



**HAL**  
open science

# Caractérisation et étude des potentialités chondrogéniques des cellules souches mésenchymateuses d'origine synoviale pour le traitement des lésions focales et diffuses du cartilage

Paul Neybecker

► **To cite this version:**

Paul Neybecker. Caractérisation et étude des potentialités chondrogéniques des cellules souches mésenchymateuses d'origine synoviale pour le traitement des lésions focales et diffuses du cartilage. In-génierie biomédicale. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0122 . tel-02461239

**HAL Id: tel-02461239**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02461239>**

Submitted on 2 Nov 2022

**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>



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE

BioSE



## École 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 Paul NEYBECKER

## **Caractérisation et étude des potentialités chondrogéniques des cellules souches mésenchymateuses d'origine synoviale pour le traitement des lésions focales et diffuses du cartilage**

**23 octobre 2019**

### **Membres du jury :**

#### **Rapporteurs :**

Mme Delphine LOGEART

Chargée de Recherche, UMR 7052 U1271, Paris

M. François RANNOU

Professeur des Universités et Praticien Hospitalier,  
UMR1124, Paris

#### **Examineurs :**

M. Philippe BOUCHER

Professeur des Universités, UMR 7021, Strasbourg

M. Pierre GILLET

Professeur des Universités et Praticien Hospitalier,  
UMR 7365, Nancy

Mme Astrid PINZANO

Chargée de Recherche, UMR 7365, Nancy,  
directrice de thèse (HDR)

Mme Christel HENRIONNET

Ingénieure de Recherche, UMR 7365, Nancy, co-  
directrice de thèse (ACT)

---

UMR 7365-CNRS-UL IMoPA « Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire », Biopôle de  
l'Université de Lorraine, Campus Brabois-Santé, Vandœuvre-lès-Nancy



## Remerciements

---

Je remercie vivement le Docteur **Delphine LOGEART**, le Professeur **Philippe BOUCHER** et le Professeur **François RANNOU** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je vous remercie du temps consacré à l'évaluation de ce manuscrit.

J'adresse mes vifs remerciements aux Docteurs **Astrid PINZANO** et **Christel HENRIONNET**. Merci d'avoir encadré mes travaux de Master 2 puis de Thèse. Je vous remercie pour l'aide, les conseils, la confiance et le soutien que vous m'avez accordés durant ces 4 années.

J'adresse mes remerciements et mon respect au Professeur **Pierre GILLET** pour ses conseils, sa disponibilité et la confiance qu'il m'a témoignée durant ces 4 années.

Je tiens à remercier les Professeurs **Jean-Yves JOUZEAU** et **Bruno CHARPENTIER** pour m'avoir accueilli au sein d'IMoPA. Merci pour vos conseils et votre écoute.

Je remercie tout particulièrement les Professeurs **Didier MAINARD** et **Laurent GALOIS** pour la collaboration médico-chirurgicale.

Je remercie les docteurs **Véronique REGNAULT** et **Stéphane PALLU** d'avoir accepté d'être les membres de mon comité de suivi de thèse.

Je remercie le Professeur **Patrick MENU**, co-directeur de l'équipe 5 et directeur de l'école doctorale pour son soutien et son dévouement à la réussite des doctorants.

Je remercie le Professeur **Bertrand AIGLE** pour la confiance qu'il m'a accordée durant cette dernière année en demi-ATER. Je remercie les docteurs **Florence CHARRON-BOURGOIN** et **Virginie LIBANTE** pour m'avoir permis d'enseigner.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire et particulièrement les collègues du bureau pour leur sympathie et leur soutien.

Je tiens à remercier la Société Française de Rhumatologie (SFR) pour le financement des travaux portant sur les cellules issues du liquide synovial *in vitro* et *in vivo*.

Je remercie l'ensemble de ma famille. Vous y avez toujours cru. Votre soutien sans faille et votre écoute m'ont permis de réaliser ce travail. Après toutes ces années d'étude, j'arrive enfin au bout.

Enfin, je remercie ma femme, Julie, et mes filles Louise et Jeanne. Votre soutien et surtout votre patience m'ont permis de terminer cette thèse.

## Table des matières

---

<b>Remerciements.....</b>	<b>3</b>
<b>Listes des figures.....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>9</b>
<b>Liste des annexes.....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>11</b>
<b>Travaux issus de la thèse.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Publication dans des revues à comité de lecture.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Présentations dans des congrès avec actes publiés.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3 Présentations dans des congrès sans actes publiés.....</b>	<b>13</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>15</b>
<b>Etat de l'art.....</b>	<b>16</b>
<b>1 L'articulation.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Le cartilage.....</b>	<b>18</b>
1.1.1 Le cartilage hyalin : structure et fonction.....	19
1.1.2 Les chondrocytes.....	20
1.1.3 La matrice extracellulaire.....	20
<b>1.2 La membrane synoviale.....</b>	<b>22</b>
1.2.1 Structure de la membrane synoviale.....	22
1.2.2 Les synoviocytes.....	24
1.2.3 Le liquide synovial.....	25
<b>2 Les lésions du cartilage.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Les lésions focales.....</b>	<b>26</b>
2.1.1 Les lésions chondrales.....	26
2.1.2 Les lésions ostéochondrales.....	27
2.1.3 Évaluation des lésions focales du cartilage.....	27
<b>2.2 Les lésions diffuses arthrosiques.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3 Les principaux traitements des lésions localisées ou diffuses du cartilage.....</b>	<b>30</b>
2.3.1 Les traitements chirurgicaux actuels.....	30
2.3.2 Approches de médecine régénératrice.....	30
<b>3 L'ingénierie tissulaire du cartilage.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Les biomatériaux supports.....</b>	<b>33</b>
3.1.1 Les biomatériaux naturels.....	33
3.1.2 Les biomatériaux synthétiques.....	35
3.1.3 Les biomatériaux commerciaux.....	35
<b>3.2 Le contingent cellulaire.....</b>	<b>37</b>
3.2.1 L'unique type cellulaire du cartilage : les chondrocytes.....	37

3.2.2	Les cellules souches – Généralités .....	37
3.2.3	Les cellules utilisables en ingénierie tissulaire du cartilage .....	38
<b>3.3</b>	<b>Choix des conditions environnementales pour la différenciation des CSMs en ingénierie du cartilage.....</b>	<b>47</b>
3.3.1	La différenciation chondrogénique des CSMs.....	47
3.3.2	Pré-orientation des cellules lors de l'expansion cellulaire en monocouche .....	48
3.3.3	Induction de la différenciation chondrogénique des CSMs au sein du biomatériau.....	49
<b>4</b>	<b>L'utilisation des CSMs en clinique .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>Utilisation des CSMs issues de la moelle osseuse .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2</b>	<b>Utilisation des CSMs issues du tissu adipeux.....</b>	<b>54</b>
<b>4.3</b>	<b>Utilisation des CSMs articulaires.....</b>	<b>55</b>
4.3.1	CSMs issues de la graisse infra-patellaires.....	55
4.3.2	CSMs issues du cartilage articulaire.....	55
4.3.3	CSMs issues de la membrane synoviale.....	55
	<b>Résultats obtenus .....</b>	<b>56</b>
<b>1</b>	<b>Caractérisation des CSMs issues de la Moelle Osseuse, de la Membrane Synoviale et du Liquide Synovial durant la phase d'expansion .....</b>	<b>57</b>
<b>1.1</b>	<b>Objectifs .....</b>	<b>57</b>
<b>1.2</b>	<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>57</b>
1.2.1	Isolement et expansion des cellules souches mésenchymateuses .....	57
1.2.2	Caractérisation des CSMs par cytométrie en flux .....	59
1.2.3	Analyse de l'expression des gènes .....	60
1.2.1	Potentialités de différenciation des CSMs .....	61
<b>1.3</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>63</b>
1.3.1	Caractérisation des marqueurs de surface cellulaires.....	63
1.3.2	Étude de l'expression des gènes d'intérêt du cartilage .....	65
1.3.3	Étude de la multipotence des cellules par évaluation des capacités de différenciation vers les voies adipogénique, chondrogénique et ostéogénique.....	68
<b>1.4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>71</b>
<b>1.5</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>73</b>
<b>2</b>	<b>Effet des conditions environnementales sur la production d'un substitut cartilagineux avec des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial.....</b>	<b>74</b>
<b>2.1</b>	<b>Objectifs .....</b>	<b>74</b>
<b>2.2</b>	<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>75</b>
2.2.1	Isolement et expansion des CSMs .....	75
2.2.2	Ensemencement des CSMs au sein des biomatériaux .....	75
2.2.3	Milieus de culture utilisés pour la différenciation chondrogénique .....	75
2.2.4	Activité mitochondriale au sein des substituts cartilagineux.....	76
2.2.5	Dosage d'ADN au sein des substituts cartilagineux .....	76
2.2.6	Analyse de l'expression des gènes au sein des substituts cartilagineux .....	76
2.2.7	Dosage des glycosaminoglycanes sulfatés synthétisés au sein des substituts cartilagineux.....	77
2.2.8	Analyse de la qualité de la matrice extracellulaire par histologie et immunohistochimie 77	77

## Liste des figures

2.2.9	Mesures densitométriques pour évaluer le contenu en glycosaminoglycanes et en collagène de type II.....	78
<b>2.3</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>80</b>
2.3.1	Activité mitochondriale normalisée par la quantité d'ADN.....	80
2.3.2	Différences d'expression des gènes d'intérêt du cartilage suite à 28 jours de différenciation en condition normoxique .....	80
2.3.3	Impact de l'hypoxie sur l'expression des gènes d'intérêt du cartilage.....	85
2.3.4	Qualité de la synthèse matricielle .....	88
<b>2.4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>93</b>
<b>2.5</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>95</b>
<b>3</b>	<b>Potentialités des CSMs issues du liquide synovial dans le traitement des lésions diffuses du cartilage chez le rat "nude" .....</b>	<b>97</b>
<b>3.1</b>	<b>Objectifs .....</b>	<b>97</b>
<b>3.2</b>	<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>97</b>
3.2.1	Aspects réglementaires .....	97
3.2.2	Design de l'étude .....	98
3.2.3	Analyses réalisées .....	99
<b>3.3</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>102</b>
3.3.1	Observations macroscopiques .....	102
3.3.2	Évaluation de l'inflammation synoviale .....	103
3.3.3	Évaluation des lésions arthrosiques .....	105
<b>3.4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>107</b>
<b>3.5</b>	<b>Conclusions .....</b>	<b>109</b>
	<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>110</b>
	<b>Publication dans une revue à comité de lecture .....</b>	<b>113</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>129</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>136</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'articulation du genou chez l'Homme en coupe sagittale.....	17
Figure 2 : Les différents types de cartilage .....	18
Figure 3 : Composition de la matrice extracellulaire et organisation des fibres de collagène au sein du cartilage hyalin.....	20
Figure 4 : Structure de la membrane synoviale.....	23
Figure 5 : Les différents types de lésions focales du cartilage.....	26
Figure 6 : Classification des lésions chondrales proposée par l'International Cartilage Repair Society en 2001.....	28
Figure 7 : Structure d'un cartilage arthrosique. ....	29
Figure 8 : Techniques de médecine régénératrice.....	31
Figure 9 : La triade de l'ingénierie tissulaire du cartilage. ....	32
Figure 10 : Processus de différenciation chondrogénique des CSMs sous l'influence de différents biofacteurs. ....	47
Figure 11 : Gradient de la teneur en oxygène au sein du cartilage articulaire.....	51
Figure 12 : Design de l'étude.....	59
Figure 13 : Expression génique du collagène de type 2, de l'agrécan, du facteur de transcription Sox9 et de la COMP dans les CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial à la fin du deuxième passage en monocouche. ....	66
Figure 14 : Expression génique du collagène de type 1 et du versican dans les CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial à la fin du deuxième passage en monocouche. ....	67
Figure 15 : Expression génique des marqueurs hypertrophiques (Collagène de type 10) et ostéogéniques (RunX2 et ostéocalcine) dans les CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial à la fin du deuxième passage en monocouche. ....	68
Figure 16 : Potentialités de différenciation chondrogénique des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial. ....	69
Figure 17 : Potentialités de différenciation ostéogénique des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial.....	69
Figure 18 : Potentialités de différenciation adipogénique des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial.....	70
Figure 19 : Expression des marqueurs chondrogéniques (COMP, SOX9, COL2A1, COL2B et ACAN) au sein des substituts cartilagineux fonctionnalisés avec des CSMs-MO, des CSMs-MS et des CSMs-LS après 28 jours de culture sous l'influence de facteurs de croissance en condition normoxique. ....	82
Figure 20 : Expression des marqueurs fibrotiques (VCAN et COL1A1) au sein des substituts cartilagineux fonctionnalisés avec des CSMs-MO, des CSMs-MS et des CSMs-LS après 28 jours de culture sous l'influence de facteurs de croissance en condition normoxique. ....	83
Figure 21 : Expression des marqueurs hypertrophiques (COL10A1) et osseux (RUNX2 et BGLAP) au sein des substituts cartilagineux fonctionnalisés avec des CSMs-MO, des CSMs-MS et des CSMs-LS après 28 jours de culture sous l'influence de facteurs de croissance en condition normoxique .....	85
Figure 22 : Résumé de l'impact de l'hypoxie sur l'expression des différents gènes d'intérêts du cartilage au sein des substituts cartilagineux fonctionnalisés avec des CSMs-MO, des CSMs-MS et des CSMs-LS après 28 jours de culture sous l'influence de facteurs de croissance et de la tension en oxygène .....	86
Figure 23 : L'utilisation des TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 3 seuls ou en association avec la BMP-2 induit une synthèse importante de glycosaminoglycanes au sein des éponges par les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse .....	87
Figure 24 : L'utilisation des TGF- $\beta$ s, seuls ou en association avec la BMP-2, permet la synthèse d'une matrice cartilagineuse au sein des éponges de collagènes fonctionnalisés avec des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale ou du liquide synovial.....	89

## Liste des figures

<i>Figure 25 : L'utilisation des TGF-<math>\beta</math>s seuls ou en association avec la BMP-2 permet la synthèse d'une matrice cartilagineuse riche en collagène de type II au sein des éponges de collagènes fonctionnalisés avec des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale ou du liquide synovial.....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 26 : La différenciation chondrogénique des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale ou du liquide synovial en fonction des différentes conditions de culture n'entraîne pas la formation de dépôts calciques. ....</i>	<i>92</i>
<i>Figure 27 : Design de l'étude in vivo .....</i>	<i>99</i>
<i>Figure 28 : L'injection de CSMs-LS ne prévient pas l'apparition de lésions arthrosiques au niveau macroscopique. ....</i>	<i>102</i>
<i>Figure 29 : Le modèle d'arthrose et l'injection de CSMs-LS n'induisent pas d'inflammation synoviale .....</i>	<i>104</i>
<i>Figure 30 : L'injection de CSMs-LS ne permet pas de prévenir l'apparition de lésions arthrosiques au niveau histologique. ....</i>	<i>106</i>

## Liste des tableaux

---

<i>Tableau I : La classification des lésions proposées par Outerbridge en 1961.....</i>	<i>27</i>
<i>Tableau II : Les principaux marqueurs de surface cellulaires des CSMs .....</i>	<i>39</i>
<i>Tableau III : Principaux résultats cliniques obtenus avec l'utilisation de CSMs-MO dans le cadre de thérapie cellulaire chez des patients souffrant d'arthrose du genou (gonarthrose) .....</i>	<i>52</i>
<i>Tableau IV : Principaux résultats cliniques obtenus avec l'utilisation de CSMs-TA dans le cadre de thérapie cellulaire chez des patients souffrant d'arthrose du genou (gonarthrose) .....</i>	<i>54</i>
<i>Tableau V : Les différents couples d'anticorps utilisés en cytométrie en flux .....</i>	<i>60</i>
<i>Tableau VI : Caractérisation de l'expression des marqueurs de surface cellulaire des CSMs issues de la moelle osseuse. ....</i>	<i>63</i>
<i>Tableau VII : Caractérisation de l'expression des marqueurs de surface cellulaire des CSMs issues de la membrane synoviale.....</i>	<i>64</i>
<i>Tableau VIII : Caractérisation de l'expression des marqueurs de surface cellulaire des CSMs issues du liquide synovial. ....</i>	<i>65</i>
<i>Tableau IX : Score histologique du cartilage et des remaniements osseux d'après le score modifié de Mankin .....</i>	<i>100</i>
<i>Tableau X : Score histologique de la membrane synoviale d'après le score modifié de Rooney .....</i>	<i>101</i>

## Liste des annexes

---

<i>Annexe A : Tableau des différentes amorces utilisées lors de RT-qPCR.....</i>	<i>130</i>
<i>Annexe B : L'utilisation des TGF-<math>\beta</math>s seuls ou en association avec la BMP-2 induit une diminution de l'activité mitochondriale normalisée par la quantité d'ADN dans les biomatériaux fonctionnalisés avec des CSMs issues de la moelle osseuse .....</i>	<i>131</i>
<i>Annexe C : L'utilisation des TGF-<math>\beta</math>s seuls ou en association avec la BMP-2 induit une diminution de l'activité mitochondriale normalisée par la quantité d'ADN dans les biomatériaux fonctionnalisés avec des CSMs issues de la membrane synoviale.....</i>	<i>131</i>
<i>Annexe D : L'utilisation des TGF-<math>\beta</math>s seuls ou en association avec la BMP-2 induit une diminution de l'activité mitochondriale normalisée par la quantité d'ADN dans les biomatériaux fonctionnalisés avec des CSMs issues du liquide synovial .....</i>	<i>132</i>
<i>Annexe E : L'hypoxie n'a pas d'effet significatif sur la quantité de GAGs synthétisée au sein des substituts.....</i>	<i>133</i>
<i>Annexe F : Analyse histologique par coloration Hématoxyline-Erythrosine-Safran (HES).....</i>	<i>134</i>
<i>Annexe G : Analyse histologique par coloration au rouge Sirius. ....</i>	<i>135</i>

## Liste des abréviations

---

### A

<b>ACAN</b>	Gène codant l'agrecane
<b>ACLT</b>	<i>Anterior Cruciate Ligament Transection</i> (Section du ligament croisé antérieur)
<b>ADN</b>	Acide DésoxyRibonucléique
<b>ADNc</b>	Acide DésoxyRibonucléique complémentaire
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>ARNm</b>	Acide RiboNucléique messenger

### B

<b>BA</b>	Bleu Alcian
<b>bFGF</b>	basic Fibroblastic Growth Factor
<b>BGLAP</b>	Gène codant l'ostéocalcine
<b>BMP</b>	Bone Morphogenetic Protein
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin

### C

<b>CD</b>	Cluster Differentiation
<b>CHRU</b>	Centre Hospitalier Régional Universitaire
<b>CMF</b>	CytoMétrie en Flux
<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>COL1A1</b>	Gène codant le collagène 1
<b>COL2A1</b>	Gène codant le collagène 2
<b>COLII</b>	Collagène de type II
<b>COL2B</b>	Gène codant l'isoforme B du collagène 2
<b>COL10A1</b>	Gène codant le collagène 10
<b>COMP</b>	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
<b>COMP</b>	Gène codant la COMP
<b>COTA</b>	Chirurgie Orthopédique, Traumatologique et Arthroscopique
<b>CS</b>	Chondroïtine Sulfate
<b>CSH</b>	Cellules Souches Hématopoïétiques
<b>CSMs</b>	Cellules Souches Mésoenchymateuses
<b>CSMs-CA</b>	Cellules Souches Mésoenchymateuses issues du Cartilage Articulaire
<b>CSMs-GIP</b>	Cellules Souches Mésoenchymateuses issues de la Graisse Infra-Patellaire
<b>CSMs-LS</b>	Cellules Souches Mésoenchymateuses issues du Liquide Synovial
<b>CSMs-MO</b>	Cellules Souches Mésoenchymateuses issues de la Moelle Osseuse
<b>CSMs-MS</b>	Cellules Souches Mésoenchymateuses issues de la Membrane Synoviale
<b>CSMs-TA</b>	Cellules Souches Mésoenchymateuses issues du Tissu Adipeux

### D, E, F

<b>DAB</b>	DiAminoBenzidine
<b>DMB</b>	Dimethyl Methylene Blue
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMF</b>	DiMethylFormamide
<b>EDTA</b>	Acide Ethylène Diamino Tétra- Acétique
<b>FITC</b>	Fluorescéine IsoThioCyanate

### G, H, I, K, L

<b>GAGs</b>	GlycosAminoGlycanes sulfatés
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>HES</b>	Hématoxyline Eosine Safran
<b>HRP</b>	<i>Horse Radish Peroxydase</i>
<b>ICRS</b>	<i>International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society</i>

## Liste des Abréviations

<b>IMF</b>	Intensité Moyenne de Fluorescence
<b>IRM</b>	Imagerie par Résonance Magnétique
<b>ITS</b>	Insuline Transferrine Sélénium
<b>KS</b>	Kératane Sulfate
<b>LCA</b>	Ligament Croisé Antérieur
<b>LS</b>	Liquide Synovial

### M, N, O

<b>MEC</b>	Matrice ExtraCellulaire
<b>MIA</b>	Mono IodoAcétate
<b>MTT</b>	Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl-tétrazolium
<b>NaCl</b>	Chlorure de Sodium
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé

### P

<b>PAD</b>	Proline, Acide ascorbique, Dexaméthasone
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PCL</b>	Poly- $\epsilon$ -CaproLactone
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PE</b>	PhycoErythrine
<b>PGs</b>	Protéoglycanes
<b>PGA</b>	Acide Poly-Glycolique
<b>PLA</b>	Acide Poly-Lactique
<b>PLGA</b>	Acide Poly-LactiqueCoGlycolique

### R

<b>RA</b>	Rouge Alizarine
<b>RPS29</b>	Gène codant la RPS29
<b>RS</b>	Rouge Sirius
<b>RT</b>	Reverse Transcriptase
<b>RunX2</b>	Runt related transcription factor 2
<b>RUNX2</b>	Gène codant pour Runx2

### S, T, U, V

<b>SF-MSCs</b>	<i>Synovial Fluid Mesenchymal Stem Cells</i>
<b>Sox9</b>	SRY (Sex-Determining Region Y) box 9
<b>SOX9</b>	Gène codant Sox9
<b>SVF</b>	Sérum de Veau Fœtal
<b>TEC</b>	Tissue Engineered Construct
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor $\beta$
<b>Tris</b>	Trishydroxyméthylaminométhane
<b>UTCT</b>	Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus
<b>VCAN</b>	Gène codant le versican

## Travaux issus de la thèse

---

### 1.1 Publication dans des revues à comité de lecture

---

**NEYBECKER P**, HENRIONNET C, PAPE E, MAINARD D, GALOIS L, LOEUILLE D, GILLET P, PINZANO A. 2018. « In Vitro and in Vivo Potentialities for Cartilage Repair from Human Advanced Knee Osteoarthritis Synovial Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells ». *Stem Cell Research & Therapy* 9 (1): 329.

La publication est présentée en annexe.

### 1.2 Présentations dans des congrès avec actes publiés

---

HENRIONNET C, POURCHET L, **NEYBECKER P**, GILLET P, MAINARD D, MARQUETTE C, PINZANO A. New strategies to produce of cartilaginous substitutes using 3D printing for personalized regenerative medicine. SFA 2018, Strasbourg, 12-15 décembre 2018. *Revue de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique* 104(8):S108-S109 (Orale).

**NEYBECKER P**, HENRIONNET C, MAINARD D, GILLET P, PINZANO A. Isolement et caractérisation des cellules souches mésenchymateuses issues du liquide synovial pour l'ingénierie cellulaire et tissulaire du cartilage. SFA 2017. Marseille 6-9 décembre 2017 (Conférence). *Revue de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique. Volume 103 (8) 2017 : S283-284.*

MAINARD D, GALOIS L, **NEYBECKER P**, HENRIONNET C, GILLET P, PINZANO A. Etude des potentialités chondrogéniques des cellules souches mésenchymateuses synoviales pour la production d'un implant cartilagineux par ingénierie tissulaire. 91<sup>ème</sup> SOFCOT. Paris, 8-11 novembre 2016. *Revue de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique. Volume 102, Issue 7, 2016, S177. (Orale).*

### 1.3 Présentations dans des congrès sans actes publiés

---

**NEYBECKER P**, HENRIONNET C, PAPE E, MAINARD D, GALOIS L, LOEUILLE D, GILLET P, PINZANO A. Potentialités des cellules souches mésenchymateuses issues du liquide synovial pour l'ingénierie cellulaire ou tissulaire du cartilage. 31<sup>ème</sup> Congrès de Rhumatologie, Paris, 9-11 Décembre 2018 (Poster).

HENRIONNET C, POURCHET L, **NEYBECKER P**, GILLET P, MAINARD D, MARQUETTE C, PINZANO A. Nouvelles stratégies de production de substituts cartilagineux par impression 3D pour la médecine régénérative personnalisée. 93<sup>ème</sup> SOFCOT, Paris, 12-15 novembre 2018 (Orale).

**NEYBECKER P**, HENRIONNET C, MAINARD D, GALOIS L, GILLET P, PINZANO A. Des cellules souches mésenchymateuses issues du liquide synovial et des éponges de collagène : une combinaison gagnante pour la production d'un substitut cartilagineux ?  
93<sup>ème</sup> SOFCOT, Paris, 12-15 novembre 2018 (Orale).

**NEYBECKER P**, HENRIONNET C, MAINARD D, GALOIS L, GILLET P, PINZANO A. Les cellules souches mésenchymateuses issues du liquide synovial pour la production d'un substitut cartilagineux : caractérisation et différenciation.  
20<sup>ème</sup> JFBTM. Monaco 21-23 mars 2018 (Poster).

HENRIONNET C, POURCHET L, **NEYBECKER P**, GILLET P, MAINARD D, MARQUETTE C, PINZANO A. Effect of cell density on the production of three-dimensional (3D)-bioprinted hydrogel constructs for cartilage engineering.  
20<sup>ème</sup> JFBTM. Monaco 21-23 mars 2018 (Poster).

**NEYBECKER P**, HENRIONNET C, GALOIS L, MAINARD D, GILLET P, PINZANO A. Isolement et caractérisation des cellules souches mésenchymateuses issues du liquide synovial pour l'ingénierie cellulaire et tissulaire du cartilage.  
19<sup>ème</sup> JFBTM. Lyon 18-20 mai 2017 (Poster).

**NEYBECKER P\***, HENRIONNET C, MAINARD D, GALOIS L, GILLET P, PINZANO A. Les cellules souches mésenchymateuses d'origine synoviale et l'ingénierie tissulaire du cartilage : rôle de l'hypoxie.  
Journée de la Fédération de Recherche CNRS-UL 3209 BMCT, 15 Décembre 2016 (Orale).  
\*obtention d'un prix

MAINARD D, **NEYBECKER P**, HENRIONNET C, GALOIS L, GILLET P, PINZANO A. Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses d'origine synoviale et production d'un implant cartilagineux par ingénierie tissulaire.  
SFA 2016, Paris, 30 novembre -3 décembre 2016 (Orale).

**NEYBECKER P**, HENRIONNET C, GALOIS L, GILLET P, PINZANO A. Chondrogenic potential of synovial mesenchymal stem cells for the production of tissue-engineered cartilaginous substitute.  
2<sup>nd</sup> Workshop of Regenerative Medicine in Bordeaux 2016, Bordeaux, 24-26 October 2016. (Orale).

**NEYBECKER P**, HENRIONNET C, MAINARD D, GALOIS L, GILLET P, PINZANO A. Chondrogenic potential of synovial mesenchymal stem cells for the production of cartilaginous implant by tissue engineering. 6<sup>th</sup> International Symposium Europe China "Molecular, cellular and tissue engineering, and clinical applications".  
First meeting of the CNRS GDRI France-China n°0851 "Mesenchymal stem cells and regenerative medicine". Nancy 11-13 juillet 2016 (Poster).

**NEYBECKER P\***, HENRIONNET C, MAINARD D, GALOIS L, GILLET P, PINZANO A. Characterization and chondrogenic potentialities of synovial mesenchymal stem cells in treatment of focal and diffuse lesions of cartilage.  
18<sup>ème</sup> JFBTM. Nancy 1-3 juin 2016 (Conférence). \* Obtention du prix BIOMAT 2016

## Introduction générale

---

Actuellement, les pathologies articulaires concernent 1 Français sur 2. Certains traumatismes peuvent provoquer des lésions focales cartilagineuses et engendrer à plus long terme le développement d'une arthrose. Ainsi, le traitement des lésions focales et diffuses du cartilage reste un objectif majeur en orthopédie. Le cartilage hyalin est un tissu avasculaire non innervé, ce qui lui confère des capacités de réparation très limitées. Les traitements proposés actuellement sont principalement symptomatiques (antalgiques) et les techniques de réparation utilisées (essentiellement mosaïcoplastie) conduisent à l'obtention d'un fibrocartilage qui ne possède pas toutes les qualités du tissu originel et qui se dégrade à court terme.

Actuellement les deux grands types de thérapies étudiées sont : 1) la thérapie par ingénierie cellulaire qui va consister à injecter des cellules dans la cavité intra-articulaire afin de stimuler la régénération du cartilage, 2) la thérapie par ingénierie tissulaire qui associe un biomatériau support, un contingent cellulaire et des conditions environnementales favorables pour obtenir un substitut cartilagineux. Ce dernier doit être bio-fonctionnel et bio-intégrable en site articulaire. Concernant le contingent cellulaire utilisé, les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) semblent être de meilleures candidates que les propres cellules du cartilage, les chondrocytes, dont la quantité obtenue reste relativement faible. De plus, lors de l'expansion en monocouche nécessaire à l'obtention d'un nombre suffisant de cellules, les chondrocytes perdent l'expression des marqueurs chondrogéniques comme le collagène de type II et l'agrécan notamment. En revanche, les CSMs, par leur facilité d'isolement, d'expansion et leurs potentialités de différenciation, en particulier vers la voie chondrogénique, s'avèrent plus propices à l'ingénierie tissulaire du cartilage.

Dans ce travail, notre choix s'est donc porté sur l'utilisation des cellules souches adultes d'origine humaine, dont les CSMs issues de la moelle osseuse qui sont déjà largement utilisées, mais également sur des CSMs issues de la membrane synoviale et du liquide synovial. Ces cellules présentent l'avantage d'être en site articulaire et peuvent être facilement récupérées lors d'une arthroscopie diagnostique/thérapeutique.

Dans ce manuscrit, nos travaux scientifiques sont organisés en trois objectifs majeurs :

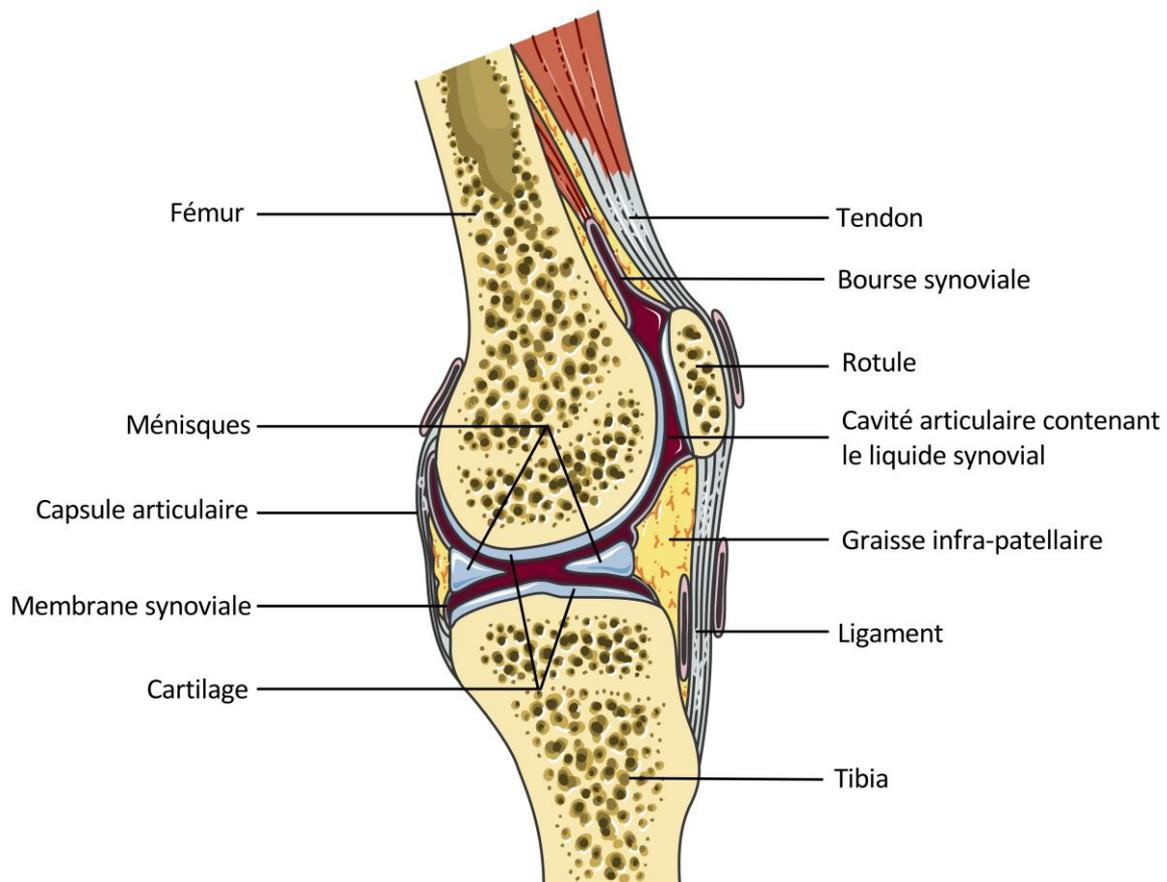
- **Le premier objectif** était de caractériser les CSMs issues de la moelle osseuse (CSMs de référence très étudiée dans la littérature), de la membrane synoviale et du liquide synovial et d'évaluer la multipotence des CSMs (potentialités de différenciation chondrogénique, adipogénique et ostéogénique).
- **Le second objectif** était d'étudier les capacités de ces CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial à produire des substituts cartilagineux à partir d'un biomatériau à base de collagène et de déterminer les conditions environnementales en culture cellulaire les plus favorables à l'obtention d'une matrice extracellulaire proche du cartilage natif (facteurs de croissance et /ou teneur en oxygène).
- **Le troisième objectif** était d'évaluer les potentialités des CSMs issues du liquide synovial dans le cadre d'une thérapie cellulaire pour le traitement des lésions diffuses du cartilage induites par section du ligament croisé antérieur chez le rat "nude".

# État de l'art

## 1 L'articulation

L'articulation a un rôle majeur dans le mouvement de notre corps. La stabilité de l'articulation est assurée par un réseau de tendons et de ligaments. L'articulation synoviale est entourée par une capsule appelée capsule articulaire qui délimite la cavité articulaire. Cette capsule est tapissée par la membrane synoviale qui sécrète le liquide synovial. Il s'agit d'un lubrifiant de l'articulation jouant le rôle de liquide nourricier du cartilage. Le liquide synovial se trouve normalement en faible quantité dans l'articulation. Il s'agit d'un liquide transparent et filant qui permet la lubrification des surfaces articulaires et de faciliter leur glissement pendant les mouvements.

Les épiphyses sont recouvertes d'un cartilage de type hyalin (**Figure 1**). Le cartilage est un tissu conjonctif non innervé, non vascularisé dont la fonction principale est de protéger l'os sous-chondral des agressions biomécaniques et traumatiques inhérentes à la mobilité articulaire et la locomotion. Le tissu cartilagineux a la particularité d'être de consistance solide, mais n'est pas calcifié. Il est composé d'un seul type cellulaire, les chondrocytes qui représentent 10% du volume du cartilage, et d'une matrice extracellulaire (MEC) dense et complexe, riche en collagène de type II.

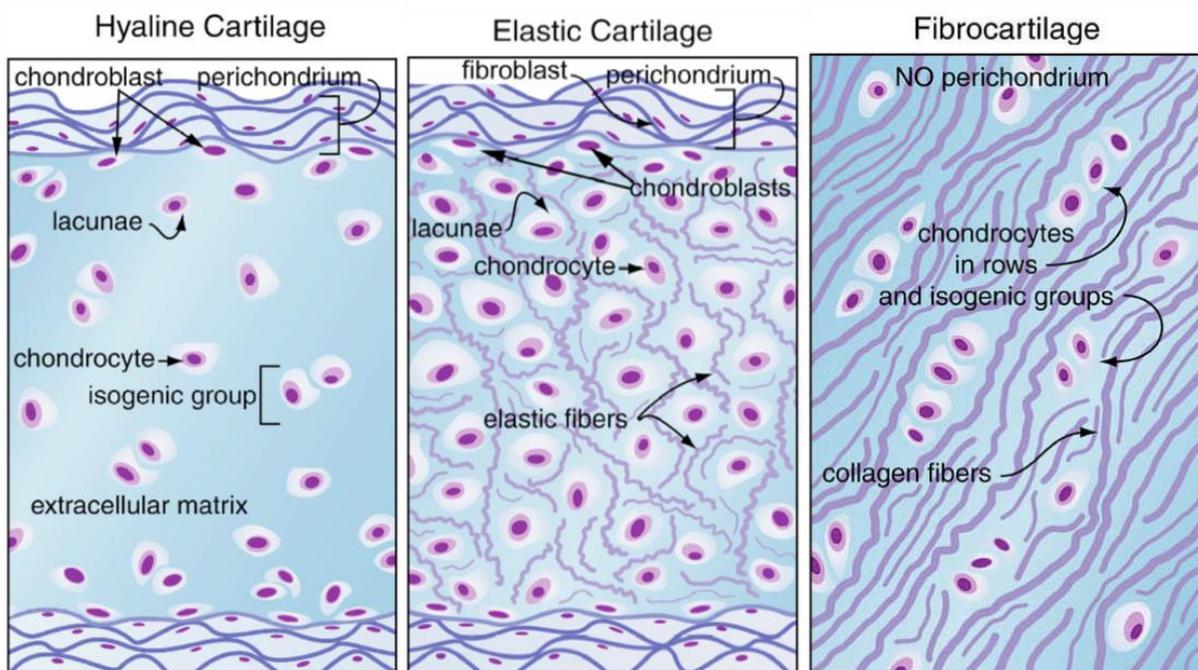


**Figure 1 : Schéma de l'articulation du genou chez l'Homme en coupe sagittale.**  
Adapté de Servier Medical Art <https://smart.servier.com> (Page consultée le 12 octobre 2015)

## 1.1 Le cartilage

Le cartilage est un tissu spécialisé non innervé et non vascularisé. Ses cellules, les chondrocytes, sont responsables de l'homéostasie du cartilage c'est-à-dire qu'elles assurent à la fois la synthèse de la matrice extracellulaire, mais également sa dégradation. La composition de cette matrice extracellulaire définit les propriétés mécaniques (résistance à l'étirement et à la compression et absorption des chocs) du cartilage assurant ainsi les propriétés viscoélastiques du tissu ainsi que sa pérennité au cours du temps. Chez l'Homme adulte, on peut distinguer trois types de cartilage (**Figure 2**) :

- **Le cartilage hyalin** est un tissu conjonctif non innervé et non vascularisé. Il s'agit du cartilage le plus abondant dans le corps humain. Il forme le premier squelette de l'embryon qui va progressivement se minéraliser pour former les os. Le cartilage hyalin va alors persister au niveau des épiphyses et ainsi assurer le glissement des os articulaires lors d'un mouvement et absorber les contraintes mécaniques subies par l'articulation (compression et tension).
- **Le cartilage élastique** est présent dans le pavillon de l'oreille, de la trompe d'Eustache de l'épiglotte, de la trachée et des bronches. La densité de chondrocytes est plus importante dans le cartilage élastique que dans le cartilage hyalin. Ces cellules vont sécréter une matrice riche et dense en collagène de type II et en fibres élastiques qui lui confère une résistance importante à la déformation.
- **Le fibrocartilage** (ou cartilage fibreux) possède des propriétés mécaniques lui permettant de résister à la traction, à la déformation et à la compression. Il est composé principalement de collagène de type I et de chondrocytes organisés en rangées successives. Ce cartilage est présent au niveau des ménisques, des disques vertébraux et de la symphyse pubienne.



