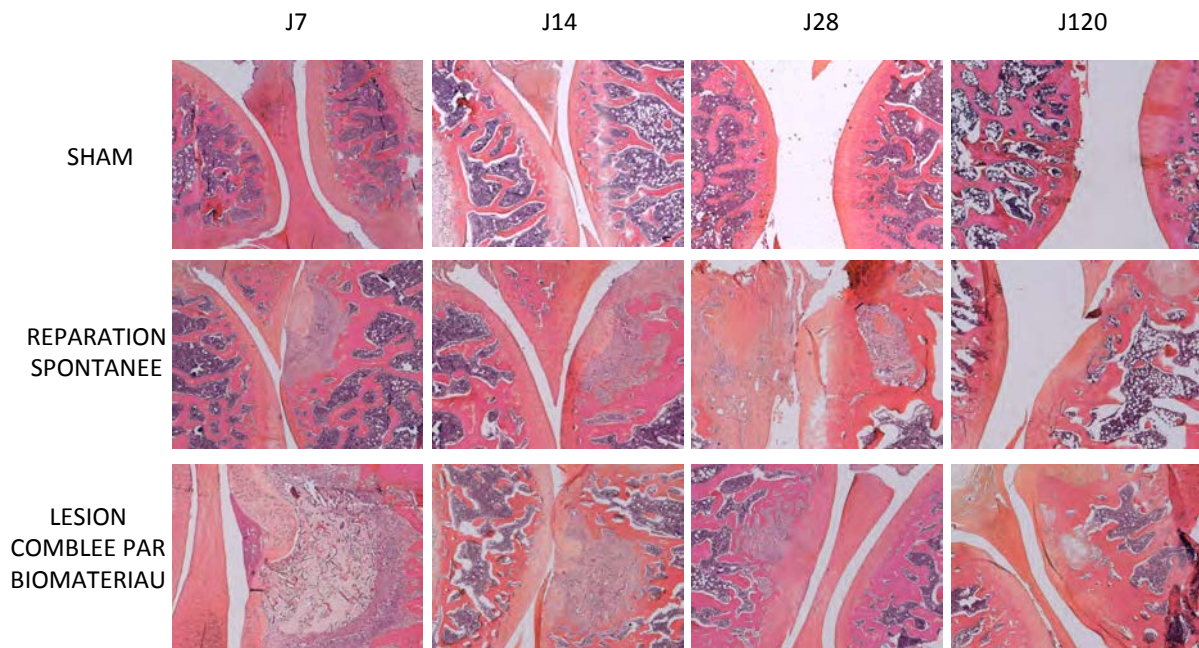
**Figure 51.** Mesure du volume ( $\text{mm}^3$ ) du cartilage articulaire des rats au cours du temps pour chaque condition. Le volume du cartilage ne varie pas de manière significative au cours du temps ni entre les différents groupes (Sham, Réparation spontanée, lésion comblée par le biomatériau). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart-type. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test ANOVA, multiples facteurs, suivi d'un test a posteriori de Bonferroni. \* :  $p < 0,05$ .

*b) Evaluation de la qualité du tissu de réparation*

La coloration HES permet de visualiser l'aspect général ainsi que la cellularité du tissu observé (Figure 52). Le groupe sham présente un cartilage sain, quel que soit le temps d'observation, avec des chondrocytes arrangés en clusters au sein de lacunes. Les cellules sont distribuées parallèlement à la surface puis prennent une disposition en colonne (perpendiculaire à la surface) plus en profondeur.

Pour la condition réparation spontanée, 7 jours après la création de la lésion, nous observons une région dépourvue de tissu cartilagineux au niveau du défaut. Ensuite, la lésion est comblée par un tissu de réparation ne contenant pas de cellules de type chondrocytaire. A partir de J14, le tissu formé en surface de la lésion est de type fibreux présentant des irrégularités de surface et est acellulaire ou très peu cellularisé.

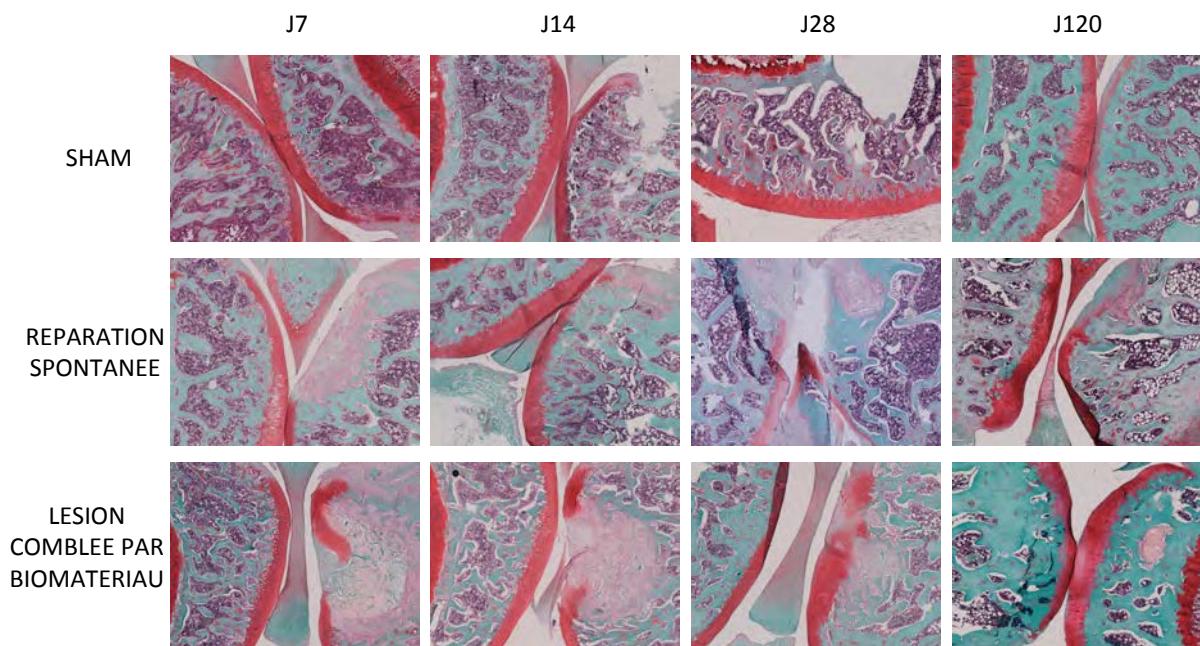
Après implantation de l'implant fonctionnalisé à base de CSM humaines différenciées, le tissu de réparation apparaît fibreux et acellulaire à J7 et J14 et le biomatériau montre de premiers signes d'intégration au tissu environnant et un remodelage osseux et cartilagineux est observé. Après 28 jours et 120 jours d'implantation, le tissu de réparation se réorganise. Il contient de nombreux chondrocytes qui commencent à se disposer en cluster mais dont la distribution est encore anarchique. L'implant s'intègre bien au tissu et se dégrade lentement.



**Figure 52. Coloration en HES des sections de genoux de rats en fonction du temps d'implantation de l'implant fonctionnalisé.** Le cartilage des rats témoins (Sham) apparaît normal tout au long de l'étude. Les réparations spontanées n'induisent pas ou peu de réparation du tissu cartilagineux. Les images obtenues pour la condition lésion comblée par le biomatériau démontrent la bonne intégration de l'implant avec la synthèse d'un tissu de réparation entraînant un resurfaçage de la lésion.

La coloration en Safranine O ( Figure 53) a permis de mettre en évidence la présence de GAGs au sein du cartilage. Une déplétion en GAGs (tissu de mauvaise qualité ou lésé) se traduit par une diminution de l'intensité de coloration.

Le cartilage sain (témoin sham) est intensément coloré en rose quel que soit le temps d'observation. Le tissu synthétisé par réparation spontanée ne présente pas de coloration et ce même après 120 jours post-chirurgie. Le tissu de réparation formé après implantation du biomatériau ne présente pas de coloration en safranine O après 7 et 14 jours. En revanche, à partir de 28 jours, la coloration rose du néo-tissu s'intensifie révélant la synthèse de GAGs. Néanmoins quelques zones dépourvues de coloration persistent au sein du tissu. A J120, la coloration rose est exacerbée et seule de petites régions à la surface du tissu apparaissent pauvres en GAGs.



**Figure 53. Coloration en Safranine O des sections de genoux de rat (n=3) en fonction du temps et du traitement de la lésion.** Le cartilage sain présente une coloration rose/orange intense. Le cartilage des témoins (Sham) apparaît intact au cours du temps. Pour la condition réparation spontanée, le cartilage est dégradé dès J7 puis un tissu de réparation de mauvaise qualité (coloration rose faible ou inexistante du tissu de réparation) est synthétisé à partir de J14. Après implantation du biomatériau fonctionnalisé, le cartilage n'est pas réparé au bout de 14 jours puis un tissu de réparation est synthétisé au niveau de la lésion. Ce tissu apparaît rose dès J28 mais quelques zones hypo-intenses sont encore retrouvées au sein de ce tissu. Après 120 jours, le tissu présente une coloration rose intense avec une légère zone en périphérie dont la coloration est plus légère. L'implant semble bien s'intégrer au tissu environnant et la structure collagénique de l'éponge se dégrade au fur et à mesure.

#### 4. Discussion

Une fois l'implantation du biomatériau fonctionnalisé effectuée *in vivo* en site ectopique chez la souris *nude*, il s'avérait nécessaire de tester les capacités de réparation du cartilage à l'aide de cet implant fonctionnalisé en site articulaire. Bien que le maintien du phénotype chondrogénique des implants ait échoué en sous-cutané, un résultat similaire ne sera pas forcément observé en site articulaire puisque l'implant est placé dans des conditions physiologiques réelles.

L'une des premières questions que nous nous sommes posées était la possibilité de l'intégration de l'implant fonctionnalisé obtenu *in vitro* avec le cartilage adjacent et ainsi induire une réparation du cartilage par la formation d'un néo-tissu dans le site lésionnel.

Silverman, en 2000, a prouvé qu'un implant à base de polymères de fibrine contenant des chondrocytes articulaires porcins était capable de s'attacher au cartilage natif. Aucune démarcation n'avait été observée entre leur implant et le cartilage natif après implantation sous-cutanée chez la souris *nude* [380]. Bien que peu d'études aient été menées sur le sujet, récemment Vahdati a démontré que le succès de l'ancrage de l'implant au cartilage environnant dépendait de sa taille et de ses propriétés physiques ainsi que du coefficient de friction de surface. Si ce dernier est supérieur au coefficient de friction de surface du cartilage articulaire, l'ancrage de l'implant au cartilage se soldera par un échec [381]. L'intégration d'un implant issu de l'ingénierie tissulaire s'avère ainsi hautement réalisable.

Nos résultats ont démontré une bonne intégration de notre implant au sein du tissu environnant après implantation intra-articulaire. L'implant a permis également la synthèse d'un tissu de réparation dont les caractéristiques se rapprochent du cartilage natif dès J28. En effet, le contenu en GAGs du tissu est abondant, des chondrocytes ont colonisé le tissu et commencent à s'organiser en cluster leur distribution demeure cependant anarchique même après 120 jours (soit 3 mois) post-implantation. Une étude plus longue peut être envisagée afin de confirmer le maintien du phénotype cartilagineux du tissu de réparation et de s'assurer que le remodelage se poursuit pour obtenir un tissu dont les caractéristiques sont similaires à celles du cartilage sain chez la même espèce animale (rat) ou chez une espèce différente.

Depuis environ une dizaine d'années, la majorité des études *in vivo* portant sur la qualité de la réparation du cartilage en site articulaire par ingénierie tissulaire ont été réalisées chez le lapin, la chèvre ou le mouton et le porc. Le lapin permet d'effectuer des études préliminaires sur la réparation cartilagineuse. Cette espèce possède une taille d'articulation permettant la création de lésions cartilagineuses et son exploration par imagerie. Il a été démontré que le tissu de réparation synthétisé *in situ* à partir d'un implant à base d'alginate et de chondrocytes de lapin présentait des caractéristiques similaires au cartilage normal adjacent tant après observation histologique qu'après exploration par microscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) [382].

A ce jour, la majeure partie des études de réparation du cartilage après création de lésions partielles ou ostéochondrales chez le lapin ont démontré la possibilité de produire un tissu de type cartilagineux présentant les mêmes caractéristiques que le tissu natif à partir de matériel issu de l'ingénierie tissulaire. Ces travaux ont été menés sur des chondrocytes ou des CSM et montrent de bons résultats. Même si la création d'un défaut cartilagineux ou ostéochondrale est possible dans l'articulation de lapin, il reflète médiocrement les lésions rencontrées chez l'Homme. De larges lésions couvrant une partie ou la totalité de l'épaisseur du cartilage et supérieures à 3mm de diamètre chez des animaux adultes ne peuvent pas être réparées spontanément. [383, 384, 385] Pour cette raison, très peu d'études ont été réalisées en effectuant des lésions partielles purement cartilagineuses. Pourtant, elles présentent l'avantage d'éviter la régénération tissulaire par les cellules souches provenant de la moelle osseuse.

Dans cette optique, Lin et coll, en 2008, ont montré la capacité de chondrocytes différenciés surexprimant BMP-4, à synthétiser une matrice cartilagineuse de type hyalin dès 3 semaines d'implantation *in situ* [386] et plus abondante après 3 mois. Plus récemment, des chondrocytes transfectés avec les gènes de la BMP-7 et de IGF-1 ont également généré un tissu aux propriétés similaires au cartilage natif tant d'un point de vue biochimique (contenu en GAGs), qu'histologique (protéoglycannes et collagène II) et macroscopique (aspect lisse sans délimitation entre l'implant, couleur blanche) entre 3 et 7 mois post-implantation [387, 388]. Le temps de maturation de l'implant issu de l'ingénierie tissulaire *in vitro* apparaît

comme une étape clé dans le processus de réparation *in vivo* car plus le temps de culture *in vitro* est adapté, meilleure seront la qualité de l'implant et la qualité du tissu de réparation [389].

L'utilisation de CSM, comme contingent cellulaire, est également à l'étude dans de nombreuses publications et donne également des résultats encourageants en ingénierie du cartilage. Shao, en 2006, a montré que des implants à base de CSM ostéomédullaires allogéniques et d'un biomatériau à base de PCL (Poly- $\epsilon$ -caprolactone) peuvent induire la réparation de larges lésions chez le lapin dès 3 mois post-implantation. Mais le néo-tissu formé ne semblait pas pouvoir supporter la charge physiologique de l'articulation [390].

D'autres groupes ont utilisé des CSM provenant de la moelle osseuse dont la différenciation chondrogénique a été induite soit par transfection soit par addition au milieu de culture de facteurs de croissance, appartenant en particulier à la famille des TGF- $\beta$ s ou par simple culture dans un environnement 3D. Ils ont prouvé l'efficacité de la réparation à l'aide d'implants contenant des CSM différenciées puisque le tissu de réparation, riche en protéoglycannes et collagène II, présentait des caractéristiques s'approchant du cartilage hyalin entre 2 et 3 mois après implantation *in situ* [391, 392, 393, 394].

Une possible réparation de lésions cartilagineuses a également été observée à l'aide d'autres sources de CSM, comme les CSM issues de la membrane synoviale. Les CSM synoviales sont capables de synthétiser un tissu de réparation contenant une matrice riche en protéoglycannes et en collagène II car le tissu présentait une coloration intense en Safranine O et montrait un marquage positif en immunohistochimie du collagène II après 3 semaines d'implantation. La qualité de la synthèse matricielle au sein de la lésion s'améliore après 6 mois d'implantation dans l'articulation du lapin [395].

Lee a obtenu des résultats similaires en implantant *in situ* chez le lapin un implant fonctionnalisé avec des CSM synoviales dont la différenciation chondrogénique a été induite par ajout de TGF- $\beta$ 1 et BMP-2 [396]. Il est intéressant de noter que dans le traitement des lésions focales cartilagineuses chez le lapin, les chondrocytes autologues et les CSM allogéniques semblaient présenter des capacités de réparation semblables produisant un tissu cartilagineux de type hyalin [397].

Des études équivalentes ont été réalisées sur des animaux de plus grande taille. Les moutons et les chèvres sont des modèles intéressants. Ils sont considérés comme des animaux de grande taille tout en permettant des facilités d'hébergement par comparaison avec des animaux plus grands. Ces modèles permettent la création de défauts d'un diamètre de 6mm [398]. Guo, en 2004, a publié qu'un implant à base de céramique et de chondrocytes pouvait être le tuteur de la formation d'un néo-cartilage au sein d'une lésion ostéochondrale chez le mouton. Ce nouveau tissu présentait les caractéristiques du cartilage hyalin et induisait un resurfaçage complet de cette lésion après 6 mois. Cependant, un suivi plus long paraît nécessaire pour conclure sur la stabilité de la réparation et son efficacité [399].

L'implantation *in situ* chez le mouton d'un biomatériau contenant des chondrocytes autologues conduit à la production d'une matrice cartilagineuse capable de combler la lésion démontrant ainsi le succès de cette technique et la stabilité phénotypique de l'implant après 6 mois [400]. De même, Miot et son équipe ont prouvé des capacités de réparation similaire chez la chèvre, 8 mois post-implantation après une période de culture adaptée *in vitro* [401].



Le modèle porcin est référencé dans un grand nombre d'articles. Il permet de réaliser des lésions mesurant près de 8mm de diamètre. Ce diamètre se rapproche du diamètre observé communément chez l'Homme en clinique. Liu a mis en évidence la présence d'un nouveau tissu, au sein de la lésion, synthétisé grâce à l'ingénierie tissulaire après 24 semaines soit 6 mois d'implantation en site lésionnel chez le porc. Ce tissu avait l'aspect morphologique, histologique et biochimique du cartilage originel. Le contenu en GAGs du tissu de réparation atteignait 80% de la quantité de GAGs présent dans le cartilage sain [402].

D'autres groupes ont également démontré chez le porc que l'utilisation de chondrocytes autologues ou allogéniques pouvait induire la formation d'un tissu de réparation avec l'apparence macroscopique et la résistance du cartilage natif après des temps d'implantation *in situ* compris entre 2 et 9 mois [403, 404]. Des études complémentaires sur la résistance mécanique à la compression semblent utiles afin de s'assurer du succès des techniques d'ingénierie tissulaire mais aussi chirurgicales. L'utilisation de chondrocytes humains pour la création d'implants fonctionnalisés produisant un tissu de réparation de bonne qualité dans la lésion est possible et donne des résultats satisfaisants après environ 3 mois d'implantation *in vivo* [251]. Des études plus longues ont été menées chez le porc et ont démontré les capacités d'un implant cartilagineux contenant des chondrocytes à s'intégrer au cartilage environnant sans démarcation visible après un an et à synthétiser une matrice riche en collagène II [250].