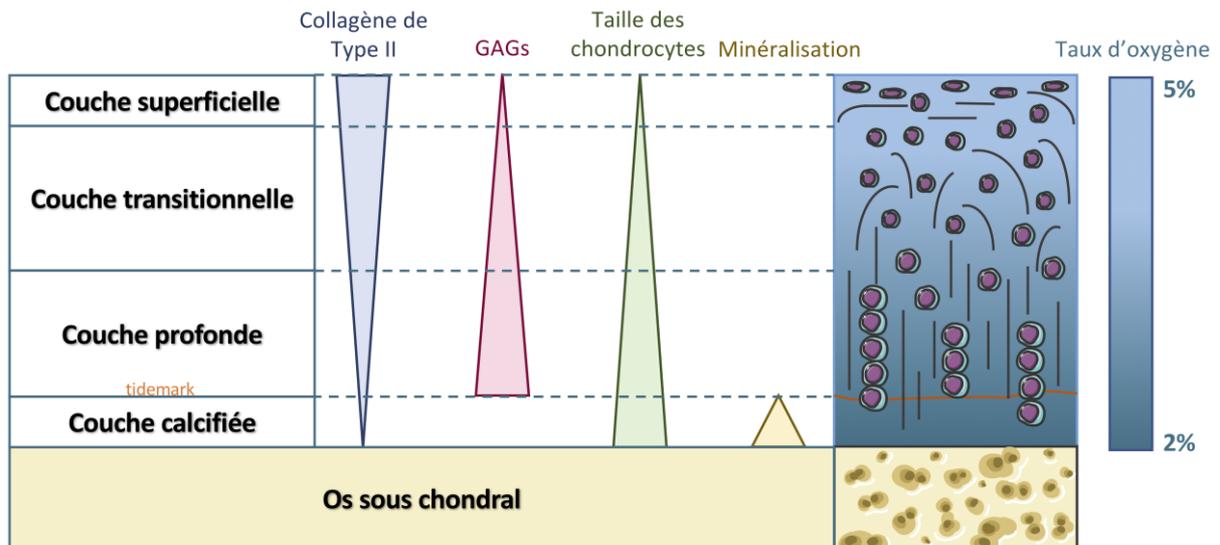
**Figure 2 : Les différents types de cartilage.**

[http://www.auburn.edu/academic/classes/zy/hist0509/html/Lec05Bnotes-cart\\_bone\\_bloo.html](http://www.auburn.edu/academic/classes/zy/hist0509/html/Lec05Bnotes-cart_bone_bloo.html) (page consultée le 4 juin 2016)

### 1.1.1 Le cartilage hyalin : structure et fonction

Au sein du cartilage articulaire, la matrice extracellulaire est formée en majorité par du collagène de type II et des protéoglycanes et tout particulièrement de l'agrécane. D'un point de vue macroscopique, le cartilage est blanc bleuâtre et devient jaune chez les individus âgés [1]. L'épaisseur du cartilage hyalin est en moyenne comprise entre 2,2 et 2,4 mm chez l'adulte [2]. Il est organisé en 4 couches (**Figure 3**), la concentration en collagène de type II et en protéoglycanes est importante au niveau de la surface cartilagineuse et diminue dans les couches profondes. À l'inverse, la taille des chondrocytes augmente de la couche superficielle vers l'os sous-chondral (**Figure 3**). Nous notons, de la surface en contact avec le liquide synovial jusqu'à l'os sous-chondral : 1) la couche superficielle (ou tangentielle), 2) la couche transitionnelle (ou intermédiaire) et 3) la couche radiale (ou profonde) séparée de 4) la couche calcifiée par la « tide mark ».

1. **La couche superficielle** est en contact direct avec la cavité articulaire et le liquide synovial. Il s'agit de la zone la plus fine (5 à 10 % de la hauteur totale du cartilage), elle est recouverte par un fin film de lubricine qui forme une surface de glissement optimale à la surface du cartilage [3]. Les chondrocytes sont de formes ellipsoïdales allongées, ils synthétisent une forte quantité de protéoglycanes et de collagène type II. Les fibres de collagène sont organisées parallèlement à la surface articulaire pour permettre une grande résistance aux forces de cisaillement et de compression. La zone superficielle protège ainsi le cartilage sous-jacent des forces de déchirement générées lors de l'activité articulaire.
2. **La couche transitionnelle** représente 40 à 60 % du volume du cartilage articulaire. La densité cellulaire est faible. Les chondrocytes, de forme sphérique, sont enveloppés dans une matrice riche et dense en protéoglycanes et en collagène de type II. Les fibres de collagène s'entrecroisent obliquement en un réseau non orienté moins dense que celui de la surface articulaire, et tendent à devenir parallèles à la surface articulaire et perpendiculaire en profondeur en formant ainsi les arcades de Benninghoff [4]. Il s'agit de la première zone de résistance aux forces de compression [5].
3. **La couche profonde** représente 30 à 40 % du volume du cartilage. Les fibres de collagènes de type II sont moins nombreuses et arrangées perpendiculairement à la surface articulaire. Les chondrocytes sont organisés en colonnes également perpendiculaires à la surface. Cette structure confère une très bonne résistance aux forces de compression. Elle représente la zone où la concentration en protéoglycanes est la plus importante du cartilage.
4. **La couche calcifiée** est en contact avec la plaque osseuse sous-chondrale à laquelle elle amarre le cartilage, mais la jonction reste très irrégulière, et représente 5 à 10 % de l'épaisseur totale du cartilage. Cette zone contient peu de chondrocytes avec une activité métabolique faible. La matrice extracellulaire est calcifiée et les chondrocytes ont un phénotype hypertrophique. Des fibrilles de collagène de type X permettent l'ancrage du cartilage avec l'os sous-chondral qui possède des propriétés élastiques moindres [6].



**Figure 3 : Composition de la matrice extracellulaire et organisation des fibres de collagène au sein du cartilage hyalin.**

Le cartilage hyalin est riche en collagène de type II et en agrégane. En profondeur, les fibres de collagène sont arrangées perpendiculairement à la surface articulaire puis de façon parallèle dans la couche superficielle pour former les arcades de Beninghoff.

Adapté de Servier Medical Art, <https://smart.servier.com> (Page consultée la première fois le 12 octobre 2015)

### 1.1.2 Les chondrocytes

Les chondrocytes sont des cellules spécialisées et très différenciées. Ils représentent approximativement 1 % du volume du tissu dans le cartilage articulaire adulte [3]. Les chondrocytes sont des cellules volumineuses (entre 10 et 30  $\mu\text{m}$  de diamètre) arrondies et situées dans de petites logettes (chondroplastes) qu'elles remplissent complètement à l'état vivant. En raison du caractère avasculaire du cartilage, la nutrition est assurée par diffusion du liquide synovial à travers la matrice et les chondrocytes utilisent essentiellement le glucose comme substrat énergétique et privilégient la voie de la glycolyse anaérobie. Il est principalement converti en glucosamine pour la synthèse des protéoglycanes. Les chondrocytes sont responsables de la synthèse de tous les composants de la matrice, comme les collagènes et les protéoglycanes, du maintien de l'homéostasie et de la dégradation de la matrice extracellulaire en synthétisant les enzymes qui vont détruire le cartilage, notamment des métalloprotéases, des hyaluronidases et des agrécanases. Dans certaines circonstances pathologiques, les chondrocytes possèdent la capacité de sécréter des cytokines pro-inflammatoires qui gouvernent la destruction du cartilage.

### 1.1.3 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est abondante et homogène avec une densification autour des chondroblastes. Elle est composée d'environ 65% d'eau, entre 10 et 20 % de collagènes et de 10 à 20% de protéoglycanes.

### 1.1.3.1 L'eau

La teneur en eau est comprise entre 65% (couche radiale) et 80% (couche superficielle) [7]. Celle-ci peut être sous forme libre, afin de véhiculer les nutriments ou les produits de dégradation métabolique, mais également sous forme liée, en association avec les protéoglycanes, ce qui confère au tissu sa consistance élastique et sa résistance aux contraintes mécaniques subies par l'articulation.

### 1.1.3.2 Les collagènes

Plus de 20 types sont connus, à classer entre fibrillaires et non fibrillaires, mais seulement cinq collagènes ont été identifiés dans le cartilage articulaire en quantité suffisante pour permettre leur isolement : les collagènes : II, VI, IX, et XI. Les collagènes représentent environ 60% du poids sec du cartilage. Le collagène de type II représente 90 à 95% des collagènes présents dans la matrice extracellulaire cartilagineuse [5]. Les autres collagènes sont alors qualifiés de « mineurs », car ils ne représentent que 5 à 10% des collagènes présents dans la MEC. Les collagènes forment un réseau dense et structurant. Leur synthèse n'est réalisée que pendant les premières années de la vie (cartilage de croissance) et il est admis que le chondrocyte adulte n'en produit plus (ou peu en condition physiologique). Ainsi, la perte d'une molécule ne sera pas remplacée ou du moins pas par du collagène de type II.

Le collagène de type II est un collagène de type fibrillaire qui représente 90 à 95% du contenu en collagènes de la MEC du cartilage hyalin [8]. Il est composé de trois chaînes  $\alpha 1(\text{II})$  formant une molécule homotrimérique. Il existe deux formes de collagènes de type II provenant d'un épissage alternatif, l'isoforme IIB qui est dominante dans le cartilage mature alors que l'isoforme IIA est plus présente dans le cartilage embryonnaire [9]. Le collagène de type VI est uniquement présent dans la matrice péricellulaire du chondrocyte [10] et il est impliqué dans la cohésion des chondrocytes à la MEC. Il existe des formes homotrimériques et hétérotrimériques qui contiennent de courts domaines en triple hélice et un domaine globulaire représentant les 2/3 de la molécule. Ce collagène confère au tissu un caractère flexible.

Le collagène de type IX (environ 3 % du contenu en collagènes) permet les connexions entre les différentes fibres de collagènes et ainsi participe aux propriétés mécaniques du cartilage. Le collagène de type XI est un collagène fibrillaire incorporé au niveau du cartilage de type II et permet de réguler son assemblage, sa taille et son diamètre. Le collagène de type X est un homotrimère plus court que les collagènes de type II et XI. Il est particulièrement abondant dans les zones où les chondrocytes sont hypertrophiques et il pourrait avoir un rôle dans la calcification des zones hypertrophiques (Martel-Pelletier et al. 2008). La présence du collagène de type X est transitoire durant la formation des os.

### 1.1.3.3 Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des protéines glycosylées et représentent 10 à 20% du poids humide du cartilage. Leur fonction est de retenir l'eau dans le cartilage, ce qui confère au tissu ses propriétés mécaniques. Ils sont constitués d'une protéine axiale sur laquelle sont fixés plusieurs glycosaminoglycanes (GAGs) dont notamment la chondroïtine sulfate (CS) et le kératane sulfate (KS). Le cartilage articulaire est composé de deux types de protéoglycanes :

D'une part des protéoglycanes formant de larges agrégats, et d'autre part des protéoglycanes de petite taille.

L'agrécan (grand protéoglycane) constitue 90 % des protéoglycanes du cartilage. Du fait de leur taille, ces protéoglycanes sont retenus dans la matrice extracellulaire durant les déformations subies par le cartilage. L'agrécan confère au cartilage ses propriétés de résistance biomécanique. La perte de ces macromolécules, observée lors de l'arthrose par exemple, conduit à l'altération des propriétés mécaniques du tissu.

Les petits protéoglycanes, comme la décorine, le biglycane et la fibromoduline ne représentent que 3 % environ du tissu cartilagineux. Généralement, ils ne sont pas spécifiques du cartilage, mais participent à la formation de la matrice extracellulaire. D'un point de vue général, ces molécules se lient aux autres macromolécules et influencent probablement l'organisation de la matrice extracellulaire et la fonction des chondrocytes, les petits protéoglycanes pouvant influencer l'activité des cytokines dans le cartilage.

## 1.2 La membrane synoviale

---

La membrane synoviale est un tissu conjonctif mésenchymateux spécialisé d'une épaisseur d'environ 100 µm en condition physiologique normale. Cette membrane tapisse la cavité articulaire et assure les fonctions suivantes :

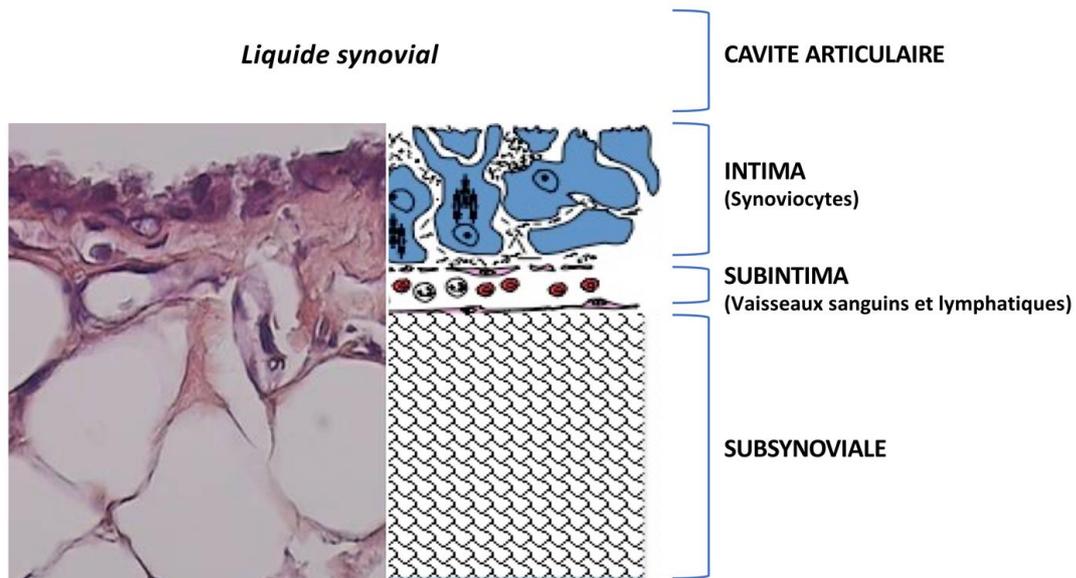
- Elle assure la sécrétion du liquide synovial et donc la lubrification du cartilage,
- Elle assure la nutrition des chondrocytes,
- Elle a un rôle de défense contre les agressions extérieures.

En cas d'agression mécanique, infectieuse ou inflammatoire, la membrane synoviale s'épaissit et sécrète un excès de liquide synovial (épanchement de synovie). Par ailleurs, par son innervation importante, elle participe activement aux phénomènes douloureux lors des processus rhumatismaux inflammatoires ou dégénératifs.

### 1.2.1 Structure de la membrane synoviale

La membrane synoviale s'insère entre la limite os-cartilage et elle est organisée en replis. Typiquement, la membrane synoviale est composée de trois couches (**Figure 4**) :

1. L'intima : couche bordante en contact avec la cavité articulaire,
2. La sub-intima : couche sous-intimale en contact avec la subsynoviale
3. La subsynoviale est un tissu conjonctif paucicellulaire de soutien qui permet la séparation de l'intima et de la subintima avec la capsule articulaire.



**Figure 4 : Structure de la membrane synoviale.**

La membrane synoviale est constituée d'une à trois assises cellulaires composant l'intima. Cette structure repose sur la subintima riche en capillaires permettant la nutrition de la membrane synoviale. Enfin, la subsynoviale permet de séparer la membrane synoviale de la capsule articulaire.

#### 1.2.1.1 L'intima

L'intima a une épaisseur qui varie entre 20 et 40  $\mu\text{m}$ . L'intima est composée de synoviocytes organisés en une à quatre couches de cellules entourées d'une fine matrice fibreuse.

Deux types cellulaires sont présents dans la membrane synoviale :

- Les synoviocytes de type macrophagique (ou de type A) ont un rôle de nettoyeur de l'articulation et participent aux réponses immunologiques en conditions pathologiques.
- Les synoviocytes de type fibroblastique (ou de type B) [12], [13] qui ont un potentiel prolifératif supérieur à celui des synoviocytes de type A. Les synoviocytes de type B sont responsables de la production du liquide synovial et de la matrice extracellulaire de l'intima [14].

#### 1.2.1.2 La subintima

L'intima repose sur un tissu sous-jacent appelé subintima. Cette subintima est riche en fibroblastes et en macrophages enchâssés dans une MEC riche en collagènes et en protéoglycanes. Elle comprend également des capillaires, artérioles et vaisseaux lymphatiques permettant l'apport nutritif de la membrane synoviale [15]. Enfin, elle est constituée de fibres nerveuses qui sont généralement associées avec les vaisseaux [16].

La nature de la subintima permet de définir 3 différents types de membrane synoviale [17]:

- Alvéolaire (la plus spécialisée), l'intima est composée d'une à trois couches de cellules reposant sur un tissu conjonctif lâche riche en capillaire et en artériole puis d'un tissu adipeux en profondeur.

- Adipeuse, elle est composée d'une couche cellulaire intima et d'un réseau de capillaires. Cette intima est généralement séparée de la subintima par une bande riche en collagène reposant sur un tissu adipeux abondant.
- Fibreuse, elle consiste en un tissu fibreux (comme un tendon ou un ligament) bordé par une couche discontinue de cellules. Elle est retrouvée au niveau des zones de pression.

### 1.2.1.3 La subsynoviale

La subsynoviale est la couche la plus profonde de la membrane synoviale. Elle permet de séparer l'intima et la subintima de la capsule articulaire. Elle repose sur la subintima et est composée d'un tissu conjonctif lâche paucicellulaire et riche en hyaluronane qui permet la mobilité de la membrane synoviale.

## 1.2.2 Les synoviocytes

### 1.2.2.1 Synoviocytes de type A

Ces cellules de type macrophagique sont les plus nombreuses et dérivent des monocytes circulants originaires de la moelle osseuse. Ces synoviocytes de type A sont généralement présents dans l'intima et la subintima. Ils possèdent une morphologie ronde et des microvillosités à leur surface qui sont des caractéristiques structurales des macrophages [17]. Ces cellules sont riches en vacuoles, lysosomes et vésicules pinocytaires en relation avec la fonction de phagocytose. Ces cellules expriment des molécules du système majeur d'histocompatibilité de classe II nécessaire à la fonction de présentation de l'antigène.

Ils permettent ainsi d'absorber les débris de l'articulation et de la membrane synoviale et jouent ainsi le rôle de « nettoyeur » de l'articulation. Dans l'arthrose, ils participent à la destruction du cartilage *via* la production continue de cytokines pro-inflammatoires. Ils peuvent également participer à la formation d'ostéophytes *via* le relargage de TGF- $\beta$ 3 et de BMP-2 et induire un remodelage au niveau de l'articulation [13].

### 1.2.2.2 Synoviocytes de type B

Les synoviocytes de type fibroblastiques sont localisés dans l'intima, au contact de la cavité articulaire. Ces cellules ont une activité de synthèse importante de par leur noyau volumineux et un réticulum endoplasmique rugueux (REG) très développé. Ils assurent notamment la synthèse de l'acide hyaluronique, composant essentiel du liquide synovial ainsi que tous les autres constituants du liquide synovial [17]. Ils sécrètent également la lubriline qui protège la surface du cartilage articulaire ainsi que de la fibronectine. De plus, les synoviocytes de type B expriment le marqueur CD55 à leur surface ce qui permet de les différencier des synoviocytes de type A.

### 1.2.3 Le liquide synovial

En contexte physiologique, le liquide synovial est retrouvé en faible quantité dans la cavité articulaire (entre 0,5 et 2 mL). En condition physiologique, ce liquide ne contient que les éléments suivants : eau, sels, minéraux et protéines.

La fonction principale du liquide synovial est de lubrifier l'articulation et de véhiculer les nutriments vers les chondrocytes dans le cartilage articulaire. C'est un dialysat du plasma sanguin et contrairement à d'autres fluides dérivés du plasma sanguin, le liquide synovial est composé de protéines à des fortes concentrations notamment, d'albumine, de globuline et de lubricine. Généralement, le taux de protéine est compris entre 18 et 20 mg/mL dans un liquide synovial normal. Ce taux augmente lors de maladie articulaire comme l'arthrose (30,6 à 31,8 mg/ml) [18].

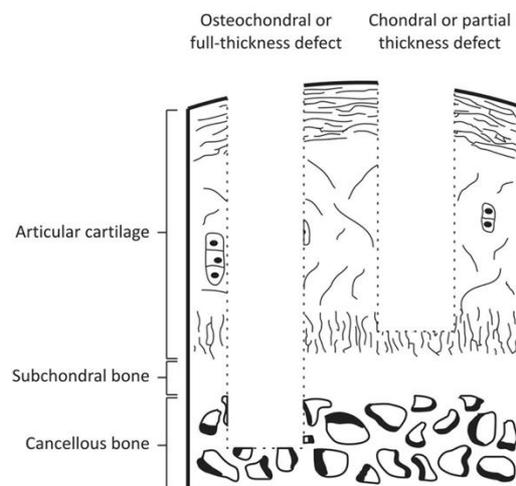
L'acide hyaluronique est un mucopolysaccharide présent dans le liquide synovial. Il s'agit d'une longue chaîne caractérisée par la répétition d'unité acide glucuronique et N-acétylglucosamine. Il est retrouvé dans le liquide synovial sous forme de hyaluronate de sodium. Son association avec l'eau va permettre de former un gel déformable qui va jouer un rôle de lubrification et d'absorption des contraintes mécaniques. En effet, le gel peut être décomposé et devenir plus élastiques en réponse à de fortes forces de cisaillement puis de façon réversible, être recomposé suite à la baisse du cisaillement. Le pH physiologique du liquide synovial est compris entre 7,30 et 7,43 [19]. La modification de ce pH peut avoir des effets importants au niveau de la lubrification de l'articulation. En effet, plus le pH augmente, plus le coefficient de friction diminue et inversement quand le pH diminue, le coefficient de friction augmente [20].

## 2 Les lésions du cartilage

### 2.1 Les lésions focales

Le cartilage est un tissu avasculaire qui possède des capacités de réparation très limitées. Les lésions cartilagineuses résultent de lésions trouvant leur origine soit dans le cartilage fragilisé ou surchargé, soit dans l'os sous-chondral. Ces lésions focales peuvent apparaître sur du cartilage sain dans un contexte traumatique (chute) ou d'activités sportives (entorses graves, rupture du ligament croisé antérieur, ou des luxations rotuliennes), voire des lésions spécifiques rencontrées au cours de l'enfance (ostéochondrite) conduisant au cours du temps au développement de la pathologie arthrosique.

Elles sont fréquentes dans la population. Une étude a montré que 61% des patients souffrant de douleurs articulaires avaient des lésions cartilagineuses sévères pour la majorité des patients (classe 3 ou 4 selon de score ICRS) [21]. Dans une étude similaire, 60% des patients ayant subi une arthroscopie présentaient des lésions macroscopiques [22]. Enfin, en 1997, une étude a montré que sur 993 arthroscopies, 20% des patients (moyenne d'âge : 35 ans) souffraient de lésions cartilagineuses [23, p. 99]. Ces lésions focales sont classées en deux grandes catégories : les lésions chondrales et les lésions ostéochondrales (**Figure 5**).



**Figure 5 : Les différents types de lésions focales du cartilage.**

*Les lésions ostéochondrales ou dites de pleine profondeur traversent l'intégralité de l'épaisseur du cartilage contrairement aux lésions chondrales qui n'atteignent pas l'os sous-chondral (Carballo et al., 2017 [1]).*

#### 2.1.1 Les lésions chondrales

Il s'agit pour la plupart de fissurations ou de lésions de surface plus étendues. Ces lésions n'atteignent ni la couche de cartilage calcifié ni l'os sous-chondral. Par son caractère avasculaire, le cartilage articulaire mature est incapable de produire un tissu nouveau de qualité permettant une réparation stable de ces lésions superficielles [24], [25].

### 2.1.2 Les lésions ostéochondrales

Les lésions ostéochondrales ont été mises en évidence chez des patients jeunes qui ont moins de 40 ans. Sur 31 516 arthroscopies, 5% des patients présentent ce type de lésions [26]. Les lésions ostéochondrales atteignent l'os sous-chondral au-delà de la « tidemark » et de la zone du cartilage calcifié ce qui induit une colonisation par les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse et des facteurs de croissance permettant une cicatrisation.

Cependant, le tissu de réparation obtenu est de mauvaise qualité et est de type fibreux, ce qui entraîne une gêne fonctionnelle importante : douleurs, épanchements, pseudo-blocages qui gênent la poursuite des activités sportives et parfois professionnelles. Ce tissu de réparation ne possède pas les capacités de résistance biomécanique du cartilage hyalin [27]–[29]. Cette réparation inadéquate concourt à une dégradation à court terme et à l'installation d'une arthrose plus ou moins rapide [6], [30]. Les traitements actuels de ces lésions sont basés essentiellement sur l'utilisation d'antalgiques ou d'anti-inflammatoires. Ils agissent sur la douleur, mais ne retardent pas l'arthrose et n'évitent pas la mise en place de prothèses. Le développement de nouvelles thérapeutiques représente donc un enjeu majeur en orthopédie.

### 2.1.3 Évaluation des lésions focales du cartilage

L'arthroscopie demeure une référence pour évaluer les lésions [31], car c'est le seul examen qui permet une visualisation directe de l'articulation. De nombreux scores ont été développés pour permettre de classer les différentes lésions articulaires [32]. En 1961, Outerbridge a d'abord proposé une classification des lésions en 4 stades [33], en fonction de la profondeur, de l'étendue et de la localisation des lésions (Tableau I). Cette classification a été complétée par la classification française de Beguin et Locker qui associe l'utilisation d'un crochet palpeur pour une évaluation plus précise de la profondeur des lésions [34].

**Tableau I : La classification des lésions proposées par Outerbridge en 1961.**

Classification Outerbridge	
<b>Grade 1</b>	Ramollissement cartilagineux
<b>Grade 2</b>	Présence de fragmentation ou de fissures <1,5 cm
<b>Grade 3</b>	Présence de fragmentation ou de fissures >1,5 cm
<b>Grade 4</b>	Mise à nu de l'os sous-chondral

C'est seulement en 2001 que l'*International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society* (ICRS) propose une gradation des lésions en fonction de la profondeur et établit une cartographie des condyles interne et externe, des plateaux tibiaux et de la rotule qui permet une classification du siège de la lésion. L'évaluation des lésions focales du cartilage par cette classification permet d'analyser le pronostic des lésions chondrales, d'aider au traitement et surtout de comparer les différents traitements, le problème majeur étant que beaucoup de

lésions superficielles restent asymptomatiques. En effet, les plus symptomatiques sont les lésions les plus larges, en zone d'appui et présentant des contours instables (**Figure 6**).

A.

**Classification de l'« International Cartilage Repair Society »**

**Grade 0** : Cartilage normal

**Grade 1** : Cartilage presque normal

**1-A** : ramollissement.

**1-B** : fissure superficielles

**Grade 2** : Lésions inférieures à 50% de l'épaisseur du cartilage

**Grade 3** : Lésions supérieures à 50% de l'épaisseur du cartilage

**3-A** : n'atteint pas la couche calcifiée

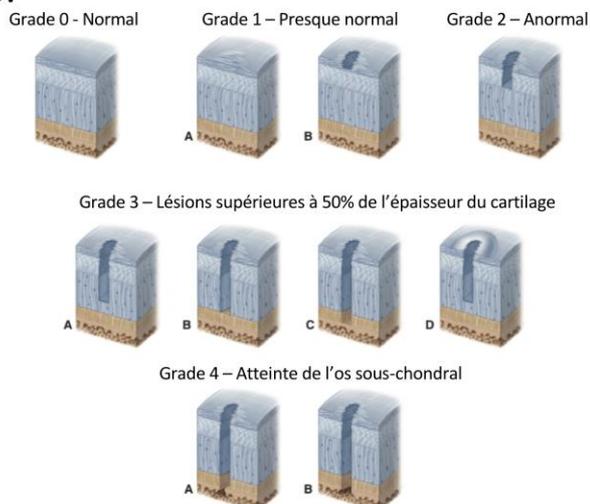
**3-B** : atteint la couche calcifiée

**3-C** : atteint la plaque sous chondrale

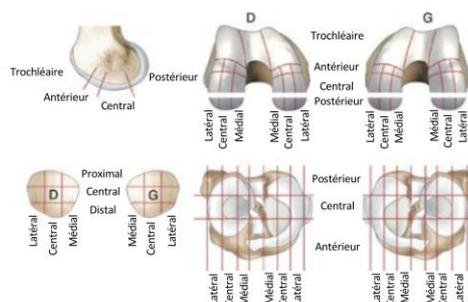
**3-D** : lésions profondes et douloureuses

**Grade 4** : Lésions ostéochondrales (atteint toute l'épaisseur du cartilage)

B.



C.



**Figure 6 : Classification des lésions chondrales proposée par l'International Cartilage Repair Society en 2001.**

A-B) Classification des lésions. C) L'ICRS a également proposé une classification du siège de la lésion. L'étendue de la lésion peut également être évaluée. Les lésions peuvent être petites (<2 cm<sup>2</sup>), moyennes (>2 cm<sup>2</sup>) ou larges (>5 cm<sup>2</sup>). [www.cartilage.org](http://www.cartilage.org) (page consultée le 12 mars 2016)

## 2.2 Les lésions diffuses arthrosiques

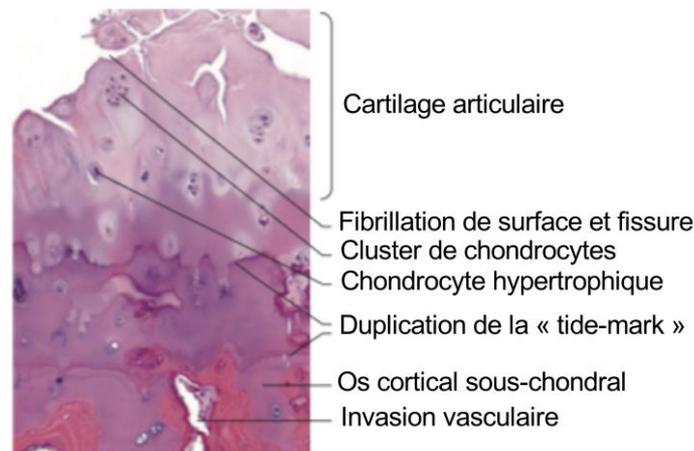
L'arthrose, par sa fréquence et son impact socioprofessionnel, constitue une véritable préoccupation de santé publique dans les pays occidentaux du fait du vieillissement global de la population. En effet, l'arthrose est l'une des pathologies les plus communes affectant un pourcentage important de personnes âgées. Les altérations cartilagineuses peuvent résulter aussi bien d'une charge anormale sur un cartilage sain que d'une charge normale sur un tissu déjà fragilisé. Quelles que soient les causes de l'étiologie de l'arthrose, le malade est particulièrement handicapé par les douleurs et les difficultés à se déplacer.

Les facteurs de risques sont :

- L'obésité,
- la pratique intensive d'une activité sportive,

- un traumatisme (fractures ou microtraumatismes répétitifs, luxation des ménisques),
- des facteurs structuraux et génétiques,
- des troubles métaboliques dont les mécanismes d'action ne sont pas déterminés,
- la sénescence.

Du fait de la structure d'une articulation, les rhumatismes peuvent provenir du cartilage, mais aussi de l'os sous-chondral et de la membrane synoviale. Les détériorations que subit le cartilage se répercutent donc sur les chondrocytes eux-mêmes ainsi que sur l'os sous-chondral. Ainsi, l'arthrose est une maladie dégénérative et surtout évolutive de l'articulation caractérisée par une dégradation du cartilage, une inflammation de la membrane synoviale et un remodelage de l'os sous-chondral (**Figure 7**).



**Figure 7 : Structure d'un cartilage arthrosique.**

*Le cartilage arthrosique est caractérisé par la fissuration et la fragmentation du cartilage. Nous observons également une hypertrophie des chondrocytes et une invasion de moelle osseuse. Adapté de Martel-Pelletier et al., 2016*

La maladie n'affecte donc pas seulement le cartilage hyalin, mais l'ensemble de l'articulation diarthroïdale. D'une part, les chondrocytes sont capables de répondre aux cytokines pro-inflammatoires provenant du liquide synovial inflammatoire. Les chondrocytes vont alors sécréter un ensemble de métalloprotéases et d'hyaluronidases qui vont participer aboutit à la dégradation de la matrice extracellulaire. D'autre part, la détérioration de l'os sous-chondral provoque une augmentation des contraintes appliquées sur le cartilage et une usure de celui-ci.

La progression de la pathologie est donc étroitement liée à l'expression accrue des composés pro-inflammatoires tels que les cytokines pro-inflammatoires, des espèces réactives de l'oxygène ou de chimiokines [35] et à l'expression des enzymes (métalloprotéases et d'hyaluronidases) impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP-1, MMP-3, MMP-13, agrécanase, ADAMTS-4, ADAMTS-5) qui sont de plus en plus exprimées. Il en résulte automatiquement une augmentation de sa sensibilité aux différentes contraintes mécaniques, des fibrillations vont apparaître puis des fissures (associées à un doublement de la « tidemark »), des fragments de cartilage peuvent se décrocher conduisant à la mise à nu de l'os sous-chondral.

## 2.3 Les principaux traitements des lésions localisées ou diffuses du cartilage

---

### 2.3.1 Les traitements chirurgicaux actuels

Des techniques chirurgicales sont utilisées depuis plusieurs décennies pour réparer les lésions du cartilage.

- **Le forage de Pridie** (ou forage sous-chondral) est une technique conçue en 1959. Elle consiste en un forage de l'os sous-chondral atteignant la moelle osseuse. Ainsi, un caillot de sang pourra se former et initier la réparation de la lésion.
- **L'abrasion** est une technique développée par Johnsson en 1980. Le principe de cette méthode repose sur une abrasion des bords de la lésion afin d'obtenir des bords collagéniques lisses (débridement) sur lesquels un caillot de fibrine peut se former.
- **La microfracture** est une adaptation du forage de Pridie. Après avoir retiré le cartilage calcifié, de nombreux puits de 1 à 2 mm de diamètre et 4 à 5 mm de profondeur sont réalisés à l'aide d'un poinçon. La lésion va être comblée par un caillot sanguin contenant des cellules souches mésoenchymateuses issues de la moelle osseuse de l'os sous-chondral. Ainsi, un tissu de réparation va être formé. La microfracture apparaît donc 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.
- La **mosaicoplastie**, également appelée autogreffe ostéocondrale, repose sur le prélèvement de carottes cartilagineuses au sein de zones non portantes pour les greffer au niveau des lésions débridées. L'avantage de cette technique est l'utilisation d'un tissu différencié pour réparer la lésion. Cependant, les espaces libres entre les différentes carottes cartilagineuses sont comblés par un tissu de type fibrocartilagineux.

Ces différentes techniques aboutissent à un tissu de réparation de mauvaise qualité de type fibreux, pauvre en collagène de type II ne présentant pas les caractéristiques du cartilage hyalin natif. Ce tissu de réparation supportera mal les contraintes et les charges biomécaniques des articulations et tendra à se dégrader très vite. Ces résultats ont conduit au développement depuis une vingtaine d'années de techniques chirurgicales associant l'ingénierie cellulaire, pour lesquelles des chondrocytes autologues sont utilisés pour améliorer la qualité du tissu de réparation au sein de la lésion cartilagineuse. En effet, les chondrocytes sont les cellules spécialisées du cartilage capables de synthétiser l'ensemble de la MEC.

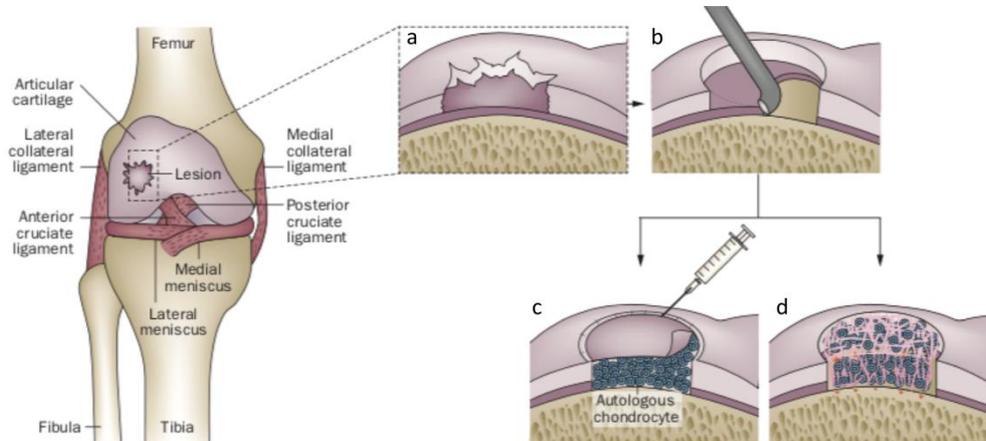
### 2.3.2 Approches de médecine régénératrice

La transplantation de chondrocytes autologues a donc été mise en place pour la première fois par Brittberg en 1994 [36]. Le principe de cette méthode repose sur un prélèvement de cartilage sain au niveau d'une zone non portante qui va être digérée afin d'isoler les chondrocytes (**Figure 8c**). Par le faible nombre de chondrocytes obtenus, ceux-ci sont alors amplifiés en culture monocouche pour obtenir un nombre suffisant de cellules alors réimplantées dans la lésion. Même si l'amplification s'avère essentielle pour obtenir un nombre suffisant de cellules, les chondrocytes ont la particularité de très rapidement se différencier en culture monocouche avec une perte considérable de leur capacité à synthétiser du collagène de type II et des protéoglycanes.