Les fibres de collagènes au sein du tissu de réparation sont distribuées et orientées de manière similaire au cartilage originel [405]. Plusieurs équipes ont démontré la possibilité d'utiliser des CSM d'origine différente en tant que contingent cellulaire pour l'ingénierie du cartilage dans le but d'induire une réparation du site lésé créé après 6 mois d'implantation *in situ* [406, 407]. Un groupe a comparé l'efficacité de la réparation des chondrocytes et des CSM et a démontré la supériorité des CSM d'origine xénogénique et allogénique [408].

Après mesure du volume cartilagineux, aucune différence volumique significative n'a été observée entre le cartilage d'un genou sain et le cartilage d'un genou ayant été lésé. Notre équipe avait mis en évidence la possibilité de mesurer le volume/l'épaisseur du cartilage et de discriminer les changements de volume et d'épaisseur dus à l'arthrose à l'aide de séquence 3D haute résolution pondérée en T1 sur un imageur 7T [409]. Il avait également été démontré que cette divergence s'explique par le fait que certaines des images présentaient un plus faible ratio signal/bruit et quelques artéfacts rendant la segmentation moins précise malgré l'utilisation de l'antenne 4 canaux, développée pour permettre l'acquisition simultanée des deux genoux de l'animal et l'obtention d'images 3D de très haute résolution [379]. Néanmoins, le volume ne donne pas d'information concernant la qualité du cartilage. Le volume cartilagineux reste stable en fonction de l'âge de l'animal, car son épaisseur diminue avec la maturation, alors que la taille de l'articulation s'accroît. Le processus de remodelage cicatriciel peut également conduire à une relative hypertrophie biaisant l'étude volumique.

De plus, nous n'avons pas pu exploiter les images pondérées en T2 pour mesurer les T2 et obtenir des cartographies T2. En effet, nous souhaitions mesurer le T2 au sein du cartilage sain et du tissu de réparation. Certaines cartographies étant de mauvaise qualité, le calcul du T2 moyen dans les différents tissus a donné des valeurs de T2 incohérentes entre les individus d'un même groupe et n'a pas pu être exploité. Pourtant, notre équipe avait déjà démontré antérieurement *in vitro* la possibilité d'évaluer la qualité du tissu de réparation et de discriminer différents types tissulaires après implantation d'un implant à base d'alginate et de chondrocytes autologues chez le rat en utilisant la cartographie T2 sur un imageur à 8,5T.

Une évaluation quantitative avait également été effectuée et avait montré une variation zonale du T2 global de la superficie vers la profondeur du cartilage rotulien sain alors qu'aucune variation n'était observée dans le tissu de réparation. La valeur de T2 global était légèrement supérieure dans le tissu de réparation après implantation du biomatériau fonctionnalisé en comparaison avec la valeur des contrôles [220]. Cette étude avait été menée sur le cartilage rotulien de rat *ex vivo* ce qui avait permis d'abolir les artefacts dus aux mouvements l'animal. De plus le cartilage rotulien est plus épais que le cartilage fémoral facilitant la visualisation du tissu et sa segmentation.

Quelques études ont été menées sur l'évaluation *in vivo* par IRM du tissu de réparation issu de l'ingénierie tissulaire. Des travaux chez le lapin ont prouvé le potentiel de la technique d'IRM pour différencier différentes qualités de réparations. Chez le lapin, un tissu de réparation provenant de l'implantation d'un implant fonctionnalisé présentait des variations de T2 similaires à celles du cartilage natif [410]. Il existe une relation entre le temps de relaxation transversal T2 et le pourcentage de remplissage par le tissu de réparation indiquant l'importance du T2 pour suivre le comblement de la lésion [Erreur ! Signet non défini., 411, 412].

Plus récemment, Shi a réalisé le suivi par IRM du tissu de réparation après création d'un défaut couvrant la totalité de l'épaisseur du cartilage et implantation d'un biomatériau à base de PLLGA (Poly(L-lactic-co-glycolic Acid)) et de CSM ostéomédullaires. Cet implant a permis la synthèse d'un tissu de réparation de bonne qualité riche en protéoglycannes et collagène II après 24 mois d'implantation. Cependant, l'analyse par IRM s'intéressait essentiellement aux variations de signal au sein des différents tissus de réparation sans approfondir ces résultats par une évaluation quantitative [413].

En 2006, des travaux similaires avaient été réalisés chez le cheval après implantation de chondrocytes autologues ensemencés dans un biomatériau à base de polymères au sein d'un large défaut. Après un an, le signal IRM du tissu de réparation est semblable à celui du cartilage sain. Aucune mesure évaluation quantitative n'a été faite dans cet article. [414] Jing et coll ont marqué des CSM à l'aide de SPIOs puis les ont ensemencées dans un gel qu'ils ont injecté au sein d'une lésion cartilagineuse chez le lapin. Ce travail visait essentiellement à effectuer un suivi des cellules une fois implantées *in situ* et a permis de préciser que les CSM du biomatériau ne participaient que peu au processus de réparation du cartilage [303]. Il est intéressant de noter que, contrairement à notre étude dans laquelle les explorations IRM sont réalisées sur l'animal vivant anesthésié, les analyses IRM ont été effectuées sur des pièces anatomiques.

Chez l'Homme, les techniques d'implantation de chondrocytes autologues (ACI) et d'implantation de matrice associée à des chondrocytes (MACT) sont évaluées par IRM. L'essentiel des études d'IRM s'articule autour de la visualisation de la lésion et la comparaison de l'intensité du signal entre tissu de réparation et tissu sain [415]. Une évaluation quantitative du T2 a démontré que le tissu de comblement résultant d'une MACT avait un T2 global se rapprochant du cartilage sain alors que le tissu de réparation obtenu après microfracture seule avait un T2 significativement inférieur [416].

Récemment, nous avons également montré que la cartographie T2 pourrait être utilisée en association avec l'imagerie du tenseur de diffusion afin d'obtenir des renseignements complémentaires sur la morphologie, la composition et la structure interne du cartilage. La combinaison de ces deux types d'analyses IRM paraît intéressante pour l'évaluation quantitative du cartilage sain, lésé et traité par ingénierie tissulaire [285].

## 5. Conclusion

Dans le processus de vérification de la qualité du tissu de réparation, l'étape d'implantation du biomatériau fonctionnalisé *in situ* s'avère cruciale. Elle permet de s'assurer de la qualité de l'implant obtenu *in vitro* et d'évaluer son intégration et le maintien de son phénotype chondrogénique en condition physiologique. Nous avons démontré que notre implant, constitué d'une éponge de collagène ensemencée avec des CSM différenciées, constituait un support intéressant pour la synthèse d'un nouveau tissu au sein de la lésion. Ce tissu de réparation a comblé la totalité de la lésion et est constitué d'une matrice riche en GAGs dès 28 jours d'implantation. La quantité de GAGs du tissu est plus importante après 3 mois d'implantation. Ces résultats attestent du potentiel de réparation de notre implant fonctionnalisé.

L'évaluation non invasive de la qualité du cartilage est un défi de taille tant d'un point de vue diagnostique que curatif. En effet, la détection précoce des lésions focales cartilagineuses permettrait la mise en place d'un traitement plus rapide et plus efficace. La distinction entre un tissu sain, un tissu lésé et un tissu obtenu par ingénierie tissulaire en IRM à l'aide de cartographie T2, du calcul du T2 moyen et de la mesure du volume du cartilage a échoué dans notre étude. L'évaluation des problèmes rencontrés ainsi que la révision des protocoles d'acquisitions IRM pourraient être utiles afin d'explorer de manière non invasive la réparation des lésions avec succès. La mesure du T2 moyen, comme marqueur de la qualité tissulaire, n'est à ce jour que très peu étudié et en particulier chez le petit animal (rat). A notre connaissance, notre étude IRM est, à ce jour, l'une des seules ayant été réalisée sur un animal de petite taille vivant anesthésié.



## V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le cartilage est un tissu avasculaire, non innervé, dont la réparation après survenue de lésions est extrêmement limitée. Le phénomène douloureux n'apparaît que lorsque les lésions atteignent l'os sous-chondral, qui, lui, est innervé. Dans ce contexte de lésions cartilagineuses, les seuls traitements disponibles en clinique à ce jour sont les traitements médicamenteux et les traitements chirurgicaux. Les premiers, symptomatiques, permettent de soulager les symptômes douloureux. Les seconds, thérapeutiques, visent à induire la synthèse d'un tissu de réparation (voire de cicatrisation) au sein de la lésion, qui possède des caractéristiques similaires à celle du cartilage natif.

Bien que la mosaïcoplastie donne des résultats assez satisfaisants, l'ingénierie cellulaire reposant sur la méthode de Brittberg a connu un réel essor. Elle est déjà utilisée en clinique sous le nom d'ACI (Implantation de Chondrocytes Autologues) et donne lieu à une réparation cartilagineuse intéressante. Plus récemment, les techniques d'ingénierie tissulaire se sont développées (MACI). L'ingénierie tissulaire a pour but d'ensemencer un biomatériau avec un contingent cellulaire et d'adapter les conditions de culture afin d'obtenir un implant fonctionnalisé capable d'être implanté au sein du défaut et d'induire la synthèse d'un nouveau tissu cartilagineux.

Le chondrocyte, unique cellule du cartilage, s'impose comme le candidat idéal. Cependant, son accès est limité puisque les prélèvements calibrés de cartilage doivent être prélevés en zones non portantes. Leur culture en monocouche entraîne une rapide dédifférenciation (dès les premiers passages) et donc une perte de leur capacité à synthétiser un cartilage de bonne qualité. De fait, ils sont cultivés en monocouche durant une courte période, ce qui ne permet pas d'acquérir un nombre satisfaisant de cellules pour les études d'ingénierie tissulaire.

Une alternative passe l'utilisation de CSM, cellules multipotentes, présentant des potentialités de prolifération et différenciation chondrogénique intéressantes. Les CSM peuvent être isolées à partir de nombreux tissus (moelle osseuse, graisse, membrane synoviale, gelée de Wharton, ...), et accessibles via la mise en place de procédures chirurgicales plus ou moins lourdes (arthrotomie, prélèvement sous arthroscopie, liposuccion). Une autre alternative serait d'utiliser des chondrocytes, de les faire proliférer pour en obtenir un nombre suffisant puis d'induire leur redifférenciation. Dans notre expérience, une étape de pré-orientation des cellules en monocouche s'avère indispensable pour engager les cellules vers une différenciation chondrogénique lors de leur ensemencement dans un environnement tridimensionnel.

L'induction de la différenciation/redifférenciation chondrogénique se fait généralement par addition de facteurs de croissance, appartenant aux familles des TGF- $\beta$ s et BMPs, soit directement dans le milieu de culture soit par transfection des cellules. La synthèse *in vitro* d'une matrice cartilagineuse (riche en protéoglycannes et en collagène de type II) sans dérive du phénotype au-delà du stage chondrocytaire est primordiale et conditionne la décision d'implanter le biomatériau fonctionnalisé expérimentalement, et à terme cliniquement. Les implantations chez l'animal en site ectopique, dans un premier temps, puis *in situ*, dans un second temps, doivent constituer des étapes incontournables pour évaluer le devenir de l'implant en conditions physiologiques.

Dans le cadre d'un diagnostic des lésions ostéochondrales ainsi que d'un suivi de leur prise en charge, l'utilisation de techniques d'imagerie non invasive constitue un enjeu majeur. L'IRM offre, à ce titre, de nombreux avantages puisque cette technique, non invasive,

permet l'individualisation du cartilage et donne des renseignements à la fois structuraux et biochimiques des tissus observés, selon la qualité du tissu cicatriciel.

Dans ce manuscrit, les travaux s'articulent autour de trois axes principaux :

- 1) L'étude des potentialités chondrogéniques des CSM de différentes origines (moelle, synoviale) et la caractérisation de l'implant fonctionnalisé selon leurs conditions d'expansion et de différenciation;
- 2) La faisabilité d'un suivi par IRM de l'implant fonctionnalisé *in vitro* après marquage par un agent de contraste ferromagnétique (SPIOs).
- 3) Le devenir du greffon *in vitro* et *in vivo* après implantation en site ectopique chez la souris *nude* (histologie) et en site articulaire chez le rat *nude* (histologie et IRM).

## A. POTENTIALITES CHONDROGENIQUES DES DIFFERENTES CSM

Tout d'abord, nous nous sommes donc intéressées à la différenciation chondrogénique de cellules souches de différentes origines (moelle osseuse, membrane synoviale) et de chondrocytes dédifférenciés soumis à une stimulation chondrogénique (environnement 3D : éponge de collagène I ; addition de TGF-  $\beta$ 1) durant 28 jours et 56 jours *in vitro* après différents temps de prolifération en monocouche (P4 et P8) et en condition normoxique ou hypoxique.

Les CSM ostéomédullaires et synoviales et les chondrocytes dédifférenciés ont démontré leurs capacités à se différencier vers un phénotype chondrogénique par l'expression des gènes d'intérêts spécifiques et la synthèse d'une matrice riche en protéoglycannes et en collagène II au sein de l'éponge. Pour les trois types cellulaires, un passage plus précoces (P4) est le mieux adapté pour induire une différenciation chondrogénique et un temps d'induction de 28 jours permet de limiter l'apparition de calcifications au sein du biomatériau.

L'hypoxie favorise la synthèse de collagène II pour les CSM ostéomédullaires et synoviales. D'un point de vue de l'expression des gènes d'intérêt du cartilage, les chondrocytes représentent le meilleur contingent cellulaire comparativement aux CSM ostéomédullaires puis synoviales. En revanche, les CSM issues de la moelle osseuse synthétisent une matrice cartilagineuse plus abondante et plus homogène que les CSS et les chondrocytes redifférenciés. Les trois types cellulaires apparaissent comme autant de candidats intéressants en tant que contingent cellulaire en ingénierie du cartilage.

*Perspectives* : Les conditions de culture utilisées dans cette étude ont été définies lors de travaux précédents et adaptées spécifiquement aux CSM ostéomédullaires. Afin de pouvoir effectuer une comparaison entre les différents types cellulaires, nous avons conservé ces conditions de culture. Il paraît donc intéressant d'optimiser les conditions de culture (milieu utilisé, facteur de croissance, temps de différenciation, ...) pour les CSM originaires de la membrane synoviale et pour les chondrocytes dédifférenciés. L'étape suivante sera d'implanter l'implant fonctionnalisé à base de CSS ou de chondrocytes redifférenciés en sous-cutané chez la souris *nude* puis en intra-articulaire chez le rat *nude*. De même, des études complémentaires sur la teneur en oxygène durant les différentes périodes de culture *in vitro* pourraient être utiles. Par exemple, une phase d'expansion en hypoxie suivie d'une période de différenciation en normoxie ou en hypoxie pourrait être comparée aux conditions que nous avons déjà testées dans le but d'approfondir les données sur l'effet de l'hypoxie sur la différenciation chondrogénique des différents types cellulaires.

## B. CARACTERISATION IN VIVO DE L'IMPLANT HETEROTOPIQUE ET ORTHOTOPIQUE

Dans une seconde étape, nous avons évalué la qualité du tissu de réparation après mise en place de l'implant fonctionnalisé à base de CSM ostéomédullaires en site ectopique chez la souris « *nude* » après 1 mois, 2 mois et 3 mois. Les implants prélevés après un mois contiennent une matrice riche en protéoglycannes et en collagène de type II comme en attestent respectivement la coloration bleu Alcian et l'immunomarquage anti-collagène II. En revanche, des calcifications existent en périphérie du biomatériau. Au-delà d'un mois d'implantation, les implants se dégradent, présentent un contenu diminué voire inexistant en protéoglycannes et en collagène II, sont colonisés par des vaisseaux sanguins et se calcifient. Cette métaplasie vers un phénotype osseux est vraisemblablement inhérente à l'apport de vascularisation et donc d'oxygène peri-implantatoire.

Afin d'évaluer ce paramètre, nous avons choisi d'envelopper les implants dans un gel d'alginate avant de les implanter. Cet enrobage a permis de ralentir les processus de vascularisation, de dégradation et de perte des contenus en protéoglycannes et collagène II. Malheureusement, la colonisation de l'implant par de nombreux dépôts calciques persistait au sein de l'éponge. L'échec du maintien du phénotype cartilagineux peut être imputé au fait que l'environnement sous-cutané n'est pas le plus adapté à la différenciation chondrogénique.

Par la suite, nous avons implanté notre biomatériau fonctionnalisé par les CSM issues de la moelle osseuse dans une lésion calibrée forcée dans le condyle fémoral de rats *nude*. Les analyses histologiques ont démontré que notre implant a permis la synthèse d'un tissu de réparation de nature différente de celui produit lors d'une réparation spontanée. Spontanément, le tissu de comblement apparaît fibreux, dénué de cellules chondrocytaires même à 3 mois post-implantation.

En revanche, en présence de l'implant, le tissu de réparation possède certaines caractéristiques du tissu cartilagineux à partir d'un mois d'implantation. On note un resurfaçage de la lésion et le néo-tissu contient des chondrocytes organisés en cluster. La coloration en safranine O a mis en évidence que ce tissu était riche en protéoglycannes après 1 mois d'implantation. Le tissu de réparation apparaît de meilleure qualité après 3 mois.

*Perspectives* : Dans un premier temps, concernant l'implantation de nos biomatériaux fonctionnalisés en site ectopique, l'optimisation de différentes conditions de culture pourrait être une solution pour pallier la perte du phénotype chondrogénique de l'implant. Par exemple, différents temps d'induction chondrogénique *in vitro* pourraient être testés de manière à confirmer les données de la littérature qui affirment qu'un temps de d'induction de la différenciation chondrogénique *in vitro* plus long permet le maintien d'un phénotype stable *in vivo*.

De plus, l'hypoxie est un facteur clé dans la limitation de la perte des capacités de synthèse des composants matriciels du cartilage et de l'invasion vasculaire. Il serait alors intéressant d'étudier le devenir d'implants hétérotopiques dont la phase d'expansion ou la période de différenciation, voire les deux, ont été réalisées en hypoxie. Au vu des résultats obtenus, il serait également intéressant de réaliser des analyses immunohistochimiques sur les coupes de genoux de rats à J7, J14, J28 et J120 afin d'évaluer la synthèse de collagène I et II dans le tissu de réparation au sein du site lésionnel.

Cette étude IRM exploratoire a été effectuée sur des groupes de rats comprenant 3 rats par condition. Ce nombre ayant été choisi afin de satisfaire à la réglementation européenne en matière d'expérimentation animale [Directive européenne 2010/63/UE du 22 septembre 2010 retranscrite en droit français au 1er février 2013 (décret 2013-118 accompagné de 4 arrêtés d'application)] en respectant la règle des 3Rs : Réduction, Raffinement, Remplacement. Donc, dans un second temps, il serait intéressant de reproduire l'expérimentation sur des groupes de taille supérieure afin de s'assurer que les résultats obtenus sont reproductibles, c'est-à-dire que l'implant induit la synthèse d'un tissu de réparation dont les caractéristiques se rapprochent de celles du cartilage natif.

A plus long terme et à condition que les nouvelles implantations donnent les mêmes résultats, nous souhaiterions implanter nos implants fonctionnalisés au sein d'une lésion calibrée dans le condyle fémoral d'un animal de plus grande taille, par exemple le mini-porc. Cette espèce offre plusieurs avantages : plus petits (40-45 kg) que les porcs, ils sont plus faciles à héberger, sont également plus dociles et permettraient de conduire des études de plus longue durée. La nouvelle animalerie centrale sur le site de la Faculté de Médecine permettra sans doute de mener à bien ces projets.

### C. SUIVI IRM DE L'IMPLANT IN VITRO ET IN VIVO

Enfin, nous avons évalué la faisabilité d'un marquage cellulaire par des particules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIOs) et l'effet d'une gamme de concentrations de SPIOs (12,5 à 200  $\mu\text{g Fe/mL}$ ) sur la différenciation chondrogénique des CSM. Nous avons démontré que les SPIOs internalisées par les CSM induisaient une inhibition partielle de la chondrogenèse des cellules dès la plus faible concentration de SPIOs testée (12,5  $\mu\text{g Fe/mL}$ ) qui s'accroissait avec l'augmentation de la concentration.

Nous avons vérifié la persistance du marquage et la qualité de la synthèse matricielle au sein de l'éponge de collagène II contenant des CSM différenciées par analyses histologiques et par exploration en IRM à 3T sur un imageur clinique et à 7T sur un imageur dédié petit animal. Les analyses histologiques ont démontré la présence de SPIOs au sein des cellules après 28 jours avec une augmentation du marquage cellulaire en fonction de la concentration de SPIOs. Cependant, les synthèses de collagène II et de protéoglycannes étaient diminuées par le marquage par des SPIOs de façon modérée à 12,5  $\mu\text{g Fe/mL}$  puis plus accentuée pour les concentrations supérieures.

L'analyse IRM nous a aussi permis d'affirmer qu'il était possible de différencier un tissu de mauvaise qualité d'un tissu de bonne qualité en mesurant le T2 moyen du tissu. Parallèlement, l'exploration IRM a permis de conclure à un marquage possible des cellules par les SPIOs pour des concentrations inférieures ou égales à 25  $\mu\text{g Fe/mL}$ . Ce travail a mis en évidence la possibilité de marquer les cellules durablement de façon à suivre par la suite le devenir des cellules une fois le biomatériau fonctionnalisé implanté dans l'organisme. L'utilisation de concentrations de SPIOs inférieures ou égales à 25  $\mu\text{g Fe/mL}$  semble être un bon compromis entre l'obtention d'un signal IRM de bonne qualité et une différenciation chondrogénique des CSM modérément affectée par le marquage.

*Perspectives* : Malgré les résultats encourageants que nous avons obtenus, notre étude sur le marquage cellulaire ne peut être poursuivie en l'état puisque les SPIOs utilisées (Endorem®) ont été retirées du marché pour des raisons économiques. Pour pallier ce problème, la première alternative serait d'utiliser un autre type de SPIOs commercialisé. La seconde alternative serait d'utiliser d'autres nanoparticules à base de fer pouvant être



synthétisées par des collègues chimistes, ayant de l'expérience dans la synthèse de nanoparticules biocompatibles. Dans les deux cas, il faudra réitérer l'ensemble des analyses effectuées au cours de cette étude pour déterminer la toxicité des particules sur les cellules, leurs effets sur la différenciation chondrogénique, la possibilité d'un marquage persistant et la qualité de la détection par IRM. Par la suite, nous souhaiterions évaluer par IRM la qualité du tissu synthétisé au sein de l'implant fonctionnalisé une fois implanté en site ectopique chez la souris *nude* et en site lésionnel dans le condyle fémoral du rat *nude*.

L'exploration par IRM des genoux des rats implantés avec notre biomatériau fonctionnalisé à base de CSM différenciées non marquées, nous a permis de mesurer le volume du cartilage d'un genou sain, lésé et ayant subi une réparation spontanée ou comblé par notre implant fonctionnalisé. Nous n'avons mis en évidence aucune différence significative de volume entre les trois conditions. Lorsque l'implant est greffé dans la lésion calibrée, nous avons également observé un tissu de réparation présentant un signal similaire au tissu environnant et conduisant à un resurfaçage. En revanche, nous avons échoué dans l'évaluation de la qualité du tissu de réparation à l'aide de cartographie T2 et de mesure du T2 moyen du tissu, puisque les cartographies étaient pour certaines de mauvaise qualité et valeurs obtenues ne permettaient pas une interprétation des résultats alors que les analyses histologiques, nous ont permis d'affirmer que l'implant a induit la formation d'un tissu de réparation dont la morphologie et la composition se rapprochent du cartilage environnant non lésé.

*Perspectives* : A notre connaissance, l'exploration IRM sur animal vivant anesthésié est très peu pratiquée en particulier chez le petit animal et nécessite sans doute quelques ajustements. Le protocole IRM doit être attentivement étudié afin de déterminer ce qui pourrait causer le problème puis réadapté en conséquence en collaboration avec l'équipe du laboratoire Créatis-LRMN de Lyon. Une fois le problème réglé, cette étude doit être reproduite plusieurs fois chez le rat *nude* afin de s'assurer de l'acuité et de la reproductibilité des résultats.

## D. CONCLUSION GENERALE

Pour conclure, nous avons réussi à déterminer les conditions de culture 3D *in vitro* adaptées à la différenciation chondrogénique des CSM ostéomédullaires au sein d'éponges de collagène de type II. Ces conditions définies, nous avons mis en évidence la possibilité d'un marquage des CSM par les SPIOs permettant un suivi de l'implant une fois implanté *in vivo*. Bien que l'implant ait échoué à maintenir son phénotype chondrogénique une fois implanté en site ectopique chez la souris, il semblait, néanmoins, constituer un tuteur prometteur en site lésionnel dans le condyle fémoral de rat pour la synthèse d'un tissu de réparation dont la qualité s'approchait de celle du cartilage natif. Ces résultats s'annoncent donc encourageants dans l'optique d'une application clinique ultérieure.



## VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - **Stockwell RA**. The cell density of human articular and costal cartilage. *J Anat.* **1967** Sep;101(Pt 4):753-763.
- 2 - **Bhosale AM**, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull.* **2008**;87:77-95.
- 3 - **Alford JW**, Cole BJ. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med.* **2005** Feb;33(2):295-306.
- 4 - **Troeborg L**, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta.* **2012** Jan;1824(1):133-145.
- 5 - **Mow VC**, Ratcliffe A, Poole AR. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials.* **1992**;13(2):67-97.
- 6 - **van der Harst MR**, Brama PA, van de Lest CH, Kiers GH, DeGroot J, van Weeren PR. An integral biochemical analysis of the main constituents of articular cartilage, subchondral and trabecular bone. *Osteoarthritis Cartilage.* **2004** Sep;12(9):752-761.
- 7 - **Buckwalter JA**, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect.* **1998**;47:477-486.
- 8 - **Gelse K**, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* **2003** Nov 28;55(12):1531-1546.
- 9 - **Ofek G**, Revell CM, Hu JC, Allison DD, Grande-Allen KJ, Athanasiou KA. Matrix development in self-assembly of articular cartilage. *PLoS One.* **2008** Jul 30;3(7):e2795.
- 10 - **Vasios G**, Nishimura I, Konomi H, van der Rest M, Ninomiya Y, Olsen BR. Cartilage type IX collagen-proteoglycan contains a large amino-terminal globular domain encoded by multiple exons. *J Biol Chem.* **1988** Feb 15;263(5):2324-2329.
- 11 - **Wu JJ**, Woods PE, Eyre DR. Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J Biol Chem.* **1992** Nov 15;267(32):23007-23014.
- 12 - **Morrison EH**, Ferguson MW, Bayliss MT, Archer CW. The development of articular cartilage: I. The spatial and temporal patterns of collagen types. *J Anat.* **1996** Aug;189 ( Pt 1):9-22.
- 13 - **Schmid TM**, Linsenmayer TF. Immunoelectron microscopy of type X collagen: supramolecular forms within embryonic chick cartilage. *Dev Biol.* **1990** Mar;138(1):53-62.
- 14 - **Estrada LE**, Dodge GR, Richardson DW, Farole A, Jimenez SA. Characterization of a biomaterial with cartilage-like properties expressing type X collagen generated in vitro using neonatal porcine articular and growth plate chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* **2001** Feb;9(2):169-177.

- 15 - **Tchetina E**, Mwale F, Poole AR. Distinct phases of coordinated early and late gene expression in growth plate chondrocytes in relationship to cell proliferation, matrix assembly, remodeling, and cell differentiation. *J Bone Miner Res.* **2003** May;18(5):844-851.
- 16 - **Poole AR**, Pidoux I. Immunoelectron microscopic studies of type X collagen in endochondral ossification. *J Cell Biol.* **1989** Nov;109(5):2547-2554.
- 17 - **Mwale F**, Billinghamurst C, Wu W, Alini M, Webber C, Reiner A, Ionescu M, Poole J, Poole AR. Selective assembly and remodelling of collagens II and IX associated with expression of the chondrocyte hypertrophic phenotype. *Dev Dyn.* **2000** Aug;218(4):648-662. Erratum in: *Dev Dyn.* **2001** Feb;220(2):187.
- 18 - **Mwale F**, Wang HT, Nelea V, Luo L, Antoniou J, Wertheimer MR. The effect of glow discharge plasma surface modification of polymers on the osteogenic differentiation of committed human mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* **2006** Apr;27(10):2258-2264.
- 19 - **Mwale F**, Girard-Lauriault PL, Wang HT, Lerouge S, Antoniou J, Wertheimer MR. Suppression of genes related to hypertrophy and osteogenesis in committed human mesenchymal stem cells cultured on novel nitrogen-rich plasma polymer coatings. *Tissue Eng.* **2006** Sep;12(9):2639-47.
- 20 - **Mwale F**, Stachura D, Roughley P, Antoniou J. Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. *J Orthop Res.* **2006** Aug;24(8):1791-1798.
- 21 - **Mwale F**, Rampersad S, Richard H, Guoying Y, Al Rowas S, Madiraju P, Antoniou J, Lavery S. The constitutive expression of type x collagen in mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients is reproduced in a rabbit model of osteoarthritis. *J Tissue Eng.* **2011**;2011:587547.
- 22 - **Aigner T**, Stöve J. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev.* **2003** Nov 28;55(12):1569-1593. Review.
- 23 - **Rogers BA**, Murphy CL, Cannon SR, Briggs TW. Topographical variation in glycosaminoglycan content in human articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br.* **2006** Dec;88(12):1670-1674. Review.
- 24 - **Heinegård D**. Proteoglycans and more-from molecules to biology. *Int J Exp Pathol.* **2009** Dec;90(6):575-586. Review.
- 25 - **Benninghoff A**. Form und bau der gelenknorpel in ihren beziehungen zur function.I. Die modellierenden und formerhaltenden faktorendes knorpelreliefs. *Z Gesamte Anat* **1925**;76:43-63.
- 26 - **Malinin T**, Quelette EA, Articular cartilage nutrition is mediated by subchondral bone : a long-term autograft study in baboons. *Osteoarthritis Cartilage* **2000** ;8 :483-491.
- 27 - **Wang Y**, Wei L, Zeng L, He D, Wei X. Nutrition and degeneration of articular cartilage. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* **2013** Aug;21(8):1751-1762.
- 28 - **Bader DL**, Salter DM, Chowdhury TT. Biomechanical influence of cartilage homeostasis in health and disease. *Arthritis.* **2011**;2011:979032.
- 29 - **Smith MD**. The normal synovium. *Open Rheumatol J.* **2011**;5:100-106.

- 30 - **Redman SN**, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater.* **2005** Apr 14;9:23-32.
- 31 - **Hjelle K**, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy.* **2002** Sep;18(7):730-734.
- 32 - **Arøen A**, Løken S, Heir S, Alvik E, Ekeland A, Granlund OG, Engebretsen L. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med.* **2004** Jan-Feb;32(1):211-215.
- 33 - **Outerbridge RE**. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br.* **1961** Nov;43-B:752-757.
- 34 - **Browne JE**, Branch TP. Surgical alternatives for treatment of articular cartilage lesions. *J Am Acad Orthop Surg.* **2000** May-Jun;8(3):180-189.
- 35 - **Cicuttini F**, Ding C, Wluka A, Davis S, Ebeling PR, Jones G. Association of cartilage defects with loss of knee cartilage in healthy, middle-age adults: a prospective study. *Arthritis Rheum.* **2005** Jul;52(7):2033-2039.
- 36 - **Squires GR**, Okouneff S, Ionescu M, Poole AR. The pathobiology of focal lesion development in aging human articular cartilage and molecular matrix changes characteristic of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **2003** May;48(5):1261-1270.
- 37 - **Temple-Wong MM**, Bae WC, Chen MQ, Bugbee WD, Amiel D, Coutts RD, Lotz M, Sah RL. Biomechanical, structural, and biochemical indices of degenerative and osteoarthritic deterioration of adult human articular cartilage of the femoral condyle. *Osteoarthritis Cartilage.* **2009** Nov;17(11):1469-1476.
- 38 - **Odenbring S**, Egund N, Lindstrand A, Lohmander LS, Willén H. Cartilage regeneration after proximal tibial osteotomy for medial gonarthrosis. An arthroscopic, roentgenographic, and histologic study. *Clin Orthop Relat Res.* **1992** Apr;(277):210-216.
- 39 - **Masahiko T**, Damle S, Penmatsa M, West P, Yang X, Bostrom M, Hidaka C, Yamauchi M, Pleshko N. Temporal changes in collagen cross-links in spontaneous articular cartilage repair. *Cartilage.* **2012** Jul;3(3):278-287.
- 40 - **Johnson LL**. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy.* **1986**;2(1):54-69.
- 41 - **Johnson LL**. Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop Relat Res.* **2001** Oct;(391 Suppl):S306-S317.
- 42 - **Craig W**, David JW, Ming HZ (2003) A current review on the biology and treatment of the articular cartilage defects (part I & part II). *J Musculoskelet Res.* **2003**;7(3&4):157-181.
- 43 - **Smillie IS**. Treatment of osteochondritis dissecans. *J Bone Joint Surg Br.* **1957** May;39-B(2):248-260.
- 44 - **Pridie AH** (1959) The method of resurfacing osteoarthritic knee. *J Bone Joint Surg Br.* **1959**;41:618-623.

- 45 - **Madry H**, Grün UW, Knutsen G. Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. *Dtsch Arztebl Int.* **2011** Oct;108(40):669-677.
- 46 - **Steadman JR**, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK. Microfracture technique for full-thickness chondral defects: technique and clinical results. *Operat Tech Orthop.* **1997**;7:300-307.
- 47 - **Hunziker EB**. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002 Jun;10(6):432-463.
- 48 - **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(3):318-321.
- 49 - **Hangody L**, Kish G, Kárpáti Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bély M. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics.* **1998** Jul;21(7):751-756.
- 50 - **Hangody L**, Feczkó P, Bartha L, Bodó G, Kish G. Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle. *Clin Orthop Relat Res.* **2001** Oct;(391 Suppl):S328-S336.
- 51 - **Hangody L**, Füles P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am.* **2003**;85-A Suppl 2:25-32.
- 52 - **Hangody L**, Ráthonyi GK, Duska Z, Vásárhelyi G, Füles P, Módis L. Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am.* **2004** Mar;86-A Suppl 1:65-72.
- 53 - **Hangody L**, Vásárhelyi G, Hangody LR, Sükösd Z, Tibay G, Bartha L, Bodó G. Autologous osteochondral grafting--technique and long-term results. *Injury.* **2008** Apr;39 Suppl 1:S32-S39.
- 54 - **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** Oct 6;331(14):889-895.
- 55 - **Strauss EJ**, Fonseca LE, Shah MR, Yorum T. Management of focal cartilage defects in the knee - Is ACI the answer? *Bull NYU Hosp Jt Dis.* **2011**;69(1):63-72.
- 56 - **Brittberg M**, Peterson L, Sjögren-Jansson E, Tallheden T, Lindahl A. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am.* **2003**;85-A Suppl 3:109-115.
- 57 - **Minas T**. Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. *Clin Orthop Relat Res.* **2001** Oct;(391 Suppl):S349-S361.
- 58 - **Bentley G**, Bhamra JS, Gikas PD, Skinner JA, Carrington R, Briggs TW. Repair of osteochondral defects in joints--how to achieve success. *Injury.* **2013** Jan;44 Suppl 1:S3-S10. Review.
- 59 - **Sohn DH**, Lottman LM, Lum LY, Kim SG, Pedowitz RA, Coutts RD, Sah RL. Effect of gravity on localization of chondrocytes implanted in cartilage defects. *Clin Orthop Relat Res.* **2002** Jan;(394):254-262.

- 60 - **Marcacci M**, Zaffagnini S, Kon E, Visani A, Iacono F, Loretto I. Arthroscopic autologous chondrocyte transplantation: technical note. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* **2002** May;10(3):154-159. Review.
- 61 - **Schuman L**, Buma P, Versleyen D, de Man B, van der Kraan PM, van den Berg WB, Homminga GN. Chondrocyte behaviour within different types of collagen gel in vitro. *Biomaterials.* **1995** Jul;16(10):809-814.
- 62 - **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** Dec;66(6):549-556.
- 63 - **Chaipinyo K**, Oakes BW, Van Damme MP. The use of debrided human articular cartilage for autologous chondrocyte implantation: maintenance of chondrocyte differentiation and proliferation in type I collagen gels. *J Orthop Res.* **2004** Mar;22(2):446-455.
- 64 - **Grigolo B**, Roseti L, Fiorini M, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, Giardino R, Facchini A. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (hyaff-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials.* **2001** Sep;22(17):2417-2424.
- 65 - **Kim IL**, Khetan S, Baker BM, Chen CS, Burdick JA. Fibrous hyaluronic acid hydrogels that direct MSC chondrogenesis through mechanical and adhesive cues. *Biomaterials.* **2013** Jul;34(22):5571-5580.
- 66 - **Ab-Rahim S**, Selvaratnam L, Raghavendran HR, Kamarul T. Chondrocyte-alginate constructs with or without TGF- $\beta$ 1 produces superior extracellular matrix expression than monolayer cultures. *Mol Cell Biochem.* **2013** Apr;376(1-2):11-20.
- 67 - **Ng KW**, Ateshian GA, Hung CT. Zonal chondrocytes seeded in a layered agarose hydrogel create engineered cartilage with depth-dependent cellular and mechanical inhomogeneity. *Tissue Eng Part A.* **2009** ; 15(9):2315-2324.
- 68 - **Whu SW**, Hung KC, Hsieh KH, Chen CH, Tsai CL, Hsu SH. In vitro and in vivo evaluation of chitosan-gelatin scaffolds for cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* **2013** ; 33(5):2855-2863.
- 69 - **Heymer A**, Bradica G, Eulert J, Nöth U. Multiphasic collagen fibre-PLA composites seeded with human mesenchymal stem cells for osteochondral defect repair: an in vitro study. *J Tissue Eng Regen Med.* **2009** ; 3(5):389-397.
- 70 - **Jung Y**, Park MS, Lee JW, Kim YH, Kim SH, Kim SH. Cartilage regeneration with highly-elastic three-dimensional scaffolds prepared from biodegradable poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone). *Biomaterials.* **2008** ; 29(35):4630-4636.
- 71 - **Krajewska B**. Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. *Sep Purif Technol.* **2005** ; 41:305-312.
- 72 - **Iwasa J**, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* **2009** ; 17(6):561-577. Review.