Avant réimplantation, la lésion est débridée et recouverte par un lambeau de périoste suturé pour éviter la fuite des cellules implantées. L'implantation de chondrocytes autologues est généralement utilisée chez les patients de moins de 50 ans qui ont un défaut cartilagineux (aire > 1 cm<sup>2</sup>) suite à un traumatisme aigu [37]. Brittberg et coll. ont prouvé, qu'après un suivi postopératoire moyen de 4 ans, 90% des patients traités pour des lésions des condyles fémoraux avaient de bons résultats cliniques [38]. Une autre étude rétrospective portant sur 224 patients traités par une implantation de chondrocytes autologues a montré que 92% des patients étaient satisfaits du traitement [39].

Cependant, cette technique présente des inconvénients majeurs tels que la faible quantité de cartilage disponible au sein des zones saines non portantes, la perte du phénotype chondrocytaire après un temps de culture prolongé en monocouche, le risque de fuite en dehors de la lésion des chondrocytes transplantés, et enfin la complexité de la technique ainsi que son coût. De plus, l'âge avancé du patient et les lésions cartilagineuses étendues (aire > 4,5 cm<sup>2</sup>) sont des facteurs de risques qui augmentent la nécessité d'une deuxième opération [40].

Ainsi, pour pallier ces inconvénients, les techniques d'ingénierie tissulaire permettant la culture cellulaire dans des matrices artificielles tridimensionnelles ayant des propriétés mécaniques et biologiques proches de celles du tissu cartilagineux ont été développées. Aujourd'hui, une technique d'implantation de chondrocytes autologues couplés avec une matrice (MACI : Matrix Associated Chondrocyte Implantation) est actuellement utilisée en clinique. Cette technique permet de maintenir le phénotype chondrogénique des cellules au sein de l'articulation (**Figure 8d**). En effet, malgré une dédifférenciation durant les phases d'expansion, les chondrocytes retrouvent leur phénotype dans un environnement en 3 dimensions.



**Figure 8 : Techniques de médecine régénératrice.**

a) Lésion focale du cartilage b) Débridement de la lésion c) Transplantation de chondrocytes autologues : la lésion est recouverte par un lambeau périosté ou une membrane de collagène puis remplie de chondrocytes d. MACI, les chondrocytes sontensemencés dans une matrice résorbable qui sera implantée sur le site de la lésion. Adapté de Makris et al., 2015

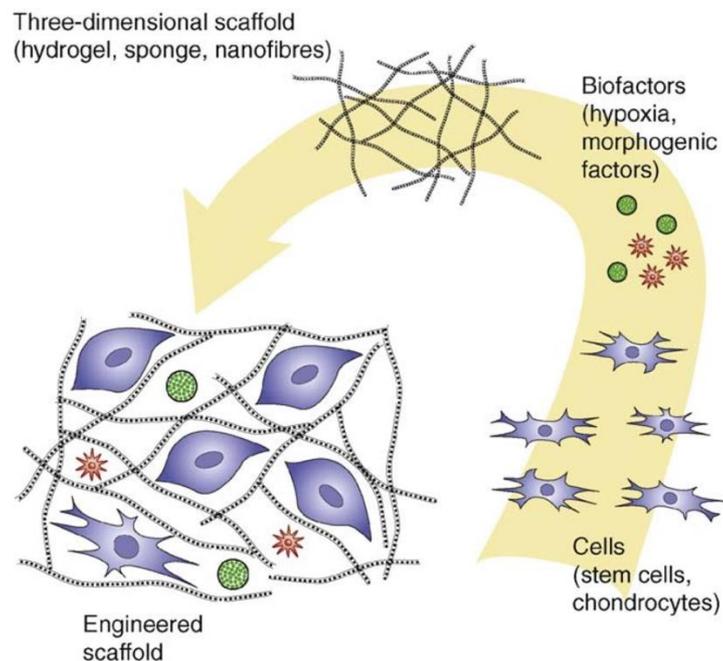
### 3 L'ingénierie tissulaire du cartilage

Certains tissus, comme le foie ou la peau, sont capables de se régénérer naturellement. Cependant, le cartilage est un tissu non vascularisé ce qui lui confère des capacités de réparation très limitées. Ainsi et depuis maintenant près de 25 ans, l'ingénierie tissulaire connaît un essor considérable. Le principe de cette méthode vise à concevoir, *in vitro*, un néo-tissu fonctionnel pour le réimplanter au niveau articulaire chez le patient afin de maintenir ou d'améliorer les fonctions du cartilage.

L'ingénierie tissulaire du cartilage est composée d'une succession d'étape nécessaire à la production d'un substitut. La première étape consiste à isoler des cellules à partir d'une biopsie tissulaire. Ensuite, l'expansion cellulaire permet d'obtenir le nombre suffisant de cellules pour les ensemercer dans un support tridimensionnel. Enfin, le substitut va être mûré *in vitro* dans des conditions environnementales propices à l'obtention d'un substitut implantable dans le site de la lésion.

L'ingénierie tissulaire *in vitro* du cartilage repose sur une triade constituée sur le choix (**Figure 9**) :

- D'un contingent cellulaire
- D'un biomatériau support des cellules
- De la nature des signaux permettant la fonctionnalisation du substitut



**Figure 9 : La triade de l'ingénierie tissulaire du cartilage.**

L'ingénierie tissulaire du cartilage repose sur l'association de cellules, de biofacteurs et d'un environnement tridimensionnel afin de produire un substitut cartilagineux. D'après Vinatier et al. 2009 [41]

La combinaison de ces 3 facteurs vise à produire un substitut cartilagineux. Pour être fonctionnel, ce tissu néo-synthétisé doit avoir une composition et une organisation structurale les plus proches possible du tissu cartilagineux. L'objectif de l'IT étant de créer un néo-cartilage

*in vitro* et utiliser ces substituts pour combler une perte de substance chondrale et/ou ostéochondrale.

Les études *in vitro* permettent d'obtenir une grande quantité d'information sur le potentiel de différenciation des CSMS. Cependant, des études approfondies doivent être réalisées *in vivo* (études précliniques) afin d'évaluer le comportement de l'implant ainsi que la capacité de réparation et de cicatrisation du cartilage avant toute utilisation chez l'Homme.

### 3.1 Les biomatériaux supports

---

Le modèle de référence pour étudier la chondrogenèse *in vitro* est le pellet (culot de cellules). Ce système tridimensionnel permet de mimer l'étape de condensation des cellules lors de la chondrogenèse dans l'embryon. Cependant, en vue d'une implantation, les cellules sont associées avec un biomatériau qui constitue un support de culture *in vitro* et une solution pour la réparation du cartilage, les cellules sont alors isolées les unes des autres pour permettre la synthèse d'une matrice extracellulaire. Les supports tridimensionnels sont en effet de bons candidats pour la réparation du cartilage, car ils peuvent servir de système de transport des cellules dans les lésions cartilagineuses.

Ces biomatériaux doivent remplir un cahier des charges bien spécifique. Le biomatériau idéal doit être :

- Adaptable aux dimensions de la lésion à combler
- Il doit permettre l'adhésion, la prolifération et la différenciation chondrogénique des cellules ou le maintien du phénotype chondrocytaire
- Biocompatible : le biomatériau ne doit pas engendrer de réactions inflammatoires
- Biodégradable : la matrice doit pouvoir se résorber
- Stables d'un point de vue structurel et mécanique : c'est-à-dire pouvoir remplacer le cartilage mécaniquement et permettre aux cellules de synthétiser une matrice extracellulaire
- Stérilisable

Les biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage sont classés en fonction de leurs origines, soit des biomatériaux naturels, soit des biomatériaux synthétiques.

#### 3.1.1 Les biomatériaux naturels

Ces biomatériaux sont similaires d'un point de vue biologique et biochimique au tissu natif et présentent donc un intérêt particulier en ingénierie tissulaire. Les biomatériaux naturels peuvent être composés :

- De protéines (collagène, soie)
- De polysaccharides (acide hyaluronique, alginate, agarose, chitosan...)

Aujourd'hui, les biomatériaux à base de collagène et d'acide hyaluronique sont les plus étudiés, car ils composent naturellement le cartilage articulaire [42].

### 3.1.1.1 Les biomatériaux à base de protéines

#### a. *Le collagène*

Le collagène est un composant natif du cartilage et constitue un excellent biomatériau, car il est biodégradable [43], [44]. Il peut être utilisé pour la fabrication de différents types de supports comme des éponges, des gels ou des membranes [45]. Le collagène de type I est le plus utilisé en ingénierie tissulaire (IT), car il est le moins immunogène [46] contrairement au collagène de type II. Ces biomatériaux collagéniques permettent l'ancrage des cellules et la prolifération cellulaire [47], [48]. Ils permettent le maintien du phénotype chondrocytaire [49], la re-différenciation des chondrocytes [50], et la différenciation chondrogénique des Cellules Souches Embryonnaires (CSE) [51] et des Cellules Souches Mésenchymateuses issues de la Moelle Osseuse (CSMs-MO) [52].

Cependant, les biomatériaux à base de collagène se dégradent très rapidement ce qui entraîne une diminution des propriétés mécaniques [53]. Deux études montrent que l'association de CSMs-MO avec des éponges de collagène de type I permet de réparer des lésions focales chez le mouton avec la formation d'un cartilage hyalin [54] et une abondance de collagène de type II [55].

#### b. *La soie*

La soie est également étudiée comme support tridimensionnel pour l'IT. Initialement, elle était utilisée pour fabriquer les fils de suture [56]. Des structures 3D en soie permettent l'attachement et la prolifération de CSMs de moelle osseuse [57]. C'est également un matériau favorisant la chondrogenèse des CSMs-MO et des chondrocytes [58], des CSMs dérivées du placenta humain [59] et du tissu adipeux [60].

### 3.1.1.2 Les biomatériaux à base de polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères synthétisés naturellement par le bois, les plantes, les algues et les crustacés marins. Ils sont très utilisés en IT du cartilage, en particulier l'alginate, l'acide hyaluronique ou le chitosan.

L'**alginate** est un polymère linéaire composé de répétition d'acide D-manuronique et d'acide D-glucuronique. Il permet la re-différenciation de chondrocytes bovins [61] ainsi que la différenciation chondrogénique des CSMs de moelle osseuse [62], [63], de tissu adipeux [64] et de membrane synoviale [65]. Cependant, l'alginate possède une résistance mécanique moindre que celle du cartilage.

L'**acide hyaluronique** est un composant naturel présent au sein du liquide synovial et dans le cartilage articulaire. Il permet la différenciation des CSMs-MO [66] et des CSMs-TA [67] et la re-différenciation de chondrocytes [68]. Les biomatériaux à base de **chitosan** permettent la re-différenciation des chondrocytes en culture *in vitro* [69], [70] et la différenciation de CSMs de tissu adipeux [71].

Ces biomatériaux naturels ont démontré leur efficacité comme vecteur de cellules pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Dans un modèle de lésions ostéochondrales chez le chien, les CSMs-MO associés avec un gel de fibrine et de PRP [72] ont permis la formation de cartilage hyalin. Chez la chèvre, une réparation complète de lésions focales cartilagineuses a

été observée avec un implant cartilagineux à base d'acide hyaluronique et de CSMS-MO [72]. Des résultats similaires ont été observés avec une association CSMS-MO et colle de fibrine [73].

### **3.1.2 Les biomatériaux synthétiques**

Ces biomatériaux ont des propriétés mécaniques et biochimiques facilement modifiables, ce qui leur confère des propriétés de résistances mécaniques aux contraintes de l'articulation supérieures aux biomatériaux naturels. De plus, leur synthèse est aisée, plus uniforme et le risque de transmission de pathogènes est très limité [74]. Les matrices les plus étudiées sont à base d'acide polyglycolique (PGA), d'acide polylactique (PLA), d'acide polylactique-coglycolique (PLGA) et de poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) [75].

En recherche, les biomatériaux à base de PGA sont capables de soutenir la différenciation chondrogénique de CSMS issues de la moelle osseuse [76]. Ils ont démontré leur efficacité dans la réparation du cartilage dans un modèle de lésions ostéochondrales chez le lapin [77] ou encore chez le cochon en association avec le PLA [78]. Les biomatériaux à base de PLGA ont permis la différenciation chondrogénique de CSMS issues du tissu adipeux [79], [80] et de la graisse infra-patellaire [81]. Des études ont également montré la différenciation chondrogénique des CSMS ostéomédullaires au sein de polymères à base de poly- $\epsilon$ -caprolactone [82]–[84].

Les polyesters tels que PGA, PLA et PLGA sont labellisés pour une utilisation chez l'Homme par la FDA (US Food Drug and Administration). Ces biomatériaux sont déjà utilisés en clinique. Par exemple, la matrice commerciale BioSeed®-C est un biomatériau à base de PLGA utilisé dans le cadre de MACI (Matrix Associated Chondrocyte Implantation). Les chondrocytes autologues différenciés ensemencés dans ce biomatériau retrouvent un phénotype « chondrocyte like » [85].

Ces biomatériaux synthétiques peuvent être greffés chimiquement ou associés à d'autres biomatériaux. Ces biomatériaux hybrides ont prouvé leur efficacité dans la réparation du cartilage *in vivo*. L'utilisation de PCL associé à du TGF- $\beta$ 2 et de la BMP-7 et ensemencés avec des CSMS-MO permet d'obtenir un tissu de réparation cartilagineux d'une qualité satisfaisante [86]. Des résultats similaires sont observés chez la souris grâce à l'utilisation d'un biomatériau en PLGA couplé à des microsphères larguant du TGF- $\beta$ 3 [87]. L'acide hyaluronique peut également être couplé à un biomatériau à base de PGA et permettre une réparation de cartilage hyalin «like» [88].

Cependant, ces différentes matrices synthétiques présentent certains inconvénients comme un caractère hydrophobe, une dégradation en condition physiologique relativement longue [75] et un manque de site d'attachement des cellules. De plus, leur dégradation par hydrolyse engendre parfois des composés acides et toxiques qui provoquent des réactions inflammatoires [89].

### **3.1.3 Les biomatériaux commerciaux**

Des biomatériaux hybrides sont aujourd'hui fabriqués et commercialisés. C'est une alternative au biomatériau unique, il est composé d'une association de molécules synthétiques et/ou naturels afin de répondre aux exigences de l'articulation (contraintes mécaniques), mais ils permettent également l'attachement et la différenciation des cellules.

Il existe des composites :

- PGA/PLA : Bio-Seed®-C
- De collagène de type I et III : Chondro-Gide® et Maix ®
- De chitosan et de  $\beta$ -glycerophosphate : BST-Cargel®
- De collagène et d'hydroxyapatite : Collapat® et Hemotèse®

Ces différents biomatériaux ont prouvé leur efficacité pour la réparation du cartilage et sont utilisés pour les MACI. L'ensemble de ces biomatériaux constitue donc un support tridimensionnel de culture des cellules. Cette matrice va permettre la différenciation des cellules afin de former un substitut cartilagineux. L'optimisation du contingent cellulaire reste un enjeu thérapeutique majeur.

## 3.2 Le contingent cellulaire

---

Dans le cadre de cette partie, nous allons nous intéresser aux sources cellulaires susceptibles d'être utilisées en ingénierie du cartilage.

### 3.2.1 L'unique type cellulaire du cartilage : les chondrocytes

En ingénierie tissulaire du cartilage, le chondrocyte s'avère à première vue le meilleur candidat puisqu'il est l'unique cellule du cartilage et permet à la fois la synthèse et la dégradation de sa matrice extracellulaire. Cette cellule est déjà largement utilisée et fait preuve de résultats encourageants dans le cadre d'injection au niveau des lésions (TCA) et lors d'implantation de chondrocytes associés à une matrice. Cependant deux inconvénients majeurs existent :

- D'une part, le prélèvement de cartilage est un acte invasif qui nécessite d'être réalisé en zone non portante ce qui limite considérablement la quantité de tissu disponible et donc de cellules disponibles.
- D'autre part, l'expansion en monocouche nécessaire pour obtenir un nombre suffisant de cellules pour l'ingénierie tissulaire conduit à une dédifférenciation des cellules et donc à une instabilité phénotypique. En effet, les chondrocytes cultivés en monocouche deviennent de type fibroblastique et perdent leurs fonctions spécifiques comme la synthèse de collagène de type II et de protéoglycanes au profit du collagène de type I [90].

Cependant, les chondrocytes dédifférenciés lors des étapes d'expansion en monocouche retrouvent leur phénotype différencié lorsqu'ils sont cultivés en environnement 3D [61]. En revanche, les chondrocytes issus de patients arthrosiques possèdent des altérations métaboliques et répondent moins bien à une re-différenciation via des facteurs environnementaux. Ainsi, les recherches s'orientent vers l'utilisation de cellules souches comme contingent cellulaire dans le cadre de l'ingénierie du cartilage.

### 3.2.2 Les cellules souches – Généralités

Les cellules souches sont des cellules non spécialisées qui peuvent se différencier sous l'influence de facteurs environnementaux. Elles sont dotées de deux grandes caractéristiques : l'auto-renouvellement et une capacité de différenciation [91]. Ces cellules sont à l'origine de l'organisme lors du développement embryonnaire puis fœtal, mais constituent également un réservoir dans l'organisme pour le renouvellement et le maintien de l'homéostasie.

Chez l'organisme adulte, il y a une régulation fine du mécanisme permettant de conserver le pool de cellules souches. En effet, un équilibre parfait existe entre la prolifération de ces cellules pour maintenir le stock cellulaire et la différenciation pour assurer le maintien d'un tissu [92].

La capacité de différenciation est caractérisée par la possibilité des cellules souches à générer différents types cellulaires fonctionnels et différenciés. La cellule va alors perdre son caractère souche (« souchitude ») et par conséquent va perdre sa capacité d'auto-renouvellement. Il est admis dans la communauté scientifique que plus une cellule est différenciée, moins elle prolifère. Par contre, toutes les cellules souches ne sont pas « capables » de se transformer en toutes les cellules différenciées d'un organisme. Cette capacité de différenciation dépend

donc du type de cellules souches : (i) totipotente (ii) pluripotente (iii) multipotente (iv) unipotente.

(i) les cellules dites totipotentes constituent les premières cellules de l'organisme. Elles correspondent aux cellules capables de donner un organisme entier et les annexes extra-embryonnaires (placenta et cordon ombilical) par différenciation. Ces cellules constituent le zygote (stade 2 cellules) jusqu'au stade morula (16 cellules) de l'embryon.

(ii) les cellules dites pluripotentes sont capables de se différencier vers les 3 lignées germinales qui vont permettre la formation de l'organisme : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Elles sont présentes au niveau de la masse interne de l'embryon à partir du stade blastocyste.

(iii) les cellules multipotentes sont retrouvées au sein d'un organisme adulte (moelle osseuse, sang périphérique, liquide synovial, ...), mais également au niveau fœtal (liquide amniotique, placenta, gelée de Wharton ...). Ces cellules appartiennent à l'un des trois feuillet embryonnaires et sont donc engagées dans une voie de différenciation. Elles ne peuvent pas se différencier en une cellule appartenant à un autre feuillet. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) sont un exemple de cellules multipotentes.

(iv) les cellules unipotentes sont présentes dans les différents tissus d'un organisme. Elles participent à l'homéostasie du tissu lors de lésion ou de renouvellement cellulaire. Elles possèdent des capacités de différenciation très limitées, comme, par exemple, les kératinocytes.

### **3.2.3 Les cellules utilisables en ingénierie tissulaire du cartilage**

#### **3.2.3.1 Les cellules souches pluripotentes**

Il existe deux grands types de cellules souches pluripotentes : les cellules souches embryonnaires (CSE) et les iPSC (induced Pluripotent Stem Cells).

Les cellules souches embryonnaires sont potentiellement utilisables pour l'ingénierie du cartilage. Cependant, ces cellules possèdent des épitopes très immunogènes et peuvent donc être responsables de rejet [93]. De plus, les études sur la différenciation des CSE donnent des résultats contradictoires. D'une part, ces cellules ont été cultivées en trois dimensions puis implantées en site articulaire, mais les résultats concernant la différenciation chondrogénique et le potentiel de réparation des lésions *in vivo* se sont avérés très aléatoires [94]. D'autre part, ces cellules sont capables d'induire une réparation de type cartilage-like chez le rat [95].

Par ailleurs, en plus d'un risque carcinologique élevé, l'origine embryonnaire des CSE entraîne une vive controverse éthique concernant leurs utilisations en médecine régénératrice. Depuis 2007, il est également possible de créer des cellules pluripotentes *in vitro*. En effet, en 2012, le prix Nobel de physiologie et de médecine a été attribué à une équipe japonaise [96] qui a publié un protocole permettant d'obtenir des cellules souches pluripotentes à partir de fibroblastes différenciés qui sont reprogrammés : les cellules pluripotentes induites (iPSC). D'après Yamanaka et coll., les cellules différenciées sont reprogrammées par transformation à l'aide d'un rétrovirus grâce à 4 gènes exprimant des facteurs de transcription spécifique de la pluripotence : Oct3/4, Sox2, KLF4 et cMyc. Parallèlement à ces travaux, une équipe américaine a identifié un autre cocktail de gène (Oct4, Sox2, Nanog et Lin28) pour reprogrammer des fibroblastes humains en iPSC [97].

Les iPSC constituent une alternative aux CSMs pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Elles peuvent être produites à partir de différentes sources cellulaires comme les fibroblastes de peau [98], des chondrocytes [99], des cellules de sang de cordon, des cellules nucléées issues du sang ou dérivées de fibroblastes de la membrane synoviale [100]. Des cellules d'origine articulaire ont déjà été utilisées pour être reprogrammées en iPSC. Cependant, la capacité de différenciation chondrogénique de ces cellules est controversée. En effet, il a été montré que les iPSC dérivées de cellules articulaires possèdent des capacités de différenciation chondrogénique supérieure [99] ou inférieure [100] aux iPSC produites à partir de cellules non articulaires. D'un point de vue général, ces cellules possèdent des capacités de prolifération illimitées et sont moins concernées par les problèmes éthiques soulevés par les cellules souches embryonnaires [101].

### 3.2.3.2 Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses CSMs ont été isolées de différents tissus comme la moelle osseuse [102], la membrane synoviale [103], le liquide synovial [104], le cartilage, la graisse, le tissu adipeux [105], la pulpe dentaire [106], l'endomètre ou encore le sang menstruel [107].

Au niveau foetal, des CSMs peuvent être isolées à partir du liquide amniotique ou encore du placenta [108] et de la gelée de Wharton [109]. Elles représentent une population de cellules hétérogènes et non identifiables par un seul marqueur. En 2006, la société internationale de thérapie cellulaire (*The International Society of Cellular Therapy*, ISCT) a proposé trois critères permettant de définir le statut de CSMs [110].

Ainsi, nous pouvons distinguer :

1. Une capacité d'adhésion au plastique
2. Une expression des marqueurs de surface CD105, CD90 et CD73 et une absence des marqueurs hématopoïétiques CD34, CD45, CD14 (ou CD11b) et CD79 $\alpha$  (ou CD19) ainsi que l'absence d'expression du marqueur HLA de classe II. Pour être considérée comme pure, une population de cellules doit exprimer les marqueurs mésenchymateux à plus de 95% et l'expression des marqueurs hématopoïétiques à moins de 2% (**Tableau II**).
3. Une capacité de différenciation vers les voies chondrogénique, ostéogénique et adipogénique.

**Tableau II : Les principaux marqueurs de surface cellulaires des CSMs.**

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité ; MEC : Matrice ExtraCellulaire ; MO : Moelle Osseuse

Marqueurs	Expression	Fonction
<b>CD73</b>	> 95%	Ecto-5'-nucleotidase
<b>CD90</b>	> 95%	THY1, glycoprotéine de surface
<b>CD105</b>	> 95%	Endoglin, récepteur du TGF- $\beta$
<b>CD34</b>	< 5%	Protéine de surface, progéniteurs hématopoïétiques primitifs
<b>CD45</b>	< 5%	Tyrosine phosphatase implique dans la signalisation cellulaire
<b>HLA-DR</b>	< 5%	CMH de classe II

L'ensemble des critères évoqués sont communs pour l'identification de CSMs quelle que soit l'origine tissulaire étudiée.

a. *Les CSMs issues de tissus fœtaux*

La gelée de Wharton est un tissu conjonctif hydraté qui entoure la veine et les deux artères ombilicales avec une localisation extra embryonnaire. Ce tissu a été décrit en 1656 par Thomas Wharton. En 1991, Mc Elreavey est le premier à mettre en évidence et à caractériser des cellules fibroblastiques au sein de la gelée de Wharton [111]. Ces cellules sont ensuite caractérisées comme CSMs puisqu'elles répondent aux critères de recommandations de l'ISCT [109]. Le prélèvement des cellules est un acte non invasif et non iatrogène, car elles sont prélevées sur le cordon ombilical (déchet opératoire) après la naissance. Les CSMs-GW possèdent un temps de doublement de population court ainsi qu'une très faible immunogénicité [112]. De plus, ces cellules ne forment pas de tératomes lorsqu'elles sont implantées chez des souris immuno-déficientes [113]. Une étude récente de notre unité a montré qu'il est possible de différencier les CSMs-GW vers la voie chondrogénique grâce à des facteurs classiques de différenciation [114]. Enfin, chez le rat, la combinaison de CSMs issues de la gelée de Wharton avec de l'acide hyaluronique a permis une bonne réparation de défauts focaux d'un point de vue macroscopique et histologique [115]. Des résultats similaires ont été obtenus chez le miniporc [116]

Les cellules issues de la gelée de Wharton constituent donc une source prometteuse de CSMs pour l'ingénierie tissulaire et cellulaire. Le sang de cordon, présent dans la veine ombilicale, est également une source de CSMs [117]. Cependant, cette source est pauvre en CSMs et le taux d'isolement ainsi que les capacités de prolifération de ces cellules sont inférieures à celles des CSM de la gelée de Wharton [118].

b. *Les CSMs issues de la moelle osseuse*

Les cellules souches mésenchymateuses ont été identifiées pour la première fois dans la moelle osseuse de cochons d'Inde dans les années 1970 par A. Friedenstein. Il identifie ces cellules comme « cellules fibroblastiques formatrices de colonies » dites CFU-F, capables de se multiplier et de former des dépôts osseux et cartilagineux [119]. Par la suite, Maureen Owen définit les « cellules souches stromales de la moelle » en 1988 [120] lors de travaux *in vitro* sur la multipotence des cellules adhérentes de la MO. En 1991, Arnold Caplan va finalement utiliser le terme de « cellule souche mésenchymateuse » [121].

Les CSMs issues de la Moelle Osseuse (CSMs-MO) sont les cellules souches les plus étudiées et les mieux caractérisées. Chez l'Homme, ces cellules sont récupérées par ponction de la crête iliaque, mais également par ponction du tibia ou lors d'une intervention chirurgicale orthopédique. Cependant, il s'agit d'une procédure douloureuse et invasive. La méthode standard d'isolement de ces cellules se base sur les capacités d'adhésion au plastique contrairement aux Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) qui vont rester en suspension. Les CSH sont donc éliminées par les changements de milieux successifs. Le taux d'isolement des CSMs-MO est d'environ 100% [122] bien que les CSMs-MO soient une population rare et ne représentent qu'entre 0,001 et 0,01% des cellules nucléées de la moelle osseuse [102], [123]. Concernant l'immuno-phénotype, les cellules sont caractérisées par le biais des critères définis en 2006 par l'ISCT. D'autres marqueurs ont été proposés comme des récepteurs d'intégrines (CD29, CD49a-e, CD51), des molécules d'adhésion (CD44, CD106, CD146,

CD166), des enzymes (CD39) ou en encore des antigènes embryonnaires SSEA-1 et SSEA-4 (Stage-Specific Embryonic Antigen) [124].

Plusieurs études *in vivo* ont été réalisées afin d'étudier les capacités de réparation cartilagineuses des CSMs-MO dans des modèles expérimentaux chez l'animal. Les CSMs ont été injectées seules ou en association avec un vecteur dans le cadre de thérapie cellulaire. L'injection d'une combinaison de CSMs-MO et d'acide hyaluronique permet de limiter la progression de lésions arthrosiques et d'augmenter la réparation de lésions diffuses dans des modèles d'arthrose chez le lapin [125], [126], le cochon [127] et la chèvre [128]. Cependant, chez le rat, la capacité de réparation en utilisant des cellules seules est supérieure à celle utilisant une association avec de l'acide hyaluronique [129]. De plus, il a été également montré que l'injection intra-articulaire de CSMs-MO dans un modèle d'arthrose au MIA (Mono Iodo Acetate) permet de diminuer la douleur, mais n'a aucun effet sur le développement des lésions du cartilage [130].

Par ailleurs, ces cellules sont également utilisées en association avec un biomatériau support afin de combler des lésions focales. Wakitani et coll. ont montré, en 1994, une bonne capacité de réparation de lésions focales chez le lapin lorsque les CSMs issues de la moelle osseuse sontensemencées dans un gel de collagène de type I [131]. De plus, chez le rat, l'association de ces cellules avec un biomatériau à base d'acide hyaluronique permet de prévenir l'apparition de lésions arthrosiques [132]. Des résultats similaires sont obtenus dans la réparation de cartilage via la transplantation d'agrégats de cellules et de fibrine [133] ou de feuillets de cellules [134]. De plus, l'utilisation de biomatériau support à base de PGA-acide hyaluronique [88] ou de PLGA [135] ont permis d'obtenir un tissu de réparation de type cartilage hyalin « like » chez le lapin. Enfin, chez le chien, l'implantation de CSMs-MO dans un biomatériau à base de PLA permet un recouvrement complet de la lésion focale et une bonne intégration du greffon, mais le tissu de réparation obtenu présente des propriétés biomécaniques plus faibles que le cartilage natif [136].

### c. Les CSMs issues du tissu adipeux

Les CSMs issues du tissu adipeux ont été isolées pour la première fois en 2001 à partir d'un prélèvement humain de graisse sous-cutanée [105]. Une population de cellules indifférenciées possédant des capacités de multipotence a été identifiée dans le tissu adipeux et dans des échantillons provenant de liposuction [124]. Ces cellules sont alors décrites comme des cellules souches adipeuses (CSA) ou CSMs issues du Tissu Adipeux (CSMs-TA). Ces cellules sont très présentes dans l'organisme, il y a environ 300 fois plus de cellules souches adipeuses dans 100 g de tissu graisseux que de cellules souches mésenchymateuses dans un prélèvement de 100 ml de moelle osseuse [137]. Ces cellules ont une forme allongée de type fibroblastique. Elles sont isolées par leur capacité d'adhésion au plastique après ensemencement de la fraction vasculaire stromale récupérée après digestion et centrifugation du tissu graisseux [138]. De plus, elles possèdent les capacités de différenciation vers les voies ostéogénique, chondrogénique et adipogénique, mais également des capacités de différenciation en neurone [139]. Ces cellules souches adipeuses présentent bien les marqueurs de surface définis par l'ISCT.

L'utilisation des CSMs-TA en thérapie cellulaire a été évaluée *in vivo*. Chez la souris, l'injection de CSMs-TA permet une régénération du cartilage supérieure à la condition témoin (PBS seul) [140]. La combinaison d'acide hyaluronique avec  $1 \times 10^7$  ou  $5 \times 10^7$  CSMs-TA permet d'obtenir un cartilage de réparation dans un modèle d'arthrose chez le mouton ainsi qu'une baisse de

l'expression des facteurs inflammatoires [141]. Chez le lapin, l'injection de PRP et de  $4 \times 10^6$  CSMs-TA permet d'augmenter la réparation du cartilage par rapport à une injection de cellules seules [142]. L'injection de  $5 \times 10^7$  CSMs-TA de porc chez des chiens âgés permet une diminution de la douleur ainsi qu'une augmentation de l'activité physique. Cependant, aucune amélioration en IRM n'a été observée chez ces animaux [143].

Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage, les capacités de réparation des CSMs-TA associées avec des matrices tridimensionnelles ont été évaluées *in vivo*. Chez le lapin, l'association de CSMs-TA avec un biomatériau à base de collagène permet la réparation de défauts ostéocondraux. Le tissu de réparation obtenu est de type hyalin avec une forte expression du collagène de type II [144]. Des résultats similaires sont obtenus avec l'utilisation d'une structure tridimensionnelle à base de fibrine [145] d'alginate [146], un biomatériau à base de PLGA et de chitosan [147], de PLGA [148] ou encore avec une matrice cartilagineuse decellularisée [149]. Enfin, chez la chèvre, l'utilisation de CSMs-TA ensemencées dans des éponges de collagène de type I et III permettent une bonne réparation de défaut cartilagineux [150].

#### d. *Les CSMs issues du cartilage articulaire*

En 2002, Dowthwaite et coll sont les premiers à isoler des CSMs du cartilage articulaire bovin grâce à un test d'adhésion à la fibronectine. Ces cellules forment des colonies lorsqu'elles sont ensemencées à des faibles concentrations, elles possèdent des capacités de multi-différenciation et expriment Notch 1 et l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  à leur surface. Plusieurs méthodes d'isolement de ces cellules ont également été testées comme des tests d'exclusion au Hoechst 33 342 et du tri cellulaire en fonction de l'expression positive et négative de marqueurs de surface cellulaire par cytométrie en flux.

Plusieurs marqueurs de surface cellulaire sont identifiés comme marqueurs de cellules souches cartilagineuses comme Notch 1, CD44, CD105, CD151 et CD166 [151], [152]. Chez la souris, les cellules exprimant Prg4 ont été définies comme les CSMs issues du cartilage articulaire [153]. Les progéniteurs CD166+ et CD105+ sont notamment retrouvés au niveau de la couche radiale du cartilage sain et arthrosique [154]. Le marqueur de surface cellulaire CD146 est identifié comme un marqueur prédictif d'une bonne différenciation chondrogénique des CSMs du cartilage dans un modèle de pellet [155]. La proportion de ces cellules augmente avec l'arthrose, le cartilage sain est composé de 4% de CSMs du cartilage articulaire alors que ce pourcentage est de 8% dans un cartilage arthrosique [152]. De plus, les CSMs issues du cartilage articulaire conservent leur capacité de différenciation chondrogénique suite à de nombreux passages en expansion [156].

Les CSMs issues du cartilage articulaire possèdent des capacités de différenciation chondrogéniques supérieures aux CSMs issues de la moelle osseuse [157] et du tissu adipeux [158]. McCarthy et coll ont comparé les capacités de différenciation chondrogénique en pellet de CSMs issues de cartilage et de moelle osseuse chez le cheval. Les résultats montrent que contrairement aux CSMs de moelle osseuse, les CSMs de cartilage ne dérivent pas vers un phénotype hypertrophique. En effet, il n'y a pas d'expression de collagène de type X, ni de calcification au sein des pellets [159].

Trois études référencées dans la littérature montrent une utilisation des cellules issues du cartilage pour étudier la réparation de lésions focales du cartilage. Des pellets ont été injectés à des souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficient) en site ectopique. Après deux semaines, les pellets étaient dissociés et de nombreux nodules cartilagineux ont été retrouvés

au niveau des muscles [160]. Chez le cheval, la transplantation de CSMs du cartilage articulaire dans des lésions profondes à entraîner la formation d'un tissu de réparation et une diminution de la formation d'ostéophytes [2]. Enfin, chez la chèvre, la transplantation de pellet constitué de CSMs-CA a permis d'obtenir un tissu de réparation satisfaisant avec une quantité importante de collagène de type II [156].

e. *Les CSMs issues de la membrane synoviale*

La présence de CSMs au sein de la membrane synoviale a été mise en évidence par la production de nodules cartilagineux à l'intérieur du tissu synovial (métaplasie chondroïde) dans une pathologie bénigne appelée chondromatose synoviale [161], [162]. En 2001, De Bari et coll ont démontré que des CSMs pouvaient être isolées de la membrane synoviale humaine [103]. Comme vu précédemment, la membrane synoviale est constituée de deux types de cellules : les synoviocytes de type A (dits macrophagiques) qui assurent la fonction d'immunité innée et adaptative et de type B (dits fibroblastiques) qui produisent le liquide synovial. Les CSMs issues de la membrane synoviale semblent dériver des synoviocytes de type B [163]. En effet, les caractéristiques ultrastructurales et immunocytochimiques des CSMs MS sont semblables aux synoviocytes de type B [164].

Les CSMs-MS sont présentes dans la subsynoviale et l'intima dans les souris C57BL/6 [163]. Chez l'Homme, les CSMs MS sont localisées dans la subintima sur un prélèvement sain alors que la répartition est beaucoup plus diffuse chez un patient arthrosique [165].

Il existe deux types de CSMs issues de la membrane synoviale :

- D'une part, les CSMs dites fibreuses. Elles sont isolées à partir du tissu synovial à savoir intima, subintima et subsynoviale.
- et d'autre part, les CSMs adipeuses isolées à partir de la graisse infra-patellaire se retrouvent derrière le tendon rotulien [166], [167].

Il a été montré que le type fibreux possédait une capacité de différenciation chondrogénique supérieure [167] ainsi que de meilleures capacités de prolifération et de sécrétion de lubriline [168] au type adipeux.

Ces CSMs de la membrane synoviale sont isolées par leur capacité à se détacher sous l'action d'une protéinase lors du premier passage en culture cellulaire contrairement aux synoviocytes de type A [169]. Cependant, il coexiste différentes populations de CSMs dans la membrane synoviale [170]. Différentes études ont montré l'intérêt de trier les cellules pour augmenter la différenciation chondrogénique. L'ensemble des cellules issues de la digestion de la membrane synoviale possèdent des capacités de différenciation chondrogénique moindre que les cellules CD14(-) caractérisée par une augmentation de l'expression de collagène de type II et d'agrécan ainsi qu'une diminution de l'expression du collagène de type I [171]. Les cellules LNGFR(+) et CD90(+) présentent également une bonne différenciation chondrogénique [172]. Aucune différence concernant la différenciation chondrogénique n'a été mise en évidence entre des cellules issues de patients arthrosiques ou souffrant de polyarthrite rhumatoïde [173], [174].

En comparaison aux CSMs de la moelle osseuse, les CSMs-MS possèdent une capacité de différenciation chondrogénique supérieure [175] ainsi qu'une dérive hypertrophique moins importante [166], [176] et une augmentation du potentiel de formation de colonies [177]. Chez le rat, les CSMs-MS possèdent un taux de prolifération plus élevé que les CSMs issues de la moelle osseuse, du périoste ou de la graisse [178]. Les CSMs-MS conservent leurs

potentialités chondrogéniques pendant 4 passages [179], [180]. Plus récemment, il a été montré que ces cellules expriment des marqueurs chondrogéniques (collagène de type II, agrécane) jusqu'au 7<sup>ème</sup> passage [181]. Le potentiel de différenciation en chondrocytes des CSMs-MS est indépendant de l'âge [182], ainsi que du sexe et du stade d'arthrose du donneur [181]. *In vivo*, il a été montré que les CSMs issues de la membrane synoviale possèdent des capacités de réparation du cartilage, mais également du ménisque.