- 73 - **Galois L**, Freyria AM, Herbage D, Mainard D. [Cartilage tissue engineering: state-of-the-art and future approaches]. *Pathol Biol (Paris)*. **2005** ; 53(10):590-598. Review.
- 74 - **Sage A**, Chang AA, Schumacher BL, Sah RL, Watson D. Cartilage outgrowth in fibrin scaffolds. *Am J Rhinol Allergy*. **2009** ; 23(5):486-491.
- 75 - **Hofmann S**, Knecht S, Langer R, Kaplan DL, Vunjak-Novakovic G, Merkle HP, Meinel L. Cartilage-like tissue engineering using silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*. **2006** ; 12(10):2729-2738.
- 76 - **Wang Y**, Blasioli DJ, Kim HJ, Kim HS, Kaplan DL. Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials*. **2006** ; 27(25):4434-4442.
- 77 - **Tigli RS**, Ghosh S, Laha MM, Shevde NK, Daheron L, Gimble J, Gümüşderelioglu M, Kaplan DL. Comparative chondrogenesis of human cell sources in 3D scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*. **2009** Jul;3(5):348-360.
- 78 - **Domm C**, Schünke M, Steinhagen J, Freitag S, Kurz B. Influence of various alginate brands on the redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate bead culture under high and low oxygen tension. *Tissue Eng*. **2004** ; 10(11-12):1796-1805.
- 79 - **Chiang H**, Jiang CC. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. *J Formos Med Assoc*. **2009** ; 108(2):87-101.
- 80 - **Chung C**, Burdick JA. Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Tissue Eng Part A*. **2009** ; 15(2):243-254.
- 81 - **Rabel RA**, Osterbur L, Maki A, Lewis J, Wheeler MB. 193 hyaluronic Acid-glycidyl methacrylate hydrogels support in vitro chondrogenic differentiation of porcine adipose-derived stem cells. *Reprod Fertil Dev*. **2013** ; 26(1):211.
- 82 - **Schagemann JC**, Paul S, Casper ME, Rohwedel J, Kramer J, Kaps C, Mittelstaedt H, Fehr M, Reinholz GG. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells via biomimetic and bioactive poly- $\epsilon$ -caprolactone scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. **2013** ; 101(6):1620-1628.
- 83 - **Mintz BR**, Cooper JA Jr. Hybrid hyaluronic acid hydrogel/poly(  $\epsilon$ -caprolactone) scaffold provides mechanically favorable platform for cartilage tissue engineering studies. *J Biomed Mater Res A*. **2013** Sep 25.
- 84 - **Yamane S**, Iwasaki N, Majima T, Funakoshi T, Masuko T, Harada K, Minami A, Monde K, Nishimura S. Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. **2005** ; 26(6):611-619.
- 85 - **Kim IY**, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park IY, Kim BC, Cho CS. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv*. **2008** ; 26(1):1-21. Review.
- 86 - **Munirah S**, Kim SH, Ruszymah BH, Khang G. The use of fibrin and poly(lactic-co-glycolic acid) hybrid scaffold for articular cartilage tissue engineering: an in vivo analysis. *Eur Cell Mater*. **2008** ; 21;15:41-52.



- 87 - **Kock L**, van Donkelaar CC, Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res.* **2012** ; 347(3):613-627. Review.
- 88 - **Zein I**, Hutmacher DW, Tan KC, Teoh SH. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials.* **2002** ; 23(4):1169-1185.
- 89 - **Deshpande AA**, Heller J, Gurny R. Bioerodible polymers for ocular drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* **1998** ; 15(4):381-420. Review.
- 90 - **Im GI**, Ko JY, Lee JH. Chondrogenesis of adipose stem cells in a porous polymer scaffold: influence of the pore size. *Cell Transplant.* **2012** ; 21(11):2397-2405.
- 91 - **Fong CY**, Subramanian A, Gauthaman K, Venugopal J, Biswas A, Ramakrishna S, Bongso A. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells undergo enhanced chondrogenic differentiation when grown on nanofibrous scaffolds and in a sequential two-stage culture medium environment. *Stem Cell Rev.* **2012** ; 8(1):195-209.
- 92 - **Christensen BB**, Foldager CB, Hansen OM, Kristiansen AA, Le DQ, Nielsen AD, Nygaard JV, Bünger CE, Lind M. A novel nano-structured porous polycaprolactone scaffold improves hyaline cartilage repair in a rabbit model compared to a collagen type I/III scaffold: in vitro and in vivo studies. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* **2012** ; 20(6):1192-1204.
- 93 - **Nguyen QT**, Hwang Y, Chen AC, Varghese S, Sah RL. Cartilage-like mechanical properties of poly (ethylene glycol)-diacrylate hydrogels. *Biomaterials.* **2012** ; 33(28):6682-6690.
- 94 - **Mhanna R**, Oztürk E, Vallmajo-Martin Q, Millan C, Müller M, Zenobi-Wong M. GFOGER-Modified MMP-Sensitive Polyethylene Glycol (PEG) Hydrogels Induce Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A.* **2013** Oct 17.
- 95 - **Dashtdar H**, Murali MR, Abbas AA, Suhaeb AM, Selvaratnam L, Tay LX, Kamarul T. PVA-chitosan composite hydrogel versus alginate beads as a potential mesenchymal stem cell carrier for the treatment of focal cartilage defects. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* **2013** Oct 22.
- 96 - **Shokrgozar MA**, Bonakdar S, Dehghan MM, Emami SH, Montazeri L, Azari S, Rabbani M. Biological evaluation of polyvinyl alcohol hydrogel crosslinked by polyurethane chain for cartilage tissue engineering in rabbit model. *J Mater Sci Mater Med.* **2013** ; 24(10):2449-2460.
- 97 - **Isogai N**, Kusuhara H, Ikada Y, Ohtani H, Jacquet R, Hillyer J, Lowder E, Landis WJ. Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng.* **2006** ; 12(4):691-703.
- 98 - **Darling EM**, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res.* **2005** ; 23(2):425-432.
- 99 - **Schnabel M**, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vécsei V, Schlegel J. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage.* **2002** ; 10(1):62-70.
- 100 - **Dommm C**, Schünke M, Christesen K, Kurz B. Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage.* **2002** ; 10(1):13-22.

- 101 - **Babur BK**, Ghanavi P, Levett P, Lott WB, Klein T, Cooper-White JJ, Crawford R, Doran MR. The interplay between chondrocyte redifferentiation pellet size and oxygen concentration. *PLoS One*. **2013** ; 8(3):e58865.
- 102 - **Sandell LJ**, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res*. **2001**; 3(2):107-113. Review.
- 103 - **Tallheden T**, Bengtsson C, Brantsing C, Sjögren-Jansson E, Carlsson L, Peterson L, Brittberg M, Lindahl A. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis Res Ther*. **2005** ; 7(3):R560-R568.
- 104 - **Vinatier C**, Bouffi C, Merceron C, Gordeladze J, Brondello JM, Jorgensen C, Weiss P, Guicheux J, Noël D. Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr Stem Cell Res Ther*. **2009** ; 4(4):318-329. Review.
- 105 - **Pevsner-Fischer M**, Levin S, Zipori D. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem Cell Rev*. **2011** ; 7(3):560-568.
- 106 - **Kode JA**, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*. **2009** ; 11(4):377-391.
- 107 - **Bhatia R**, Hare JM. Mesenchymal stem cells: future source for reparative medicine. *Congest Heart Fail*. **2005** ; 11(2):87-91. Review.
- 108 - **Hilfiker A**, Kasper C, Hass R, Haverich A. Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation? *Langenbecks Arch Surg*. **2011** ; 396(4):489-497.
- 109 - **Tucker BA**, Karamsadkar SS, Khan WS, Pastides P. The role of bone marrow derived mesenchymal stem cells in sports injuries. *J Stem Cells*. **2010** ; 5(4):155-166. Review.
- 110 - **Emadedin M**, Aghdami N, Taghiyar L, Fazeli R, Moghadasali R, Jahangir S, Farjad R, Baghaban Eslaminejad M. Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis. *Arch Iran Med*. **2012** Jul;15(7):422-428.
- 111 - **Harvanová D**, Tóthová T, Sarišský M, Amrichová J, Rosocha J. Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells. *Folia Biol (Praha)*. **2011** ; 57(3):119-124.
- 112 - **Sakaguchi Y**, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*. **2005** ; 52(8):2521-2529.
- 113 - **Guilak F**, Estes BT, Diekman BO, Moutos FT, Gimble JM. 2010 Nicolas Andry Award: Multipotent adult stem cells from adipose tissue for musculoskeletal tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res*. **2010** ; 468(9):2530-2540.
- 114 - **Havlas V**, Kos P, Jendelová P, Lesný P, Trč T, Syková E. [Comparison of chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with cultured chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. **2011** ; 78(2):138-144.

- 115 - **Ansar MM**, Esfandiariy E, Mardani M, Hashemibeni B, Zarkesh-Esfahani SH, Hatf M, Kabiri A. A comparative study of aggrecan synthesis between natural articular chondrocytes and differentiated chondrocytes from adipose derived stem cells in 3D culture. *Adv Biomed Res.* **2012** ; 1:24.
- 116 - **Jorgensen C**. ADIPOA: cell therapy with stromal adipocytes cells. *Rev Med Interne.* **2011** Dec;32 Suppl 2:S203.
- 117 - **Wang HS**, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells.* **2004** ; 22(7):1330-1337.
- 118 - **La Rocca G**, Lo Iacono M, Corsello T, Corrao S, Farina F, Anzalone R. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells maintain the expression of key immunomodulatory molecules when subjected to osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation in vitro: new perspectives for cellular therapy. *Curr Stem Cell Res Ther.* **2013** ; 8(1):100-113.
- 119 - **Chen X**, Zhang F, He X, Xu Y, Yang Z, Chen L, Zhou S, Yang Y, Zhou Z, Sheng W, Zeng Y. Chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in type I collagen-hydrogel for cartilage engineering. *Injury.* **2013** ; 44(4):540-549.
- 120 - **Troyer DL**, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells.* **2008** ; 26(3):591-599. Review.
- 121 - **Christodoulou I**, Kolisis FN, Papaevangelidou D, Zoumpourlis V. Comparative Evaluation of Human Mesenchymal Stem Cells of Fetal (Wharton's Jelly) and Adult (Adipose Tissue) Origin during Prolonged In Vitro Expansion: Considerations for Cytotherapy. *Stem Cells Int.* **2013** ; 2013:246134.
- 122 - **Wang L**, Tran I, Seshareddy K, Weiss ML, Detamore MS. A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* **2009** ; 15(8):2259-2566.
- 123 - **Liu S**, Yuan M, Hou K, Zhang L, Zheng X, Zhao B, Sui X, Xu W, Lu S, Guo Q. Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells. *Cell Immunol.* **2012** Jul-Aug;278(1-2):35-44.
- 124 - **Stojkovic M**, Lako M, Strachan T, Murdoch A. Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. *Reproduction.* **2004** Sep;128(3):259-267. Review.
- 125 - **Nakajima M**, Wakitani S, Harada Y, Tanigami A, Tomita N. In vivo mechanical condition plays an important role for appearance of cartilage tissue in ES cell transplanted joint. *J Orthop Res.* **2008** Jan;26(1):10-17.
- 126 - **Yu J**, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* **2007** Dec 21;318(5858):1917-1920.
- 127 - **Okita K**, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* **2007** Jul 19;448(7151):313-317.

- 128 - **Takahashi K**, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. **2006** ; 25;126(4):663-676.
- 129 - **Takahashi K**, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. **2007** ; 30;131(5):861-872.
- 130 - **Kiskinis E**, Eggan K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J Clin Invest*. **2010** ;120(1):51-59.
- 131 - **Diekman BO**, Christoforou N, Willard VP, Sun H, Sanchez-Adams J, Leong KW, Guilak F. Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2012** ; 20;109(47):19172-19177.
- 132 - **Qu C**, Puttonen KA, Lindeberg H, Ruponen M, Hovatta O, Koistinaho J, Lammi MJ. Chondrogenic differentiation of human pluripotent stem cells in chondrocyte co-culture. *Int J Biochem Cell Biol*. **2013** ; 45(8):1802-1812.
- 133 - **Guzzo RM**, Gibson J, Xu RH, Lee FY, Drissi H. Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondrogenitor cells. *J Cell Biochem*. **2013** ; 114(2):480-490.
- 134 - **Teramura T**, Onodera Y, Mihara T, Hosoi Y, Hamanishi C, Fukuda K. Induction of mesenchymal progenitor cells with chondrogenic property from mouse-induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram*. **2010** ; 12(3):249-261.
- 135 - **Ellman MB**, Yan D, Ahmadiania K, Chen D, An HS, Im HJ. Fibroblast growth factor control of cartilage homeostasis. *J Cell Biochem*. **2013** ; 114(4):735-742. Review.
- 136 - **Chia SL**, Sawaji Y, Burleigh A, McLean C, Inglis J, Saklatvala J, Vincent T. Fibroblast growth factor 2 is an intrinsic chondroprotective agent that suppresses ADAMTS-5 and delays cartilage degradation in murine osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. **2009** Jul;60(7):2019-2027.
- 137 - **Maehara H**, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Kawasaki Y, Sugata Y, Yuasa M, Hirano M, Mochizuki N, Kikuchi M, Shinomiya K, Okawa A. Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Orthop Res*. **2010** ; 28(5):677-686.
- 138 - **Chuma H**, Mizuta H, Kudo S, Takagi K, Hiraki Y. One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. **2004** ; 12(10):834-842.
- 139 - **Ishii I**, Mizuta H, Sei A, Hirose J, Kudo S, Hiraki Y. Healing of full-thickness defects of the articular cartilage in rabbits using fibroblast growth factor-2 and a fibrin sealant. *J Bone Joint Surg Br*. **2007** ; 89(5):693-700.
- 140 - **Madry H**, Orth P, Kaul G, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Cucchiari M. Acceleration of articular cartilage repair by combined gene transfer of human insulin-like growth factor I and fibroblast growth factor-2 in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg*. **2010** ; 130(10):1311-1322.

- 141 - **Miyakoshi N**, Kobayashi M, Nozaka K, Okada K, Shimada Y, Itoi E. Effects of intraarticular administration of basic fibroblast growth factor with hyaluronic acid on osteochondral defects of the knee in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg.* **2005** ; 125(10):683-692.
- 142 - **Siebert CH**, Miltner O, Weber M, Sopka S, Koch S, Niedhart C. Healing of osteochondral grafts in an ovine model under the influence of bFGF. *Arthroscopy.* **2003** ; 19(2):182-187.
- 143 - **Solchaga LA**, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* **2005** ; 203(2):398-409.
- 144 - **Stewart AA**, Byron CR, Pondenis H, Stewart MC. Effect of fibroblast growth factor-2 on equine mesenchymal stem cell monolayer expansion and chondrogenesis. *Am J Vet Res.* **2007** ; 68(9):941-945.
- 145 - **Moore EE**, Bendele AM, Thompson DL, Littau A, Waggle KS, Reardon B, Ellsworth JL. Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* **2005** ; 13(7):623-631.
- 146 - **Kato Y**, Gospodarowicz D. Stimulation by glucocorticoid of the synthesis of cartilage-matrix proteoglycans produced by rabbit costal chondrocytes in vitro. *J Biol Chem.* **1985** ; 25;260(4):2364-2373.
- 147 - **Takano T**, Takigawa M, Suzuki F. Stimulation by glucocorticoids of the differentiated phenotype of chondrocytes and the proliferation of rabbit costal chondrocytes in culture. *J Biochem.* **1985** ; 97(4):1093-1100.
- 148 - **Horton WA**, Jayo MJ, Leipold HW, Machado MA, Campbell D, Ahmed S. Bovine achondrogenesis: evidence for defective chondrocyte differentiation. *Bone.* **1987** ; 8(3):191-197.
- 149 - **Quarto R**, Campanile G, Cancedda R, Dozin B. Thyroid hormone, insulin, and glucocorticoids are sufficient to support chondrocyte differentiation to hypertrophy: a serum-free analysis. *J Cell Biol.* **1992** ; 119(4):989-995.
- 150 - **Grigoriadis AE**, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol.* **1988** ; 106(6):2139-2151.
- 151 - **Grigoriadis AE**, Aubin JE, Heersche JN. Effects of dexamethasone and vitamin D3 on cartilage differentiation in a clonal chondrogenic cell population. *Endocrinology.* **1989** ; 125(4):2103-2110.
- 152 - **Shintani N**, Hunziker EB. Differential effects of dexamethasone on the chondrogenesis of mesenchymal stromal cells: influence of microenvironment, tissue origin and growth factor. *Eur Cell Mater.* **2011** ; 24(22):302-320.
- 153 - **Lu YC**, Evans CH, Grodzinsky AJ. Effects of short-term glucocorticoid treatment on changes in cartilage matrix degradation and chondrocyte gene expression induced by mechanical injury and inflammatory cytokines. *Arthritis Res Ther.* **2011** ; 13(5):R142.