L'injection de CSMs-MS après résection du ménisque chez le porc permet la réparation de ce dernier avec un effet protecteur sur le cartilage [183]. Des résultats similaires ont également été observés chez le lapin [184], le rat [185], [186] et le miniporc [187]. Ces cellules possèdent également des capacités de réparation du cartilage chez le rat dans le cadre de défauts ostéochondraux. Dans une étude, les CSMs-MS sont transfectées avec de l'oxyde de fer afin de réaliser un guidage magnétique jusqu'au défaut cartilagineux après injection intra-articulaire [188]. La mise en suspension des CSMs-MS dans une lésion ostéochondrale a permis une adhérence rapide des cellules ainsi qu'une amélioration de la qualité du tissu de réparation chez le porc [189] et chez le lapin [190].

Le fond génétique des cellules a également été étudié chez la souris. Des CSMs-MS ont été isolées à partir de souris « superhealer » MRL/MpJ qui possèdent des capacités de cicatrisation supérieures et des souris C57BL/6 [191]. Cependant, aucune différence n'a été observée entre les deux sources cellulaires pour la réparation du cartilage. Les CSMs-MS possèdent également des capacités de réparation du cartilage *in vivo* lorsqu'elles sont associées avec un environnement tridimensionnel. Cependant, elles sont incapables de conserver leur phénotype « chondrocyte-like » induit *in vitro* en micro-masse [192] ou en gel d'agarose [193] après implantation en site ectopique chez la souris « *nude* ».

L'implantation en site articulaire dans des lésions du cartilage permet d'obtenir un tissu de réparation de bonne qualité. Différentes études ont été réalisées chez des animaux de petites et grandes tailles. Chez le lapin, différentes études ont montré les capacités de réparation de lésions ostéochondrales du tissu cartilagineux grâce à des CSMs-MS ensemencées dans divers biomatériaux comme un gel de collagène [194], un gel de fibrine [195], un gel chargé en PRP [196] et une association de collagène de type I, d'acide hyaluronique et de fibrinogène [197].

D'autres études, menées chez le porc, ont montré les effets de réparation des CSMs-MS au niveau de lésions chondrales dans un cadre allogénique. L'utilisation de constructions tissulaires générées par la différenciation des cellules et la production de matrice *in vitro* a permis de former un tissu de réparation proche d'un cartilage normal [198], [199]. Cependant, des études complémentaires ont mis en évidence que les propriétés mécaniques du tissu de réparation n'étaient pas semblables au tissu natif [200], [201]

#### f. *Les CSMs issues de la graisse infra-patellaire (GIP)*

La graisse infra-patellaire correspond à un tissu adipeux présent au contact de l'articulation. Il s'agit d'une structure extra-synoviale au contact de la membrane synoviale composée d'environ 20 cm<sup>3</sup> de tissu adipeux [202], [203]. Cependant, son rôle exact n'est pas encore connu [204]. Elle peut être facilement prélevée lors d'une arthroscopie ou d'une chirurgie du genou [205]. Comme les CSMs du tissu adipeux, les CSMs issues de la GIP sont récupérées dans la Fraction Vasculaire Stromale (FVS). Ces cellules sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD9+, CD10+, CD13+, CD29+, CD44+, CD49e+, CD59+, CD105+, CD106+

et CD166+. Ces cellules possèdent également des capacités de différenciation vers les lignées adipogénique, chondrogénique et ostéogénique [206].

En parallèle à ces travaux, il a été montré que les CSMs-GIP sont classées en deux sous-populations. D'une part, les péricytes (CD31- / CD34- / CD45- / CD146+) qui représentent environ 4% de la FVS et, d'autre part, les cellules de l'adventice (CD31- / CD34+ / CD45- / CD146-) soit environ 21 % de la FVS. Ces deux populations constituent les cellules souches péri-vasculaires et seules les cellules adhérentes de cette population constituent les CSMs issues de la graisse infra-patellaire [207]. Récemment, une hypothèse a été émise concernant le rôle des péricytes. Ces cellules constitueraient une source de cellules capable de migrer dans la membrane synoviale puis dans le liquide synovial pour atteindre le cartilage et réparer les lésions cartilagineuses [208]. Cette hypothèse est appuyée par les récents travaux de Roelofs et al. En effet, une population de cellules souches dérivées de cellules *Gdf5* de l'interzone est retrouvée dans la membrane synoviale. À la suite d'un traumatisme, ces cellules sont alors capables de proliférer, de migrer et de se différencier en chondrocytes au niveau de la zone lésée du cartilage. De plus, ces cellules *Gdf5* positives sont retrouvées au niveau des ménisques, des ligaments et du tissu adipeux [209].

g. *Les CSMs issues du liquide synovial*

Les cellules souches issues du liquide synovial ont été identifiées en 2004 [104]. Le liquide synovial peut être facilement prélevé par ponction lors d'arthrocentèses, d'arthroscopies ou de chirurgies du genou. La méthode la plus répandue pour isoler les CSMs issues du liquide synovial est un ensemencement « direct » dans les flasques de culture cellulaire [210]–[212]. Ces CSMs sont retrouvées à une fréquence d'environ 40 cellules par million de cellules mononucléées chez les patients arthrosiques vs 1 à 2 cellules par million chez les personnes souffrant de polyarthrite rhumatoïde [104]. Cependant, le nombre de CSMs dans le liquide synovial augmente chez les patients souffrant d'une arthrose précoce du genou [210], suite à une rupture ligamentaire [213] ou méniscale [214] et chez des patients atteints de lésions ostéochondrales de la cheville [211]. Plus récemment, il a été montré que le nombre de CSMs augmente proportionnellement avec la taille des lésions cartilagineuses et le stade d'arthrose [215].

L'origine tissulaire des CSMs-LS n'est pas encore élucidée, mais il est accepté que les cellules puissent dériver d'un tissu articulaire comme le cartilage ou la membrane synoviale [215]. Une récente étude confirme cette hypothèse, les cellules du liquide synovial ont un profil génétique très proche des cellules issues de la membrane synoviale [216]. Ces cellules sont notamment caractérisées par une forte expression de CD13, CD55 et CD105. Elles possèdent également des capacités de différenciation vers les trois lignées [104]. Ces cellules sont également identifiables via l'expression de Stro-1 [217].

Plusieurs études confirment leurs capacités de différenciation vers les lignées chondrogénique, ostéogénique et adipogénique chez l'Homme [214], [217], le cheval [218], [219] ou encore chez la vache [210]. Les capacités de prolifération des CSMs-LS sont plus importantes que celles des CSMs issues de la moelle osseuse [210], [212]. Ces études montrent également que ces cellules ont des capacités de différenciation vers les voies adipogénique et ostéogénique inférieures. Cependant, elles possèdent les mêmes capacités de différenciation que les CSMs-MS [220]. Elles possèdent également des propriétés immunosuppressives et immunorégulatrices [221], [222].

Ainsi, les CSMs issues du liquide synovial possèdent plusieurs avantages :

- i) Elles peuvent être facilement récupérées par ponction du liquide synovial
- ii) Cette source cellulaire peut être utilisée de façon autologue
- iii) Ces cellules d'origine articulaire sont déjà dans les conditions physiologiques et subissent les contraintes environnementales de l'articulation qui agit comme un pré-conditionnement des cellules (hypoxie, contraintes mécaniques)
- iv) Elles possèdent des capacités immuno-régulatrices et immunosuppressives.

Une seule étude porte sur l'injection intra-articulaire de CSMs-LS chez l'animal. Ce travail récent montre un effet bénéfique d'une injection de CSM-LS dans un modèle de lésion focale chez le lapin. 5 millions de cellules ont été injectées à 7, 14, 21 et 28 jours après la chirurgie ce qui a permis d'obtenir un tissu de réparation « cartilage like » en comparaison à la condition témoin [223].

Peu d'études ont été menées sur l'utilisation de CSMs issues du liquide synovial en combinaison à un biomatériau support chez l'animal. Chez le porc, un hydrogel enrichi en CSMs-LS et en PRP (Platelet Rich Plasma) possède un meilleur potentiel de réparation de lésions ostéochondrales qu'un hydrogel chargé en PRP seul [224]. Chez le rat, l'utilisation de CSMs-LS issues de cheval ensemencées dans de l'agarose permet la réparation du cartilage lésé avec une importante synthèse de collagène de type II [225]. De plus, des CSMs-LS encapsulées dans un hydrogel permettent la réparation de défauts cartilagineux chez le rat après 8 semaines [226]. Enfin, dans le cadre de greffe allogénique chez le lapin, l'utilisation de CSMs-LS encapsulées dans un hydrogel à base de chitosan et d'oxyde d'éthylène permet une réparation cartilagineuse de bonne qualité en comparaison à l'hydrogel seul [227]

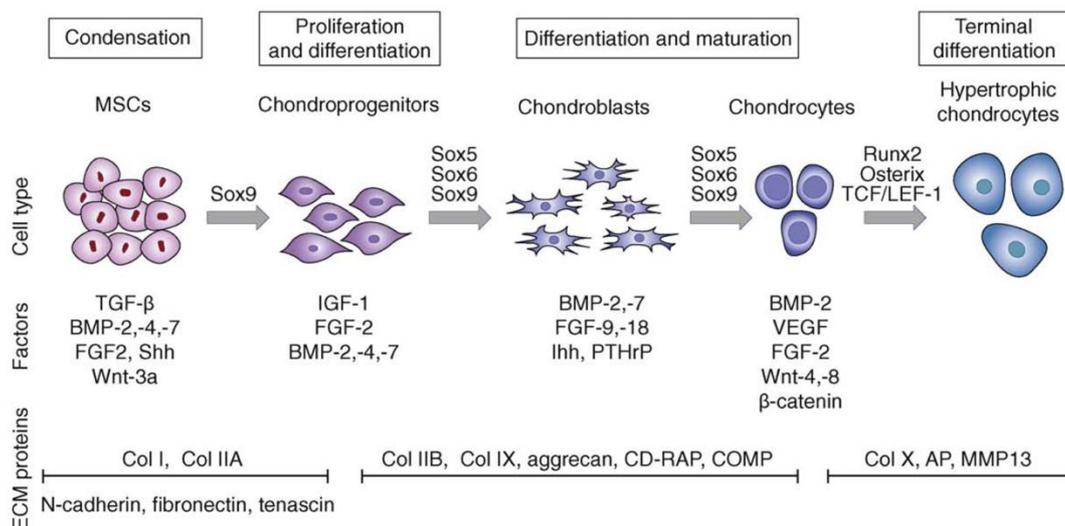
Les sources cellulaires potentielles pour l'ingénierie tissulaire sont donc multiples. Notre choix s'oriente vers les cellules souches mésenchymateuses et particulièrement les CSMs issues de la membrane synoviale et du liquide synovial. Les CSMs représentent une source privilégiée, car elles possèdent des capacités prolifératives importantes et des capacités de différenciation accrues vers la voie chondrogénique. Cette différenciation est médiée par l'action de facteurs exogènes tels que des facteurs de croissance ou des conditions environnementales particulières comme l'hypoxie. Nous allons détailler ces facteurs dans la partie suivante.

### 3.3 Choix des conditions environnementales pour la différenciation des CSMs en ingénierie du cartilage

La différenciation chondrogénique des CSMs nécessite une culture en 3 dimensions et l'action de facteur exogène. Ces facteurs exogènes peuvent être utilisés lors de l'expansion cellulaire afin de préorienter les cellules ou lors de la différenciation en culture tridimensionnelle.

#### 3.3.1 La différenciation chondrogénique des CSMs

Cette différenciation est une succession d'évènements médiée notamment par des facteurs de croissance. Après condensation des CSMs, les cellules vont commencer à se différencier. Cependant, le stade ultime de différenciation des cellules souches mésenchymateuses est le chondrocyte hypertrophique caractéristique de la zone calcifiée du cartilage. En fonction de l'étape dans cette cascade de différenciation, les cellules vont exprimer préférentiellement certains marqueurs ce qui permet d'évaluer le stade de la différenciation chondrogénique (**Figure 10**)



**Figure 10 : Processus de différenciation chondrogénique des CSMs sous l'influence de différents biofacteurs.**

La différenciation des CSMs vers la voie chondrogénique est médiée par différents facteurs comme les membres de la superfamille du TGF- $\beta$ . La différenciation en chondrocyte est constituée d'une succession d'étape de la condensation des CSMs jusqu'à la différenciation terminale en chondrocytes hypertrophiques. D'après Vinatier et al., 2009 [41]

Dans le cadre de ce travail, nous avons évalué l'expression relative de certains de ces marqueurs par analyse RT-PCRq. Les marqueurs chondrogéniques correspondent au collagène IIB (*COL2B*), l'agrécane (*ACAN*), la Cartilage Oligomeric Cartilage Matrix Protein (*COMP*) ou encore le facteur de transcription Sox9 (*SOX9*). Le collagène de type X (*COL10A1*) est un marqueur plus tardif traduisant la différenciation hypertrophique de nos cellules. L'ostéocalcine (*BGLAP*) et le facteur de transcription RunX2 (*RUNX2*) vont traduire d'une différenciation ostéogénique. Enfin, certains marqueurs tels que le collagène de type I (*COL1A1*) et le versican (*VCAM*) sont considérés comme fibrotiques.

### 3.3.2 Pré-orientation des cellules lors de l'expansion cellulaire en monocouche

Plusieurs suppléments de culture permettent la pré-orientation des cellules en monocouche comme la famille des Fibroblast Growth Factor, la proline, la dexaméthasone ou l'acide ascorbique.

#### 3.3.2.1 Les FGFs

Les FGFs font partie de la super famille des heparin binding growth factor. Ils sont essentiels au développement embryonnaire des vertébrés [228]. Ils vont être utilisés pendant les phases d'expansion cellulaire en monocouche et non pendant la différenciation chondrogénique en 3D. L'ajout de FGF durant les phases d'expansion augmente la prolifération des cellules quelle que soit l'espèce ou la source cellulaire étudiée. Le FGF a un effet mitogène sur les cellules humaines [229], porcines [230] ou murines [231], mais également sur des cellules issues du tissu adipeux [230], de la graisse infra patellaire [232], de la moelle osseuse [233] de la membrane synoviale [231] et du liquide synovial [234]

**FGF-2.** Il est également appelé basic FGF (bFGF). Il permet de maintenir le potentiel de différenciation des CSMs ostéo-médullaires. Les cellules cultivées avec du FGF-2 possèdent toujours leur capacité de différenciation après 30 doublements de population contrairement aux cultures sans FGF-2 [235]. Il induit une expansion plus rapide et une meilleure différenciation des cellules lorsqu'il est appliqué pendant les phases d'expansion [236], [237]. Ceci conduit à une augmentation de la qualité de la matrice cartilagineuse néo-synthétisée [238], [239]. Le FGF-2 augmente le contenu en glycosaminoglycanes et la taille des pellets lors de la différenciation chondrogénique et les dépôts de calcium lors d'une différenciation ostéogénique [237]. Par contre, l'ajout de FGF-2 pendant la différenciation va inhiber la chondrogenèse [237], [240].

**FGF-9 et FGF-18.** Ils permettent également une augmentation de la prolifération ainsi qu'une augmentation de la production de MEC cartilagineuse [239]. Cependant le FGF-9 induit l'hypertrophie des chondrocytes [241] et la synthèse de protéines hypertrophiques comme le collagène de type X [242]. Tandis que le FGF-18 a des effets pro-chondrogéniques *in vitro* [243, p. 18] et stimule la réparation du cartilage dans un modèle d'arthrose chez le rat [244].

#### 3.3.2.2 La proline

La proline est un acide aminé essentiel à la synthèse de collagène. Les résidus proline et hydroxyproline représentent environ 30% des acides aminés contenus dans les collagènes fibrillaires. Cet acide aminé joue un rôle important dans l'assemblage des collagènes fibrillaires. Il a été montré que l'apport en proline dans le milieu de culture permet de stimuler la synthèse protéique des cellules [245] et, notamment, augmente la synthèse de collagène [246]. Il potentialise ainsi la synthèse d'une MEC de type cartilagineuse riche en collagène.

#### 3.3.2.3 La dexaméthasone

La dexaméthasone est un glucocorticoïde de synthèse. Les effets chondrogéniques de la dexaméthasone ont été montrés sur les CSMs de moelle osseuse issues du lapin en 1998 [247]. Des résultats similaires ont été obtenus avec des CSMs-MO [248]. Dans cette étude, la

dexaméthasone permet la différenciation chondrogénique des CSMs seulement en présence de TGF- $\beta$ 1. Cependant, l'ajout de ce glucocorticoïde inhibe complètement les effets chondrogéniques de la BMP-2 sur les cellules synoviales [65], [176], [249]. Cette molécule permet la différenciation chondrogénique des cellules progénitrices du cartilage issues de la moelle osseuse et de la membrane synoviale [250]–[252]. La dexaméthasone permet de garantir l'intégrité de la matrice cartilagineuse [253], [254], elle possède des propriétés chondroprotectrices, en modulant l'activité des agrécanases [255], et anti-inflammatoires puissantes [256].

#### 3.3.2.4 L'acide ascorbique

L'acide ascorbique (ou vitamine C) possède un rôle antioxydant. C' est également un cofacteur essentiel de la prolyl-lysyl hydroxylase, enzyme qui permet la production de collagène via la synthèse de résidu hydroxyproline et hydroxylysine [257]. Lors d'une absence d'acide ascorbique, les collagènes sécrétés par les chondrocytes présentent un défaut d'hydroxylation et sécrètent moins de collagène [258].

La vitamine C permet d'augmenter la synthèse de collagène de type II par les chondrocytes [259], [260]. L'ajout d'acide ascorbique seul dans le milieu de culture est suffisant pour induire la différenciation chondrogénique de la lignée chondrocytaire ATDC5 [261]. Il a également un effet inducteur sur la synthèse de glycosaminoglycanes [262].

Sur les CSMs issues de la moelle osseuse, l'acide ascorbique augmente la prolifération et la synthèse de matrice extracellulaire sans avoir d'effet toxique pour les cellules [263], [264]. Il permet également d'induire la différenciation chondrogénique des CSMs-MS en monocouche. Il augmente significativement le dépôt de collagène de type II. Les cellules et cette matrice de collagène vont alors former un feuillet. Ce feuillet peut être détaché du support et peut constituer un modèle tridimensionnel de complexes cellules-MEC synthétisé en monocouche appelé TEC (Tissue Engineered Construct) [199], [201].

### **3.3.3 Induction de la différenciation chondrogénique des CSMs au sein du biomatériau**

#### 3.3.3.1 Les facteurs de croissance

##### a. *Les TGF- $\beta$ s*

En ingénierie tissulaire du cartilage, plusieurs facteurs de croissance ont été identifiés comme régulant la différenciation chondrogénique [265]. Les membres de la superfamille des TGF- $\beta$ s sont des régulateurs importants de la différenciation chondrogénique lors de l'embryogenèse [266], [267]. Aujourd'hui, les familles des Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ s) et des BMPs (Bone Morphogenic Protein) sont très étudiées.

La famille des TGF- $\beta$ s est composée de 5 membres (TGF- $\beta$ 1 à TGF- $\beta$ 5). Le TGF- $\beta$ 1 est connu pour stimuler l'activité synthétique des chondrocytes et agit contre les effets cataboliques induits par des médiateurs pro-inflammatoires comme l'interleukine 1 [268], [269]. Les TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 et - $\beta$ 3 permettent de stimuler la synthèse de marqueurs chondrogéniques tels que les protéoglycanes et le collagène de type II par des chondrocytes primaires [270]. Le TGF- $\beta$ 1 est connu pour induire la différenciation chondrogénique des CSMs de la moelle osseuse en

diminuant l'expression du collagène de type I et en augmentant celle du collagène de type II et de l'agrécan [271]. Le TGF- $\beta$ 2 et le TGF- $\beta$ 3 sont des inducteurs de la différenciation chondrogénique plus puissants que le TGF- $\beta$ 1. Ils permettent une synthèse plus importante de collagène de type II et un dépôt de protéoglycanes deux fois plus importants que le TGF- $\beta$ 1 par des CSMs-MO [272].

Des résultats contradictoires sont obtenus concernant l'effet des TGF- $\beta$ s sur la dérive vers un phénotype ostéogénique. D'une part, il a été montré que le TGF- $\beta$  inhibe la différenciation en chondrocyte hypertrophique [273] et d'autre part, engage les cellules vers l'hypertrophie avec une synthèse de collagène de type X [274]. Les membres de la famille des TGF- $\beta$ s permettent d'induire la différenciation chondrogénique des CSMs issues de la moelle osseuse [235], [275], [276] de la membrane synoviale [65], [176], [277]–[279] du tissu adipeux [105], [280] et des cellules souches embryonnaires [281], [282].

#### b. *Les BMPs*

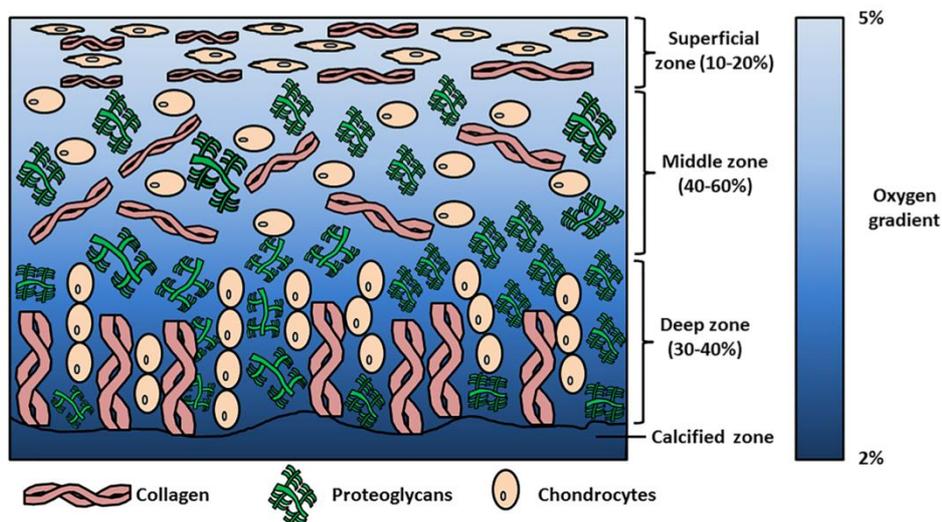
Les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) sont des glycoprotéines de la superfamille des TGF- $\beta$ . Ces protéines jouent un rôle essentiel au cours du développement embryonnaire dans les processus de chondrogenèse et d'ostéogenèse [283]. Les BMP-2, 4, 6 et 7 jouent un rôle essentiel dans la chondrogenèse *in vivo* [284]. L'ajout de BMP-2, 4, 6, 7, 9, 13 ou 15 dans le milieu de culture augmente la synthèse de collagène de type II de chondrocytes *in vitro* [285], [286]. La BMP-2 induit, comme le TGF- $\beta$ 1, la production d'une MEC de type cartilagineuse avec une augmentation du dépôt de protéoglycanes et de collagène de type II, ainsi qu'une diminution de l'expression du gène du collagène de type I pour des CSMs ostéomédullaires [276], synoviales [287] du tissu adipeux [288] et des iPS [289].

L'association de la BMP-2 avec le TGF- $\beta$ 1 ou le TGF- $\beta$ 3 permet de potentialiser l'effet chondro-inducteur du TGF- $\beta$  seul sur des CSMs de la moelle osseuse [62], [290], de la membrane synoviale [291] et du liquide synovial [292]. Cependant, l'utilisation à long terme de la BMP-2 engendre une différenciation de type ostéoblastique [293]. La BMP-4 permet de potentialiser la re-différenciation des chondrocytes en culture monocouche [294], mais oriente les cellules vers un phénotype hypertrophique lors de la différenciation de cellules pluripotentes [295]. La BMP-7 stimule la production de collagène de type II et de protéoglycanes dans des explants de cartilage [296].

#### 3.3.3.2 La teneur en oxygène

Le cartilage articulaire est un tissu avasculaire, les chondrocytes sont donc exposés à des teneurs en oxygène faibles qui varient de 5% au niveau de la zone superficielle à 2% au niveau de la zone profonde du cartilage articulaire [297]. La teneur en oxygène du milieu environnant est connue pour avoir un impact sur la prolifération, le maintien du phénotype chondrocytaire et la différenciation chondrogénique des CSMs en ingénierie tissulaire du cartilage. L'hypoxie régule le maintien du phénotype des chondrocytes par l'intermédiaire des facteurs de transcription HIFs (Hypoxia Inducible Factors) qui augmentent l'expression des gènes de la MEC cartilagineuse [298] et modulent l'activité métabolique des chondrocytes vers un métabolisme glycolytique [299]. La culture de chondrocyte en hypoxie permet une diminution de l'expression du collagène de type I et permet donc de limiter la dérive fibroblastique lors des phases d'expansion [300]. Lors des phases d'expansion, l'hypoxie stimule la prolifération

et prévient la sénescence des chondrocytes [301] et des CSMs ostéomédullaires [302]–[305]. Pour les CSMs de tissu adipeux, l'hypoxie augmente l'expression des marqueurs de pluripotence comme SOX2 ou NANOG sans altérer l'expression des marqueurs de surface CD73, CD90 et CD105 [306], [307].



**Figure 11 : Gradient de la teneur en oxygène au sein du cartilage articulaire.**  
(Pattapa et al., 2019)

En plus des effets sur la prolifération, un pré-conditionnement en hypoxie peut promouvoir la différenciation chondrogénique [308], [309] et inhiber la différenciation ostéogénique des CSMs-MO [303], [310]–[312] et des CSMs-TA [307], [313]. Une faible tension en oxygène, associée à une culture en 3D, permet d'augmenter l'expression du collagène de type II, de l'agrécane et de Sox9 [314], [315]. Ainsi, l'hypoxie s'avère une condition de culture très intéressante pour la production de substituts cartilagineux, car elle permet de se rapprocher des conditions physiologiques du cartilage articulaire.

La culture des CSMs en hypoxie lors des étapes d'expansion permet également de stimuler la différenciation chondrogénique ultérieure en 3D pour des cellules issues de la moelle osseuse caractérisée par une baisse de l'expression du collagène de type X [310], [316], du tissu adipeux [308], [317] ou de la graisse infra-patellaire [318], [319]. L'hypoxie favorise la différenciation chondrogénique en 3D des CSMs issues de la moelle osseuse [312], du tissu adipeux ou encore de la membrane synoviale [320]. Une condition hypoxique permet également de réprimer la différenciation terminale hypertrophique des CSMs de la moelle osseuse [321], du tissu adipeux [322], de la membrane synoviale [320], [323] et des CSMs issues du sang de cordon [324].

Cependant, des résultats contradictoires sont également retrouvés dans la littérature. Un pré-conditionnement lors des phases d'expansion en hypoxie n'a pas d'effet sur la différenciation de CSMs-MS de porc [231], des CSMs-TA [325] ou diminue la différenciation de CSMs-MO en comparaison à une expansion en normoxie [305]. L'impact de l'hypoxie sur la prolifération et la différenciation des CSMs peuvent donc être dépendantes de la source cellulaire.

## 4 L'utilisation des CSMs en clinique

Comme vu précédemment, l'utilisation des CSMs dans l'ingénierie cellulaire et tissulaire du cartilage est très étudiée actuellement. Les études *in vitro* puis *in vivo* sur l'animal permettent d'obtenir une grande quantité d'informations sur le potentiel de différenciation, le comportement des CSMs et sur les capacités de réparation et de cicatrisation du cartilage avant toute intervention chez l'Homme. Dans le cadre des études cliniques, les CSMs de moelle osseuse et du tissu adipeux sont les deux types cellulaires majoritairement utilisés. À l'heure actuelle, aucune étude n'a été réalisée avec des CSMs issues du liquide synovial. Dans cette partie, nous allons nous intéresser à l'utilisation des CSMs sur l'Homme en ingénierie cellulaire (injection des cellules) ou en ingénierie tissulaire (cellules + matrice).

### 4.1 Utilisation des CSMs issues de la moelle osseuse

Les principaux résultats obtenus à l'issue d'études cliniques de thérapie cellulaire par injection des cellules en site articulaire sont résumés dans le **Tableau III**.

**Tableau III : Principaux résultats cliniques obtenus avec l'utilisation de CSMs-MO dans le cadre de thérapie cellulaire chez des patients souffrant d'arthrose du genou (gonarthrose).**

Publications	Détails de l'étude	Principaux résultats
Davatchi et al., 2011 [326]	Injection de $9 \times 10^6$ CSMs-MO autologues Suivi de 12 mois	Réparation de type cartilagineuse Gain de fonction Diminution de la douleur Résultat confirmé à 5 ans (Davatchi et al., 2016 [327])
Vega et al., 2015 [328]	Comparaison de 2 groupes : HA seul & HA + CSMs-MO ( $40 \times 10^6$ )	Pour le groupe HA + cellules : Tissu de réparation de type cartilage hyalin « like » Diminution de la douleur 77% des patients satisfaits
Soler et al., 2016 [329]	Injection de $40 \times 10^6$ CSMs-MO allogéniques Suivi de 12 mois	Réparation de type cartilagineuse Baisse du temps de relaxation T2 en IRM
Orozco et al., 2013 [330]	Injection de $40 \times 10^6$ CSMs-MO autologues Suivi de 12 mois	↓ de la douleur ↑ de la qualité de vie Cicatrisation du cartilage Résultat confirmé à 2 ans (Orozco et al., 2014 [331])
Emadedin et al., 2012 [332]	Injection de $20 \times 10^6$ CSMs-MO autologues Suivi de 12 mois	↑ de l'épaisseur du cartilage ↑ de la distance de marche ↓ de l'œdème sous-chondral Resultat confirmé à 30 mois (Emadedin et al., 2015 [333])

<p><b>Al-Najar et al., 2017</b> [334]</p>	<p>Injection de 2 dose de CSMS-MO autologues à 1 mois d'intervalle 1<sup>ère</sup> dose : 30,8 x 10<sup>6</sup> 2<sup>ème</sup> dose : 30,4 x 10<sup>6</sup> Suivi de 24 mois</p>	<p>↑ de l'épaisseur du cartilage à 12 mois ↑ de la fonction physique de l'articulation ↓ de la douleur</p>
<p><b>Wong et al., 2013</b> [335]</p>	<p>Comparaison : Injection de 14 x 10<sup>6</sup> CSMS-MO + acide hyaluronique et acide hyaluronique seul 3 semaines après une ostéotomie tibiale</p>	<p>Meilleure réparation de type cartilagineuse dans le groupe HA + cellules</p>
<p><b>Lamo-Espinosa et al., 2016</b> [336]</p>	<p>Injection de CSMS-MO autologues Comparaison de deux doses de cellules + acide hyaluronique (dose faible (10 x 10<sup>6</sup>) et dose élevé (100 x 10<sup>6</sup>) Suivi de 12 mois</p>	<p>↓ de la douleur pour les 2 groupes Uniquement pour la dose 100 x 10<sup>6</sup> : ↑ de la qualité du cartilage ↑ de la fonction physique de l'articulation</p>
<p><b>Gupta et al., 2016</b> [337]</p>	<p>Comparaison de l'injection de 4 différentes doses de CSMS-MO allogéniques combinées à de l'acide hyaluronique : 25 x 10<sup>6</sup> / 50 x 10<sup>6</sup> / 75 x 10<sup>6</sup> / 150 x 10<sup>6</sup> Suivi de 12 mois</p>	<p>↑ de la douleur et gonflement de l'articulation pour les fortes doses (&gt;50 x 10<sup>6</sup>) Aucun changement observé en IRM Améliorations constatées avec la dose 25 x 10<sup>6</sup> sans différence significative avec le placebo</p>
<p><b>Bastos et al., 2018</b> [338]</p>	<p>Injection de CSMS-MO seules ou en association avec du PRP Suivi de 12 mois</p>	<p>↓ de la douleur pour les 2 groupes et de la fonction de l'articulation Pas de différence entre les deux groupes</p>

La grande majorité des études utilisant des CSMS-MO en injection intra-articulaire pour le traitement de l'arthrose (**Tableau III**) ont montré un effet bénéfique de l'utilisation des cellules ainsi que l'innocuité de la procédure. Une seule étude a montré des effets néfastes [337]. L'injection de CSMS-MO peut également être utilisée dans le cadre de la régénération du ménisque. L'injection de cellules allogéniques à faible (50x10<sup>6</sup>) ou à forte dose (150x10<sup>6</sup>) après une ménisectomie partielle a permis une régénération du ménisque dans les deux groupes en comparaison avec une injection d'acide hyaluronique seul [339].

Dans le cadre de thérapie tissulaire du cartilage, les CSMS sont associées à une matrice qui apporte un environnement tridimensionnel pour combler des lésions chondrales ou ostéocondrales. Le premier traitement de lésions ostéocondrales avec des cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse a été réalisé par Wakitani *et coll* [340]. Des CSMS-MO ont été prélevées au niveau de la crête iliaque, cultivées,ensemencées dans des gels de collagène puis transplantées dans des lésions cartilagineuses. Les résultats ont montré une bonne intégration du greffon et de bonnes capacités de réparation du cartilage. L'implantation de gel de collagène ensemencé avec des CSMS-MO au sein d'un défaut chondrale chez un sportif a permis la formation d'un tissu cartilagineux fonctionnel [341]. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant des CSMS-MO ensemencées dans un gel de collagène de type I [342], mais également en combinaison avec une glue de fibrine supplémentée en plaquettes sanguines [343] et des CSMS-MO ensemencées dans un biomatériau à base de collagène de type I [344]. De plus, l'implantation de CSMS-MO associée à une matrice commerciale à base

de collagène de type I et III (Chondro-Guide®) au niveau de défauts chondraux du cartilage de la cheville a permis une réparation de type du cartilage hyalin « like » [345].

## 4.2 Utilisation des CSMs issues du tissu adipeux

Les principaux résultats obtenus à l'issue d'études cliniques de thérapie cellulaire par injection des cellules en site articulaire sont résumés dans le **Tableau IV**.

**Tableau IV : Principaux résultats cliniques obtenus avec l'utilisation de CSMs-TA dans le cadre de thérapie cellulaire chez des patients souffrant d'arthrose du genou (gonarthrose).**

Publications	Détails de l'étude	Principaux résultats
<b>Jo et al., 2014</b> [346]	Injection de CSMs-TA autologues Comparaison de 3 doses : faible dose ( $10 \times 10^6$ ) dose moyenne ( $50 \times 10^6$ ) et forte dose ( $100 \times 10^6$ ) Suivi de 6 mois	Uniquement pour la dose $1 \times 10^8$ : Formation de cartilage de type hyalin ↑ de la fonction physique de l'articulation ↓ de la douleur Ces résultats ont été confirmés avec un suivi de 2 ans. Jo et al., 2017 [347]
<b>Pers et al., 2016</b> [348]	Injection de CSMs-TA autologues Comparaison de 3 doses : faible dose ( $2 \times 10^6$ ) dose moyenne ( $10 \times 10^6$ ) et forte dose ( $50 \times 10^6$ ) Suivi de 6 mois	Uniquement dans la dose de $2 \times 10^6$ ↑ de la fonction physique de l'articulation ↓ de la douleur
<b>Song et al., 2018</b> [349]	Injection de CSMs-TA autologue Comparaison de 3 doses : faible dose ( $10 \times 10^6$ ) dose moyenne ( $20 \times 10^6$ ) et forte dose ( $50 \times 10^6$ ). Procédure : 2 injections après 3 et 6 semaines après le début de la procédure puis une injection de $50 \times 10^6$ cellules après 48 semaines Suivi de 6 mois	↑ de la fonction physique de l'articulation ↑ du volume cartilagineux ↓ de la douleur La troisième injection permet d'augmenter l'effet des deux premières injections notamment pour les deux doses les plus faibles
<b>Nguyen et al., 2017</b> [350]	Injection de CSMs-TA autologues Comparaison d'une microfracture et d'une microfracture + cellules ( $10^7$ ) + PRP Suivi de 18 mois	Pas de différence entre les deux groupes (↓ du score Outerbridge)

Comme pour les CSMs-MO, ces différentes études ont montré la faisabilité ainsi que l'innocuité des procédures employées. Globalement l'utilisation des CSMs-TA a un effet bénéfique sur la cicatrisation/réparation du cartilage.

En ingénierie tissulaire, en comparaison avec une implantation de cellules seules, l'implantation de CSMs-TA dans une glu de fibrine permet une réparation de meilleure qualité avec un meilleur score ICRS après un suivi de 34 mois [351]. Après un suivi de deux ans, des résultats similaires ont été obtenus [352]. Dans le cadre d'une arthrose précoce, l'implantation de CSMs-TA dans un gel de fibrine permet également une réparation cartilagineuse de bonne qualité. Cependant, un âge supérieur à 60 ans et des lésions inférieures à  $6 \text{ cm}^2$  sont des

facteurs prédictifs d'échec du traitement [353]. Enfin, il n'y a pas de différence significative pour la réparation de défaut cartilagineux entre l'implantation de CSMs-TA dans une glue de fibrine en association avec une microfracture et une microfracture seule [354].

### **4.3 Utilisation des CSMs articulaires**

---

À l'heure actuelle, peu d'études sont référencées dans la littérature concernant l'utilisation des CSMs présentes dans l'articulation pour une application clinique chez l'Homme.

#### **4.3.1 CSMs issues de la graisse infra-patellaires**

Deux études ont mis en évidence une diminution de la douleur et une augmentation de la fonction du genou chez des patients souffrant d'arthrose après injection de CSMs issues de la graisse infra-patellaire en combinaison avec du PRP [355], [356].

#### **4.3.2 CSMs issues du cartilage articulaire**

En 2016, Jiang et al. ont étudié les capacités de réparation des CSMs-CA autologues chez l'Homme. Les cellules ont étéensemencées dans un biomatériau à base de collagène de type I et III puis implantées au niveau de lésions cartilagineuses (aire moyenne des lésions 8,5 cm<sup>2</sup>). Après un an, aucune ossification et aucune vascularisation n'ont été trouvées au sein des tissus de réparation. De plus, les scores cliniques révèlent une amélioration de la fonction et une diminution de la douleur [357]

#### **4.3.3 CSMs issues de la membrane synoviale**

Les CSMs-MS ont été récemment utilisées dans le cadre d'un essai clinique. Une injection intra-articulaire de CSMs autologues d'origine synoviale a permis d'obtenir après 11 mois un tissu de réparation de type « cartilage hyalin-like » dans des lésions focales au niveau du condyle fémoral évalué notamment par histologie et par un score IRM [358].

En comparaison avec des chondrocytes autologues, les CSMs-MS associées avec une membrane de collagène de type I et III ont permis d'obtenir une réparation de lésions cartilagineuses avec une amélioration observée sur les plans clinique et radiologique [359]

# Résultats obtenus

# 1 Caractérisation des CSMs issues de la Moelle Osseuse, de la Membrane Synoviale et du Liquide Synovial durant la phase d'expansion

---

## 1.1 Objectifs

---

L'objectif de mon travail a tout d'abord visé à caractériser les CSMs issues des prélèvements de membrane synoviale et de liquide synovial, en comparaison avec les CSMs issues de la moelle osseuse durant les phases d'expansion nécessaires à l'obtention d'un nombre suffisant de cellules pour produire des substituts cartilagineux par ingénierie tissulaire.

Pour cela, nous avons étudié l'expression des marqueurs de surface cellulaires spécifiques des CSMs tels que CD73, CD90 et CD105, HLA-DR, CD34 et CD45 par cytométrie en flux. La pluripotence de ces cellules a été évaluée par leurs capacités de différenciation vers les voies adipogénique, chondrogénique et ostéogénique. Enfin, nous avons étudié le profil d'expression basal des gènes d'intérêt du cartilage pendant la phase d'expansion et avant l'étape de prédifférenciation et ensemencement dans les biomatériaux afin de produire un substitut cartilagineux.

## 1.2 Matériels et Méthodes

---

### 1.2.1 Isolement et expansion des cellules souches mésenchymateuses

Les prélèvements de moelle osseuse (MO) ont été obtenus suite à la mise en place de prothèse totale de hanche. Ceux de membrane synoviale (MS) et de liquide synovial (LS) ont été obtenus suite à la mise en place de prothèse totale de genou au sein du service de Chirurgie Orthopédique, Traumatologique et Arthroscopique (COTA, CHRU Nancy, Prs D. MAINARD et L. GALOIS). Tous les patients concernés étaient des patients arthrosiques dont le score radiologique de Kellgren et Lawrence était compris entre 3 et 4 (âge moyen aux alentours de 65 ans). Les patients ont été informés au préalable par le chirurgien orthopédiste, et ont signé un formulaire de consentement éclairé, autorisant notamment des actes de recherches sur ces prélèvements. Les prélèvements sont anonymisés avant leur utilisation dans les différents travaux de recherches.

#### 1.2.1.1 Isolement des CSMs issues de la moelle osseuse

La moelle osseuse a été prélevée et placée dans une solution de PBS 1X héparinée (1250 U/mL, Sanofi, France) supplémentée en antibiotiques (100 µg/mL de streptomycine et 100 U/mL de pénicilline). Le prélèvement a été dilué dans une solution de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) puis centrifugé à 1400 tours/min pendant 5 min. Le culot a été repris dans du milieu de culture puis les cellules ont été comptées et ensemencées à raison de 5000 cellules/cm<sup>2</sup> dans des boîtes de Pétri (55 cm<sup>2</sup>) et ont été cultivées dans un incubateur en condition normoxique (20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, et 37°C). Le milieu utilisé est un milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium 1 g/L de glucose (Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Foetal (Dutscher, France), ainsi que 2 mM de Glutamine (Gibco, France), 100

$\mu\text{g/mL}$  de Streptomycine (Gibco, France), 100 U/ml de Pénicilline (Gibco, France) et 1 ng/mL de bFGF (Miltenyi).

### 1.2.1.2 Isolement des CSMs issues de la membrane synoviale

La membrane synoviale a été prélevée puis placée dans un pot stérile sec. Elle a été coupée en petits morceaux puis digérée dans une solution à 2 mg/mL de collagénase B (Roche, France) supplémentée en antibiotiques (100  $\mu\text{g/mL}$  de streptomycine et 100 U/mL de pénicilline) sous agitation pendant une nuit à 37°C. Après digestion, les cellules ont été comptées puis centrifugées à 1400 tours/min pendant 5 min. Le culot a été repris dans du milieu de culture puis ensemencées dans des boîtes de Pétri (55 cm<sup>2</sup>) à raison de 10 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules ont été placées dans un incubateur en condition normoxique (20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, et 37°C). Le milieu utilisé est un milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium 1g/l de glucose (Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Foetal, ainsi que 2 mM de Glutamine (Gibco, France), 100  $\mu\text{g/mL}$  de Streptomycine (Gibco, France), 100 U/ml de Pénicilline (Gibco, France) et 1 ng/mL de bFGF (Miltenyi, France).

### 1.2.1.3 Isolement des CSMs issues du liquide synovial

Le liquide synovial était une nouvelle source de CSMs non étudiée au laboratoire. Dans un premier temps, nous avons pu constater que les prélèvements contenaient un nombre très limité de cellules avec une grande variabilité entre les patients. Le nombre de cellules contenu dans un prélèvement est dépendant du volume de liquide synovial récupéré. Ainsi, différentes techniques de mise en culture ont été évaluées afin d'optimiser cet isolement cellulaire et surtout de le rendre reproductible entre les patients.

- Dans un premier temps, nous avons digéré les prélèvements avec de la collagénase B (2mg/mL, Roche, France) ou avec de la hyaluronidase (1 mg/mL, Sigma, France) pendant 1h à 37°C sous agitation. Cependant, cette technique ne nous permettait pas d'isoler un nombre suffisant de cellules pour permettre une amplification (n=10 prélèvements).
- Nous avons également centrifugé les prélèvements à 300g. Différents temps de centrifugation ont été testés afin d'isoler les cellules du liquide synovial. Cependant, pour des temps de centrifugation, variant de 5 à 30 min, très peu, voire aucune cellule n'ont pu être isolées.
- Enfin, nous avons testé un ensemencement direct par dilution du prélèvement au 1/6<sup>ème</sup> dans des boîtes de pétri « Cell+ suregrip » (Sarstedt, France). En comparaison aux techniques de digestion enzymatique et de centrifugation sur le même patient (n=5), cette technique a permis d'isoler un nombre suffisant de cellules avec une confluence atteinte après 10 jours de culture.

À l'issue des résultats, les CSMs du liquide synovial ont été isolées par dilution directe du prélèvement au 1/6 dans du milieu de culture et par leur propriété d'adhésion au plastique. Le milieu de culture était changé 24h après l'ensemencement afin d'éliminer les éléments qui n'ont pas adhéré.

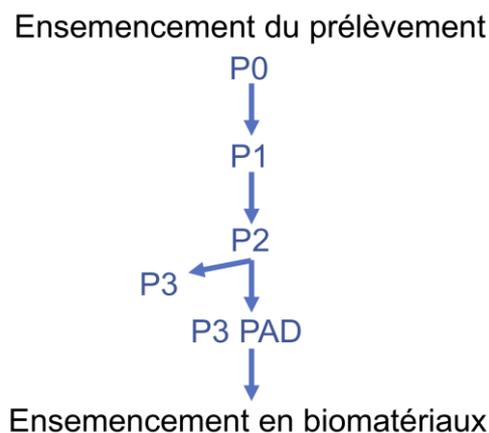
#### 1.2.1.4 Expansion des CSMs issues de MO, MS, et LS

L'expansion des trois types de CSMs a été réalisée dans les mêmes conditions. Les CSMs-MO, -MS, -LS sont cultivées dans un incubateur en condition normoxique (teneur en oxygène de 21%, à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>). Lorsque les cellules ont atteint environ 80% de confluence, elles ont été lavées au PBS 1X puis 2 mL de trypsine-EDTA (0,05%, Gibco, France) ont été ajoutés dans les boîtes. Après une incubation de 5 à 7 min à 37 °C, l'ajout de milieu complet a permis de neutraliser l'action de la trypsine. La suspension cellulaire obtenue a été centrifugée à 1400 tours/min pendant 5 min puis le culot a été repris dans du milieu complet pour être réensemencé dans de nouvelles boîtes (amplification).

Le milieu de culture utilisé pour l'expansion cellulaire de passage P0 à P2 était un milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contenant 1 g/L de glucose (Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de SVF (Dutscher, France), 2 mM de Glutamine (Gibco, France), 100 µg/mL de Streptomycine et 100 U/mL de Pénicilline (Gibco, France) et 1 ng/mL de bFGF (Miltenyi, France). Lors du dernier passage P3, un milieu de pré-différenciation chondrogénique a été utilisé. Il est composé de DMEM 4,5g/L de glucose (Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de glutamine (Gibco, France), 100 µg/mL, de streptomycine et 100 U/mL de pénicilline (Gibco, France), 110 µg/mL de pyruvate (Gibco, France), 40 µg/mL de proline (Sigma, France), 50 µg/mL de L-acide-ascorbique-2-phosphate (Sigma, France), 100 nM de dexaméthasone (Sigma, France) et 1 ng/mL de bFGF (Miltenyi France).

#### 1.2.2 Caractérisation des CSMs par cytométrie en flux

Nous avons réalisé un suivi de l'expression des marqueurs de surface cellulaire par cytométrie en flux au cours des 3 passages en expansion (dès la fin du P0 et jusqu'au P3). Pour l'ingénierie tissulaire du cartilage, un milieu de prédifférenciation composé de Proline, d'Acide ascorbique et de Dexaméthasone (PAD) est nécessaire lors du dernier passage en P3. Dans cette partie nous avons donc souhaité également comparer l'expression des marqueurs de surface entre un passage d'expansion classique P3 et un milieu de prédifférenciation P3 PAD (**Figure 12**).



**Figure 12 : Design de l'étude.**

L'expression des marqueurs de surface cellulaire a été évalué à la fin de chaque passage en monocouche durant la phase d'expansion. P0 : passage 0 ; P1 = premier passage ; P2 : deuxième passage ; P3 : troisième passage ; PAD : Proline - Acide ascorbique – Dexaméthasone.

Le marquage des cellules a été effectué sur 500.000 cellules. Lorsque les cellules ont atteint environ 80% de confluence, elles ont été trypsinées puis lavées avec du PBS 1X et incubées pendant 15 min à l'obscurité dans 100 µL de Zombie Aqua (Biolegend, USA) un marqueur de viabilité, dilué au 1000<sup>e</sup> dans du PBS. Après centrifugation à 300g pendant 5 min, les cellules ont été incubées dans une solution de blocage BSA 0,5% (Sigma Aldrich, France) pendant 5 minutes à température ambiante. Après lavage dans du PBS 1X, les cellules ont été centrifugées (300 g, 5 min) et les culots ont été re-suspendus dans une solution d'immunomarquage contenant les différents couples d'anticorps (anti CD45/anti CD34 ; anti CD73/anti HLA-DR ; anti CD90/anti CD105 ou dans 100 µL de solution de blocage pour constituer notre témoin négatif. Les couples d'anticorps utilisés sont répertoriés dans le **Tableau V**. Après 45 min d'incubation (4°C, à l'obscurité), 500 µL de PBS ont été ajoutés dans chaque tube. Une centrifugation (300 g, 5 min) a permis d'éliminer les anticorps en excès. Le culot cellulaire est finalement repris dans 300 µL de PBS puis analysé à l'aide d'un cytomètre en flux (Gallios, Beckman Coulter). Les analyses ont été effectuées grâce au logiciel Kaluza™.

**Tableau V : Les différents couples d'anticorps utilisés en cytométrie en flux.**

Tube	Marquage	Référence
1	Négatif	/
2	CD45-FITC : 20 µL CD34-PE : 20 µL	555482 (BD pharmingen) 555822 (BD pharmingen)
3	HLA-DR-FITC : 20 µL CD73-PE : 20 µL	IM0463U (Beckman Coulter) 550257 (BD pharmingen)
4	CD90-FITC : 20 µL CD105-PE : 10 µL	IM1839U (Beckman Coulter) AO7414 (Beckman Coulter)

### 1.2.3 Analyse de l'expression des gènes

#### 1.2.3.1 Extraction des ARN

Lorsque les cellules ont atteint 80% de confluence, elles ont été lavées avec 5 mL de PBS 1X pendant 5 min. Ensuite, elles ont été grattées et le surnageant a été centrifugé à 12000 tours/min pendant 1 min. Les culots secs ont ensuite été congelés à -80 °C. L'extraction a ensuite été réalisée grâce à un kit d'extraction d'ARN (RNeasy mini kit, Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. La quantité d'ARN totaux obtenue a été mesurée grâce à un Nanodrop.

La quantité d'ARN totaux obtenue après extraction a été ensuite mesurée par spectrophotométrie par mesure de la DO à 260 et à 280 nm grâce à un Nanodrop. Le rapport DO260/DO280 permet de déterminer la qualité de l'échantillon (rapport DO260/280 supérieur à 2). La longueur d'onde à 260 nm permet de détecter les acides nucléiques et la longueur d'onde à 280 nm permet de détecter les protéines. La concentration en ARN de l'échantillon est directement donnée par l'appareil selon la formule suivante :

$$[\text{ARN}] \mu\text{g/mL} = \text{DO}_{260\text{nm}} \times 40$$

#### 1.2.3.2 Transcriptase inverse

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) a été réalisée à l'aide d'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 a été préparée en utilisant 500 ng de solution d'ARN qsp 15 µL, 1 µL d'enzyme et 4 µL de tampon puis effectuée selon les recommandations du fournisseur : 5 min à 37°C ; 30 min à 42°C ; 5 min à 85°C.

### 1.2.3.3 PCR quantitative en temps réel

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode permettant une amplification génique *in vitro* en trois étapes : dénaturation, hybridation, et élongation. Grâce à l'utilisation d'un gène de référence (*RPS 29*) dont l'expression ne varie pas en fonction des conditions expérimentales, cette technique permet de faire une quantification relative des gènes d'intérêt dans les échantillons. La quantification est possible grâce à une gamme réalisée en parallèle (de  $10^{-3}$  à  $10^{-6}$  µg d'ADN/mL de chaque ADNc correspondant). La PCR quantitative a été effectuée dans un thermocycler (Light Cycler Roche, 1909339) dans des plaques 96 puits. Dans chaque puit ont été déposés 10 µL de Sybr Green (Qiagen, 204145), 2 µL de solution de RT diluée au ¼, 1 µL d'amorce sens, 1 µL d'amorce antisens et 6 µL d'eau. La spécificité de l'amplification a été vérifiée pour chaque gène par une courbe de fusion.

Sur nos différents échantillons, nous avons analysé l'expression relative des gènes codant pour :

- Des marqueurs **chondrogéniques** tels que le collagène de type II (*COL2A1*), l'agrécane (*ACAN*), le facteur de transcription Sox9 (*SOX9*) et la protéine matricielle COMP (*COMP*).
- Des marqueurs **fibrotiques** : versican (*VCAM*) et collagène de type I (*COL1A1*)
- Un marqueur **hypertrophique** : le collagène de type X (*COL10A1*).
- Des marqueurs de la **différenciation osseuse** : Ostéocalcine (*BGLAP*) et le facteur de transcription RunX2 (*RUNX2*)
- Une **protéine de référence** : RPS 29 (*RPS29*) dont l'expression ne varie pas en fonction des conditions de culture.

Les séquences des amorces pour tous ces gènes ont été obtenues à partir des informations des séquences des ARN messager humains publiées sur le site NCBI. Les séquences, les tailles des amplicons, et les températures optimales d'hybridation sont décrites en **Annexe A**. Les amorces de PCR ont été commandées chez MWG-Biotech.

## 1.2.1 Potentialités de différenciation des CSMs

### 1.2.1.1 Potentialités chondrogéniques

Après deux passages en monocouche P2, les CSMs issues de MO, MS et LS ont été trypsinées puis centrifugées (à raison de  $0,5 \times 10^6$  cellules par tube) à 300 g pendant 10 minutes dans des tubes dédiés de 15 mL afin de réaliser une culture cellulaire en 3D en culot "pellet culture", essentielle à l'obtention d'un phénotype chondrogénique. Les culots ont été cultivés dans un milieu chondrogénique composé de DMEM « High-Glucose » (4,5 g/L, Invitrogen, France) supplémenté avec 1% d'ITS+Premix (Beckton Dickinson), de TGF-β1 (10 ng/mL, Miltenyi Biotec), d'acide ascorbique-2-Phosphate (50 µg/ml, Sigma), de pyruvate de sodium (100 mM, Invitrogen), de proline (40 µg/ml, Sigma), de dexaméthasone ( $10^{-7}$ M,

Sigma), et de pénicilline-streptomycine (Gibco, France). Après 28 jours de culture, les culots ont été fixés dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 24 heures à 4°C, déshydratés et inclus en paraffine. Des sections de 5 µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome puis les lames ont été colorées au bleu Alcian pendant 2 heures puis contre-colorées à l'aide d'une solution de kernechtrot. Cette coloration au bleu Alcian permet de mettre en évidence le contenu en protéoglycanes dans la matrice extracellulaire lors de la différenciation chondrogénique.

#### 1.2.1.2 Potentialités adipogéniques

Après deux passages en monocouche P2, les CSMs de MO, MS et LS ont été trypsinées puisensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 5000 cellules par puit et cultivées dans un milieu adipogénique pendant 21 jours. Ce milieu adipogénique était composé de DMEM High-Glucose (4,5 g/L, Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Dutscher), 2 mM de Glutamax (Gibco, France), 1% pénicilline-streptomycine (Gibco), 110 µg/mL de pyruvate de sodium (Gibco, France), 1 µM de dexaméthasone (Sigma, France), 5 µg/mL d'insuline (Sigma, France), 500 µM d'isobutyl-méthyl-xanthine (Sigma, France) et 0,2 mM d'indométacine (Sigma, France). À l'issue des 21 jours, les cellules ont été rincées avec du PBS et fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes. Après un rinçage à l'eau pendant 1 h puis avec de l'isopropanol à 60% (5 min), les vésicules lipidiques caractéristiques de la différenciation adipogénique ont été mises en évidence par une coloration Red Oil 1% (Sigma, France) dans de l'isopropanol 60% pendant 10 min à température ambiante puis rincées à l'eau distillée et observées au microscope optique (DMD 108, Leica, France).

#### 1.2.1.3 Potentialités ostéogéniques

Après deux passages en monocouche P2, les CSMs de MO, MS et LS ont été trypsinées puisensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 10 000 cellules/puits et cultivées dans un milieu ostéogénique pendant 14 jours. Le milieu ostéogénique était un milieu de différenciation ostéogénique commercial « StemMACS OsteoDiff Media » (Miltenyi Biotec, France). Après 14 jours de culture, selon les recommandations du fournisseur, les cellules ont été lavées avec du PBS et fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes. Le tapis cellulaire a été coloré pendant 5 min au rouge Alizarine 2% (Sigma, France) puis rincé à l'eau distillée pendant 1 h et observé au microscope optique (DMD 108, Leica, France). Cette coloration permet de mettre en évidence les dépôts de calcium témoignant d'une différenciation ostéogénique.

## 1.3 Résultats

### 1.3.1 Caractérisation des marqueurs de surface cellulaires

#### 1.3.1.1 Immunophénotype des CSMs issues de la moelle osseuse

L'expression des différents marqueurs de surface cellulaire étudiés par cytométrie en flux sur les CSMs-MO est reportée dans le **Tableau VI**. Les résultats mettent en évidence que pour l'ensemble des patients étudiés, l'expression des marqueurs de surface caractéristiques des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) CD34 et CD45 est inférieure à 5% quel que soit le passage considéré. HLA-DR est un récepteur de surface cellulaire du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II permettant la présentation de l'antigène. L'expression de HLA-DR est très variable en fonction des patients considérés. Mais globalement, son expression augmente au cours des passages pour atteindre un maximum de 53,12% à la fin du 3<sup>e</sup> passage. En revanche, le milieu de prédifférenciation en PAD engendre une diminution de son expression avec un retour au taux d'expression initial observé à la fin du P0 (16.35 %).

Concernant les marqueurs spécifiques des CSMs (CD73, CD90 et CD105), aucune variation significative du marqueur CD73 n'est observée en fonction des passages et le pourcentage de cellules positives reste globalement supérieur à 95 %. L'expression du marqueur CD90 est restée stable au cours des passages (environ 50%) sans influence de l'utilisation du milieu de prédifférenciation PAD, mais avec de plus grandes variabilités entre les patients. Enfin, le marqueur de surface CD105 est exprimé dans une grande majorité de cellules (plus de 70 % dès le P0), mais avec de grandes variations entre les patients, mais aussi entre les passages. Dans tous les cas, à la fin du troisième passage P3, avec ou sans PAD, plus de 90 % des cellules sont positives pour le CD105.

**Tableau VI : Caractérisation de l'expression des marqueurs de surface cellulaire des CSMs issues de la moelle osseuse.**

L'immuno-phénotypage a été réalisé à la fin de chaque passage durant l'expansion cellulaire de passage 0 à passage 3. P0 : passage 0 ; P1 = premier passage ; P2 : deuxième passage ; P3 : troisième passage ; PAD : Proline - Acide ascorbique – Dexaméthasone. Les résultats sont exprimés en pourcentages de cellules positives pour le marqueur considéré  $\pm$  écart type, n=3 patients.

	P0	P1	P2	P3	P3 PAD
<b>CD45</b>	<b>1,52 <math>\pm</math> 1,97</b>	<b>0,55 <math>\pm</math> 0,72</b>	<b>0,10 <math>\pm</math> 0,04</b>	<b>0,19 <math>\pm</math> 0,22</b>	<b>0,28 <math>\pm</math> 0,05</b>
<b>CD34</b>	<b>1,10 <math>\pm</math> 1,33</b>	<b>0,36 <math>\pm</math> 0,54</b>	<b>0,02 <math>\pm</math> 0,02</b>	<b>0,10 <math>\pm</math> 0,09</b>	<b>0,61 <math>\pm</math> 0,50</b>
<b>HLA-DR</b>	<b>17,59 <math>\pm</math> 13,29</b>	<b>21,45 <math>\pm</math> 17,85</b>	<b>33,72 <math>\pm</math> 14,85</b>	<b>53,12 <math>\pm</math> 15,15</b>	<b>16,35 <math>\pm</math> 8,28</b>
<b>CD73</b>	<b>87,25 <math>\pm</math> 16,56</b>	<b>97,06 <math>\pm</math> 2,80</b>	<b>96,58 <math>\pm</math> 3,06</b>	<b>97,92 <math>\pm</math> 2,18</b>	<b>94,23 <math>\pm</math> 1,94</b>
<b>CD90</b>	<b>42,07 <math>\pm</math> 14,91</b>	<b>49,58 <math>\pm</math> 15,05</b>	<b>42,55 <math>\pm</math> 15,70</b>	<b>55,43 <math>\pm</math> 10,09</b>	<b>45,39 <math>\pm</math> 10,31</b>
<b>CD105</b>	<b>77,76 <math>\pm</math> 30,66</b>	<b>90,76 <math>\pm</math> 11,82</b>	<b>70,82 <math>\pm</math> 43,45</b>	<b>97,63 <math>\pm</math> 1,11</b>	<b>89,44 <math>\pm</math> 3,97</b>

### 1.3.1.2 Immunophénotype des CSMs issues de la membrane synoviale

L'expression des différents marqueurs de surface cellulaire étudiés sur les CSMs-MS est reportée dans le **Tableau VII**. Les résultats mettent en évidence que comme pour les CSMs MO, l'expression de CD45 est faible dès le P0 (7,77%) et reste inférieure à 5% pour l'ensemble des passages suivant, sans effet du milieu de prédifférenciation. Le marqueur de surface CD34 est fortement exprimé à la fin du P0 (34,17%), mais une baisse de son expression est observée pour les passages suivants (<5% à partir du 2<sup>e</sup> passage).

En ce qui concerne l'expression du récepteur de surface cellulaire du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II permettant la présentation de l'antigène HLA-DR, son expression est très variable en fonction des patients considérés. Globalement son expression va augmenter au cours des passages, mais comme pour les CSMs-MO, l'utilisation du milieu PAD permet de diminuer son expression. Concernant les marqueurs spécifiques des CSMs, l'expression de CD73 est élevée (>90%) à partir du 1<sup>er</sup> passage. L'expression de CD90 augmente au cours des passages, en passant de 44% en P0 à plus de 80% en fin de P3. De même, l'expression de CD105 augmente de P0 à P3 pour atteindre 97,73% en P3. Le milieu de prédifférenciation PAD n'induit de variation significative de l'expression des 3 marqueurs spécifiques des CSMs : CD73, CD90 et CD105, en comparaison à un milieu d'expansion classique P3.

**Tableau VII : Caractérisation de l'expression des marqueurs de surface cellulaire des CSMs issues de la membrane synoviale.**

L'immuno-phénotypage a été réalisé à la fin de chaque passage durant l'expansion cellulaire de passage 0 à passage 3. P0 : passage 0 ; P1 = premier passage ; P2 : deuxième passage ; P3 : troisième passage ; PAD : Proline - Acide ascorbique – Dexaméthasone. Les résultats sont exprimés en pourcentages de cellules positives pour le marqueur considéré  $\pm$  écart type, n=3 patients.

	P0	P1	P2	P3	P3 PAD
<b>CD45</b>	<b>7,77 <math>\pm</math> 9,04</b>	<b>2,40 <math>\pm</math> 3,53</b>	<b>1,16 <math>\pm</math> 1,64</b>	<b>1,26 <math>\pm</math> 1,07</b>	<b>1,15 <math>\pm</math> 0,95</b>
<b>CD34</b>	<b>34,17 <math>\pm</math> 25,67</b>	<b>8,37 <math>\pm</math> 6,90</b>	<b>1,59 <math>\pm</math> 1,41</b>	<b>1,27 <math>\pm</math> 1,14</b>	<b>1,05 <math>\pm</math> 0,84</b>
<b>HLA-DR</b>	<b>7,83 <math>\pm</math> 8,24</b>	<b>8,87 <math>\pm</math> 10,57</b>	<b>13,58 <math>\pm</math> 22,25</b>	<b>28,31 <math>\pm</math> 39,04</b>	<b>10,33 <math>\pm</math> 14,67</b>
<b>CD73</b>	<b>89,80 <math>\pm</math> 3,81</b>	<b>92,85 <math>\pm</math> 6,44</b>	<b>96,80 <math>\pm</math> 1,94</b>	<b>98,28 <math>\pm</math> 1,27</b>	<b>83,18 <math>\pm</math> 23,37</b>
<b>CD90</b>	<b>44 <math>\pm</math> 19,27</b>	<b>57,34 <math>\pm</math> 22,14</b>	<b>75,35 <math>\pm</math> 10,44</b>	<b>82,60 <math>\pm</math> 18,61</b>	<b>64,65 <math>\pm</math> 15,89</b>
<b>CD105</b>	<b>75,16 <math>\pm</math> 22,91</b>	<b>90,30 <math>\pm</math> 11,22</b>	<b>93,11 <math>\pm</math> 6,53</b>	<b>97,73 <math>\pm</math> 1,57</b>	<b>81,09 <math>\pm</math> 23,39</b>

### 1.3.1.3 Immunophénotype des CSMs issues du liquide synovial

L'expression des différents marqueurs de surface cellulaire étudiés sur les CSMs-LS est rapportée dans le **Tableau VIII**. L'expression des marqueurs de surface caractéristique des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) CD34 et CD45 va diminuer au cours des passages et atteindre moins de 5% en P3 PAD. En ce qui concerne le récepteur de surface cellulaire du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe, HLA-DR, son expression est très variable à la fin du passage 0 (P0), en fonction des patients considérés. Mais d'un point de vue général, son expression diminue au cours des passages pour atteindre environ 5% à la fin du 3<sup>e</sup> passage.

Concernant les marqueurs spécifiques des CSMs, l'expression de CD73 reste variable à P0 avec une moyenne de 65,02%, mais s'homogénéise à partir du premier passage pour atteindre plus de 90 % de cellules positives. L'expression de CD90 très variable en fonction des patients. Son expression va augmenter de 41,51% à P0 jusqu'à atteindre 83,11% en P3. En comparaison au milieu d'expansion, l'ajout de PAD induit une légère diminution de l'expression. Enfin, l'expression de CD105 est stable entre tous les passages.

**Tableau VIII : Caractérisation de l'expression des marqueurs de surface cellulaire des CSMs issues du liquide synovial.**

L'immuno-phénotypage a été réalisé à la fin de chaque passage durant l'expansion cellulaire de passage 0 à passage 3. P0 : passage 0 ; P1 = premier passage ; P2 : deuxième passage ; P3 : troisième passage ; PAD : Proline - Acide ascorbique – Dexaméthasone. Les résultats sont exprimés en pourcentages de cellules positives pour le marqueur considéré  $\pm$  écart type, n=3 patients.

	P0	P1	P2	P3	P3 PAD
<b>CD45</b>	<b>34,29 <math>\pm</math> 14,36</b>	<b>10,89 <math>\pm</math> 9,33</b>	<b>9,45 <math>\pm</math> 3,79</b>	<b>6,82 <math>\pm</math> 3,36</b>	<b>3,18 <math>\pm</math> 2,05</b>
<b>CD34</b>	<b>12,82 <math>\pm</math> 11,22</b>	<b>10,14 <math>\pm</math> 8,79</b>	<b>3,89 <math>\pm</math> 2,51</b>	<b>5,40 <math>\pm</math> 2,56</b>	<b>2,24 <math>\pm</math> 1,60</b>
<b>HLA-DR</b>	<b>33,10 <math>\pm</math> 14,17</b>	<b>14,40 <math>\pm</math> 2,79</b>	<b>9,96 <math>\pm</math> 4,36</b>	<b>5,44 <math>\pm</math> 1,14</b>	<b>4,07 <math>\pm</math> 0,79</b>
<b>CD73</b>	<b>65,02 <math>\pm</math> 13,28</b>	<b>91,45 <math>\pm</math> 7,23</b>	<b>93,61 <math>\pm</math> 4,78</b>	<b>91,53 <math>\pm</math> 8,32</b>	<b>93,42 <math>\pm</math> 7,82</b>
<b>CD90</b>	<b>41,51 <math>\pm</math> 29,96</b>	<b>44,94 <math>\pm</math> 6,40</b>	<b>59,04 <math>\pm</math> 21,01</b>	<b>83,11 <math>\pm</math> 22,03</b>	<b>66,88 <math>\pm</math> 21,71</b>
<b>CD105</b>	<b>92,38 <math>\pm</math> 1,11</b>	<b>90,71 <math>\pm</math> 10,16</b>	<b>94,47 <math>\pm</math> 3,84</b>	<b>88,17 <math>\pm</math> 11,61</b>	<b>94,13 <math>\pm</math> 8,27</b>

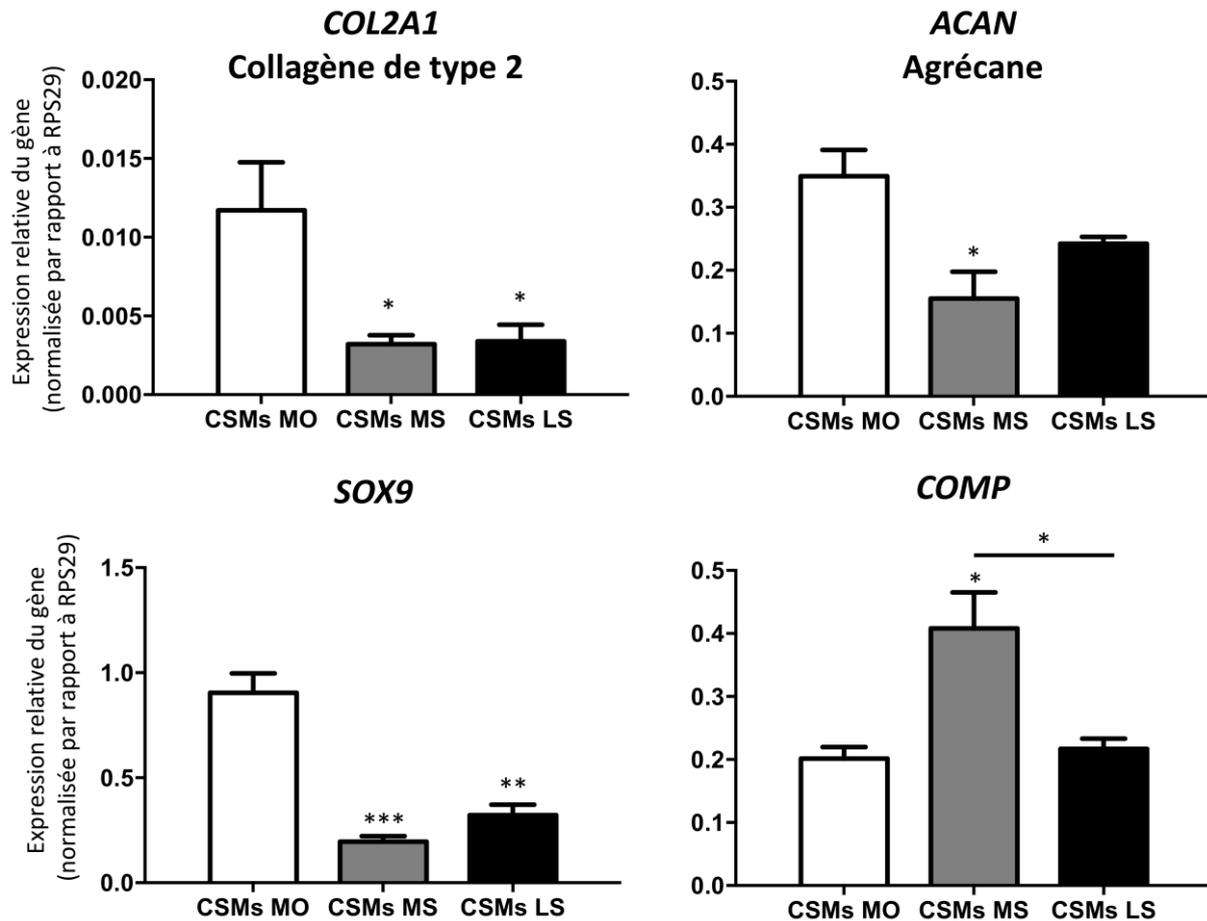
### 1.3.2 Étude de l'expression des gènes d'intérêt du cartilage

Dans cette partie, nous avons voulu étudier et comparer l'expression basale de l'ensemble de ces gènes pour les trois types de cellules (MO, MS et LS) avant la mise en biomatériaux. Un seul passage sans prédifférenciation a donc été choisi pour les trois types de cellules : la fin du passage 2. Les figures 12, 13 et 14 représentent les résultats de l'expression des gènes d'intérêt (collagène de type 1, 2, 10, agrécane, versican, COMP, ostéocalcine, Sox9 et RunX2).

D'une façon générale, les gènes étudiés sont plus exprimés par les CSMs issues de la moelle osseuse (CSMs-MO) que par les CSMs issues de la membrane synoviale (CSMs-MS) ou du liquide synovial (CSMs-LS). De plus, il est important de remarquer que l'ensemble des résultats mettent en évidence un niveau d'expression basal relativement bas pour l'ensemble des gènes étudiés excepté pour le collagène de type 1 (partie 1.3.2.2) en comparaison aux résultats obtenus lors de la différenciation chondrogénique des CSMs lors de l'ingénierie tissulaire (partie 2).

#### 1.3.2.1 Expression des marqueurs chondrogéniques

Le collagène 2 ainsi que l'agrécane sont spécifiques du cartilage hyalin. La COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) est un marqueur du métabolisme du cartilage. Enfin Sox9 est un facteur de transcription qui joue un rôle très important dans la régulation des gènes matriciels du cartilage, dont l'expression du collagène 2.



**Figure 13 : Expression génique du collagène de type 2, de l'agrécan, du facteur de transcription Sox9 et de la COMP dans les CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial à la fin du deuxième passage en monocouche.**

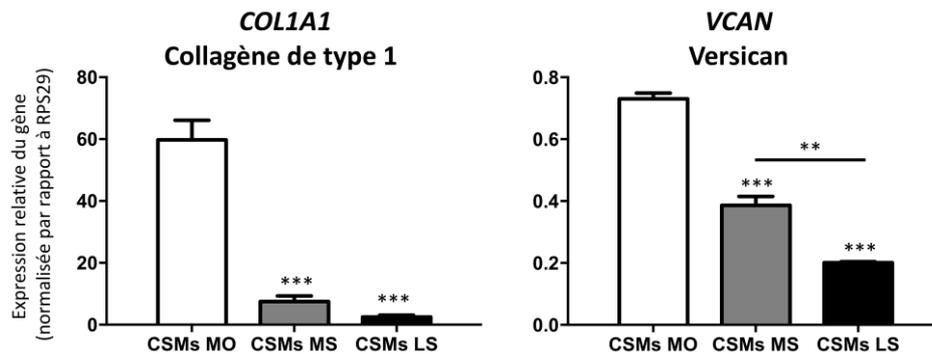
Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage RPS29. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA 1 facteur suivi d'un test a posteriori de Tukey. (\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ ). CSMs-MO : CSMs issues de la moelle osseuse ; CSMs-MS : CSMs issues de la membrane synoviale ; CSMs-LS : CSMs issues du liquide synovial.

Les résultats sont présentés sur la **Figure 13**. Pour le collagène de type 2, l'expression basale dans les CSMs-MS et -LS est 3 fois inférieure à celle des CSMs-MO. De plus, les cellules d'origine synoviale présentent le même niveau d'expression. L'expression basale de l'agrécan reste assez homogène entre les 3 types cellulaires, même si les CSMs MS l'expriment de façon légèrement plus faible (facteur x2). En ce qui concerne l'expression de la COMP, aucune variation significative n'est observée entre les CSMs MO et les CSMs LS. Par contre, dans les CSMs-MS, l'expression basale de la COMP est légèrement supérieure (facteur X2). Sox9 présente une expression plus importante dans les CSMs-MO que dans les CSMs MS et les CSMs-LS (facteur X4).

De plus, il est à noter que l'étude du ratio COL2A1/COL1A1 met en évidence une expression préférentielle du collagène de type 2 par rapport au collagène de type 1 dans les cellules issues du liquide synovial, en comparaison avec les cellules issues de la moelle osseuse ou de la membrane synoviale (données non présentées).

### 1.3.2.2 Expression des marqueurs fibrotiques

Le collagène I est présent dans le fibrocartilage et le versican donne un caractère fibreux à la structure. Les résultats sont présentés sur la **Figure 14**. Le collagène de type 1 est significativement plus exprimé par les CSMs issues de la moelle osseuse (CSMs-MO) que par les CSMs-MS (8 fois inférieure) et des CSMs-LS (24 fois inférieure). Quant au versican, il est majoritairement exprimé dans les CSMs MO. Son expression est plus modérée dans les CSMs MS (facteur x2) ainsi que dans les CSMs LS (facteur X3). Enfin, son expression est significativement plus basse dans les CSMs-LS que dans les CSMs-MS.