- 154 - **Farquharson C**, Berry JL, Mawer EB, Seawright E, Whitehead CC. Ascorbic acid-induced chondrocyte terminal differentiation: the role of the extracellular matrix and 1,25-dihydroxyvitamin D. *Eur J Cell Biol.* **1998** ; 76(2):110-118.
- 155 - **Clark AG**, Rohrbaugh AL, Otterness I, Kraus VB. The effects of ascorbic acid on cartilage metabolism in guinea pig articular cartilage explants. *Matrix Biol.* **2002** Mar;21(2):175-184.
- 156 - **Ibold Y**, Lübke C, Pelz S, Augst H, Kaps C, Ringe J, Sittlinger M. Effect of different ascorbate supplementations on in vitro cartilage formation in porcine high-density pellet cultures. *Tissue Cell.* **2009** ; 41(4):249-256.
- 157 - **Tiku ML**, Allison GT, Naik K, Karry SK. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* **2003** ; 11(3):159-166.
- 158 - **Ronzière MC**, Roche S, Gouttenoire J, Démarteau 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(5):851-861.
- 159 - **Temu TM**, Wu KY, Gruppuso PA, Phornphutkul C. The mechanism of ascorbic acid-induced differentiation of ATDC5 chondrogenic cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2010** ; 299(2):E325-E334.
- 160 - **Lopes JM**, Larbier M. Influence of amino-acid concentration in the culture medium on the rate of amino-acid incorporation into protein and amino-acid oxidation of cultured chicken hepatocytes. *Reprod Nutr Dev.* **1994** ; 34(2):157-164.
- 161 - **Barker GA**, Wilkins RJ, Golding S, Ellory JC. Neutral amino acid transport in bovine articular chondrocytes. *J Physiol.* **1999** ; 1;514 ( Pt 3):795-808.
- 162 - **Ng KW**, DeFrancis JG, Kugler LE, Kelly TA, Ho MM, O'Connor CJ, Ateshian GA, Hung CT. Amino acids supply in culture media is not a limiting factor in the matrix synthesis of engineered cartilage tissue. *Amino Acids.* **2008** ; 35(2):433-438.
- 163 - **Hausmann E**, Neuman WF. Conversion of proline to hydroxyproline and its incorporation into collagen. *J Biol Chem.* **1961** ; 236:149-152.
- 164 - **Steck E**, Bertram H, Abel R, Chen B, Winter A, Richter W. Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* **2005** ; 23(3):403-411.
- 165 - **Na K**, Park JH, Kim SW, Sun BK, Woo DG, Chung HM, Park KH. Delivery of dexamethasone, ascorbate, and growth factor (TGF beta-3) in thermo-reversible hydrogel constructs embedded with rabbit chondrocytes. *Biomaterials.* **2006** ; 27(35):5951-5957.
- 166 - **Na K**, Choi SJ, Kim S, Sun BK, Woo DG, Chung HM, Park KH. Enhancement of cell proliferation and differentiation by combination of ascorbate and dexamethasone in thermo-reversible hydrogel constructs embedded with rabbit chondrocytes. *Biotechnol Lett.* **2007** ; 29(10):1453-1457.
- 167 - **Miller RE**, Grodzinsky AJ, Vanderploeg EJ, Lee C, Ferris DJ, Barrett MF, Kisiday JD, Frisbie DD. Effect of self-assembling peptide, chondrogenic factors, and bone marrow-derived stromal cells on osteochondral repair. *Osteoarthritis Cartilage.* **2010** ; 18(12):1608-1619.

- 168 - **Jin ES**, Min J, Jeon SR, Choi KH, Jeong JH. Analysis of molecular expression in adipose tissue-derived mesenchymal stem cells : prospects for use in the treatment of intervertebral disc degeneration. *J Korean Neurosurg Soc.* **2013** ; 53(4):207-212.
- 169 - **Henrionnet C**, Roeder E, Gillet R, Galois L, Bensoussan D, Mainard D, Netter P, Gillet P, Pinzano A. Expression of chondrogenic genes by undifferentiated vs. differentiated human mesenchymal stem cells using array technology. *Biomed Mater Eng.* **2010**;20(3):175-181.
- 170 - **Henrionnet C**, Wang Y, Roeder E, Gambier N, Galois L, Mainard D, Bensoussan D, Gillet P, Pinzano A. Effect of dynamic loading on MSCs chondrogenic differentiation in 3-D alginate culture. *Biomed Mater Eng.* **2012**;22(4):209-218.
- 171 - **Goldring MB**. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* **2006** ; 20(5):1003-1025.
- 172 - **Grimaud E**, Heymann D, Rédini F. Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2002** ; 13(3):241-257. Review.
- 173 - **Freyria AM**, Mallein-Gerin F. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. *Injury.* **2012** Mar;43(3):259-265.
- 174 - **Spagnoli A**, Longobardi L, O'Rear L. Cartilage disorders: potential therapeutic use of mesenchymal stem cells. *Endocr Dev.* **2005** ; 9:17-30. Review.
- 175 - **Freyria AM**, Courtes S, Mallein-Gerin F. Differentiation of adult human mesenchymal stem cells: chondrogenic effect of BMP-2. *Pathol Biol (Paris).* **2008**;56(5):326-333.
- 176 - **Wei F**, Zhou J, Wei X, Zhang J, Fleming BC, Terek R, Pei M, Chen Q, Liu T, Wei L. Activation of Indian Hedgehog Promotes Chondrocyte Hypertrophy and Upregulation of MMP-13 in Human Osteoarthritic Cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* **2012** ; 20(7):755-763.
- 177 - **Hwang NS**, Varghese S, Li H, Elisseeff J. Regulation of osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in PEG-ECM hydrogels. *Cell Tissue Res.* **2011** ; 344(3):499-509.
- 178 - **Kurth T**, Hedbom E, Shintani N, Sugimoto M, Chen FH, Haspl M, Martinovic S, Hunziker EB. Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. *Osteoarthritis Cartilage.* **2007** ; 15(10):1178-1189.
- 179 - **Jorgensen C**, Gordeladze J, Noel D. Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells. *Curr Opin Biotechnol.* **2004** ; 15(5):406-410.
- 180 - **Sekiya I**, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res.* **2005** ; 320(2):269-276.
- 181 - **Gründer T**, Gaissmaier C, Fritz J, Stoop R, Hortschansky P, Mollenhauer J, Aicher WK. Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis Cartilage.* **2004** ; 12(7):559-567.

- 182 - **Lin L**, Zhou C, Wei X, Hou Y, Zhao L, Fu X, Zhang J, Yu C. Articular cartilage repair using dedifferentiated articular chondrocytes and bone morphogenetic protein 4 in a rabbit model of articular cartilage defects. *Arthritis Rheum.* **2008** ; 58(4):1067-1075.
- 183 - **Schmitt B**, Ringe J, Häupl T, Notter M, Manz R, Burmester GR, Sittinger M, Kaps C. BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. *Differentiation.* **2003** ; 71(9-10):567-577.
- 184 - **Perrier E**, Ronzière MC, Bareille R, Pinzano A, Mallein-Gerin F, Freyria AM. Analysis of collagen expression during chondrogenic induction of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett.* **2011** Oct;33(10):2091-2101.
- 185 - **Shintani N**, Siebenrock KA, Hunziker EB. TGF- $\beta$ 1 enhances the BMP-2-induced chondrogenesis of bovine synovial explants and arrests downstream differentiation at an early stage of hypertrophy. *PLoS One.* **2013** ; 8(1):e53086.
- 186 - **Ronzière MC**, Perrier E, Mallein-Gerin F, Freyria AM. Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng.* **2010**;20(3):145-158.
- 187 - **Guzzo RM**, Gibson J, Xu RH, Lee FY, Drissi H. Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondroprogenitor cells. *J Cell Biochem.* **2013** Feb;114(2):480-490.
- 188 - **Noël D**, Gazit D, Bouquet C, Apparailly F, Bony C, Plerce P, Millet V, Turgeman G, Perricaudet M, Sany J, Jorgensen C. Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* **2004** ; 22(1):74-85.
- 189 - **Kwon SH**, Lee TJ, Park J, Hwang JE, Jin M, Jang HK, Hwang NS, Kim BS. Modulation of BMP-2-induced chondrogenic versus osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by cell-specific extracellular matrices. *Tissue Eng Part A.* **2013** Jan;19(1-2):49-58.
- 190 - **Silver IA**. Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **1975** ; 17;271(912):261-272.
- 191 - **Ströbel S**, Loparic M, Wendt D, Schenk AD, Candrian C, Lindberg RL, Moldovan F, Barbero A, Martin I. Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Res Ther.* **2010**;12(2):R34.
- 192 - **Gonsalves M**, Barker AL, Macpherson JV, Unwin PR, O'Hare D, Winlove CP. Scanning electrochemical microscopy as a local probe of oxygen permeability in cartilage. *Biophys J.* **2000** ; 78(3):1578-1588.
- 193 - **Malda J**, Martens DE, Tramper J, van Blitterswijk CA, Riesle J. Cartilage tissue engineering: controversy in the effect of oxygen. *Crit Rev Biotechnol.* **2003** ; 23(3):175-194.
- 194 - **Lafont JE**. Lack of oxygen in articular cartilage: consequences for chondrocyte biology. *Int J Exp Pathol.* **2010** ; 91(2):99-106. Review.
- 195 - **Lafont JE**, Talma S, Hopfgarten C, Murphy CL. Hypoxia promotes the differentiated human articular chondrocyte phenotype through SOX9-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem.* **2008** ; 22;283(8):4778-4786.



- 196 - **Foldager CB**, Nielsen AB, Munir S, Ulrich-Vinther M, Søballe K, Bünger C, Lind M. Combined 3D and hypoxic culture improves cartilage-specific gene expression in human chondrocytes. *Acta Orthop.* **2011** ; 82(2):234-240.
- 197 - **Schrobbach K**, Klein TJ, Crawford R, Upton Z, Malda J, Leavesley DI. Effects of oxygen and culture system on in vitro propagation and redifferentiation of osteoarthritic human articular chondrocytes. *Cell Tissue Res.* **2012** ; 347(3):649-663.
- 198 - **Xu Y**, Malladi P, Chiou M, Bekerman E, Giaccia AJ, Longaker MT. In vitro expansion of adipose-derived adult stromal cells in hypoxia enhances early chondrogenesis. *Tissue Eng.* **2007** ; 13(12):2981-2993.
- 199 - **Adesida AB**, Mulet-Sierra A, Jomha NM. Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* **2012** Mar 2;3(2):9.
- 200 - **Markway BD**, Tan GK, Brooke G, Hudson JE, Cooper-White JJ, Doran MR. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplant.* **2010** ; 19(1):29-42.
- 201 - **Portron S**, Merceron C, Gauthier O, Lesoeur J, Sourice S, Masson M, Fellah BH, Geffroy O, Lallemand E, Weiss P, Guicheux J, Vinatier C. Effects of in vitro low oxygen tension preconditioning of adipose stromal cells on their in vivo chondrogenic potential: application in cartilage tissue repair. *PLoS One.* **2013** ; 30;8(4):e62368.
- 202 - **Li J**, He F, Pei M. Creation of an in vitro microenvironment to enhance human fetal synovium-derived stem cell chondrogenesis. *Cell Tissue Res.* **2011** ; 345(3):357-365.
- 203 - **Holzwarth C**, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, Müller I. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol.* **2010** ; 28;11:11.
- 204 - **Yang DC**, Yang MH, Tsai CC, Huang TF, Chen YH, Hung SC. Hypoxia inhibits osteogenesis in human mesenchymal stem cells through direct regulation of RUNX2 by TWIST. *PLoS One.* **2011** ; 6(9):e23965.
- 205 - **Merceron C**, Vinatier C, Portron S, Masson M, Amiaud J, Guigand L, Chérel Y, Weiss P, Guicheux J. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2010** ; 298(2):C355-C364.
- 206 - **Pei M**, Chen D, Li J, Wei L. Histone deacetylase 4 promotes TGF-beta1-induced synovium-derived stem cell chondrogenesis but inhibits chondrogenically differentiated stem cell hypertrophy. *Differentiation.* **2009** ; 78(5):260-268.
- 207 - **Mainil-Varlet P**, Aigner T, Brittberg M, Bullough P, Hollander A, Hunziker E, Kandel R, Nehrer S, Pritzker K, Roberts S, Stauffer E; International Cartilage Repair Society. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg Am.* **2003** ; 85-A Suppl 2:45-57.

- 208 - **Gotterbarm T**, Breusch SJ, Schneider U, Jung M. The minipig model for experimental chondral and osteochondral defect repair in tissue engineering: retrospective analysis of 180 defects. *Lab Anim.* **2008** ; 42(1):71-82.
- 209 - **Bian L**, Zhai DY, Tous E, Rai R, Mauck RL, Burdick JA. Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF- $\beta$ 3 from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels in vitro and in vivo. *Biomaterials.* **2011** Sep;32(27):6425-6434.
- 210 - **Ranly DM**, McMillan J, Keller T, Lohmann CH, Meunch T, Cochran DL, Schwartz Z, Boyan BD. Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised mice. *J Bone Joint Surg Am.* **2005** Sep;87(9):2052-2064.
- 211 - **Matsumoto T**, Kubo S, Meszaros LB, Corsi KA, Cooper GM, Li G, Usas A, Osawa A, Fu FH, Huard J. The influence of sex on the chondrogenic potential of muscle-derived stem cells: implications for cartilage regeneration and repair. *Arthritis Rheum.* **2008** Dec;58(12):3809-3819.
- 212 - **Vacanti CA**, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg.* **1991** ; 88(5):753-759.
- 213 - **Moretti M**, Wendt D, Dickinson SC, Sims TJ, Hollander AP, Kelly DJ, Prendergast PJ, Heberer M, Martin I. Effects of in vitro preculture on in vivo development of human engineered cartilage in an ectopic model. *Tissue Eng.* **2005** ; 11(9-10):1421-1428.
- 214 - **Jin XB**, Sun YS, Zhang K, Wang J, Shi Tp, Ju XD, Lou SQ. Ectopic neocartilage formation from predifferentiated human adipose derived stem cells induced by adenoviral-mediated transfer of hTGF beta2. *Biomaterials.* **2007** ; 28(19):2994-3003.
- 215 - **Deponti D**, Di Giancamillo A, Mangiavini L, Pozzi A, Fraschini G, Sosio C, Domeneghini C, Peretti GM. Fibrin-based model for cartilage regeneration: tissue maturation from in vitro to in vivo. *Tissue Eng Part A.* **2012** ; 18(11-12):1109-1122.
- 216 - **Toupet K**, Maumus M, Peyrafitte JA, Bourin P, van Lent PL, Ferreira R, Orsetti B, Pirot N, Casteilla L, Jorgensen C, Noël D. Long-term detection of human adipose-derived mesenchymal stem cells after intraarticular injection in SCID mice. *Arthritis Rheum.* **2013** Jul;65(7):1786-1794.
- 217 - **ter Huurne M**, Schelbergen R, Blattes R, Blom A, de Munter W, Grevers LC, Jeanson J, Noël D, Casteilla L, Jorgensen C, van den Berg W, van Lent PL. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **2012** Nov;64(11):3604-3613.
- 218 - **Anraku Y**, Mizuta H, Sei A, Kudo S, Nakamura E, Senba K, Takagi K, Hiraki Y. The chondrogenic repair response of undifferentiated mesenchymal cells in rat full-thickness articular cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage.* **2008** ; 16(8):961-964.
- 219 - **Ferretti M**, Marra KG, Kobayashi K, Defail AJ, Chu CR. Controlled in vivo degradation of genipin crosslinked polyethylene glycol hydrogels within osteochondral defects. *Tissue Eng.* **2006** ; 12(9):2657-2663.
- 220 - **Watrin-Pinzano A**, Ruaud JP, Cheli Y, Gonord P, Grossin L, Gillet P, Blum A, Payan E, Olivier P, Guillot G, Netter P, Loeuille D. T2 mapping: an efficient MR quantitative technique to evaluate spontaneous cartilage repair in rat patella. *Osteoarthritis Cartilage.* **2004** ; 12(3):191-200.

- 221 - **Chu CR**, Douchis JS, Yoshioka M, Sah RL, Coutts RD, Amiel D. Osteochondral repair using perichondrial cells. A 1-year study in rabbits. *Clin Orthop Relat Res.* **1997** ; (340):220-229.
- 222 - **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.
- 223 - **Dell'Accio F**, Vanlauwe J, Bellemans J, Neys J, De Bari C, Luyten FP. Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Res.* **2003** ; 21(1):123-131.
- 224 - **Shapiro F**, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* **1993** Apr;75(4):532-553.
- 225 - **Hunziker EB**. Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clin Orthop Relat Res.* **1999** ; (367 Suppl):S135-S146. Review.
- 226 - **Buma P**, Pieper JS, van Tienen T, van Susante JL, van der Kraan PM, Veerkamp JH, van den Berg WB, Veth RP, van Kuppevelt TH. Cross-linked type I and type II collagenous matrices for the repair of full-thickness articular cartilage defects--a study in rabbits. *Biomaterials.* **2003** ; 24(19):3255-3263.
- 227 - **Han CW**, Chu CR, Adachi N, Usas A, Fu FH, Huard J, Pan Y. Analysis of rabbit articular cartilage repair after chondrocyte implantation using optical coherence tomography. *Osteoarthritis Cartilage.* **2003** ; 11(2):111-121.
- 228 - **Chen J**, Chen H, Li P, Diao H, Zhu S, Dong L, Wang R, Guo T, Zhao J, Zhang J. Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone in vivo using MSCs induced by a spatially controlled gene delivery system in bilayered integrated scaffolds. *Biomaterials.* **2011** ; 32(21):4793-4805.
- 229 - **Lee JC**, Lee SY, Min HJ, Han SA, Jang J, Lee S, Seong SC, Lee MC. Synovium-derived mesenchymal stem cells encapsulated in a novel injectable gel can repair osteochondral defects in a rabbit model. *Tissue Eng Part A.* **2012** ; 18(19-20):2173-2186.
- 230 - **Madry H**, Kaul G, Zurakowski D, Vunjak-Novakovic G, Cucchiari M. Cartilage constructs engineered from chondrocytes overexpressing IGF-I improve the repair of osteochondral defects in a rabbit model. *Eur Cell Mater.* **2013** ; 16;25:229-247.
- 231 - **Lee SJ**, Broda C, Atala A, Yoo JJ. Engineered cartilage covered ear implants for auricular cartilage reconstruction. *Biomacromolecules.* **2011** Feb 14;12(2):306-313.
- 232 - **Bahrani H**, Razmkhah M, Ashraf MJ, Tanideh N, Chenari N, Khademi B, Ghaderi A. Differentiation of adipose-derived stem cells into ear auricle cartilage in rabbits. *J Laryngol Otol.* **2012** Aug;126(8):770-774.
- 233 - **Ahern BJ**, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage.* **2009** ;17(6):705-713. Review.