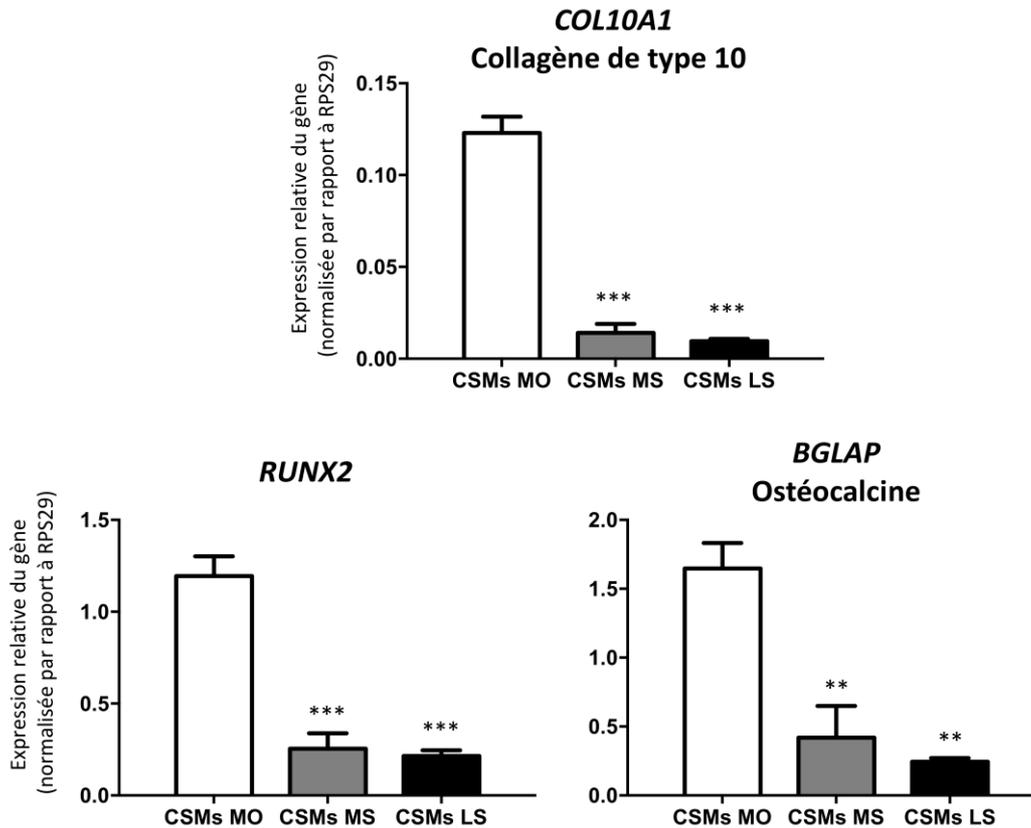


**Figure 14 : Expression génique du collagène de type 1 et du versican dans les CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial à la fin du deuxième passage en monocouche.**

Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage RPS29. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA 1 facteur suivi d'un test a posteriori de Tukey. (\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ ). CSMs-MO : CSMs issues de la moelle osseuse ; CSMs-MS : CSMs issues de la membrane synoviale ; CSMs-LS : CSMs issues du liquide synovial.

### 1.3.2.3 Expression des marqueurs hypertrophiques et ostéogéniques

Le collagène 10, lui, est exprimé par les chondrocytes hypertrophiques. Runx2 est un facteur de transcription essentiel à la différenciation osseuse et l'ostéocalcine est un marqueur osseux. Les résultats sont présentés sur la **Figure 15**. Le collagène de type 10, reste-lui aussi majoritairement exprimé dans les CSMs-MO (facteur X 8 par rapport aux CSMs-MS et X12 par rapport aux CSMs-LS). Nos résultats indiquent que RunX2 est plus exprimé par les CSMs-MO que dans les CSMs-MS et les CSMs-LS (facteur X4). L'expression du marqueur osseux, ostéocalcine, met également en évidence une expression basale supérieure dans les CSMs MO par rapport aux CSMs MS (facteur x4) et aux CSMs LS (facteur X8). Aucune différence significative n'est observée entre les cellules d'origine synoviale (CSMs-MS et CSMs-LS).

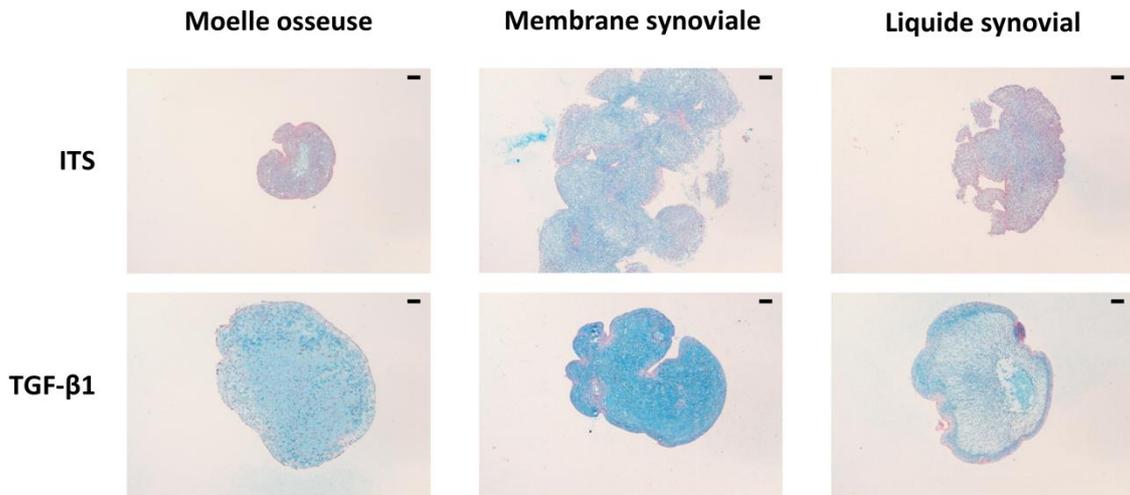


**Figure 15 : Expression génique des marqueurs hypertrophiques (Collagène de type 10) et ostéogéniques (RunX2 et ostéocalcine) dans les CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial à la fin du deuxième passage en monocouche.** Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage RPS29. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA 1 facteur suivi d'un test a posteriori de Tukey. (\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ ). CSMs-MO : CSMs issues de la moelle osseuse ; CSMs-MS : CSMs issues de la membrane synoviale ; CSMs-LS : CSMs issues du liquide synovial.

### 1.3.3 Étude de la multipotence des cellules par évaluation des capacités de différenciation vers les voies adipogénique, chondrogénique et ostéogénique

#### 1.3.3.1 Différenciation chondrogénique

À la fin du deuxième passage en expansion, les CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial ont été cultivées en pellet (système tridimensionnel essentiel à une différenciation chondrogénique) pendant 28 jours sous l'influence de TGF- $\beta$ 1 (milieu induisant une différenciation chondrogénique). Les résultats sont présentés sur la **Figure 16**. La coloration au bleu Alcian a mis en évidence une synthèse de matrice extra cellulaire riche en protéoglycanes en comparaison à la condition de culture témoin (milieu ITS permettant juste la survie des cellules). Ces résultats traduisent bien une orientation dans la voie de différenciation chondrogénique pour les trois types cellulaires.

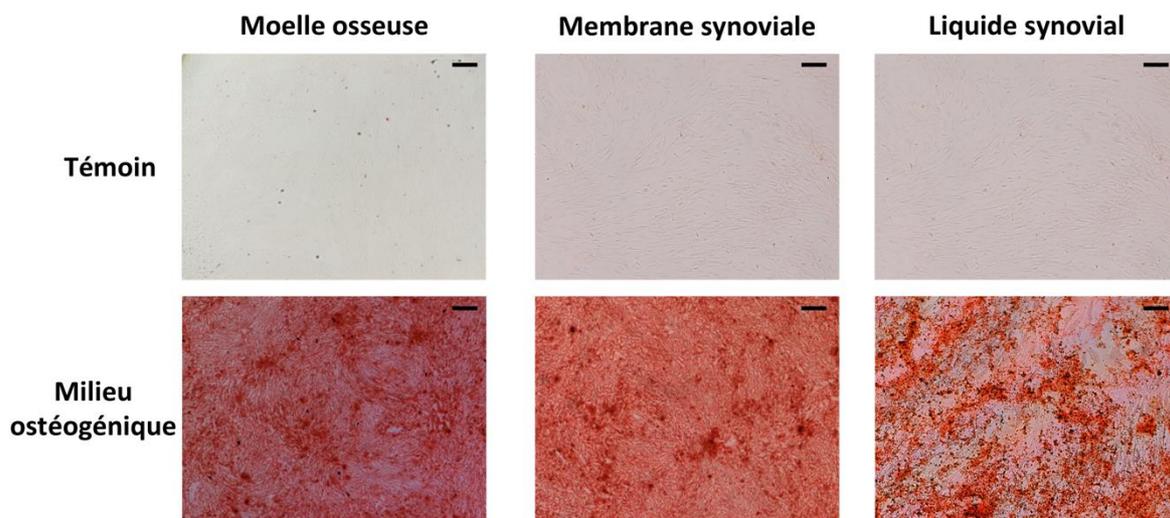


**Figure 16 : Potentialités de différenciation chondrogénique des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial.**

Les CSMs-MO, CSMs-MS et CSMs-LS ont été cultivées en pellet pendant 28 jours sous l'influence d'un milieu chondrogénique (TGF- $\beta$ 1) ou d'un milieu témoin (ITS). Le contenu en protéoglycanes a été évalué par une coloration Bleu Alcian. Les barres d'échelles représentent 400 $\mu$ m.

### 1.3.3.2 Différenciation ostéogénique

Lors du deuxième passage en expansion, les CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale ou du liquide synovial ont été mises en contact avec un milieu ostéogénique. Après 14 jours de culture, la présence de dépôts calciques a été évaluée par une coloration au rouge Alizarine. Les résultats sont présentés sur la **Figure 17**. En comparaison avec la condition de culture témoin, les résultats mettent en évidence que les trois types cellulaires possèdent des capacités de différenciation similaires avec une forte production de dépôts calciques.

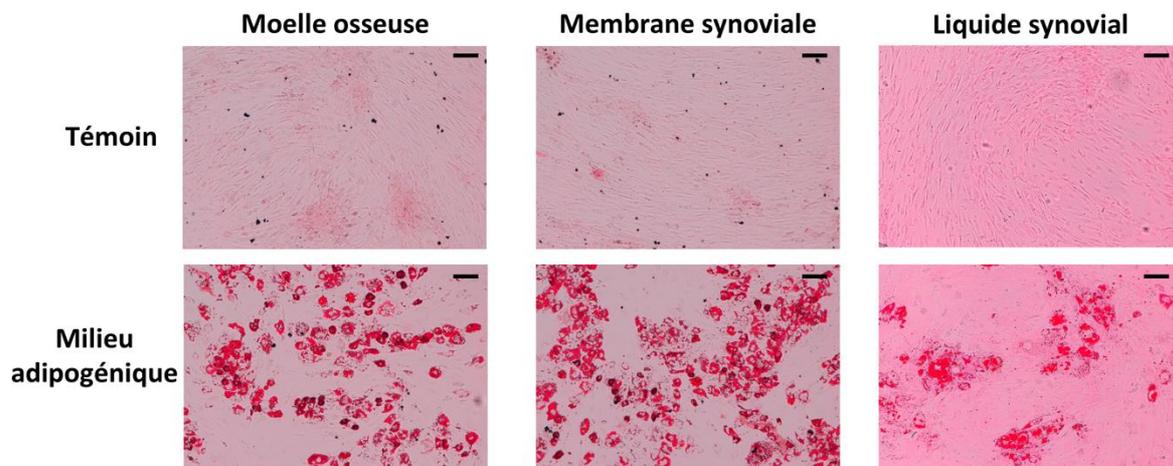


**Figure 17 : Potentialités de différenciation ostéogénique des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial.**

Les CSMs-MO, CSMs-MS et CSMs-LS ont été cultivées pendant 14 jours sous l'influence d'un milieu ostéoinducteur ou d'un milieu témoin. La présence de dépôts calciques a été évaluée par une coloration au rouge alizarine. Les barres d'échelles représentent 100 $\mu$ m.

### 1.3.3.1 Différenciation adipogénique

Les capacités de différenciation vers la voie adipogénique des CSMs de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial ont été testées à la fin du deuxième passage (P2). Après ensemencement dans des plaques 24 puits, les cellules ont été traitées par un milieu favorisant la différenciation adipogénique. Après 21 jours de culture, la présence de vésicules lipidiques, caractéristiques d'une différenciation adipogénique a été mise en évidence par une coloration Red Oil. Les résultats sont présentés sur la **Figure 18**. Ils mettent en évidence la présence de nombreuses vésicules lipidiques suggérant que les CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial possèdent des capacités de différenciation similaires vers la voie de différenciation adipogénique.



**Figure 18 : Potentiels de différenciation adipogénique des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial.**

Les CSMs-MO, CSMs-MS et CSMs-LS ont été cultivées pendant 21 jours sous l'influence d'un milieu adipogénique ou d'un milieu contrôle. La présence de vésicule lipidique a été évaluée par une coloration Red-Oil. Les barres d'échelles représentent 100µm.

## 1.4 Discussion

---

À l'heure actuelle, l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage est un sujet de recherche très documenté. Ces cellules présentent une grande plasticité cellulaire et notamment des capacités de différenciation chondrogéniques très intéressantes. En effet, l'utilisation des CSMs est envisagée dans le cadre de MACI (Matrix Associated Chondrocyte Implantation) et permettrait de palier les différents inconvénients liés à l'utilisation des chondrocytes tels que le nombre limité de cellules récupérées, la dédifférenciation des cellules lors des phases d'expansion ou encore la biopsie cartilagineuse en zone saine qui constitue un acte invasif.

La stratégie basée sur l'utilisation des CSMs en ingénierie tissulaire nécessite un grand nombre de cellules et donc une phase d'amplification importante. Le but de ce travail a été d'étudier l'expression relative des gènes d'intérêt du cartilage et d'étudier les capacités de différenciation vers les voies adipogénique, ostéogénique et chondrogénique à la fin du deuxième passage en expansion (P2). De plus, nous avons établi l'immuno-phénotype des différentes sources de cellules souches mésenchymateuses lors des phases d'amplification de P0 à P3 et de prédifférenciation (P3 PAD) en monocouche.

Ces travaux ont mis en évidence une expression relative faible de l'ensemble des gènes quel que soit le type cellulaire considéré, une expression des marqueurs de surface variable et des capacités de différenciation vers les 3 voies mésodermiques. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'immuno-phénotype des cellules basé sur les critères définis par l'ISCT [110] à savoir l'étude de l'expression de HLA-DR, CD34, CD45, CD73, CD90 et CD105.

Nos résultats ont montré que les CSMs-MO, -MS et -LS présentent une expression faible (<5%) de CD34 et CD45 après 2 passages en monocouche. CD34 est exprimé à la surface des cellules souches hématopoïétiques (CSHs) et CD45 est présent sur l'ensemble des cellules hématopoïétiques nucléées (excepté les érythrocytes et les plaquettes). Nos résultats mettent en évidence que les cellules amplifiées lors des phases d'expansion en monocouche ne sont pas des CSHs.

Pour les trois types cellulaires, l'expression de HLA-DR est variable selon le donneur et le passage étudié. Cette expression augmente pour les CSMs issues de la moelle osseuse et de la membrane synoviale au cours des passages. Ces résultats sont étonnants, car HLA-DR est un récepteur de surface du complexe majeur d'histocompatibilité généralement associé à la GvHD (Graft versus Host Disease) et va constituer une limite à l'utilisation de ces cellules pour une utilisation chez l'Homme. Il a été montré dans la littérature que les CSMs-MO issues de moelle osseuse saine n'expriment HLA-DR qu'après stimulation à l'IFN- $\gamma$  [360]. Dans une autre étude, il a été rapporté une hétérogénéité de l'expression de HLA-DR dans des CSMs-MO humaines [361]. Pour les CSMs-LS l'expression de HLA-DR diminue jusqu'à être inférieure à 5% en passage 3. Ces résultats sont en accord avec ceux de Dominici *et al.* [110].

Par ailleurs, nos résultats ont mis évidence une expression forte de CD73 pour les trois types cellulaires. L'expression de cette enzyme qui métabolise l'AMP en adénosine est décrite comme un marqueur associé à la différenciation chondrogénique et son expression diminue fortement lors de la différenciation chondrogénique des CSMs [362]. Le marqueur CD105 (Endogline) est également fortement exprimé par l'ensemble de nos cellules au cours des passages. Cette protéine transmembranaire est impliquée dans la voie de signalisation des TGF- $\beta$ s. Dans les chondrocytes, son expression est inversement proportionnelle à la capacité

de synthèse d'une matrice cartilagineuse [363]. C'est également un excellent marqueur prédictif de différenciation chondrogénique des CSMs. Par exemple, il est utilisé pour trier les cellules issues de la membrane synoviale [169].

En ce qui concerne le marqueur CD90/Thy-1, plusieurs études ont montré que ce marqueur était exprimé à la surface des CSMs et plus particulièrement à la surface des CSMs indifférenciées [362]. Par ailleurs son expression diminue une fois que les CSMs s'engagent dans la voie de différenciation chondrogénique ou ostéogénique [364]. En condition physiologique, il a été montré que les chondrocytes n'expriment pas CD90, cette expression va augmenter durant la dédifférenciation en monocouche [365] et confirment ainsi l'association de l'expression du marqueur avec un caractère indifférencié de nos cellules. Ces résultats suggèrent que l'expression variable de CD90 en fonction des patients est liée à un stade de maturation différent des cellules. Cependant, nos résultats mettent en évidence une expression de CD90 qui est positive, mais semble dépendante du donneur. Ces résultats ont déjà été observés dans des CSMs-MO [366], mais une baisse d'expression de CD90 est également associée à une baisse des capacités immunosuppressives des cellules [367].

Lors des étapes d'expansion, notre milieu est composé de 1 ng/mL de bFGF. Ce facteur de croissance est connu pour induire la prolifération des cellules [233]–[235]. Cependant l'ajout de bFGF peut également moduler l'expression des marqueurs de surface cellulaires tels que CD90 pour les CSMs-MS [229]. Cette étude a montré la capacité du FGF-2 à induire la prolifération des cellules en monocouche et à stimuler par la suite la différenciation chondrogénique des CSMs. De plus, l'utilisation de bFGF lors de l'amplification cellulaire peut également induire l'expression de HLA-DR [368]. Enfin, il a été montré que l'immunophénotype des CSMs-MO peut être altéré par les étapes de prolifération *in vitro* [369]. Cependant, dans ces différentes études, la modulation de l'expression des marqueurs de surface cellulaires est faible et n'explique pas la grande variabilité observée dans notre travail entre les différents patients. L'ensemble des cellules que nous utilisons sont issues de patients âgés souffrant d'arthrose de la hanche ou de gonarthrose. Ainsi, l'âge du donneur, les traitements médicamenteux et le microenvironnement pathologique pourraient expliquer les variations entre les différents patients. En effet, la présence de cellules souches mésenchymateuses au sein du liquide synovial est évoquée depuis les années 1960. Cependant, leur capacité de différenciation ainsi que leur caractérisation phénotypique n'ont été établies que depuis 2004 [104]. La présence de ces cellules au sein du fluide synovial est liée à des conditions pathologiques puisque le nombre de CSMs augmente avec la gravité de l'arthrose [210]. Enfin, cette hétérogénéité n'est pas retrouvée dans des populations de cellules souches mésenchymateuses néonatales que l'on peut considérer comme CSMs « jeunes » tels que les CSMs issues du sang de cordon ombilical humain [324] ou de la gelée de Wharton [114].

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'expression de certains marqueurs peut être associée aux capacités de différenciation chondrogénique des cellules. Ainsi, le tri cellulaire peut être une solution afin d'optimiser la différenciation chondrogénique des CSMs. Cependant, aucun consensus n'est défini pour identifier une population de CSMs avec des capacités de différenciation chondrogénique accrues. Concernant les CSMs issues de la membrane synoviale, il a été montré que les cellules CD105(+) présentent un niveau d'expression de collagène de type II, de Sox9 et de protéoglycanes plus élevées que les cellules CD105(-) [279]. Les cellules CD105(+) et CD166(+) présentent également une meilleure différenciation chondrogénique en pellets [370]. L'expression de CD90 peut également être considérée comme marqueur prédictif de la différenciation chondrogénique

[371]. Des résultats similaires ont été observés pour les CSMs issues du liquide synovial. Le tri via le marqueur CD90 permet d'obtenir une différenciation chondrogénique de bonne qualité [172], [372], [373]. Enfin, CD105 a déjà été utilisé pour sélectionner les CSMs-LS [169], mais il ne permet pas de prédire le potentiel chondrogénique des CSMs-MO [374]. Le PAD n'a pas eu d'effet sur l'expression des marqueurs de surface.

Dans un deuxième temps nous avons évalué l'expression relative de gènes. Cette dernière est extrêmement faible pour l'ensemble des gènes étudiés excepté pour le collagène de type I. Il est donc difficile d'établir une réelle comparaison entre les différents types cellulaires. Cependant, ce résultat met en évidence le caractère indifférencié de nos cellules. Globalement, les différents gènes sont significativement moins exprimés par les cellules synoviales. Concernant les gènes considérés comme marqueurs fibrotiques (*COL1A1*), hypertrophique (*COL10A1*) et ostéogénique (*RUNX2* et *BGLAP*), l'expression, plus faible dans les cellules synoviales, permettrait d'obtenir une stabilité phénotypique plus importante lors de la différenciation chondrogénique avec un risque de dérivation hypertrophique moins important pour ces cellules.

Enfin et conformément à la littérature, nous avons montré que les cellules issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial possèdent des capacités de différenciation vers les lignées adipogéniques, ostéogéniques et chondrogéniques [212], [217], [220].

## 1.5 Conclusion

---

Dans cette première partie, nous avons montré le caractère souche des cellules issues de la membrane synoviale et du liquide synovial en comparaison aux CSMs issues de la moelle osseuse. Concernant l'immuno-phénotype des cellules, les résultats ont montré une hétérogénéité entre les différents prélèvements, dépendante des patients considérés. Les cellules possèdent des capacités de différenciation vers les voies adipogénique, ostéogénique et chondrogénique. Enfin, l'expression relative des gènes d'intérêt du cartilage est très faible et ne permet pas de conclure sur une différence entre les types cellulaires, mais démontre bien le caractère indifférencié de nos cellules.

Ainsi, nous allons utiliser ces cellules en association avec un biomatériau à base de collagène pour la production d'un substitut cartilagineux *in vitro*. Nous étudierons l'effet de conditions environnementales (ajout de facteurs de croissance et oxymétrie) sur la différenciation chondrogénique des CSMs issues de la membrane synoviale et du liquide synovial en comparaison aux CSMs de la moelle osseuse.

## **2 Effet des conditions environnementales sur la production d'un substitut cartilagineux avec des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial**

---

### **2.1 Objectifs**

---

Les CSMs restent un type cellulaire très utilisé en ingénierie tissulaire du cartilage. Elles présentent cependant plusieurs limites liées au processus de différenciation chondrogénique, qui reste difficilement contrôlable. En effet, il est difficile de stabiliser le phénotype chondrocytaire obtenu à partir ces cellules, qui selon les conditions de culture, souvent enrichies en facteurs de croissance, s'orientent vers un phénotype hypertrophique. Ainsi, le risque majeur est à terme d'obtenir une différenciation terminale osseuse, handicap majeur pour la réparation du cartilage.

Notre objectif a donc été d'évaluer les potentialités des cellules souches mésenchymateuses issues de la membrane synoviale et du liquide synovial à produire un substitut cartilagineux fonctionnel en comparaison avec les CSMs issues de la moelle osseuse. Notre choix de biomatériaux s'est orienté vers les éponges de collagène. Cette structure tridimensionnelle est déjà utilisée au sein du laboratoire depuis 10 ans. Les conditions d'ensemencement ont été mises au point lors de travaux antérieurs dans l'équipe. De plus, ces biomatériaux sont capables de favoriser la différenciation chondrogénique des CSMs et permettent une synthèse matricielle riche et dense en protéoglycanes et en collagène de type II [375].

La proline est un acide aminé essentiel à la composition du collagène de type II ; l'acide ascorbique, un cofacteur de la prolyl-hydroxylase et la dexaméthasone (glucocorticoïde de synthèse) sont des suppléments de culture largement décrits dans la littérature pour favoriser la différenciation chondrogénique des cellules. La pré-orientation des cellules lors du dernier passage en expansion (P3) avant mise en biomatériau a été également mise au point lors de travaux antérieurs au laboratoire [376].

Ainsi, dans ce travail, nous avons comparé l'effet des conditions environnementales telles que la tension en oxygène ou l'ajout de facteurs de croissance sur la différenciation chondrogénique des CSMs issues de la membrane synoviale et du liquide synovial au sein de nos biomatériaux en comparaison avec les CSMs issues de la moelle osseuse (Gold standard). Après 28 jours de culture au sein des éponges dans les différentes conditions environnementales, nous avons étudié l'activité mitochondriale des cellules, l'expression des gènes d'intérêt du cartilage, dosé la concentration de glycosaminoglycanes synthétisés au sein des biomatériaux et enfin analysé la qualité de la matrice extracellulaire produite par des observations histologiques et immuno-histochimiques pour les trois types cellulaires.

## **2.2 Matériels et Méthodes**

---

### **2.2.1 Isolement et expansion des CSMs**

L'isolement et l'expansion des CSMs issues des trois types tissulaires (moelle osseuse, membrane synoviale et liquide synovial) restent identiques à ceux décrits dans la partie **1.2.1**. Un milieu de pré-différenciation chondrogénique enrichi en Proline, Acide ascorbique et Dexaméthasone (PAD) a été utilisé lors du dernier passage (P3) en monocouche avant l'ensemencement en biomatériau. Il est composé de milieu DMEM 4,5g/l de glucose (41965, Invitrogen) contenant 10% de SVF, 1 ng/ml de bFGF, 40 µg de proline, 50 µg/ml de L-Acide Ascorbique-2-phosphate, 100 nM de dexaméthasone, 110 µg/ml de pyruvate de sodium, 100 µg/ml de Streptomycine et 100 U/ml de Pénicilline.

### **2.2.2 Ensemencement des CSMs au sein des biomatériaux**

Les biomatériaux utilisés sont des éponges cylindriques de collagène de type I (95%) et III (5%). Elles mesurent 5 mm de diamètre sur 2 mm d'épaisseur et sont fabriquées par la société Symatèse Biomatériaux (Chaponost, France). Elles ont été placées unitairement dans une plaque 96 puits puis ensemencées par réhydratation avec 50 µL de milieu de culture contenant 500 000 cellules issues du troisième passage (P3 + PAD). Le milieu de culture utilisé était identique au milieu de pré-différenciation mais sans ajout de bFGF afin de limiter la prolifération cellulaire (milieu DMEM 4,5 g/L de glucose supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF), 2 mM de glutamine, 100 µg/mL de streptomycine et 100 U/mL de pénicilline (Gibco, France) et 110 µg/mL de pyruvate de sodium (Gibco, France) auxquels ont été ajoutés 40 µg/mL de proline (Sigma, France), 50 µg/mL de L-Acide-ascorbique-2-phosphate (Sigma, France) et 100 nM de dexaméthasone (Sigma, France)). Après 4h d'adhésion des cellules aux biomatériaux, les éponges ont été placées unitairement dans des plaques 48 puits et cultivées pendant 48 heures avec le milieu ayant servi à l'ensemencement (phase d'adaptation des cellules aux biomatériaux).

### **2.2.3 Milieux de culture utilisés pour la différenciation chondrogénique**

Après 48h de culture, six conditions de cultures ont été testées sur nos biomatériaux fonctionnalisés avec des CSMs :

- ITS 1% (ITS+premix, BD)
- ITS 1% + 10 ng/mL de TGF-β1 (Miltenyi Biotec, France)
- ITS 1% + 10 ng/mL de TGF-β3 (Miltenyi Biotec, France)
- ITS 1% + 100 ng/mL de BMP-2 (Miltenyi Biotec, France)
- ITS 1% + TGF-β1 (10 ng/mL) + BMP-2 (100 ng/mL)
- ITS 1% + TGF-β3 (10 ng/mL) + BMP-2 (100 ng/mL)

Les biomatériaux ont été cultivés pendant 28 jours avec les différentes conditions de culture sous un environnement normoxique (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C) ou hypoxique (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Le milieu de culture a été changé deux fois par semaine.

#### **2.2.4 Activité mitochondriale au sein des substituts cartilagineux**

L'activité mitochondriale des CSMs dans les éponges en fonction des conditions de culture a été mesurée grâce au MTT (Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl-tétrazolium) qui est réduit par de la succinate déshydrogénase, enzyme mitochondriale, en cristaux de bleu de formazan. Pour cela, les éponges (n=3/condition) ont été placées dans une plaque de 96 puits (1 éponge/puits). Puis 100 µL de MTT ont été ajoutés à 400 µL de milieu complet dans chaque puits. La plaque a ensuite été incubée à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> pendant 4 heures. Le surnageant a été éliminé afin de lyser les cellules avec 500 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 a été mesurée à 580 nm grâce à un spectrophotomètre (Multiskan Ex, ThermoLabsystems).

#### **2.2.5 Dosage d'ADN au sein des substituts cartilagineux**

Ce dosage s'effectue avec un intercalant de l'ADN : le Hoechst (Molecular Probes, 33258). Ce test nous a permis de déterminer la quantité de cellules vivantes dans nos éponges et de normaliser le test MTT (afin de relier une augmentation de l'activité mitochondriale à une prolifération cellulaire ou une augmentation de l'activité mitochondriale par quantité d'ADN présent dans le substitut). Le dosage a été effectué par spectrophotométrie à l'aide d'une gamme étalon préparée avec de l'ADN de thymus de veau (Sigma, D-3664). Les éponges (n=3 éponges/condition) ont été placées pendant 4 heures à 37°C dans 500 µL d'une solution de collagénase B (2mg/mL) puis elles ont été centrifugées à 13000 tours/min pendant 2 min. Les culots ont ensuite été congelés jusqu'à l'extraction. Tous les échantillons ont tout d'abord été repris avec 100 µL de tampon Hoechst (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl, pH 7,4). Ces échantillons ont ensuite été lysés par une série de congélation-décongélation dans de l'azote liquide. Enfin, 2 mL de réactif Hoechst (0,1 µg/mL dans le tampon Hoechst) ont été ajoutés dans tous les échantillons et la fluorescence ( $\lambda$  exc. = 348 nm ;  $\lambda$  em. = 456 nm) a été mesurée sur un spectrofluorimètre (F2000 Fluorescence Spectrophotometer, Hitachi).

#### **2.2.6 Analyse de l'expression des gènes au sein des substituts cartilagineux**

##### **2.2.6.1 Extraction des ARN**

Les éponges ont été placées 5 heures à 37°C dans 500 µL d'une solution de collagénase B (2mg/mL) afin de digérer la matrice et de libérer les cellules. Le surnageant a été centrifugé à 12000 tours/min pendant 1 mn. Les culots secs ont ensuite été congelés à -80 °C jusqu'à l'extraction des ARN. L'extraction a été ensuite réalisée grâce à un kit d'extraction d'ARN (RNeasy mini kit, Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. La quantité d'ARN totaux obtenue a été mesurée grâce à un Nanodrop, selon le même protocole que celui décrit dans la partie précédente (partie **1.2.3.1**).

##### **2.2.6.2 Transcriptase inverse**

L'obtention des ADN complémentaires est détaillée dans la partie **1.2.3.2**.

##### **2.2.6.3 PCR quantitative en temps réel**

Le principe d'analyse de l'expression des gènes par PCR quantitative en temps réel est décrit dans la partie **1.2.3.3**.

Sur nos différents échantillons, nous avons analysé l'expression relative des gènes codant pour :

- Des marqueurs **chondrogéniques** tels que le collagène de type II (*COL2A1*) et son isoforme B (*COL11B*), l'agrécane (*ACAN*), le facteur de transcription Sox9 (*SOX9*) et la protéine matricielle COMP (*COMP*).
- Des marqueurs **fibrotiques** : versican (*VCAM*) et collagène de type I (*COL1A1*)
- Un marqueur **hypertrophique** : le collagène de type X (*COL10A1*).
- Des marqueurs de la **différenciation osseuse** : Ostéocalcine (*BGLAP*) et le facteur de transcription RunX2 (*RUNX2*)
- Une **protéine de référence** : RPS 29 (*RPS29*) dont l'expression ne varie pas en fonction des conditions de culture.

Les séquences, les tailles des amplicons, et les températures optimales d'hybridation sont décrites en **Annexe A**.

### 2.2.7 Dosage des glycosaminoglycanes sulfatés synthétisés au sein des substituts cartilagineux

Ce dosage a été réalisé par un test colorimétrique selon la méthode de Goldberg sur les surnageants de digestion des éponges réalisés pour extraire les ARN. Pour chaque échantillon, 20 µL ont été digérés sur la nuit avec une solution de papaïne, la digestion a été stoppée par l'ajout de MonolodoAcétate (MIA). Ensuite, le volume de chaque digestion a été ajusté à 600 µl avec du tampon TRIS. Une gamme étalon de 0 à 100 µg/mL a été réalisée à partir d'une solution de chondroïtine-6-sulfate de 1 mg/mL. 20 µL de chaque échantillon ont été déposés dans chaque puits et 250 µL de DMB (1,9-Diméthylméthylène Blue) ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 525 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats ont été exprimés par la moyenne ± écart-type en µg de GAGs par éponge.

### 2.2.8 Analyse de la qualité de la matrice extracellulaire par histologie et immunohistochimie

#### 2.2.8.1 Histologie des substituts cartilagineux produits

Après 28 jours de culture, les substituts cartilagineux ont été fixés dans du paraformaldéhyde (PFA 4% dans du PBS, pH 7,4) pendant 4 heures, déshydratés et inclus en paraffine. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées au microtome (Leica RM, 2135, France). Différentes colorations ont été réalisées :

**Hématoxyline-Erythrosine-Safran (HES)** : La coloration HES est une coloration standard, qui permet de visualiser l'aspect cellulaire et la morphologie du tissu. L'hématoxyline (0,5%, 5 min) colore les noyaux en bleu foncé, l'éosine (1%, 5 min) se fixe sur les éléments acidophiles et leur confère une coloration rose (cytoplasme, fibres nerveuses, fibres élastiques et musculaires) et le safran (1%, 5 min) se lie aux collagènes et à certaines protéines, telles que la chondrine (coloration jaune). Les lames sont ensuite déshydratées et montées avec une résine synthétique (Pertex (N00811)).

**Bleu Alcian (BA)** : Le bleu Alcian permet la mise en évidence de glycosaminoglycanes (GAGs) carboxylés ou sulfatés (composés matriciels du cartilage). La coloration est réalisée par une solution de bleu Alcian (0,1 %, 2H), suivie de rinçages à l'eau courante. Un bain de 10 min dans une solution de Kernechtrot (0,5 g Kernechtrot, 25 g de sulfate d'aluminium et

500 mL d'eau distillée) est ensuite réalisé. Les échantillons sont ensuite déshydratés dans des bains d'alcool croissants (1 min alcool 95 °C, et 5 min alcool absolu) puis les lames sont montées avec la résine synthétique Pertex.

**Rouge Sirius (RS)** : Le rouge Sirius est un colorant anionique du collagène. La réaction se produit entre les groupements sulfoniques du colorant et les groupements basiques présents sur les molécules de collagène. La coloration au rouge Sirius est réalisée avec une solution saturée en acide picrique à 0,1 %. Les lames sont alors rincées dans un bain d'acide chlorhydrique 0,01N pendant 2 min puis dans une solution d'alcool à 95° puis dans de l'alcool absolu pendant 5 min. Elles sont ensuite montées avec la résine synthétique Pertex.

**Von Kossa (VK)** : le von Kossa permet de mettre en évidence la présence de dépôts de minéralisation au sein des biomatériaux. Cette coloration est basée sur une réaction de précipitation. Les ions calcium liés au phosphate sont alors remplacés par des ions d'argent. Après déparaffinage et réhydratation, les lames sont incubées 1h dans une solution de nitrate d'argent 2% et exposées à une source lumineuse de 60 Watts durant toute l'incubation. Les lames sont ensuite rincées, déshydratées dans des bains d'alcool croissants et montées avec la résine synthétique Pertex.

Les coupes sont ensuite observées au microscope (DMD 108, Leica, France) et numérisées au grossissement original x4.

#### 2.2.8.2 Immunohistochimie sur les substituts cartilagineux produits

Après déparaffinage, une barrière hydrophobe (Roti-Liquid Barrier Marker, Röth) a été appliquée de façon à former un périmètre étanche autour des coupes histologiques. Les coupes ont été réhydratées et digérées avec une solution de pepsine (0,4% (w/v)) durant 30 min à température ambiante. Suite à un lavage au PBS (1X, pH 7,4), les peroxydases endogènes ont été bloquées avec de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 3% (LSAB+système HRP, Dako, France) pendant 5 min. Les épitopes non spécifiques ont été bloqués pendant 10 min par une solution de BSA (Sérum-Albumine Bovine à 2%). Les coupes ont été alors incubées avec l'anticorps primaire dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans une solution de BSA pendant 1h à température ambiante. L'anticorps primaire utilisé était un anticorps anti-collagène de type II (Clone 6B3 LABvision, souris). Après trois lavages au PBS, le second anticorps (anticorps universel fourni par le kit LSAB+système HRP, Dako, France) a été déposé pendant 45 min à température ambiante. Ensuite, la solution de streptavidine-peroxydase (LSAB+système HRP, Dako, France) a été appliquée pendant 30 min et le chromogène DAB (DiAminoBenzidine, LSAB+système HRP, Dako, France) a été déposé sur les coupes pendant 2 min. Enfin, les coupes ont été contre-colorées pendant 30 sec dans l'hématoxyline de Harris, puis déshydratées et montées avec la résine Eukitt. Les lames ont ensuite été visualisées et numérisées sur un microscope (DMD 108, Leica, France).

#### 2.2.9 Mesures densitométriques pour évaluer le contenu en glycosaminoglycanes et en collagène de type II

Les lames ont été observées en microscopie optique (DMD 108, Leica, France). Les images en lumière transmise ont été enregistrées et traitées pour évaluer semi-quantitativement le contenu en collagène de type II et en protéoglycanes en utilisant le logiciel Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018). Les images TIFF ont été ouvertes avec Image J.

Ensuite, la sélection de la couleur a été effectuée par une méthode de seuillage en fonction de la teinte, de la saturation et de la brillance (HSB, Hue, Saturation, Brillance). La couleur a été également sélectionnée en fonction de la coloration étudiée (mode RGB, Red, Green, Blue). L'ensemble du biomatériau est délimité par une région d'intérêt (ROI, Region Of Interest) dans laquelle les zones positives pour chaque condition de culture ont été sélectionnées automatiquement en utilisant le seuil prédéfini en fonction de la coloration étudiée. Ce seuil est identique pour tous les réplicats biologiques et techniques de chaque expérience.

## 2.3 Résultats

---

### 2.3.1 Activité mitochondriale normalisée par la quantité d'ADN

L'activité mitochondriale a été déterminée par un test colorimétrique MTT normalisé par la quantité d'ADN présente au sein des éponges après 28 jours de culture dans différentes conditions. L'effet des facteurs de croissance et du taux d'oxygène sur l'activité mitochondriale normalisée est présenté en **Annexe B-C&D**. Les résultats obtenus mettent en évidence une diminution significative de l'activité mitochondriale avec l'utilisation des facteurs de croissance TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 3 seuls ou en association avec la BMP-2 ( $p < 0,001$ ), en comparaison avec la condition témoin ITS 1%. La BMP-2 seule n'induit aucune variation de cette activité. De plus, aucune différence significative n'est observée entre les éponges cultivées en normoxie et celles cultivées en hypoxie.

### 2.3.2 Différences d'expression des gènes d'intérêt du cartilage suite à 28 jours de différenciation en condition normoxique

#### 2.3.2.1 Marqueurs chondrogéniques

Les expressions relatives des gènes de la COMP, du facteur de transcription Sox9, du collagène de type 2, de l'isoforme B du collagène de type 2 et de l'agrécan au sein des éponges ensemencées avec des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial après 28 jours de culture ont été déterminées par PCR en temps réel. L'effet des facteurs de croissance sur l'expression génique est présenté sur la **Figure 19**.

Le collagène 2 (*COL2A1*) et notamment l'isoforme B (*COL2B*) sont spécifiques du cartilage hyalin. La COMP ainsi que l'agrécan (*ACAN*) sont des constituants majeurs de la matrice cartilagineuse. Sox 9 est un facteur de transcription qui joue un rôle très important dans la régulation des gènes matriciels du cartilage, dont l'expression du collagène 2, et dans la chondrogenèse.

De façon générale, l'utilisation de TGF- $\beta$ 1 et de TGF- $\beta$ 3, seuls ou en association avec la BMP-2 engendre une augmentation significative de l'expression relative des gènes considérés par rapport à la condition témoin ITS 1%. L'utilisation de la BMP-2 seule n'induit aucune variation significative.

Pour l'ensemble des gènes considérés (*COMP*, *SOX9*, *COL2A1*, *COL2B* et *ACAN*), l'expression relative est significativement plus basse pour les CSMs issues du liquide synovial, en comparaison aux CSMs-MO et CSMs-MS pour chaque combinaison de facteur de croissance étudiée (TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 3 seuls ou en association avec la BMP-2).

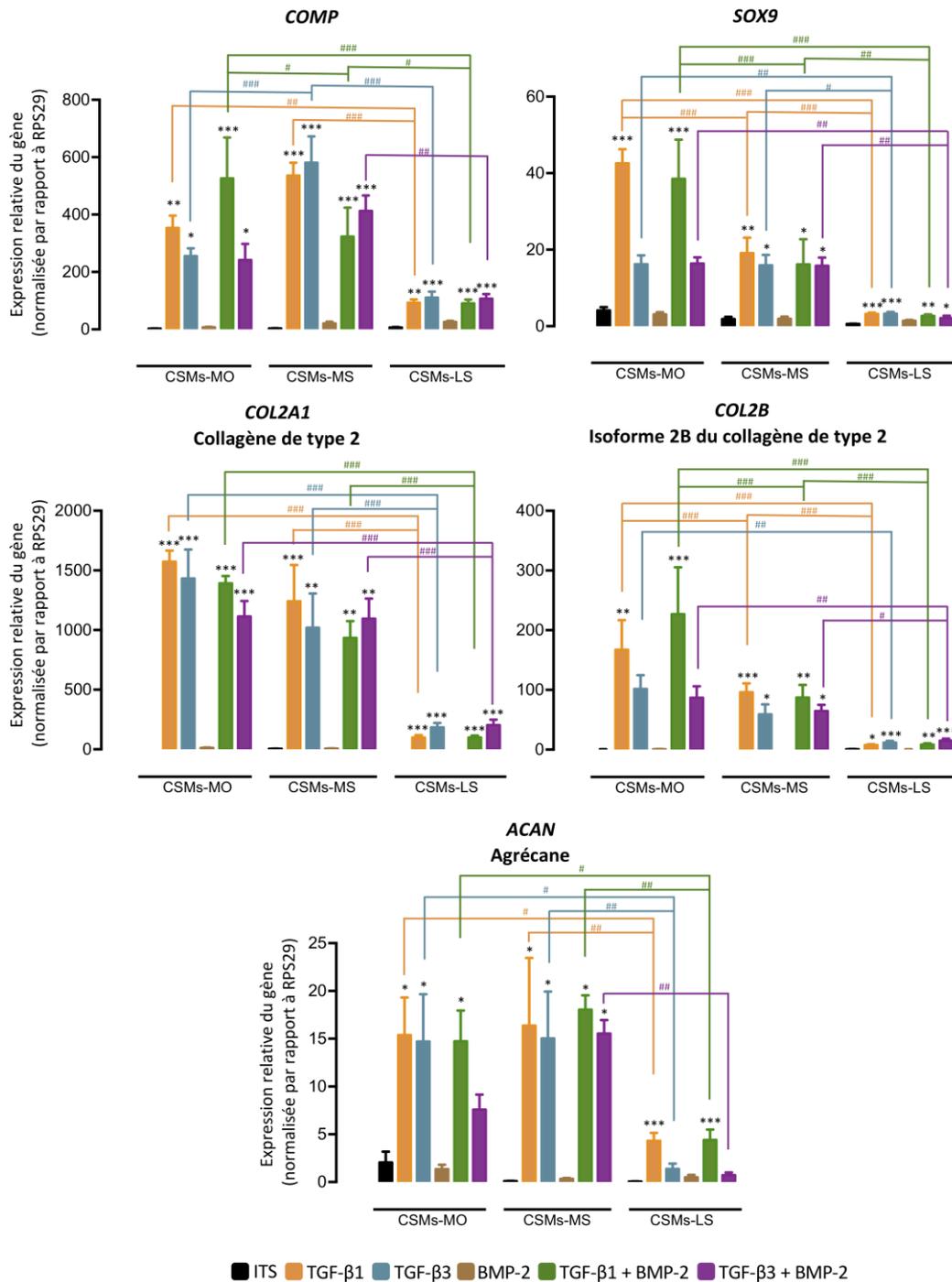
La *COMP* est significativement moins exprimée par les CSMs-LS en comparaison aux CSMs-MO et -MS (**Figure 19**). En effet, pour la condition TGF- $\beta$ 1, l'expression relative du gène de la COMP pour les CSMs-LS est 4 fois moins et 6 fois moins exprimée en comparaison aux CSMs-MO et CSMs-MS respectivement. En comparaison aux CSM-MO, les CSMs-MS expriment significativement 2,2 fois plus la COMP sous l'influence du TGF- $\beta$ 3 et 1,6 fois moins sous l'influence de la condition TGF- $\beta$ 1 + BMP-2.

Globalement, Sox9 est 5 fois moins exprimé par les CSMs-LS pour les conditions TGF- $\beta$ s, seuls ou en association avec la BMP-2, en comparaison aux CSMs-MS (**Figure 19**). En comparaison aux CSMs-MO, l'expression de SOX9 est 13 fois inférieure dans les CSMs-LS pour les conditions TGF- $\beta$ 1 +/- BMP-2. Cette diminution est plus modérée (facteur 5) pour les conditions TGF- $\beta$ 3 +/- BMP-2. Enfin, pour le TGF- $\beta$ 1 seul ou en association avec la BMP-2, les CSMs-MS expriment 2 fois moins Sox9 en comparaison aux CSMs-MO.

Les résultats obtenus pour le collagène de type 2 ont mis en évidence une expression significativement plus faible dans les CSMs-LS pour les conditions TGF- $\beta$ s seuls ou en association avec la BMP-2 en comparaison avec les CSMs de moelle osseuse et de membrane synoviale. En comparaison aux CSMs-MS, l'expression du collagène de type 2 dans les CSMs-LS est diminuée d'un facteur 12 pour le TGF- $\beta$ 1, d'un facteur 5 pour le TGF- $\beta$ 3 et son association avec la BMP-2 et d'un facteur 9 pour l'association TGF- $\beta$ 1+BMP-2. De plus, en comparaison aux CSMs-MO, l'expression au sein des biomatériaux fonctionnalisés avec des CSMs-LS est diminuée d'un facteur 15 pour le TGF- $\beta$ 1, 13 fois pour le TGF- $\beta$ 3 et environ 6 fois pour les associations TGF- $\beta$ s et BMP-2. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les expressions pour les CSMs-MO et les CSMs-MS.

Concernant l'isoforme B du collagène de type 2 (**Figure 19**), les résultats ont montré une expression du gène plus faible dans les substituts cartilagineux ensemencés avec des CSMs-LS pour les conditions TGF- $\beta$ s seuls et en association avec la BMP-2. Pour le TGF- $\beta$ 1, l'expression pour les CSMs-LS est plus faible d'un facteur 25 en comparaison aux CSMs-MO et d'un facteur 14 en comparaison aux CSMs-MS. Pour la condition TGF- $\beta$ 3, l'expression dans les CSMs-LS est 9 fois plus faible que dans les CSMs-MO. Concernant l'association TGF- $\beta$ 1 + BMP-2, l'expression relative du Col2B pour les CSMs-LS est plus faible d'un facteur 23 en comparaison aux CSMs-MO et d'un facteur 9 en comparaison aux CSMs-MS pour TGF- $\beta$ 1 + BMP-2. De plus, l'expression est significativement 6 (4) fois plus faible dans les CSMs-LS par rapport aux CSMs-MO (CSMs-MS). Enfin, en comparaison aux CSMs-MO, les CSMs-MS expriment 1,7 fois et 2,5 fois moins COL2B pour les conditions TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 1 + BMP-2, respectivement.

Les résultats de l'expression relative de l'agrécane (**Figure 19**) ont mis en évidence une expression significativement plus faible pour les CSMs-LS en comparaison aux CSMs-MO et CSMs-MS. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les CSMs-MO et les CSMs-MS. L'expression relative du gène de l'agrécane pour les CSMs-LS est significativement plus faible d'un facteur 4 pour le TGF- $\beta$ 1, 12 pour le TGF- $\beta$ 3 et 4 pour l'association TGF- $\beta$ 1 + BMP-2 en comparaison aux CSMs-MO et -MS. Enfin, en comparaison à la condition TGF- $\beta$ 3 + BMP-2 des CSMs-MS, l'expression est significativement plus faible pour les CSMs-LS.

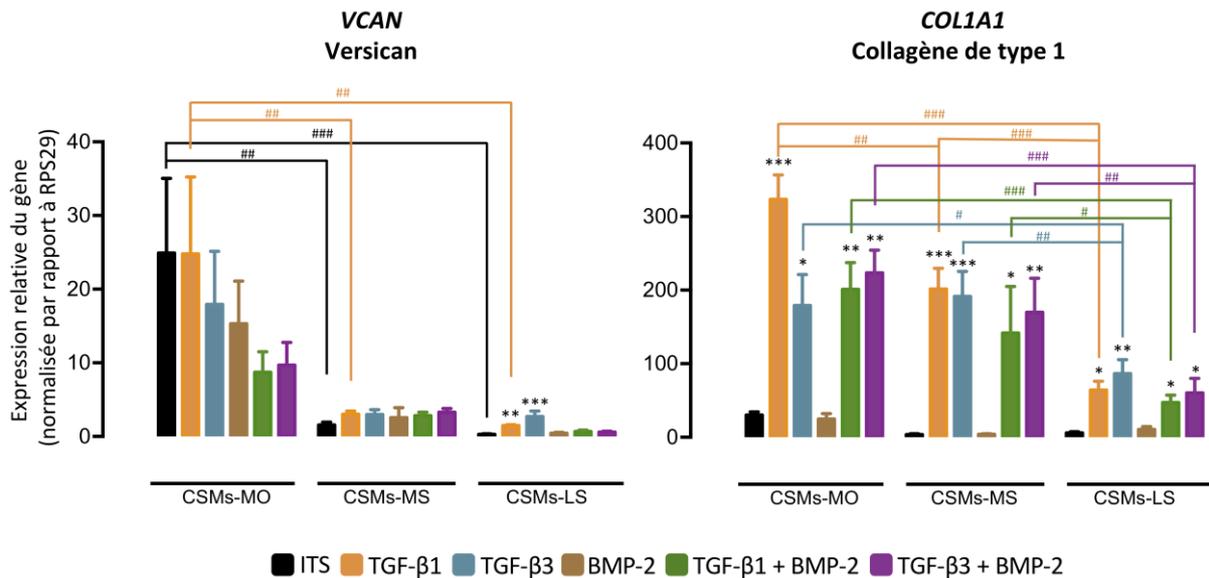


**Figure 19 : Expression des marqueurs chondrogéniques (COMP, SOX9, COL2A1, COL2B et ACAN) au sein des substituts cartilagineux fonctionnalisés avec des CSMs-MO, des CSMs-MS et des CSMs-LS après 28 jours de culture sous l'influence de facteurs de croissance en condition normoxique.**

Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage RPS29. Les analyses ont été réalisées après 28 jours de différenciation sous l'influence de différents facteurs de croissance (TGF-β1, TGF-β3 et/ou BMP-2) en normoxie. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA 1 facteur suivi d'un test a posteriori de Dunnett pour évaluer l'effet des facteurs de croissance vs la condition témoin (\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ ) puis d'une ANOVA 2 facteurs suivie d'un test a posteriori de Tukey afin d'évaluer des différences d'expression pour chaque facteur de croissance entre les différents types cellulaires considérés (# $p < 0,05$  ; ## $p < 0,01$  ; ### $p < 0,001$ ).

### 2.3.2.2 Marqueurs fibrotiques

Les expressions relatives des gènes du versican (VCAN) et du collagène de type 1 au sein des éponges ensemencées avec des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial après 28 jours de culture ont été déterminées par PCR en temps réel. L'effet des facteurs de croissance sur l'expression génique est présenté sur la **Figure 20**. Le collagène 1 est présent dans le fibrocartilage alors que le versican confère un caractère fibreux à la structure.



**Figure 20 : Expression des marqueurs fibrotiques (VCAN et COL1A1) au sein des substituts cartilagineux fonctionnalisés avec des CSMs-MO, des CSMs-MS et des CSMs-LS après 28 jours de culture sous l'influence de facteurs de croissance en condition normoxique.**

Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage RPS29. Les analyses ont été réalisées après 28 jours de différenciation sous l'influence de différents facteurs de croissance (TGF-β1, TGF-β3 et/ou BMP-2) en normoxie. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA 1 facteur suivi d'un test a posteriori de Dunnett pour évaluer l'effet des facteurs de croissance vs la condition témoin (\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ ) puis d'une ANOVA 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Tukey afin d'évaluer des différences d'expression pour chaque facteur de croissance entre les différents types cellulaires considérés (# $p < 0,05$  ; ## $p < 0,01$  ; ### $p < 0,001$ ).

Pour le versican (**Figure 20**), peu de variations significatives sont observées. Pour les CSMs-MO et -MS, les facteurs de croissance seuls ou en association n'induisent aucune variation significative de l'expression relative du gène. Pour les CSMs-LS, les conditions TGF-β1 et TGF-β3 induisent une augmentation significative. En comparaison aux CSMs issues de la moelle osseuse, les résultats mettent en évidence une expression significativement plus faible chez les CSMs-MS et -LS pour les conditions ITS et TGF-β1.

Concernant le collagène de type 1, les résultats ont montré un profil similaire entre les trois types cellulaires. En effet, l'utilisation de TGF-β1 et de TGF-β3 seuls ou en association avec la BMP-2 engendre une augmentation significative de l'expression relative des gènes considérés par rapport à la condition témoin ITS 1%. L'utilisation de la BMP-2 seule n'induit aucune variation significative. L'induction de l'expression relative du collagène de type 1 par

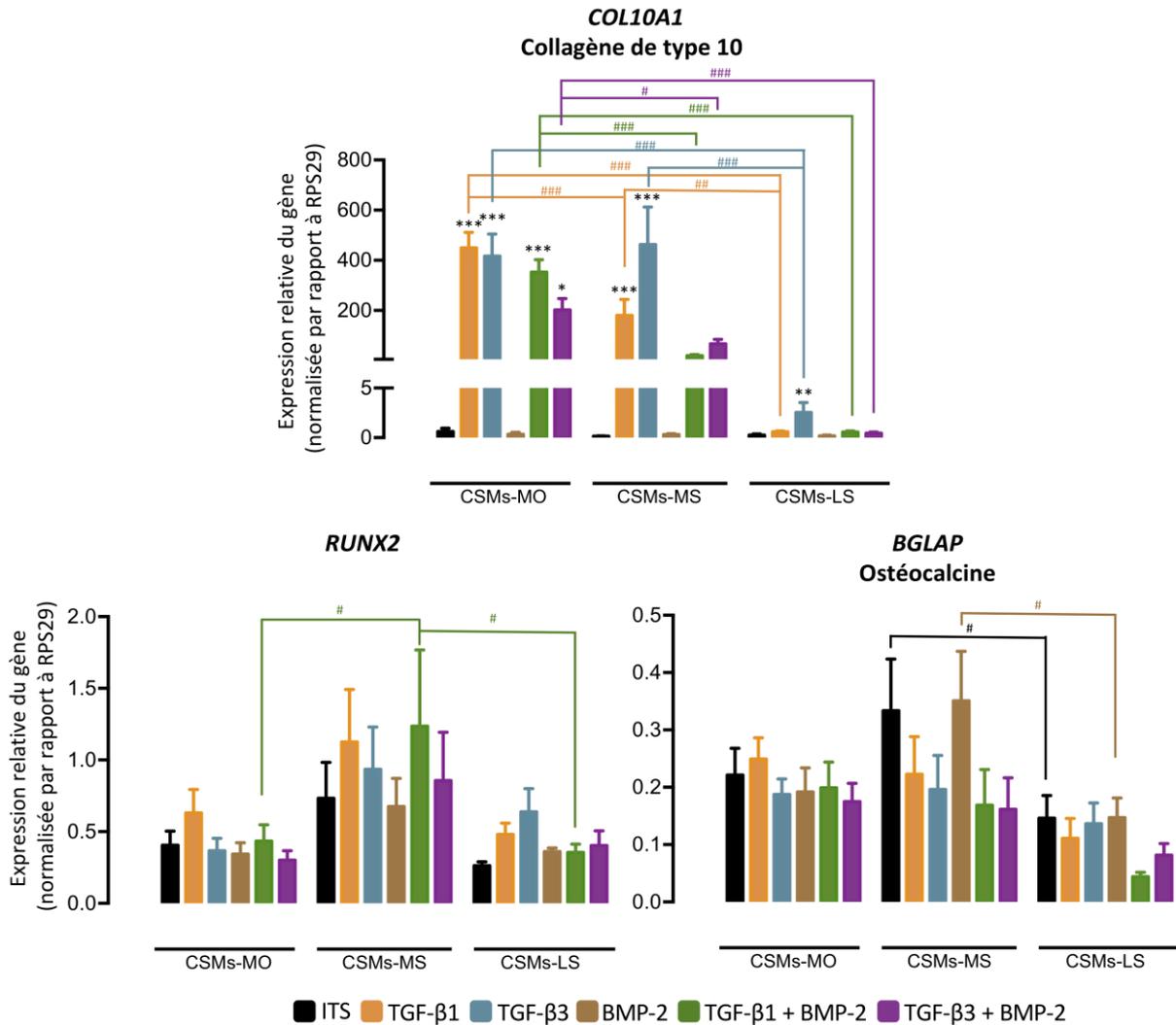
Le TGF- $\beta$ 1 est significativement plus faible dans les CSMs-MS par rapport aux CSMs-MO. Cependant, il n'y a pas d'autres différences significatives entre les CSMs-MO et -MS. L'expression relative du collagène de type 1 est significativement plus basse pour les CSMs issues du liquide synovial, en comparaison aux CSMs-MO et CSMs-MS pour chaque combinaison de facteurs de croissance, excepté pour la BMP-2 seule.

### 2.3.2.3 Marqueurs hypertrophiques et ostéogéniques

Les expressions relatives des gènes du collagène de type 10 (*COL10A1*) ainsi que de RunX2 (*RUNX2*) et de l'ostéocalcine (*BGLAP*) au sein des épongesensemencées avec des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial après 28 jours de culture ont été déterminées par PCR en temps réel. L'effet des facteurs de croissance sur l'expression génique est présenté sur la **Figure 21**. Le collagène 10 est un marqueur d'hypertrophie, il est exprimé par les chondrocytes hypertrophiques. Runx2 est un facteur de transcription essentiel à la différenciation osseuse et l'ostéocalcine est un marqueur osseux. D'une façon générale, le collagène de type 10 est beaucoup moins exprimé par les CSMs issues du liquide synovial (**Figure 21**). Pour les CSMs issues de la moelle osseuse, les TGF- $\beta$ s seuls ou en association avec la BMP-2 induisent une forte augmentation significative en comparaison à la condition témoin ITS. En ce qui concerne les CSMs-MS, seules les conditions TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 3 induisent une augmentation significative de l'expression. Enfin, pour les CSMs-LS, l'expression est faible pour l'ensemble des conditions de culture. Seul le TGF- $\beta$ 3 induit une augmentation significative de l'expression du gène en comparaison à la condition témoin.

En comparaison aux CSMs-MO, l'expression de *COL10A1* au sein des biomatériaux fonctionnalisés avec des CSMs-LS est diminuée d'un facteur 750 pour le TGF- $\beta$ 1, 165 fois pour le TGF- $\beta$ 3, 706 fois pour l'association TGF- $\beta$ 1+BMP-2 et 505 fois pour le TGF- $\beta$ 3+BMP-2. En comparaison aux CSMs-MS, l'expression du collagène de type 10 est diminuée d'un facteur 300 pour le TGF- $\beta$ 1 et d'un facteur 185 pour le TGF- $\beta$ 3. Enfin, en comparaison aux CSMs-MO, l'expression dans les substituts cartilagineux à base de CSMs-LS est plus faible d'un facteur 3 pour le TGF- $\beta$ 1 ainsi que pour son association avec la BMP-2 et d'un facteur 3 pour la combinaison TGF- $\beta$ 3+BMP-2.

Le facteur de transcription RunX2 est exprimé faiblement quel que soit le type cellulaire considéré. Pour chaque type cellulaire, aucune différence significative n'est observée entre les différentes conditions de culture. Cependant, et malgré des taux d'expression très faibles, l'expression relative du gène pour l'association TGF- $\beta$ 1 + BMP-2 est significativement plus élevée pour les CSMs-MS en comparaison aux CSMs-MO et CSMs-LS. Un profil très similaire est observé pour l'ostéocalcine (**Figure 21**). Elle est exprimée très faiblement pour les 3 types cellulaires étudiés sans différence significative entre les différentes conditions de culture. Cependant, les expressions pour les conditions ITS 1% et BMP-2 seule sont significativement plus élevée pour les CSMs-MS par rapport aux CSMs-LS.

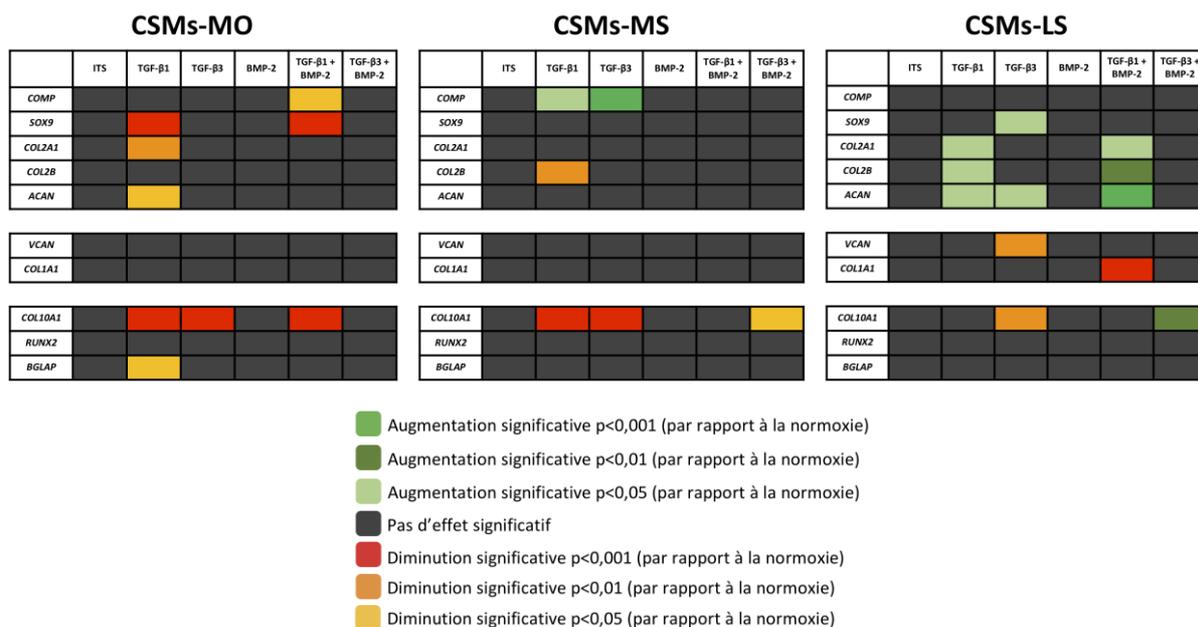


**Figure 21 : Expression des marqueurs hypertrophiques (*COL10A1*) et osseux (*RUNX2* et *BGLAP*) au sein des substituts cartilagineux fonctionnalisés avec des CSMs-MO, des CSMs-MS et des CSMs-LS après 28 jours de culture sous l'influence de facteurs de croissance en condition normoxique**

Le taux d'ARNm a été évalué par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage *RPS29*. Les analyses ont été réalisées après 28 jours de différenciation sous l'influence de différents facteurs de croissance (*TGF-β1*, *TGF-β3* et/ou *BMP-2*) en normoxie. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA 1 facteur suivi d'un test a posteriori de Dunnett pour évaluer l'effet des facteurs de croissance vs la condition témoin (\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ ) puis d'une ANOVA 2 facteurs suivie d'un test a posteriori de Tukey afin d'évaluer des différences d'expression pour chaque facteur de croissance entre les différents types cellulaires considérés (# $p < 0,05$  ; ## $p < 0,01$  ; ### $p < 0,001$ ).

### 2.3.3 Impact de l'hypoxie sur l'expression des gènes d'intérêt du cartilage

Dans cette partie, nous avons évalué l'effet de l'hypoxie (5%  $O_2$ , 5%  $CO_2$ , 37°C) en comparaison à une condition normoxique (20%  $O_2$ , 5%  $CO_2$ , 37°C) sur l'expression relative des gènes d'intérêt du cartilage après 28 jours de différenciation des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial sous l'influence de facteurs de croissance (*TGF-β1*, *TGF-β3* et/ou *BMP-2*). Les résultats sont présentés sur la **Figure 22**.



**Figure 22 : Résumé de l'impact de l'hypoxie sur l'expression des différents gènes d'intérêts du cartilage au sein des substituts cartilagineux fonctionnalisés avec des CSMs-MO, des CSMs-MS et des CSMs-LS après 28 jours de culture sous l'influence de facteurs de croissance et de la tension en oxygène.**

L'expression des gènes d'intérêt a été évaluée par RT-PCRq. L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage RPS29. Les analyses ont été réalisées après 28 jours de différenciation sous l'influence de différents facteurs de croissance (TGF-β1, TGF-β3 et/ou BMP-2) en normoxie et en hypoxie. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA 2 facteurs suivi d'un test a posteriori de Tukey afin d'évaluer l'effet de la tension en oxygène ( $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  ;  $p < 0,001$ ).

Concernant les CSMs-MO, et de façon surprenante, l'hypoxie engendre une baisse significative de l'expression des marqueurs chondrogéniques tels que la *COMP* pour l'association TGF-β1 + BMP-2 ( $p < 0,05$ ), l'agrécane ( $p < 0,05$ ) et le collagène de type 2 ( $p < 0,01$ ) pour le TGF-β1 ainsi qu'une baisse de l'expression de *SOX9* avec l'utilisation de TGF-β1 seul ou en association avec la BMP-2 ( $p < 0,001$ ).

De plus, l'hypoxie n'a aucun effet significatif sur l'expression des marqueurs fibrotiques tels que le collagène de type 1 et le versican. Cependant, l'expression du collagène de type 10 est significativement diminuée pour les conditions TGF-β1, TGF-β3 et TGF-β1 + BMP-2. Malgré des taux d'expression très faibles, l'expression de l'ostéocalcine (*BGLAP*) en hypoxie pour la condition TGF-β1 est significativement plus faible qu'en normoxie.

Globalement, l'hypoxie a peu d'effet sur l'expression des gènes dans les substituts cartilagineuxensemencés avec des CSMs issues de la membrane synoviale (**Figure 22**). En hypoxie, l'expression de la *COMP* est significativement augmentée pour les conditions TGF-β1 et TGF-β3 et l'expression de l'isoforme B du collagène de type 2 est significativement diminuée seulement pour le TGF-β1 seul.

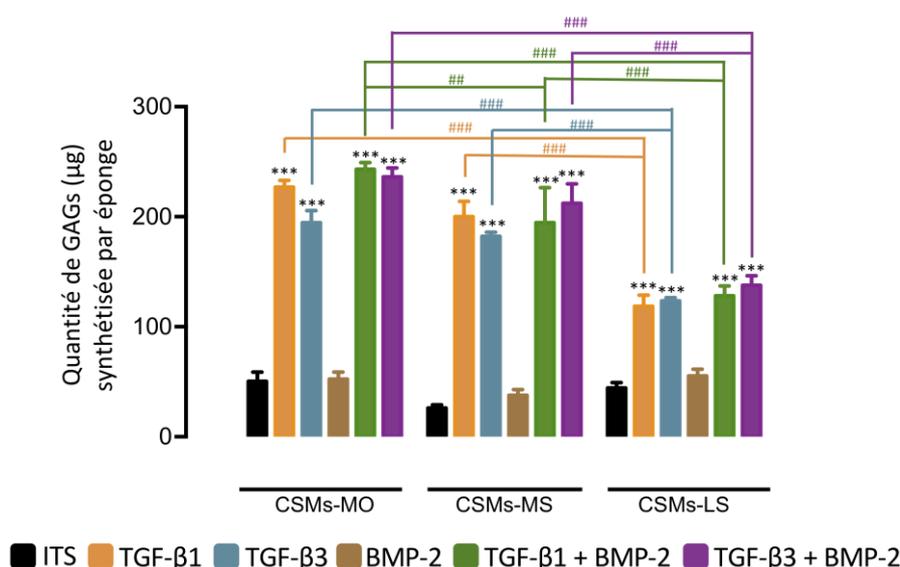
Concernant les marqueurs fibrotiques et hypertrophiques/osseux, l'hypoxie permet seulement une diminution significative de l'expression du collagène de type 10 pour les conditions TGF-β1, TGF-β3 et l'association TGF-β3 + BMP-2 en comparaison à la normoxie. Pour les CSMs-LS l'ensemble des marqueurs chondrogéniques sont impactés par l'hypoxie excepté pour la *COMP*. L'expression de *SOX9* est significativement augmentée pour le TGF-β3. Les

expressions du collagène de type 2 et de son isoforme 2B sont positivement régulées pour le TGF- $\beta$ 1 et son association avec la BMP-2. De plus, l'expression de l'agrécan est significativement augmentée pour les conditions TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 et TGF- $\beta$ 1 + BMP-2.

Concernant l'expression des marqueurs fibrotiques, l'hypoxie diminue significativement l'expression du versican (VCAM) induite par le TGF- $\beta$ 3, ainsi que l'expression du collagène de type 10 induit par l'association TGF- $\beta$ 1 + BMP-2. Enfin, en hypoxie, l'expression du collagène de type 10 est significativement diminuée avec le TGF- $\beta$ 3, mais significativement augmentée avec l'association TGF- $\beta$ 3 + BMP-2.

### 2.3.3.1 Quantité de GAGs synthétisée au sein des biomatériaux

La quantité de GAGs synthétisée dans les éponges de collagènes fonctionnalisées avec des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial a été mesurée à l'aide d'un test colorimétrique de Goldberg. Les résultats sont présentés dans la **Figure 23**.



**Figure 23 : L'utilisation des TGF- $\beta$  1 et TGF- $\beta$  3 seuls ou en association avec la BMP-2 induit une synthèse importante de glycosaminoglycanes au sein des éponges par les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse.**

La quantité de GAGs a été évaluée par un test de Goldberg. Les analyses ont été réalisées après 28 jours de différenciation sous l'influence de différents facteurs de croissance (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 et/ou BMP-2) en normoxie et en hypoxie. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA 1 facteur suivi d'un test a posteriori de Dunnett pour évaluer l'effet des facteurs de croissance vs la condition témoin (\*\*\*) puis d'une ANOVA 2 facteurs suivie d'un test a posteriori de Tukey afin d'évaluer des différences d'expression pour chaque facteur de croissance entre les différents types cellulaires considérés (# $p$ <0,05 ; ## $p$ <0,01 ; ### $p$ <0,001).

De façon générale, en condition de culture basal (ITS 1%), la quantité de GAGs contenue dans une éponge est faible, quel que soit le type cellulaire étudié. L'utilisation de TGF- $\beta$ 1 et de TGF- $\beta$ 3, seuls ou en association avec la BMP-2 engendre une augmentation significative de la production de GAGs par rapport à la condition témoin ITS 1%. L'utilisation de la BMP-2 seule n'induit aucune variation significative.

Les résultats obtenus ont mis en évidence une synthèse de GAGs significativement moindre dans les CSMs-LS pour les conditions TGF- $\beta$ s seuls ou en association avec la BMP-2 en

comparaison avec les CSMs de moelle osseuse et de membrane synoviale. Pour la condition TGF- $\beta$ 1, la synthèse de GAGs est importante pour les CSMs-MO (227  $\mu$ g/éponges) et -MS (200  $\mu$ g/éponges) et significativement plus basse dans les CSMs-LS (118  $\mu$ g/éponges). Pour les conditions TGF- $\beta$ 3 et TGF- $\beta$ s, seuls ou en association avec la BMP-2, la quantité de GAGs synthétisée par les CSMs-MO (environ 210  $\mu$ g/éponge) et par les CSMs-MS (environ 200  $\mu$ g/éponge) est significativement plus élevée que dans les CSMs-LS (environ 130  $\mu$ g/éponge). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre la quantité de GAGs synthétisée par les CSMs-MO et les CSMs-MS, exceptée pour la condition TGF- $\beta$ 1 + BMP-2.

Le même profil est observé pour les biomatériaux cultivés en hypoxie et aucune différence significative n'est trouvée entre les différentes tensions en oxygène pour chaque type cellulaire étudié (**Annexe E**).

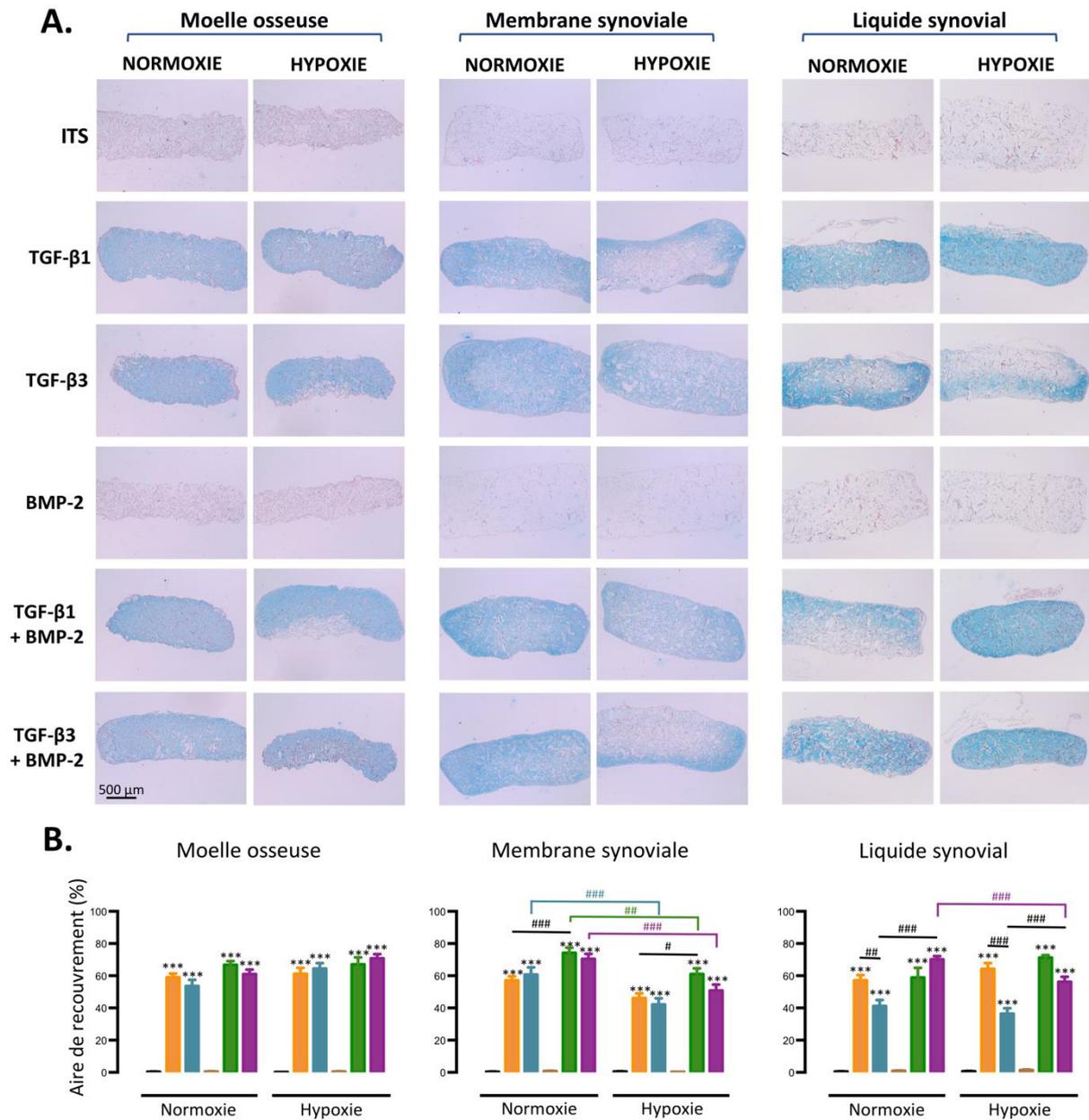
### **2.3.4** Qualité de la synthèse matricielle

Les analyses histologiques ont été réalisées sur nos biomatériaux ensemencés avec des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial après 28 jours de culture en fonction de différentes conditions. La répartition cellulaire au sein des éponges a été évaluée par la coloration HES (**Annexe F**). Les composés synthétisés ont été mis en évidence par les colorations au bleu Alcian (protéoglycanes), au rouge Sirius (collagène) (**Annexe G**) et par immunohistochimie spécifique du collagène de type II. Les éventuels dépôts calciques ont été révélés par une coloration Von Kossa. Les observations ont été réalisées sur 3 patients indépendants, cependant, une seule image représentative est présentée. La coloration HES a permis de mettre en évidence ni altération ni mortalité des cellules au sein de nos biomatériaux. La répartition cellulaire au sein des éponges est homogène, quelles que soient les conditions de culture (**Annexe F**).