- 234 - **Feczkó P**, Hangody L, Varga J, Bartha L, Diószegi Z, Bodó G, Kendik Z, Módis L. Experimental results of donor site filling for autologous osteochondral mosaicplasty. *Arthroscopy*. **2003** ; 19(7):755-761.
- 235 - **Murphy JM**, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. **2003** ; 48(12):3464-3474.
- 236 - **Nam H**, Karunanithi P, Loo WC, Naveen S, Chen H, Hussin P, Chan L, Kamarul T. The effects of staged intra-articular injection of cultured autologous mesenchymal stromal cells on the repair of damaged cartilage: a pilot study in caprine model. *Arthritis Res Ther*. **2013** Sep 20;15(5):R129.
- 237 - **Jackson DW**, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am*. **2001** ; 83-A(1):53-64.
- 238 - **Niederauer GG**, Slivka MA, Leatherbury NC, Korvick DL, Harroff HH, Ehler WC, Dunn CJ, Kieswetter K. Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats. *Biomaterials*. **2000** ; 21(24):2561-2574.
- 239 - **Brehm W**, Aklin B, Yamashita T, Rieser F, Trüb T, Jakob RP, Mainil-Varlet P. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. *Osteoarthritis Cartilage*. **2006** ; 14(12):1214-1226.
- 240 - **Simon TM**, Aberman HM. Cartilage regeneration and repair testing in a surrogate large animal model. *Tissue Eng Part B Rev*. **2010** ; 16(1):65-79.
- 241 - **Miot S**, Brehm W, Dickinson S, Sims T, Wixmerten A, Longinotti C, Hollander AP, Mainil-Varlet P, Martin I. Influence of in vitro maturation of engineered cartilage on the outcome of osteochondral repair in a goat model. *Eur Cell Mater*. **2012** ; 23:222-236.
- 242 - **Newman E**, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone*. **1995** ; 16(4 Suppl):277S-284S. Review.
- 243 - **Vasara AI**, Hyttinen MM, Pulliainen O, Lammi MJ, Jurvelin JS, Peterson L, Lindahl A, Helminen HJ, Kiviranta I. Immature porcine knee cartilage lesions show good healing with or without autologous chondrocyte transplantation. *Osteoarthritis Cartilage*. **2006** ; 14(10):1066-1074.
- 244 - **Kääb MJ**, Gwynn IA, Nötzli HP. Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. *J Anat*. **1998** ; 193 ( Pt 1):23-34.
- 245 - **Frisbie DD**, Cross MW, McIlwraith CW. A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet Comp Orthop Traumatol*. **2006** ; 19(3):142-146.
- 246 - **Pan Y**, Li Z, Xie T, Chu CR. Hand-held arthroscopic optical coherence tomography for in vivo high-resolution imaging of articular cartilage. *J Biomed Opt*. **2003** ; 8(4):648-654.
- 247 - **Zelle S**, Zantop T, Schanz S, Petersen W. Arthroscopic techniques for the fixation of a three-dimensional scaffold for autologous chondrocyte transplantation: structural properties in an in vitro model. *Arthroscopy*. **2007** ; 23(10):1073-1078.

- 248 - **Chiang H**, Kuo TF, Tsai CC, Lin MC, She BR, Huang YY, Lee HS, Shieh CS, Chen MH, Ramshaw JA, Werkmeister JA, Tuan RS, Jiang CC. Repair of porcine articular cartilage defect with autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res.* **2005** ; 23(3):584-593.
- 249 - **Chang CH**, Kuo TF, Lin CC, Chou CH, Chen KH, Lin FH, Liu HC. Tissue engineering-based cartilage repair with allogeneous chondrocytes and gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold: a porcine model assessed at 18, 24, and 36 weeks. *Biomaterials.* **2006** ; 27(9):1876-1888.
- 250 - **Petersen JP**, Ueblacker P, Goepfert C, Adamietz P, Baumbach K, Stork A, Rueger JM, Poertner R, Amling M, Meenen NM. Long term results after implantation of tissue engineered cartilage for the treatment of osteochondral lesions in a minipig model. *J Mater Sci Mater Med.* **2008** ; 19(5):2029-2038.
- 251 - **Miyazaki T**, Miyauchi S, Matsuzaka S, Yamagishi C, Kobayashi K. Formation of proteoglycan and collagen-rich scaffold-free stiff cartilaginous tissue using two-step culture methods with combinations of growth factors. *Tissue Eng Part A.* **2010** ; 16(5):1575-1584.
- 252 - **Nixon AJ**, Fortier LA, Goodrich LR, Ducharme NG. Arthroscopic reattachment of osteochondritis dissecans lesions using resorbable polydioxanone pins. *Equine Vet J.* **2004** ; 36(5):376-383.
- 253 - **Koch TG**, Betts DH. Stem cell therapy for joint problems using the horse as a clinically relevant animal model. *Expert Opin Biol Ther.* **2007** ; 7(11):1621-1626. Review.
- 254 - **Hidaka C**, Goodrich LR, Chen CT, Warren RF, Crystal RG, Nixon AJ. Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res.* **2003** ; 21(4):573-583.
- 255 - **Strauss EJ**, Goodrich LR, Chen CT, Hidaka C, Nixon AJ. Biochemical and biomechanical properties of lesion and adjacent articular cartilage after chondral defect repair in an equine model. *Am J Sports Med.* **2005** ; 33(11):1647-1653.
- 256 - **Vidal MA**, Robinson SO, Lopez MJ, Paulsen DB, Borkhsenius O, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Vet Surg.* **2008** ; 37(8):713-724.
- 257 - **Wilke MM**, Nydam DV, Nixon AJ. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J Orthop Res.* **2007** ; 25(7):913-925.
- 258 - **Hurtig MB**, Buschmann MD, Fortier LA, Hoemann CD, Hunziker EB, Jurvelin JS, Mainil-Varlet C, Mellwraith CW, Sah RL, Whiteside RA. Preclinical Studies for Cartilage Repair: Recommendations from the International Cartilage Repair Society. *Cartilage.* **2011** ; 2: 137-152.
- 259 - **Kangarlu A**, Gahunia HK. Magnetic resonance imaging characterization of osteochondral defect repair in a goat model at 8 T. *Osteoarthritis Cartilage.* **2006** Jan;14(1):52-62.
- 260 - **Reichmann WM**, Maillefert JF, Hunter DJ, Katz JN, Conaghan PG, Losina E. Responsiveness to change and reliability of measurement of radiographic joint space width in osteoarthritis of the knee: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage.* **2011** ; 19(5):550-556.

- 261 - **Chu Miow Lin D**, Reichmann WM, Gossec L, Losina E, Conaghan PG, Maillefert JF. Validity and responsiveness of radiographic joint space width metric measurement in hip osteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. **2011** ; 19(5):543-549.
- 262 - **Down C**, Xu Y, Osagie LE, Bostrom MP. The lack of correlation between radiographic findings and cartilage integrity. *J Arthroplasty*. **2011** ; 26(6):949-954.
- 263 - **Hunter DJ**, Zhang YQ, Tu X, Lavalley M, Niu JB, Amin S, Guermazi A, Genant H, Gale D, Felson DT. Change in joint space width: hyaline articular cartilage loss or alteration in meniscus? *Arthritis Rheum*. **2006** ; 54(8):2488-2495.
- 264 - **Guermazi A**, Roemer FW, Burstein D, Hayashi D. Why radiography should no longer be considered a surrogate outcome measure for longitudinal assessment of cartilage in knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. **2011** ; 13(6):247.
- 265 - **Schmid MR**, Pfirrmann CW, Hodler J, et al. Cartilage lesions in the ankle joint: comparison of MR arthrography and CT arthrography. *Skeletal Radiol*. **2003**; 32:259–265.
- 266 - **Schmid MR**, Pfirrmann CW, Hodler J, et al. Cartilage lesions in the ankle joint: comparison of MR arthrography and CT arthrography. *Skeletal Radiol*. **2003**; 32:259–265.
- 267 - **Keen HI**, Conaghan PG. Ultrasonography in osteoarthritis. *Radiol Clin North Am*. **2009** ; 47(4):581-594.
- 268 - **Guermazi A**, Burstein D, Conaghan P, Eckstein F, Hellio Le Graverand-Gastineau MP, Keen H, Roemer FW. Imaging in osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. **2008** ; 34(3):645-687.
- 269 - **Pooley RA**. AAPM/RSNA physics tutorial for residents: fundamental physics of MR imaging. *Radiographics*. **2005** Jul-Aug;25(4):1087-1099.
- 270 - **Rogers AD**, Payne JE, Yu JS. Cartilage imaging: a review of current concepts and emerging technologies. *Semin Roentgenol*. **2013** ; 48(2):148-157.
- 271 - **Eckstein F**, Faber S, Mühlbauer R, Hohe J, Englmeier KH, Reiser M, Putz R. Functional adaptation of human joints to mechanical stimuli. *Osteoarthritis Cartilage*. **2002** ; 10(1):44-50.
- 272 - **Hohe J**, Ateshian G, Reiser M, Englmeier KH, Eckstein F. Surface size, curvature analysis, and assessment of knee joint incongruity with MRI in vivo. *Magn Reson Med*. **2002** ; 47(3):554-561.
- 273 - **Blumenkrantz G**, Majumdar S. Quantitative magnetic resonance imaging of articular cartilage in osteoarthritis. *Eur Cell Mater*. **2007** ; 13:76-86. Review.
- 274 - **Gold GE**, Chen CA, Koo S, Hargreaves BA, Bangerter NK. Recent advances in MRI of articular cartilage. *AJR Am J Roentgenol*. **2009** ; 193(3):628-638.
- 275 - **Binks DA**, Hodgson RJ, Ries ME, Foster RJ, Smye SW, McGonagle D, Radjenovic A. Quantitative parametric MRI of articular cartilage: a review of progress and open challenges. *Br J Radiol*. **2013** Mar;86(1023):20120163.
- 276 - **Regatte RR**, Akella SV, Lonner JH, Kneeland JB, Reddy R. T1rho relaxation mapping in human osteoarthritis (OA) cartilage: comparison of T1rho with T2. *J Magn Reson Imaging*. **2006** ; 23(4):547-553.

- 277 - **Choi JA**, Gold GE. MR imaging of articular cartilage physiology. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. **2011** May;19(2):249-282.
- 278 - **Crema MD**, Roemer FW, Marra MD, Burstein D, Gold GE, Eckstein F, Baum T, Mosher TJ, Carrino JA, Guermazi A. Articular cartilage in the knee: current MR imaging techniques and applications in clinical practice and research. *Radiographics*. **2011** Jan-Feb;31(1):37-61.
- 279 - **Welsch GH**, Mamisch TC, Domayer SE, Dorotka R, Kutscha-Lissberg F, Marlovits S, White LM, Trattnig S. Cartilage T2 assessment at 3-T MR imaging: in vivo differentiation of normal hyaline cartilage from reparative tissue after two cartilage repair procedures--initial experience. *Radiology*. **2008** Apr;247(1):154-161.
- 280 - **Matzat SJ**, van Tiel J, Gold GE, Oei EH. Quantitative MRI techniques of cartilage composition. *Quant Imaging Med Surg*. **2013** Jun;3(3):162-174.
- 281 - **Rogers AD**, Payne JE, Yu JS. Cartilage imaging: a review of current concepts and emerging technologies. *Semin Roentgenol*. **2013** Apr;48(2):148-157.
- 282 - **Burstein D**, Gray ML, Hartman AL, Gipe R, Foy BD. Diffusion of small solutes in cartilage as measured by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and imaging. *J Orthop Res*. **1993** ; 11(4):465-478.
- 283 - **Mlynárik V**, Sulzbacher I, Bittsanský M, Fuiko R, Trattnig S. Investigation of apparent diffusion constant as an indicator of early degenerative disease in articular cartilage. *J Magn Reson Imaging*. **2003** ;17(4):440-444.
- 284 - **Xu J**, Xie G, Di Y, Bai M, Zhao X. Value of T2-mapping and DWI in the diagnosis of early knee cartilage injury. *J Radiol Case Rep*. **2011** ; 5(2):13-18.
- 285 - **Chen B, Roeder E**, Vuissoz PA, Gillet P, Felblinger J, Beaumont M, Pinzano A. Respective interest of T2 mapping and diffusion tensor imaging in assessing porcine knee cartilage with MR at 3 Teslas. *Biomed Mater Eng*. **2013** ; 23(4):263-272.
- 286 - **Villa C**, Erratico S, Razini P, Fiori F, Rustichelli F, Torrente Y, Belicchi M. Stem cell tracking by nanotechnologies. *Int J Mol Sci*. **2010** ; 11(3):1070-1081.
- 287 - **Bohnen NI**, Charron M, Reyes J, Rubinstein W, Strom SC, Swanson D, Towbin R. Use of indium-111-labeled hepatocytes to determine the biodistribution of transplanted hepatocytes through portal vein infusion. *Clin Nucl Med*. **2000** ; 25(6):447-450.
- 288 - **Hofmann M**, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH, Drexler H. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*. **2005** ; 111(17):2198-2202.
- 289 - **Slotkin JR**, Chakrabarti L, Dai HN, Carney RS, Hirata T, Bregman BS, Gallicano GI, Corbin JG, Haydar TF. In vivo quantum dot labeling of mammalian stem and progenitor cells. *Dev Dyn*. **2007** ; 236(12):3393-3401.

- 290 - **Zhang H**, Song P, Tang Y, Zhang XL, Zhao SH, Wei YJ, Hu SS. Injection of bone marrow mesenchymal stem cells in the borderline area of infarcted myocardium: heart status and cell distribution. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **2007** ; 134(5):1234-1240.
- 291 - **Li Z**, Suzuki Y, Huang M, Cao F, Xie X, Connolly AJ, Yang PC, Wu JC. Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects. *Stem Cells.* **2008** ; 26(4):864-873.
- 292 - **Torrente Y**, Gavina M, Belicchi M, Fiori F, Komlev V, Bresolin N, Rustichelli F. High-resolution X-ray microtomography for three-dimensional visualization of human stem cell muscle homing. *FEBS Lett.* **2006** ; 580(24):5759-5764.
- 293 - **Ransohoff KJ**, Wu JC. Advances in cardiovascular molecular imaging for tracking stem cell therapy. *Thromb Haemost.* **2010** ; 104(1):13-22.
- 294 - **Heymer A**, Haddad D, Weber M, Gbureck U, Jakob PM, Eulert J, Nöth U. Iron oxide labelling of human mesenchymal stem cells in collagen hydrogels for articular cartilage repair. *Biomaterials.* **2008** ; 29(10):1473-1483.
- 295 - **Zhang Z**, Mascheri N, Dharmakumar R, Fan Z, Paunesku T, Woloschak G, Li D. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-labeled cells as an effective vehicle for tracking the GFP gene marker using magnetic resonance imaging. *Cytotherapy.* **2009** ; 11(1):43-51.
- 296 - **Liu W**, Frank JA. Detection and quantification of magnetically labeled cells by cellular MRI. *Eur J Radiol.* **2009** ; 70(2):258-264.
- 297 - **Neri M**, Maderna C, Cavazzin C, Deidda-Vigoriti V, Politi LS, Scotti G, Marzola P, Sbarbati A, Vescovi AL, Gritti A. Efficient in vitro labeling of human neural precursor cells with superparamagnetic iron oxide particles: relevance for in vivo cell tracking. *Stem Cells.* **2008** ; 26(2):505-516.
- 298 - **Farrell E**, Wielopolski P, Pavljasevic P, van Tiel S, Jahr H, Verhaar J, Weinans H, Krestin G, O'Brien FJ, van Osch G, Bernsen M. Effects of iron oxide incorporation for long term cell tracking on MSC differentiation in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* **2008** ; 369(4):1076-1081.
- 299 - **Boutry S**, Brunin S, Mahieu I, Laurent S, Vander Elst L, Muller RN. Magnetic labeling of non-phagocytic adherent cells with iron oxide nanoparticles: a comprehensive study. *Contrast Media Mol Imaging.* **2008** ; 3(6):223-232.
- 300 - **Babic M**, Horák D, Trchová M, Jendelová P, Glogarová K, Lesný P, Herynek V, Hájek M, Syková E. Poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug Chem.* **2008** ; 19(3):740-750.
- 301 - **Kostura L**, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger MF, Bulte JW. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomed.* **2004** ; 17(7):513-517.
- 302 - **Arbab AS**, Yocum GT, Rad AM, Khakoo AY, Fellowes V, Read EJ, Frank JA. Labeling of cells with ferumoxides-protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells. *NMR Biomed.* **2005** ; 18(8):553-559.



- 303 - **Jing XH**, Yang L, Duan XJ, Xie B, Chen W, Li Z, Tan HB. In vivo MR imaging tracking of magnetic iron oxide nanoparticle labeled, engineered, autologous bone marrow mesenchymal stem cells following intra-articular injection. *Joint Bone Spine*. **2008** ; 75(4):432-438.
- 304 - **Reddy AM**, Kwak BK, Shim HJ, Ahn C, Lee HS, Suh YJ, Park ES. In vivo tracking of mesenchymal stem cells labeled with a novel chitosan-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles using 3.0T MRI. *J Korean Med Sci*. **2010** ; 25(2):211-219.
- 305 - **Goldberg RL**, Kolibas LM. An improved method for determining proteoglycans synthesized by chondrocytes in culture. *Connect Tissue Res*. **1990**;24(3-4):265-275.
- 306 - **Facucho-Oliveira JM**, St John JC. The relationship between pluripotency and mitochondrial DNA proliferation during early embryo development and embryonic stem cell differentiation. *Stem Cell Rev*. **2009**;5(2):140-158.
- 307 - **Birket MJ**, Orr AL, Gerencser AA, Madden DT, Vitelli C, Swistowski A, Brand MD, Zeng X. A reduction in ATP demand and mitochondrial activity with neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Cell Sci*. **2011**;124(Pt 3):348-358.
- 308 - **Merceron C**, Vinatier C, Portron S, Masson M, Amiaud J, Guigand L, Chérel Y, Weiss P, Guicheux J. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. **2010** Feb;298(2):C355-364.
- 309 - **Müller J**, Benz K, Ahlers M, Gaissmaier C, Mollenhauer J. Hypoxic conditions during expansion culture prime human mesenchymal stromal precursor cells for chondrogenic differentiation in three-dimensional cultures. *Cell Transplant*. **2011**;20(10):1589-1602.
- 310 - **Suzuki S**, Muneta T, Tsuji K, Ichinose S, Makino H, Umezawa A, Sekiya I. Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration. *Arthritis Res Ther*. **2012**;14(3):R136.
- 311 - **Shintani N**, Hunziker EB. Chondrogenic differentiation of bovine synovium: bone morphogenetic proteins 2 and 7 and transforming growth factor beta1 induce the formation of different types of cartilaginous tissue. *Arthritis Rheum*. **2007**;56(6):1869-1879.
- 312 - **Mendelson A**, Frank E, Allred C, Jones E, Chen M, Zhao W, Mao JJ. Chondrogenesis by chemotactic homing of synovium, bone marrow, and adipose stem cells in vitro. *FASEB J*. **2011** Oct;25(10):3496-3504.
- 313 - **Rui YF**, DU L, Wang Y, Wang Y, Lui PP, Tang TT, Chan KM, Dai KR. Bone morphogenetic protein 2 promotes transforming growth factor  $\beta$ 3-induced chondrogenesis of human osteoarthritic synovium-derived stem cells. *Chin Med J (Engl)*. **2010** Nov;123(21):3040-3048.
- 314 - **Koga H**, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya I. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res*. **2008**;333(2):207-215.
- 315 - **Ichinose S**, Muneta T, Koga H, Segawa Y, Tagami M, Tsuji K, Sekiya I. Morphological differences during in vitro chondrogenesis of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes. *Lab Invest*. **2010** Feb;90(2):210-221.

- 316 - **Futami I**, Ishijima M, Kaneko H, Tsuji K, Ichikawa-Tomikawa N, Sadatsuki R, Muneta T, Arikawa-Hirasawa E, Sekiya I, Kaneko K. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal cells from the mouse synovium. *PLoS One*. **2012**;7(9):e45517.
- 317 - **Suzuki S**, Muneta T, Tsuji K, Ichinose S, Makino H, Umezawa A, Sekiya I. Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration. *Arthritis Res Ther*. **2012** Jun 7;14(3):R136.
- 318 - **Ryu E**, Hong S, Kang J, Woo J, Park J, Lee J, Seo JS. Identification of senescence-associated genes in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **2008** Jul 4;371(3):431-436.
- 319 - **Ksiazek K**. A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence. *Rejuvenation Res*. **2009** Apr;12(2):105-116.
- 320 - **Wagner W**, Ho AD, Zenke M. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part B Rev*. **2010** Aug;16(4):445-453.
- 321 - **Dhanasekaran M**, Indumathi S, Lissa RP, Harikrishnan R, Rajkumar JS, Sudarsanam D. A comprehensive study on optimization of proliferation and differentiation potency of bone marrow derived mesenchymal stem cells under prolonged culture condition. *Cytotechnology*. **2013** Mar;65(2):187-197.
- 322 - **Bertolo A**, Mehr M, Janner-Jametti T, Graumann U, Aebli N, Baur M, Ferguson SJ, Stoyanov JV. An in vitro expansion score for tissue-engineering applications with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. **2013** Apr 10.
- 323 - **Munir S**, Foldager CB, Lind M, Zachar V, Søballe K, Koch TG. Hypoxia enhances chondrogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in scaffold-free and scaffold systems. *Cell Tissue Res*. **2014** Jan;355(1):89-102.
- 324 - **Lee HH**, Chang CC, Shieh MJ, Wang JP, Chen YT, Young TH, Hung SC. Hypoxia enhances chondrogenesis and prevents terminal differentiation through PI3K/Akt/FoxO dependent anti-apoptotic effect. *Sci Rep*. **2013**;3:2683.
- 325 - **Cheung JO**, Grant ME, Jones CJ, Hoyland JA, Freemont AJ, Hillarby MC. Apoptosis of terminal hypertrophic chondrocytes in an in vitro model of endochondral ossification. *J Pathol*. **2003** Nov;201(3):496-503
- 326 - **Wang CY**, Chen LL, Kuo PY, Chang JL, Wang YJ, Hung SC. Apoptosis in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells: effect of serum and medium supplements. *Apoptosis*. **2010** Apr;15(4):439-449.
- 327 - **Gawlitta D**, van Rijen MH, Schrijver EJ, Alblas J, Dhert WJ. Hypoxia impedes hypertrophic chondrogenesis of human multipotent stromal cells. *Tissue Eng Part A*. **2012** Oct;18(19-20):1957-1966.
- 328 - **Sheehy EJ**, Buckley CT, Kelly DJ. Oxygen tension regulates the osteogenic, chondrogenic and endochondral phenotype of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **2012** Jan 6;417(1):305-310.

- 329 - **Vinardell T**, Sheehy EJ, Buckley CT, Kelly DJ. A comparison of the functionality and in vivo phenotypic stability of cartilaginous tissues engineered from different stem cell sources. *Tissue Eng Part A*. **2012** Jun;18(11-12):1161-1170.
- 330 - **Darling EM**, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res*. **2005** Mar;23(2):425-432.
- 331 - **Schulze-Tanzil G**, de Souza P, Villegas Castrejon H, John T, Merker HJ, Scheid A, Shakibaei M. Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res*. **2002** Jun;308(3):371-379.
- 332 - **Kang SW**, Yoo SP, Kim BS. Effect of chondrocyte passage number on histological aspects of tissue-engineered cartilage. *Biomed Mater Eng*. **2007**;17(5):269-276.
- 333 - **Cancedda R**, Descalzi Cancedda F, Castagnola P. Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol*. **1995**;159:265-358. Review.
- 334 - **Baugé C**, Duval E, Ollitrault D, Girard N, Leclercq S, Galéra P, Boumédiène K. Type II TGF $\beta$  receptor modulates chondrocyte phenotype. *Age (Dordr)*. **2013** Aug;35(4):1105-1116.
- 335 - **Malda J**, van Blitterswijk CA, Grojec M, Martens DE, Tramper J, Riesle J. Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances redifferentiation. *Tissue Eng*. **2003** Oct;9(5):939-948.
- 336 - **Yang JJ**, Chen YM, Liu JF, Kurokawa T, Gong JP. Spontaneous redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes on hydrogel surfaces. *Tissue Eng Part A*. **2010** Aug;16(8):2529-2540.
- 337 - **Goldberg AJ**, Lee DA, Bader DL, Bentley G. Autologous chondrocyte implantation. Culture in a TGF-beta-containing medium enhances the re-expression of a chondrocytic phenotype in passaged human chondrocytes in pellet culture. *J Bone Joint Surg Br*. **2005** Jan;87(1):128-134.
- 338 - **Liu G**, Kawaguchi H, Ogasawara T, Asawa Y, Kishimoto J, Takahashi T, Chung UI, Yamaoka H, Asato H, Nakamura K, Takato T, Hoshi K. Optimal combination of soluble factors for tissue engineering of permanent cartilage from cultured human chondrocytes. *J Biol Chem*. **2007** Jul 13;282(28):20407-20415.
- 339 - **Yang KG**, Saris DB, Geuze RE, Helm YJ, Rijen MH, Verbout AJ, Dhert WJ, Creemers LB. Impact of expansion and redifferentiation conditions on chondrogenic capacity of cultured chondrocytes. *Tissue Eng*. **2006** Sep;12(9):2435-2447.
- 340 - **Dehne T**, Karlsson C, Ringe J, Sittinger M, Lindahl A. Chondrogenic differentiation potential of osteoarthritic chondrocytes and their possible use in matrix-associated autologous chondrocyte transplantation. *Arthritis Res Ther*. **2009**;11(5):R133.09
- 341 - **Jakobsen RB**, Shahdadfar A, Reinholt FP, Brinchmann JE. Chondrogenesis in a hyaluronic acid scaffold: comparison between chondrocytes and MSC from bone marrow and adipose tissue. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. **2010** Oct;18(10):1407-1416.
- 342 - **Caron MM**, Emans PJ, Coolsen MM, Voss L, Surtel DA, Cremers A, van Rhijn LW, Welting TJ. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis Cartilage*. **2012** Oct;20(10):1170-1178.

- 343 - **Murphy CL**, Polak JM. Control of human articular chondrocyte differentiation by reduced oxygen tension. *J Cell Physiol.* **2004** Jun;199(3):451-459.
- 344 - **Lafont JE**, Talma S, Murphy CL. Hypoxia-inducible factor 2alpha is essential for hypoxic induction of the human articular chondrocyte phenotype. *Arthritis Rheum.* **2007** Oct;56(10):3297-3306.
- 345 - **Markway BD**, Cho H, Johnstone B. Hypoxia promotes redifferentiation and suppresses markers of hypertrophy and degeneration in both healthy and osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* **2013** Aug 21;15(4):R92.
- 346 - **Duval E**, Leclercq S, Elissalde JM, Demoor M, Galéra P, Boumédiène K. Hypoxia-inducible factor 1alpha inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent redifferentiation of chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **2009** Oct;60(10):3038-3048.
- 347 - **Egli RJ**, Bastian JD, Ganz R, Hofstetter W, Leunig M. Hypoxic expansion promotes the chondrogenic potential of articular chondrocytes. *J Orthop Res.* **2008** Jul;26(7):977-985.
- 348 - **Henderson JH**, Ginley NM, Caplan AI, Niyibizi C, Dennis JE. Low oxygen tension during incubation periods of chondrocyte expansion is sufficient to enhance postexpansion chondrogenesis. *Tissue Eng Part A.* **2010** May;16(5):1585-1593.
- 349 - **Tallheden T**, Karlsson C, Brunner A, Van Der Lee J, Hagg R, Tommasini R, Lindahl A. Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* **2004** Jul;12(7):525-535.
- 350 - **Hsieh-Bonassera ND**, Wu I, Lin JK, Schumacher BL, Chen AC, Masuda K, Bugbee WD, Sah RL. Expansion and redifferentiation of chondrocytes from osteoarthritic cartilage: cells for human cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* **2009** Nov;15(11):3513-3523.
- 351 - **Mukaida T**, Urabe K, Naruse K, Aikawa J, Katano M, Hyon SH, Itoman M. Influence of three-dimensional culture in a type II collagen sponge on primary cultured and dedifferentiated chondrocytes. *J Orthop Sci.* **2005** Sep;10(5):521-528.
- 352 - **Albrecht C**, Schlegel W, Bartko P, Eckl P, Jagersberger T, Vécsei V, Marlovits S. Changes in the endogenous BMP expression during redifferentiation of chondrocytes in 3D cultures. *Int J Mol Med.* **2010** Sep;26(3):317-323.
- 353 - Tentative method of analysis for nitrogen dioxide content of the atmosphere (Griess-Saltzman reaction). *Health Lab Sci.* **1969** Apr;6(2):106-113.
- 354 - **Fox JB**, Zell TE, Wasserman AE. Interaction between sample preparation techniques and colorimetric reagents in nitrite analysis in meat. *J Assoc Off Anal Chem.* **1981** Nov;64(6):1397-1402.
- 355 - **Arbab AS**, Yocum GT, Kalish H, Jordan EK, Anderson SA, Khakoo AY, Read EJ, Frank JA. Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood.* **2004** Aug 15;104(4):1217-1223.

- 356 - **van Buul GM**, Kotek G, Wielopolski PA, Farrell E, Bos PK, Weinans H, Grohnert AU, Jahr H, Verhaar JA, Krestin GP, van Osch GJ, Bernsen MR. Clinically translatable cell tracking and quantification by MRI in cartilage repair using superparamagnetic iron oxides. *PLoS One*. **2011** Feb 23;6(2):e17001.
- 357 - **Yang CY**, Hsiao JK, Tai MF, Chen ST, Cheng HY, Wang JL, Liu HM. Direct labeling of hMSC with SPIO: the long-term influence on toxicity, chondrogenic differentiation capacity, and intracellular distribution. *Mol Imaging Biol*. **2011** Jun;13(3):443-451.
- 358 - **Farrell E**, Wielopolski P, Pavljasevic P, Kops N, Weinans H, Bernsen MR, van Osch GJ. Cell labelling with superparamagnetic iron oxide has no effect on chondrocyte behaviour. *Osteoarthritis Cartilage*. **2009** Jul;17(7):961-967.
- 359 - **Arbab AS**, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Lewis BK, Kalish H, Frank JA. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology*. **2003** Dec;229(3):838-846.
- 360 - **Saha S**, Yang XB, Tanner S, Curran S, Wood D, Kirkham J. The effects of iron oxide incorporation on the chondrogenic potential of three human cell types. *J Tissue Eng Regen Med*. **2013** Jun;7(6):461-469.
- 361 - **Johnstone B**, Alini M, Cucchiari M, Dodge GR, Eglin D, Guilak F, Madry H, Mata A, Mauck RL, Semino CE, Stoddart MJ. Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. *Eur Cell Mater*. **2013** May 2;25:248-267.Review.
- 362 - **De Bari C**, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. **2001** Aug;44(8):1928-1942.
- 363 - **De Bari C**, Dell'Accio F, Luyten FP. Failure of in vitro-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage in vivo. *Arthritis Rheum*. **2004** Jan;50(1):142-150.
- 364 - **Peltari K**, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, Aigner T, Richter W. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum*. **2006** Oct;54(10):3254-3266.
- 365 - **Cui JH**, Park SR, Park K, Choi BH, Min BH. Preconditioning of mesenchymal stem cells with low-intensity ultrasound for cartilage formation in vivo. *Tissue Eng*. **2007** Feb;13(2):351-360.
- 366 - **Liu K**, Zhou GD, Liu W, Zhang WJ, Cui L, Liu X, Liu TY, Cao Y. The dependence of in vivo stable ectopic chondrogenesis by human mesenchymal stem cells on chondrogenic differentiation in vitro. *Biomaterials*. **2008** May;29(14):2183-2192.
- 367 - **Gong Y**, Zhou Q, Gao C, Shen J. In vitro and in vivo degradability and cytocompatibility of poly(l-lactic acid) scaffold fabricated by a gelatin particle leaching method. *Acta Biomater*. **2007** Jul;3(4):531-540.
- 368 - **Zheng L**, Sun J, Chen X, Wang G, Jiang B, Fan H, Zhang X. In vivo cartilage engineering with collagen hydrogel and allogeneous chondrocytes after diffusion chamber implantation in immunocompetent host. *Tissue Eng Part A*. **2009** Aug;15(8):2145-2153.

- 369 - **Dell'Accio F**, De Bari C, Luyten FP. Microenvironment and phenotypic stability specify tissue formation by human articular cartilage-derived cells in vivo. *Exp Cell Res.* **2003** Jul 1;287(1):16-27.
- 370 - **Mackie EJ**, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol.* **2008**;40(1):46-62.
- 371 - **Takimoto Y**, Hiraki Y, Shukunami C. Differential actions of VEGF-A isoforms on perichondrial angiogenesis during endochondral bone formation. *Dev Biol.* **2009** Aug 15;332(2):196-211.
- 372 - **Pesesse L**, Sanchez C, Delcour JP, Bellahcène A, Baudouin C, Msika P, Henrotin Y. Consequences of chondrocyte hypertrophy on osteoarthritic cartilage: potential effect on angiogenesis. *Osteoarthritis Cartilage.* **2013** Dec;21(12):1913-1923.
- 373 - **Dai J**, Rabie AB. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J Dent Res.* **2007** Oct;86(10):937-950.
- 374 - **Liu B**, Li X, Liang G, Liu X. VEGF expression in mesenchymal stem cells promotes bone formation of tissue-engineered bones. *Mol Med Rep.* **2011** Nov-Dec;4(6):1121-1126.
- 375 - **Hattori T**, Müller C, Gebhard S, Bauer E, Pausch F, Schlund B, Bösl MR, Hess A, Surmann-Schmitt C, von der Mark H, de Crombrughe B, von der Mark K. SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development.* **2010** Mar;137(6):901-911.
- 376 - **Patra D**, Sandell LJ. Antiangiogenic and anticancer molecules in cartilage. *Expert Rev Mol Med.* **2012** Jan 19;14:e10.
- 377 - **Centola M**, Abbruzzese F, Scotti C, Barbero A, Vadalà G, Denaro V, Martin I, Trombetta M, Rainer A, Marsano A. Scaffold-based delivery of a clinically relevant anti-angiogenic drug promotes the formation of in vivo stable cartilage. *Tissue Eng Part A.* **2013** Sep;19(17-18):1960-1971.
- 378 - **Dickhut A**, Pelttari K, Janicki P, Wagner W, Eckstein V, Egermann M, Richter W. Calcification or dedifferentiation: requirement to lock mesenchymal stem cells in a desired differentiation stage. *J Cell Physiol.* **2009** Apr;219(1):219-226.
- 379 - **Perrier AL**, Goebel JC, Pinzano-Watrin A, Roeder E, Gillet P, Beuf, O. Design of a Four-Channel Surface Receiver Coil Array Without Preamplifiers for the Decoupling Between Elements: Validation for High-Resolution Rat Knee MR Imaging. *Sensors Journal, IEEE.* **2013** ; 13(6) : 2450–2458.
- 380 - **Silverman RP**, Bonasser L, Passaretti D, Randolph MA, Yaremchuk MJ. Adhesion of tissue-engineered cartilage to native cartilage. *Plast Reconstr Surg.* **2000** Apr;105(4):1393-1398.
- 381 - **Vahdati A**, Wagner DR. Implant size and mechanical properties influence the failure of the adhesive bond between cartilage implants and native tissue in a finite element analysis. *J Biomech.* **2013** May 31;46(9):1554-1560.
- 382 - **Fragonas E**, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F, Vittur F. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials.* **2000** Apr;21(8):795-801.

- 383 - **Shapiro F**, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* **1993** Apr;75(4):532-553.
- 384 - **Qiu YS**, Shahgaldi BF, Revell WJ, Heatley FW. Observations of subchondral plate advancement during osteochondral repair: a histomorphometric and mechanical study in the rabbit femoral condyle. *Osteoarthritis Cartilage.* **2003** Nov;11(11):810-820.
- 385 - **Jansen EJ**, Emans PJ, Van Rhijn LW, Bulstra SK, Kuijer R. Development of partial-thickness articular cartilage injury in a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res.* **2008** Feb;466(2):487-494.
- 386 - **Lin L**, Zhou C, Wei X, Hou Y, Zhao L, Fu X, Zhang J, Yu C. Articular cartilage repair using dedifferentiated articular chondrocytes and bone morphogenetic protein 4 in a rabbit model of articular cartilage defects. *Arthritis Rheum.* **2008** Apr;58(4):1067-1075.
- 387 - **Che JH**, Zhang ZR, Li GZ, Tan WH, Bai XD, Qu FJ. Application of tissue-engineered cartilage with BMP-7 gene to repair knee joint cartilage injury in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* **2010** Apr;18(4):496-503.
- 388 - **Madry H**, Kaul G, Zurakowski D, Vunjak-Novakovic G, Cucchiari M. Cartilage constructs engineered from chondrocytes overexpressing IGF-I improve the repair of osteochondral defects in a rabbit model. *Eur Cell Mater.* **2013** Apr 16;25:229-247.
- 389 - **Jin CZ**, Cho JH, Choi BH, Wang LM, Kim MS, Park SR, Yoon JH, Oh HJ, Min BH. The maturity of tissue-engineered cartilage in vitro affects the reparability for osteochondral defect. *Tissue Eng Part A.* **2011** Dec;17(23-24):3057-3065.
- 390 - **Shao X**, Goh JC, Hutmacher DW, Lee EH, Zigang G. Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Tissue Eng.* **2006** Jun;12(6):1539-1551.
- 391 - **Wang W**, Li B, Li Y, Jiang Y, Ouyang H, Gao C. In vivo restoration of full-thickness cartilage defects by poly(lactide-co-glycolide) sponges filled with fibrin gel, bone marrow mesenchymal stem cells and DNA complexes. *Biomaterials.* **2010** Aug;31(23):5953-5965.
- 392 - **Chen J**, Chen H, Li P, Diao H, Zhu S, Dong L, Wang R, Guo T, Zhao J, Zhang J. Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone in vivo using MSCs induced by a spatially controlled gene delivery system in bilayered integrated scaffolds. *Biomaterials.* **2011** Jul;32(21):4793-4805.
- 393 - **Park JS**, Yang HN, Woo DG, Jeon SY, Park KH. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells in fibrin constructs evaluated in vitro and in nude mouse and rabbit defects models. *Biomaterials.* **2011** Feb;32(6):1495-1507.
- 394 - **Qi Y**, Zhao T, Xu K, Dai T, Yan W. The restoration of full-thickness cartilage defects with mesenchymal stem cells (MSCs) loaded and cross-linked bilayer collagen scaffolds on rabbit model. *Mol Biol Rep.* **2012** Feb;39(2):1231-1237.
- 395 - **Pei M**, He F, Boyce BM, Kish VL. Repair of full-thickness femoral condyle cartilage defects using allogeneic synovial cell-engineered tissue constructs. *Osteoarthritis Cartilage.* **2009** Jun;17(6):714-722.

- 396 - **Lee JC**, Lee SY, Min HJ, Han SA, Jang J, Lee S, Seong SC, Lee MC. Synovium-derived mesenchymal stem cells encapsulated in a novel injectable gel can repair osteochondral defects in a rabbit model. *Tissue Eng Part A*. **2012** Oct;18(19-20):2173-2186.
- 397 - **Tay LX**, Ahmad RE, Dashtdar H, Tay KW, Masjuddin T, Ab-Rahim S, Chong PP, Selvaratnam L, Kamarul T. Treatment outcomes of alginate-embedded allogenic mesenchymal stem cells versus autologous chondrocytes for the repair of focal articular cartilage defects in a rabbit model. *Am J Sports Med*. **2012** Jan;40(1):83-90.
- 398 - **Simon TM**, Aberman HM. Cartilage regeneration and repair testing in a surrogate large animal model. *Tissue Eng Part B Rev*. **2010** Feb;16(1):65-79.
- 399 - **Guo X**, Wang C, Duan C, Descamps M, Zhao Q, Dong L, Lü S, Anselme K, Lu J, Song YQ. Repair of osteochondral defects with autologous chondrocytes seeded onto bioceramic scaffold in sheep. *Tissue Eng*. **2004** Nov-Dec;10(11-12):1830-1840.
- 400 - **Hao T**, Wen N, Cao JK, Wang HB, Lü SH, Liu T, Lin QX, Duan CM, Wang CY. The support of matrix accumulation and the promotion of sheep articular cartilage defects repair in vivo by chitosan hydrogels. *Osteoarthritis Cartilage*. **2010** Feb;18(2):257-265.
- 401 - **Miot S**, Brehm W, Dickinson S, Sims T, Wixmerten A, Longinotti C, Hollander AP, Mainil-Varlet P, Martin I. Influence of in vitro maturation of engineered cartilage on the outcome of osteochondral repair in a goat model. *Eur Cell Mater*. **2012** Apr 5;23:222-236.
- 402 - **Liu Y**, Chen F, Liu W, Cui L, Shang Q, Xia W, Wang J, Cui Y, Yang G, Liu D, Wu J, Xu R, Buonocore SD, Cao Y. Repairing large porcine full-thickness defects of articular cartilage using autologous chondrocyte-engineered cartilage. *Tissue Eng*. **2002** Aug;8(4):709-721.
- 403 - **Peretti GM**, Xu JW, Bonassar LJ, Kirchoff CH, Yaremchuk MJ, Randolph MA. Review of injectable cartilage engineering using fibrin gel in mice and swine models. *Tissue Eng*. **2006** May;12(5):1151-1168. Review.
- 404 - **Chang CH**, Kuo TF, Lin CC, Chou CH, Chen KH, Lin FH, Liu HC. Tissue engineering-based cartilage repair with allogeneous chondrocytes and gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold: a porcine model assessed at 18, 24, and 36 weeks. *Biomaterials*. **2006** Mar;27(9):1876-1888.
- 405 - **Paetzold H**, Goepfert C, Huber G, Hoenig E, Pörtner R, Schilling AF, Meenen NM, Morlock MM. The development of the collagen fibre network in tissue-engineered cartilage constructs in vivo. Engineered cartilage reorganises fibre network. *Eur Cell Mater*. **2012** Apr 5;23:209-221.
- 406 - **Zhou G**, Liu W, Cui L, Wang X, Liu T, Cao Y. Repair of porcine articular osteochondral defects in non-weightbearing areas with autologous bone marrow stromal cells. *Tissue Eng*. **2006** Nov;12(11):3209-3221.
- 407 - **Moriguchi Y**, Tateishi K, Ando W, Shimomura K, Yonetani Y, Tanaka Y, Kita K, Hart DA, Gobbi A, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. Repair of meniscal lesions using a scaffold-free tissue-engineered construct derived from allogenic synovial MSCs in a miniature swine model. *Biomaterials*. **2013** Mar;34(9):2185-2193.



- 408 - **Li WJ**, Chiang H, Kuo TF, Lee HS, Jiang CC, Tuan RS. Evaluation of articular cartilage repair using biodegradable nanofibrous scaffolds in a swine model: a pilot study. *J Tissue Eng Regen Med.* **2009** Jan;3(1):1-10.
- 409 - **Goebel JC**, Bolbos R, Pham M, Galois L, Rengle A, Loeuille D, Netter P, Gillet P, Beuf O, Watrin-Pinzano A. In vivo high-resolution MRI (7T) of femoro-tibial cartilage changes in the rat anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis: a cross-sectional study. *Rheumatology (Oxford).* **2010** Sep;49(9):1654-1664.
- 410 - **Zalewski T**, Lubiatuski P, Jaroszewski J, Szcześniak E, Kuśmia S, Kruczyński J, Jurga S. Scaffold-aided repair of articular cartilage studied by MRI. *MAGMA.* **2008** May;21(3):177-185.
- 411 - **Ramaswamy S**, Wang DA, Fishbein KW, Elisseff JH, Spencer RG. An analysis of the integration between articular cartilage and nondegradable hydrogel using magnetic resonance imaging. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **2006** Apr;77(1):144-148.
- 412 - **Nugent AE**, Reiter DA, Fishbein KW, McBurney DL, Murray T, Bartusik D, Ramaswamy S, Spencer RG, Horton WE Jr. Characterization of ex vivo-generated bovine and human cartilage by immunohistochemical, biochemical, and magnetic resonance imaging analyses. *Tissue Eng Part A.* **2010** Jul;16(7):2183-2196.
- 413 - **Shi J**, Zhang X, Zeng X, Zhu J, Pi Y, Zhou C, Ao Y. One-step articular cartilage repair: combination of in situ bone marrow stem cells with cell-free poly(L-lactic-co-glycolic acid) scaffold in a rabbit model. *Orthopedics.* **2012** May;35(5):e665-671.
- 414 - **Barnewitz D**, Endres M, Krüger I, Becker A, Zimmermann J, Wilke I, Ringe J, Sittlinger M, Kaps C. Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts. *Biomaterials.* **2006** May;27(14):2882-2889.
- 415 - **Kim MK**, Choi SW, Kim SR, Oh IS, Won MH. Autologous chondrocyte implantation in the knee using fibrin. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* **2010** Apr;18(4):528-534.
- 416 - **Welsch GH**, Mamisch TC, Domayer SE, Dorotka R, Kutscha-Lissberg F, Marlovits S, White LM, Trattnig S. Cartilage T2 assessment at 3-T MR imaging: in vivo differentiation of normal hyaline cartilage from reparative tissue after two cartilage repair procedures--initial experience. *Radiology.* **2008** Apr;247(1):154-161.



## VII. Annexes

### A. Protocoles des différentes techniques utilisées

#### 1. Dosage de l'activité mitochondriale

Les éponges sont placées dans une plaque de 96 puits à raison d'une éponge par puits. 100  $\mu$ L de MTT sont ajoutés à 400  $\mu$ L de milieu complet dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> pendant 4 heures. Le surnageant est éliminé afin de lyser les cellules avec 500  $\mu$ L de SDS-DMF (80 g de sodium dodecyl sulfate, 200 mL de diméthylformamide, 200 mL d'H<sub>2</sub>O, pH 4,7) pendant 24 heures à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. L'absorbance est mesurée à 580 nm grâce à un spectrophotomètre Multiskan (Multiskan Ex, ThermoLabsystems).

#### 2. Dosage de l'ADN

Le dosage s'effectue par spectrophotométrie à l'aide d'une gamme étalon préparée avec de l'ADN de thymus de veau (Sigma, D-3664). Les éponges sont placées pendant 4 heures à 37°C dans 500  $\mu$ L d'une solution de collagénase (2mg/mL) puis elles sont centrifugées à 13000 tours/min pendant 2 min de façon à récupérer les culots qui sont congelés jusqu'à l'extraction. Tous les échantillons sont tout d'abord repris avec 100 $\mu$ L de tampon Hoechst (10mM Tris, 1mM EDTA, 0,1M NaCl, pH 7,4). Ces échantillons sont ensuite lysés par une série de congélation-décongélation dans de l'azote liquide. Enfin, 2 mL de réactif Hoechst (0,1  $\mu$ g/mL dans le tampon Hoechst) sont ajoutés dans tous les échantillons et l'absorbance est mesurée sur un spectrofluorimètre (F2000 Fluorescence Spectrophotometer, Hitachi).

#### 3. Reverse Transcription

La spécificité de cette réaction réside dans l'utilisation d'amorces polydT qui se fixent sur les queues polyA des ARNm permettant ainsi d'obtenir leurs ADNc. La RT est préparée en utilisant 15 $\mu$ L de solution d'ARN, 1 $\mu$ L d'enzyme et 4 $\mu$ L de tampon puis placée selon les recommandations du fournisseur: 5min à 37°C ; 30min à 42°C ; 5min à 85°C.

#### 4. PCR quantitative

La PCR quantitative s'effectue dans des capillaires grâce à un thermocycler (Light Cycler Roche, 1909339). Les capillaires sont remplis avec 10  $\mu$ L de Sybr Green (Qiagen, 204145), 2  $\mu$ L de solution de RT diluée au 1/3, et 2  $\mu$ L d'amorce (10 pM) de chaque gène puis sont placés dans le Light cycler. A chaque cycle de PCR, la fluorescence est mesurée et la courbe de fusion est réalisée à la fin du dernier cycle de PCR. Cette courbe de fusion est liée à la température de fusion spécifique pour un gène donné ; elle nous permet de contrôler la spécificité de notre amplification.

Nom des amorces	Forward (5' – 3')	Reverse (3' – 5')	TM (°C)	Taille (pb)
Collagène I	AGGTOCTGATGOCTCTCCT	GGACCACTTTCACCCTTGT	60	104
Collagène II	GACAATCTGGCTCCCAAC	ACAGTCTTGCCCACTTAC	55	254
Collagène IIB	GCATGAGGGCGCGGTAGAGA	TGGTCCTGGTTGCCGGACAT	70	195
Collagène X	GCTAAGGGTGCCCCACTTAC	CTCCAGGATCACCTTTTGGGA	60	114
Agrécanne	TCGAGGACAGCGAGGCC	TCGAGGGTGTAGCGGTAGAGA	62	84
Versican	TGTTCTCCCACTACCCTTG	CTCCACAGTGGGTGGTCTT	62	121
COMP	AC AATGACGGAGTCCCTGAC	TCTGCATCAAAGTCGTCCTG	60	114
Sox9	GAGCAGACGCACATCTC	CCTGGGATTGCCCGGA	55	117
Ostéocalcine	GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT	TCAGCCAACCTCGTCACAGTC	62	174
RunX2	GCAGCACGCTATTAATCCAAATT	ACAGATTCATCCATTCTGCCACTAG	60	110
Phosphatase Alcaline	GGTGAACCGCAACTGGTACT	CCCACCTGGCTGTAGTCAT	62	187
RP29	AAGATGGGTACCAGCAGCTCTACTG	AGACGCGCAAGAGCGAGAA	60	73

**Tableau 1. Amorces des gènes étudiés.**

## 1. Dosage des GAGs

Le dosage des GAG est effectué sur les surnageants de digestion de 3 éponges. C'est un test colorimétrique reposant sur la méthode de Goldberg, une gamme étalon de 0 à 100 µg/mL est réalisée à partir d'une solution de Chondroïtine-6-Sulfate de 1 mg/mL. Dans chaque puits, 20 µL d'échantillon dilués au dixième dans du tampon Tris (Tris, Sigma, pH = 8) sont déposés et 250 µL d'une solution contenant d'une solution de DMB (1,9-Diméthylméthylène Blue). L'absorbance est mesurée à 525 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Lecteur de plaques MR 5000 Dynatech, France).

## 2. Dosage LDH

100 µL de surnageant (déposé dans une plaque 96 puits) sont ajoutés à 100 µL de solution contenant du lactate de sodium (substrat de l'enzyme), du sel de tétrazolium (colorant), de la diaphorase/NAD<sup>+</sup> (catalyseur). En présence de LDH, le lactate est transformé en pyruvate et NAD est alors transformée en NADH. En présence de NADH, le colorant jaune (sel de tétrazolium) est transformé en formazan (rouge). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, la réaction est arrêtée par 50 µL d'HCl (1N) et la quantification de la réaction est effectuée par la mesure de l'absorbance à 490 nm sur spectrophotomètre (Lecteur de plaques MR 5000 Dynatech, Guyancourt, France).

---

### **3. Dosage des nitrites**

Dans une plaque 96 puits, une gamme étalon de 0 à 50  $\mu\text{M}$  à partir d'une solution de nitrite de 50  $\mu\text{M}$  est réalisée. Dans chaque puits, 100  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont déposés ( $n=4$ ) et 100  $\mu\text{L}$  d'une solution contenant du réactif A de Griess (0,1% de dichlorhydrate de naphthyléthylène diamine dilué dans de l'eau distillée) et du réactif B de Griess (1% de sulfanilamide dilué dans de l'acide phosphorique  $\text{H}_3\text{PO}_4$  à 5%) (1:1) sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Lecteur de plaques MR 5000 Dynatech, France).

---

### **4. Dosage des $\text{PGE}_2$**

Il s'agit d'une technique faisant appel à la compétition entre la  $\text{PGE}_2$  à doser et une  $\text{PGE}_2$  marquée par la peroxydase de Raifort, vis-à-vis d'un anticorps monoclonal murin (anti- $\text{PGE}_2$ ) immobilisé sur les parois des puits de la microplaque. Après lavage, la quantité de conjugué- $\text{PGE}_2$  fixé est révélée par l'addition d'un mélange de peroxydase d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et de tétraméthylbenzidine (TMB). L'intensité de coloration est évaluée par la mesure de l'absorbance à 450 nm après inactivation de la peroxydase par addition d'acide sulfurique 2N (Lecteur de plaques MR 5000 Dynatech, France). La gamme d'étalonnage s'étend de 39 à 2500  $\text{pg/mL}$ .





Les lésions cartilagineuses, survenant majoritairement dans un contexte de traumatisme, ne se réparent pas spontanément. Les traitements chirurgicaux et les techniques d'ingénierie cellulaire, utilisés en clinique, donnent des résultats perfectibles. L'ingénierie tissulaire du cartilage fait l'objet de nombreux travaux dans le but de produire au sein de la lésion un tissu de réparation dont les caractéristiques structurales et fonctionnelles sont similaires à celles du cartilage natif. Le diagnostic précoce de ces lésions et l'évaluation du tissu de réparation sont également des enjeux majeurs en orthopédie. L'IRM est une technique d'imagerie non invasive et à haute résolution permettant une évaluation du cartilage tant d'un point de vue architectural que biochimique en utilisant des séquences dédiées.

En raison de leurs potentialités chondrogéniques, les cellules souches, provenant de différents tissus, sont une piste encourageante pour induire la régénération du cartilage lésé par des traumatismes articulaires. Des cellules souches provenant de différents tissus (moelle osseuse, membrane synoviale) ainsi que des chondrocytes dédifférenciés ont été ensemencés dans une structure tridimensionnelle poreuse à base de collagène I (éponge de collagène I) et soumis à un environnement chondrogénique afin de produire un implant fonctionnalisé. L'évaluation de la qualité de la synthèse matricielle *in vitro* dans l'implant a démontré le potentiel chondrogénique des différents contingents.

La faisabilité d'un marquage de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) par des particules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIOs), diminuant le signal en IRM a été démontrée *in vitro* à 3T et 7T. Des concentrations inférieures à 25 µg Fe/mL peuvent être utilisées sans endommager massivement la synthèse d'une matrice cartilagineuse par des CSMs ostéo-médullaires.

L'implantation des biomatériaux fonctionnalisés en site ectopique chez la souris nude a conduit à une dérive phénotypique ostéoïde de l'implant. En revanche, en site articulaire, chez le rat nude, les implants induisent la production d'un tissu de réparation comblant l'intégralité de la lésion et présentant des caractéristiques proches du cartilage sain environnant.

---

**Mots clés :** Cartilage – Cellules souches – SPIO – IRM – *In Vivo*

---

Cartilaginous lesions mainly occur from a traumatic background and do not heal spontaneously. The surgical treatment and the cellular engineering techniques, usually used in clinic, produce perfectible results. Cartilage tissue engineering is the subject of many works in order to produce a repair tissue into the lesion. This repair tissue aim to have the same structural and functional characteristics as the native cartilage.

In orthopaedic field, the early diagnostic of chondral lesions and the evaluation of the repair tissue are major issues. MRI is a high resolution and non invasive imaging technique that could be used to evaluate the architectural and biochemical structures of the cartilage by using dedicating sequences.

Because of their chondrogenic potentialities, stem cells provide a promising avenue to regenerate damaged cartilage in articular traumas. The stem cells from various origins (bone marrow, synovium) and the dedifferentiated chondrocytes were seeded into a porous 3D scaffold in collagen I (collagen I sponge). These cells were cultivated in chondrogenic conditions to produce a functionalized implant. The quality of the matrix synthesis was evaluated *in vitro* and demonstrated the chondrogenic potential of these various cell types.

Superparamagnetic iron oxid particle (SPIO) labelling of the mesenchymal stem cells (MSC) is feasible *in vitro* at 3T and 7T. A SPIO concentration lower than 25 µg Fe/mL could be used without reducing the cartilaginous matrix synthesis by bone marrow MSCs.

The functionalized biomaterial implantation in an ectopic site in a nude mouse model showed an osseous split. However, in articular site in a nude rat model, the implants produced a repair tissue filling the totality of the lesion. This tissue seems to have similar characteristic of the surrounding healthy cartilage.

---

**Key words :** Cartilage – Stem cells – SPIO – MRI – *In Vivo*

---

**Intitulé et adresse du laboratoire :** Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire  
Bâtiment Biopôle – Campus Médecine  
9 avenue de la Forêt de Haye – CS 50184  
54505 Vandoeuvre-Lès-Nancy