#### **2.3.4.1** Contenu en protéoglycanes

Le contenu en protéoglycanes au sein de nos substituts cartilagineux a été mis en évidence par une coloration au bleu Alcian. Nous avons également réalisé des analyses densitométriques pour évaluer la surface de l'éponge recouverte par le marquage. Les résultats sont présentés dans la **Figure 24**. Quelle que soit la teneur en oxygène (normoxie ou hypoxie), aucune synthèse matricielle n'est observée pour la condition minimale de survie des cellules en ITS 1%. La BMP-2 seule n'a pas d'effet sur cette synthèse.

Pour l'ensemble des types cellulaires étudiés, l'ajout de TGF- $\beta$ 1 et de TGF- $\beta$ 3 seuls ou en association avec la BMP-2 a engendré une augmentation importante de la quantité de protéoglycanes. Ces observations sont confirmées par les études densitométriques (**Figure 24B**) qui ont mis en évidence une synthèse de protéoglycanes importantes par les conditions TGF- $\beta$ s seuls ou en association avec la BMP-2. Pour les CSMs-MO, 60 à 70% de la surface de l'éponge est recouverte par la coloration bleu Alcian et aucune différence significative n'a été observée entre la normoxie et l'hypoxie.



**Figure 24 : L'utilisation des TGF-βs, seuls ou en association avec la BMP-2, permet la synthèse d'une matrice cartilagineuse au sein des éponges de collagènes fonctionnalisés avec des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale ou du liquide synovial.**

A. Après 28 jours de différenciation sous l'influence de facteurs de croissance (TGF-β 1, TGF-β 3 et/ou BMP-2) et de la tension en oxygène (Normoxie-Hypoxie), les biomatériaux ont été fixés puis inclus en paraffine. Des coupes sagittales ont été colorées au bleu Alcian afin d'évaluer le contenu en protéoglycanes. La barre d'échelle représente 500 μm. Grossissement original x4. B. Des analyses densitométriques ont été réalisées à partir des coupes colorées au bleu Alcian grâce à l'utilisation du logiciel Image J. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA 1 facteur suivi d'un test a posteriori de Dunnett pour évaluer l'effet des facteurs de croissance vs la condition témoin (\*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001) puis d'une ANOVA 2 facteurs suivie d'un test a posteriori de Tukey afin d'évaluer l'effet de la tension en oxygène (#p<0,05 ; ##p<0,01 ; ###p<0,001) (n=3 patients).

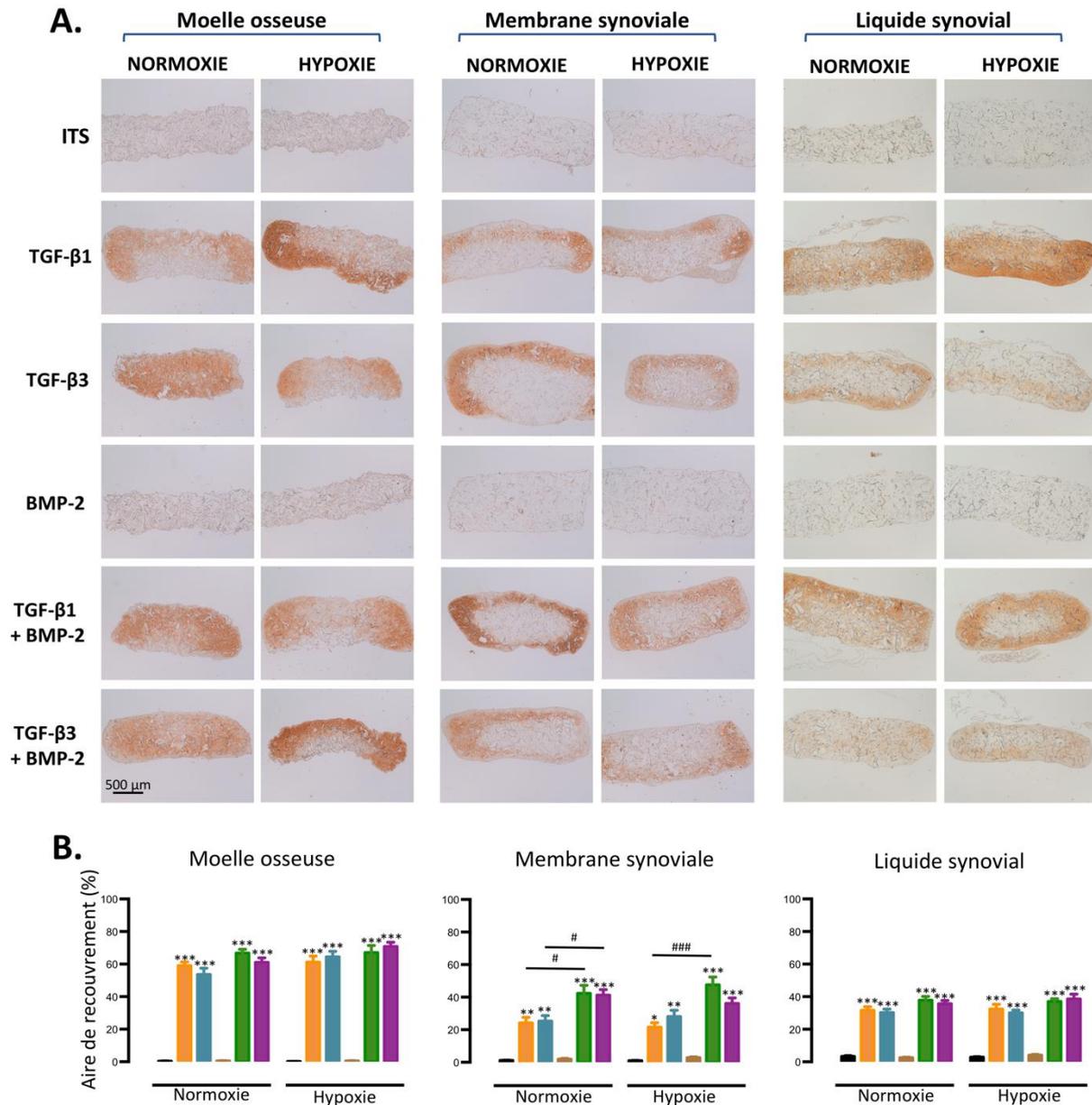
Concernant les CSMS-MS, les études densitométriques (**Figure 24B**) ont mis en évidence une synthèse de protéoglycanes importantes par les conditions TGF- $\beta$ s seuls ou en association avec la BMP-2. La BMP-2 seule n'a pas d'effet sur cette synthèse. Pour les deux teneurs en oxygène, l'association de la BMP-2 avec le TGF- $\beta$ 1 (normoxie : 75% d'aire recouverte et hypoxie 60%) a permis de potentialiser significativement l'effet du TGF- $\beta$ 1 seul (57% en normoxie et 46% en hypoxie). De plus, l'hypoxie diminue significativement la production de protéoglycanes pour les conditions TGF- $\beta$ 3 et le TGF- $\beta$ s + BMP-2.

Les CSMS issues du liquide synovial possèdent un comportement similaire au sein des éponges. Cependant, la condition TGF- $\beta$ 3 en normoxie, comme en hypoxie, semble induire une production de protéoglycanes moins importante limitée à la périphérie des éponges par rapport aux conditions TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ s + BMP-2. Cette observation est confirmée par les études densitométriques (**Figure 24B**). En normoxie et en hypoxie, la synthèse de protéoglycanes est significativement plus basse pour le TGF- $\beta$ 3 (40%) que pour le TGF- $\beta$ 1 (55%). L'association du TGF- $\beta$ 3 avec la BMP-2 permet d'augmenter significativement cette synthèse ( $p < 0,001$ ).

#### 2.3.4.2 Contenu en collagène de type II

Le contenu en collagène de type II au sein de nos substituts cartilagineux a été mis en évidence par un marquage spécifique par immunohistochimie. Nous avons également réalisé des analyses densitométriques pour évaluer la surface de l'éponge recouverte par le marquage. Les résultats sont présentés dans la **Figure 25**. Quelle que soit la teneur en oxygène (normoxie ou hypoxie), aucune synthèse matricielle n'est observée pour la condition minimale de survie des cellules en ITS 1%. La BMP-2 seule n'a pas d'effet sur cette synthèse. Pour l'ensemble des types cellulaires étudiés, l'ajout de TGF- $\beta$ 1 et de TGF- $\beta$ 3 seuls ou en association avec la BMP-2 a induit la production de collagène de type II. Ces observations ont été confirmées par les études densitométriques (**Figure 25B**) qui ont mis en évidence une synthèse de collagène de type II par les conditions TGF- $\beta$ s seuls ou en association avec la BMP-2. Pour les CSMS-MO, la synthèse de collagène de type II est fortement augmentée (environ 60% de l'aire totale de l'éponge) par les conditions TGF- $\beta$ s seuls ou en association avec la BMP-2 sans différence significative entre les teneurs en oxygène.

Concernant les CSMS-MS, les conditions TGF- $\beta$ s, seuls ou en association avec la BMP-2, induisent la synthèse de collagène de type II. Cependant, cette synthèse n'est pas homogène et se limite à la périphérie des éponges. Les analyses densitométriques ont mis en évidence, pour les deux teneurs en oxygène, une synthèse de collagène de type II significativement potentialisée par l'association de la BMP-2 avec les TGF- $\beta$ s d'un facteur 2 environ. Nous observons le même résultat en hypoxie uniquement pour l'association TGF- $\beta$ 1 + BMP-2 en comparaison au TGF- $\beta$ 1 seul. Aucune différence significative n'est observée entre les différentes teneurs en oxygène.



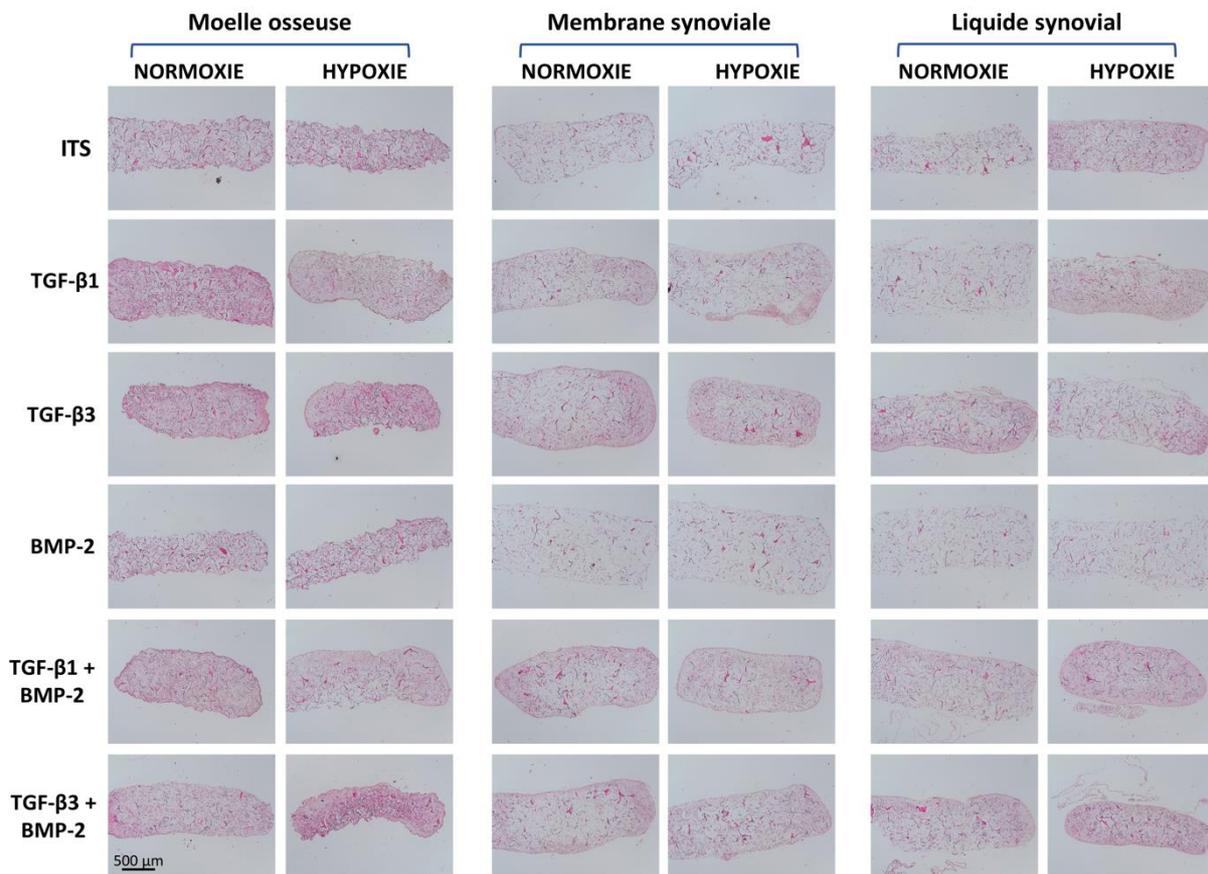
**Figure 25 : L'utilisation des TGF-βs seuls ou en association avec la BMP-2 permet la synthèse d'une matrice cartilagineuse riche en collagène de type II au sein des éponges de collagènes fonctionnalisés avec des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale ou du liquide synovial.**

A. Après 28 jours de différenciation sous l'influence de facteurs de croissance (TGF-β 1, TGF-β 3 et/ou BMP-2) et de la tension en oxygène (Normoxie-Hypoxie), les biomatériaux ont été fixés puis inclus en paraffine. Des coupes sagittales ont été spécifiquement marquées pour le collagène de type II en immunohistochimie. La barre d'échelle représente 500 μm. Grossissement original x4. B. Des analyses densitométriques ont été réalisées à partir des coupes marquées pour le collagène de type II grâce à l'utilisation du logiciel Image J. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA 1 facteur suivi d'un test a posteriori de Dunnett pour évaluer l'effet des facteurs de croissance vs la condition témoin (\*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001) puis d'une ANOVA 2 facteurs suivie d'un test a posteriori de Tukey afin d'évaluer l'effet de la tension en oxygène (#p<0,05 ; ###p<0,01 ; ####p<0,001) (n=3 patients).

Les CSMs issues du liquide synovial possèdent un comportement similaire aux CSMs-MS au sein des éponges. Ainsi, L'ajout de TGF- $\beta$ 1 et de TGF- $\beta$ 3 seuls ou en association avec la BMP-2 va augmenter de façon importante la quantité de collagène de type II dans les éponges. Cependant, la synthèse se limite à la périphérie des substituts. De plus, la synthèse semble moins importante pour le TGF- $\beta$ 3 seul et en association avec la BMP-2. Ces résultats sont confirmés par les analyses densitométriques ; des profils similaires sont observés entre la normoxie et l'hypoxie. Cependant, aucune différence significative n'est observée entre les conditions TGF- $\beta$ s seuls ou en association avec la BMP-2. Enfin, aucune différence significative n'est observée entre les deux teneurs en oxygène.

### 2.3.4.3 Contenu en calcification, témoin de la dérive ostéoïde

La recherche de dépôts calciques au sein de nos substituts cartilagineux ensemencés avec des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial a été réalisée par une coloration von Kossa. Les résultats sont présentés dans la **Figure 26**. Pour l'ensemble des conditions expérimentales, la coloration von Kossa n'a pas mis en évidence la présence de dépôts calciques.



**Figure 26 : La différenciation chondrogénique des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale ou du liquide synovial en fonction des différentes conditions de culture n'entraîne pas la formation de dépôts calciques.**

Après 28 jours de différenciation sous l'influence de facteurs de croissance (TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  3 et/ou BMP-2) et de la tension en oxygène (Normoxie-Hypoxie), les biomatériaux ont été fixés puis inclus en paraffine. Des coupes sagittales ont été colorées au von Kossa afin d'évaluer le contenu en dépôts calciques. La barre d'échelle représente 500  $\mu$ m. Grossissement original x4.

## 2.4 Discussion

---

Le cartilage possède des capacités de réparation limitées en raison de sa nature avasculaire. Ainsi, le tissu cicatriciel obtenu est bien souvent de type fibrocartilage. L'ingénierie du cartilage est développée depuis de nombreuses années et les cellules souches sont très étudiées, car elles constituent une alternative prometteuse en médecine régénératrice.

L'objectif de ce projet consistait à réaliser un substitut cartilagineux avec des cellules souches mésenchymateuses possédant des capacités de différenciation chondrogéniques ensemencées dans un biomatériau à base de collagène. Précédemment, nous avons mis en évidence le caractère « souche » des cellules issues des prélèvements de moelle osseuse, de membrane synoviale et de liquide synovial. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux capacités de ces trois contingents cellulaires à produire un substitut cartilagineux et aux conditions environnementales favorables à la synthèse d'une matrice extracellulaire de qualité. Après expansion dans un milieu classique, les cellules ont été ensemencées dans des éponges de collagène de type I et III. Nous avons comparé l'effet de différents facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$ 1, le TGF- $\beta$ 3 et la BMP-2 ainsi que la teneur en oxygène du milieu environnant sur les potentialités chondrogéniques de ces cellules souches.

Nous avons choisi de travailler avec un biomatériau support poreux à base de collagène de type I qui permet la synthèse de matrice extracellulaire au sein de ce biomatériau contrairement au système de pellets. En effet, le modèle de pellet est une structure 3D basée sur une interaction cellule-cellule. Il permet cependant d'être utilisé comme référence pour étudier les capacités de différenciation chondrogénique des CSMs.

Les résultats de l'analyse mitochondriale, normalisés par la quantité d'ADN après 28 jours de différenciation, ont montré qu'il n'y avait pas de mort cellulaire au sein de nos biomatériaux. Un profil similaire est observé entre les trois types cellulaires, à savoir une diminution significative de l'activité mitochondriale uniquement en présence de TGF- $\beta$ 1 ou TGF- $\beta$ 3 en comparaison à la condition ITS. Il est établi dans la littérature un lien entre la baisse de l'activité mitochondriale et un processus de différenciation [377]. Ainsi nos résultats suggèrent un état de différenciation plus important pour les conditions de culture contenant du TGF- $\beta$ 1 ou TGF- $\beta$ 3, seuls ou en association avec la BMP-2.

Nous avons évalué l'expression des gènes d'intérêt du cartilage par RT-PCR quantitative. Notre condition ITS n'est pas un supplément de culture chondrogénique et n'induit pas l'expression des gènes d'intérêt. Les résultats confirment que le TGF- $\beta$ 1 et le TGF- $\beta$ 3 induisent la chondrogenèse des CSMs issues de la moelle osseuse [378], de la membrane synoviale [323] et du liquide synovial [320], [379]. Ces résultats sont en accord avec un travail antérieur de notre équipe : l'utilisation de TGF- $\beta$ 1 a permis une forte surexpression des gènes d'intérêt comme le collagène de type 2 et l'agrécan après 28 jours de différenciation de CSMs-MO ensemencées dans des éponges de collagène [375].

Cependant, la BMP-2 seule n'a pas d'effet inducteur sur l'expression de l'ensemble des gènes étudiés. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Weiss *et al.*, cette équipe a montré que la BMP-2 seul n'était pas capable d'induire la chondrogenèse de CSMs-MO issues de patients arthrosiques [240]. Ce facteur de croissance est également utilisé pour induire la différenciation des CSMs en ostéoblastes [380]. De plus, la différenciation des CSMs en

chondrocytes est une succession d'étape allant de la condensation des cellules jusqu'à la différenciation terminale en chondrocytes hypertrophiques [381]. Ainsi, nous avons étudié l'expression des facteurs de transcription Sox9 et RunX2 qui sont respectivement impliqués dans la différenciation des chondrocytes et des chondrocytes hypertrophiques et ostéoblastes. Pour les trois types cellulaires, l'expression de Sox9 est significativement augmentée pour les conditions TGF- $\beta$ s +/- BMP-2 alors que l'expression de RunX2 reste faible quel que soient les conditions de culture. De plus, la très faible expression de BGLAP suggère une différenciation des CSMs en chondrocyte sans dérive vers l'hypertrophie terminale. Pour les CSMs issues de la moelle osseuse et de la membrane synoviale, la surexpression des marqueurs chondrogéniques est accompagnée par une forte surexpression du COL10A1, marqueur de l'hypertrophie des chondrocytes. Ce résultat est cohérent avec la littérature, car l'induction de la différenciation chondrogénique est liée avec une augmentation des marqueurs associés à l'hypertrophie [382]–[384].

De façon inattendue, l'hypoxie (5% O<sub>2</sub>) a très peu d'effet sur l'expression relative des gènes d'intérêt dans nos conditions expérimentales. Elle engendre une diminution significative de l'expression des gènes chondrogéniques pour les CSMs-MO. Pour les CSMs-MO, comme précédemment publié dans les billes d'alginate [312] ou encore pour les CSMs-MS cultivées en 3 dimensions dans une matrice extracellulaire [320], l'hypoxie favorise l'expression des gènes chondrogéniques tels SOX9, COL2A1, COL2B et ACAN. Enfin, elle diminue le plus souvent l'expression relative du collagène de type X notamment pour les CSMs-MO et -MS. Ces résultats sont en accord avec des travaux récents qui rapportent une baisse de l'expression relative des marqueurs hypertrophiques tels que COL10A1 lors d'une différenciation en hypoxie [310], [385], [386].

Ces résultats sont complétés avec des analyses histologiques et immuno-histochimiques. Ces techniques invasives permettent d'obtenir des informations qualitatives sur la répartition des cellules ainsi que sur la quantité de matrice extracellulaire (MEC) néo-synthétisée. Ces résultats confirment les analyses de l'expression des gènes. La condition ITS 1% n'induit pas de différenciation chondrogénique au sein de nos éponges fonctionnalisées. La production de MEC est plus importante pour les CSMs-MO en comparaison au CSMs d'origine synoviale. En effet, l'aire de recouvrement en protéoglycanes (révélé par la coloration bleu Alcian) et en collagène de type II (immuno-histochimie spécifique) est plus importante pour les CSMs-MO. Cependant, pour les cellules de la membrane synoviale, l'ajout de BMP-2 au TGF- $\beta$ 1 permet de potentialiser significativement le dépôt de protéoglycane et de collagène de type II. Étonnamment, l'hypoxie a aucun effet sur la synthèse de collagène de type II pour les trois types cellulaires considérés. Une faible teneur en oxygène va cependant diminuer significativement la production de protéoglycanes au sein des épongesensemencées avec des CSMs-MS. Il est important de noter que les différents substituts cartilagineux produits ne présentent aucune calcification après 28 jours, quelles que soient les conditions de culture (hypoxie ou normoxie).

Les TGF- $\beta$ s seuls induisent la synthèse d'une matrice cartilagineuse. Excepté pour la combinaison TGF- $\beta$ 1 + BMP-2 pour les CSMs-MS, l'ajout de BMP-2 en combinaison avec le TGF- $\beta$ 1 et - $\beta$ 3 ne permet pas de potentialiser l'effet des TGF- $\beta$ s seuls. D'autres travaux ont montré que l'expression des gènes chondrogéniques est fortement augmentée avec le cocktail TGF- $\beta$ 1 + BMP-2 après 14 jours de différenciation de CSMs issues de sang de cordon humain en normoxie [324]. Concernant les cellules issues de la membrane synoviale, nos résultats sont contradictoires à ceux obtenus par plusieurs travaux. Malgré des origines cellulaires

différentes (humaine, bovine, souris) et des systèmes de culture différents (pellet, explant), l'utilisation d'un cocktail BMPs + TGF- $\beta$ s était nécessaire pour obtenir une matrice de type cartilagineuse contrairement à l'utilisation de TGF- $\beta$  seul [174], [290], [364]–[366].

Plusieurs travaux ont comparé les capacités de différenciation de différentes sources de cellules souches humaines [179], [387] ou du rat [178]. Leurs résultats ont mis en évidence des capacités de différenciation chondrogéniques supérieures pour les cellules issues du liquide synovial [179] ou de la membrane synoviale [178], [387] en comparaison, notamment, avec des CSMs-MO. Cependant, ces études ont été menées avec des cellules provenant de l'articulation temporo-mandibulaire, lors de reconstruction du ligament croisé antérieur et sur des rats sains. De plus, le système tridimensionnel de différenciation était un pellet et non des cellulesensemencées dans un biomatériau support. Ainsi, ces deux paramètres peuvent expliquer les différences entre leurs résultats et les nôtres.

Les cellules d'origine synoviale sont récupérées sur des patients arthrosiques de stade avancé qui subissent un remplacement total de l'articulation du genou par une prothèse. Avant prélèvement, les cellules sont dans un microenvironnement pathologique. Dans des conditions dégénératives, l'homéostasie de l'articulation laisse place à un environnement catabolique avec une augmentation significative des cytokines pro-inflammatoires et une diminution du TGF- $\beta$ 1 [388]. De plus au cours de l'arthrose, l'inflammation synoviale (synovite) provoque une hypoxie [389] et une acidification du liquide synovial [390]. De plus, dans une articulation arthrosique, les cellules vont être exposées à des contraintes mécaniques anormales [391] et l'augmentation du volume de liquide synovial induit un changement du métabolisme vers la glycolyse ce qui contribue à une diminution du taux de sucre dans le fluide synovial [392]. Enfin, la dégradation du cartilage est corrélée au changement de la pression en oxygène dans l'articulation, la surproduction de radicaux libres et également à un manque d'enzyme de piégeage des radicaux libres [393], [394]. Ainsi, l'exposition à ces différents agents pro-inflammatoires [395] peut soit engendrer un pré-conditionnement des cellules, soit modifier leurs propriétés paracrine et ainsi expliquer leur capacité de différenciation chondrogénique moindre en comparaison aux CSMs de moelle osseuse.

## 2.5 Conclusion

---

Les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial possèdent des capacités de différenciation chondrogénique lorsqu'elles sontensemencées dans des éponges de collagène. L'optimisation des conditions de culture est une étape importante afin de créer un substitut cartilagineux optimal. Les résultats ont mis en évidence des différences entre les types cellulaires :

- L'effet des facteurs de croissance est similaire entre les trois types cellulaires : l'ajout de BMP-2 ne permet pas de potentialiser l'effet du TGF- $\beta$  seul.
- L'hypoxie n'a pas d'effet sur la synthèse matricielle au sein des biomatériauxensemencés avec des CSMs issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide synovial.

Ainsi, nous pouvons, dans le cadre de ce travail, définir les conditions de culture optimales pour obtenir un substitut cartilagineux :

- Pour les CSMs-MO, -MS et -LS : culture en normoxie sous l'influence de TGF- $\beta$ 1

Selon notre protocole de différenciation pendant 28 jours, nos résultats sont très encourageants, car aucune calcification n'a été observée au sein des substituts. Des études plus approfondies devront être réalisées pour s'assurer du maintien du phénotype chondrogénique pour un temps de culture plus long.

Le liquide synovial constitue une source de CSMs originale. Elles ont montré des capacités de différenciation chondrogénique intéressantes dans un environnement tridimensionnel. Nous allons nous intéresser aux capacités de réparation des CSMs-LS dans un modèle de lésions cartilagineuses diffuses chez le rat immunodéprimé.

## 3 Potentialités des CSMs issues du liquide synovial dans le traitement des lésions diffuses du cartilage chez le rat “*nude*”

---

### 3.1 Objectifs

---

Le cartilage est non innervé et non vascularisé. Ainsi, ce tissu très spécialisé possède des capacités de réparation extrêmement limitées. Dans le cadre de l’arthrose, un déséquilibre de l’homéostasie de l’articulation conduit à une dégradation du cartilage sans possibilité de réparation. Aujourd’hui, les différents traitements utilisés chez l’homme sont symptomatiques (Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens) et ne permettent pas de réparer le cartilage.

Ainsi, nous proposons d’étudier les potentialités des CSMs issues du liquide synovial (CSMs-LS) afin de prévenir l’apparition des lésions diffuses arthrosiques dans un modèle chez le petit animal. L’originalité de ce travail se base sur l’utilisation des CSMs-LS dont l’utilisation en injection intra-articulaire dans le traitement de l’arthrose diffuse n’a pas été décrite dans la littérature. De plus, le liquide synovial peut être facilement récupéré par simple ponction ce qui constitue un critère de choix dans le cadre de l’ingénierie tissulaire.

Nous avons choisi d’utiliser un modèle d’arthrose par section du ligament croisé antérieur. Celui-ci a été décrit comme un excellent modèle d’arthrose post-traumatique chez le chien, le lapin, la souris, mais également le rat. De plus et dans le cadre d’une greffe xénogénique, notre choix s’est orienté vers l’utilisation de rats immunodéprimés (rat “*nude*”) afin de limiter le rejet des cellules humaines lors de l’injection en intra-articulaire.

Nous avons étudié les capacités de réparation des cellules souches mésenchymateuses issues du liquide synovial dans un modèle de lésions cartilagineuses diffuses chez le rat “*nude*”. Les potentialités des CSMs-LS ont été évaluées sur les plans macroscopique et microscopique.

### 3.2 Matériels et Méthodes

---

#### 3.2.1 Aspects réglementaires

L’étude a été réalisée sur des rats mâle “*nude*” (CrI : NIH-Foxn1rnu, laboratoires Charles River, L’Arbresle, France) âgés de 5 semaines. Les lésions diffuses ont été induites par la réalisation du modèle mécanique par section du ligament croisé antérieur. Ce modèle consiste en la création d’une anomalie de stabilité de l’articulation du genou chirurgicalement qui, par friction lors de mouvements, engendre des forces mécaniques délétères pour le cartilage induisant ainsi la symptomatologie arthrosique observée en clinique, à savoir une érosion du cartilage en zone portante.

Les animaux ont été hébergés dès leur arrivée dans des cages en plastique transparent, sur lit de chanvre. Les cages ont été entreposées au sein de l’animalerie dédiée petits rongeurs

du laboratoire dans une pièce thermo- et hygro-régulée bénéficiant d'un cycle lumière/obscurité de 12h/12h.

Les rats ont été nourris avec de la nourriture standardisée et ont eu accès à l'eau à volonté. Les guides de bonnes pratiques relatifs à l'expérimentation animale ont été scrupuleusement suivis, le protocole de notre étude bénéficiant par ailleurs de l'aval du Comité d'Ethique Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale (CELMEA) est référencé sous le numéro d'autorisation APAFIS#6624-2016042215241254. Les procédures de chirurgie et de réveil ont été réalisées dans une pièce dédiée à la chirurgie et au réveil présente dans la structure de l'animalerie. Tout le matériel d'anesthésie est présent dans cette structure, une salle de manipulation et d'expérimentation est à disposition pour la réalisation des pesées, des injections intra-articulaires sous anesthésie générale à l'isoflurane.

### 3.2.2 Design de l'étude

Deux lots de 24 rats immuno-déficients (laboratoires Charles River, L'Arbresle, France) ont été utilisés. Huit animaux de chaque groupe ont été mis à mort à J28 après la réalisation du modèle chirurgical afin d'évaluer l'efficacité du traitement à court terme et huit animaux de chaque groupe ont été sacrifiés à J56 après la réalisation du modèle chirurgical afin d'évaluer l'efficacité du traitement à plus long terme.

Pour cela, trois groupes d'animaux ont été réalisés et étudiés (**Figure 27**) :

- Groupe A : **SHAM** (n=8 rats à J28 et n=8 rats à J56)

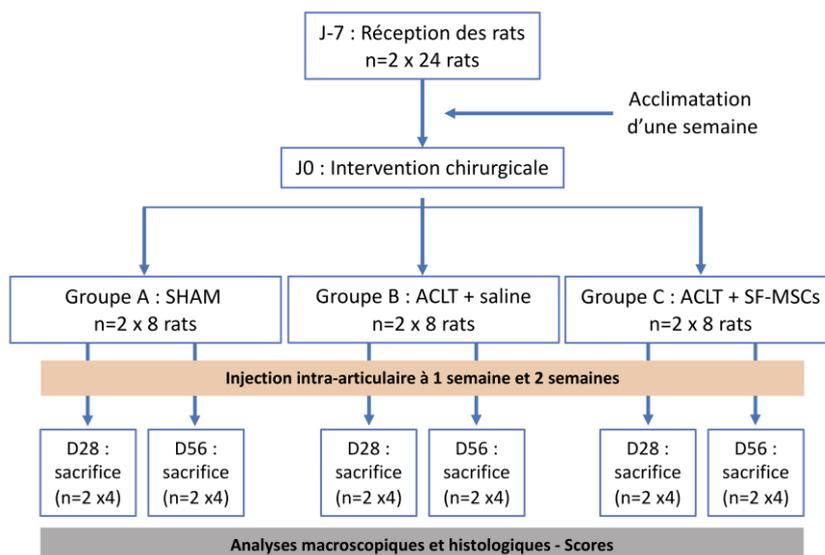
Sur le genou droit, nous avons procédé à une arthrotomie suivie d'une luxation de la rotule puis de la remise en place de la rotule, de la vérification de la fonctionnalité de l'articulation et de la suture des différents plans sectionnés. Une injection intra-articulaire de sérum physiologique a été réalisée à 1 semaine et à 2 semaines après la chirurgie. Le genou gauche de l'animal sert de témoin controlatéral, sans procédure chirurgicale et sans injection intra-articulaire. Ce groupe d'animaux est justifié pour évaluer l'effet de l'arthrotomie et de l'injection intra-articulaire de sérum physiologique sur le cartilage (altération du cartilage) et la membrane synoviale (métaplasie). Ce groupe A correspond à notre groupe contrôle par rapport au groupe B et C.

- Groupe B : **ACLT saline** (n=8 rats à J28 et n=8 rats à J56)

Sur le genou droit, nous avons procédé à une arthrotomie suivie de la luxation de la rotule dans le plan latéral, de la section du ligament croisé antérieur, de la remise en place de la rotule, de la vérification de la fonctionnalité de l'articulation et de la suture des différents plans sectionnés. Une injection intra-articulaire de 50 µL sérum physiologique (NaCl) a été réalisée en même temps en parallèle des injections intra-articulaires de CSMS dans le groupe 4 et 5. Le genou gauche de l'animal sert de témoin controlatéral, sans procédure chirurgicale et sans injection intra-articulaire.

- Groupe C : **ACLT SF-MSCs** (n=8 rats à J28 et n=8 rats à J56)

Sur le genou droit, nous avons procédé à la même chirurgie que dans le groupe B. Par contre, une injection intra-articulaire d'un million de cellules souches mésenchymateuses issues du liquide synovial en suspension dans 50 µL de sérum physiologique a été réalisée dans le genou droit dont le ligament croisé antérieur a été sectionné. Le genou gauche de l'animal sert de témoin controlatéral, sans procédure chirurgicale et sans injection intra-articulaire.



**Figure 27 : Design de l'étude in vivo.**

2 lots de 24 rats ont été répartis en 3 groupes (groupe A : SHAM, B : ACLT + saline, et C : ACLT + SF-MSCs). Les injections intra-articulaires ont été réalisées à 1 semaine et à 2 semaines après la chirurgie. Les rats ont été ensuite mis à mort 28 jours (D28) ou 56 jours (D56) après chirurgie.

**Mise à mort des animaux.** À la fin de l'expérimentation (28 jours et 56 jours après l'induction de l'arthrose expérimentale), les animaux ont été mis à mort par une overdose d'un mélange kétamine (90 mg/kg) - acépromazine (1 mg/kg) administré par voie intrapéritonéale suivie d'une dislocation cervicale avant une évaluation macroscopique et histologique des lésions articulaires. La mise à mort est confirmée par l'absence de battements cardiaques. Les genoux des animaux ont été disséqués pour des analyses macroscopique et histologique.

### 3.2.3 Analyses réalisées

#### 3.2.3.1 Poids des animaux

Le poids des animaux est un paramètre important puisqu'il est le reflet de leur bon développement et représente un indicateur de leur bien-être. Tous les animaux ont été pesés trois fois par semaine durant toute l'expérimentation.

#### 3.2.3.2 Évaluation des lésions cartilagineuses à l'échelle macroscopique dans les différents compartiments des genoux

Après sacrifice des animaux selon la procédure décrite précédemment, les genoux ont été disséqués de façon à isoler les différentes pièces du genou (rotule, tibia, et fémur). Les prélèvements sont ensuite observés au stéréomicroscope (DFC425, Leica, France) puis numérisés. Un score macroscopique de 0 à 4 est réalisé dans les 4 compartiments suivants du genou : fémur médial (FM) et latéral (FL) et tibia médial (TM) et latéral (TL) conduisant ainsi à un score maximal de 16 par genou. Les lésions sont gradées selon le score modifié de Guingamp [396] qui comporte 5 grades :

- Grade 0 : Apparence normale
- Grade 1 : Coloration jaunâtre de la surface chondrale
- Grade 2 : Faibles érosions du cartilage dans les zones portantes
- Grade 3 : Grandes érosions atteignant l'os sous-chondral

- Grade 4 : Grandes érosions avec une exposition importante de l'os sous-chondral

Les évaluations ont été réalisées par deux observateurs de manière indépendante et à l'aveugle.

### 3.2.3.3 Évaluation des lésions cartilagineuses à l'échelle microscopique dans les différents compartiments des genoux

Après dissection et analyses macroscopiques à J28 et à J56, les genoux de rat ont été fixés dans du formol (4%) puis décalcifiés dans une solution d'acide formique 5% pendant 10 jours. Les prélèvements ont été ensuite déshydratés et inclus en bloc de paraffine. Des coupes histologiques sagittales de 5 µm d'épaisseur, orthogonales à l'axe de flexion antéropostérieur et différentes colorations ont été réalisées : Hématoxyline-Eosine-Safran (HES, morphologie du cartilage articulaire), bleu de toluidine (contenu en protéoglycanes au sein du cartilage), rouge Sirius (contenu en collagène). Les coupes sont ensuite observées au microscope optique (DMD 108, Leica, France) et numérisées au grossissement original x10.

L'analyse des lésions de l'articulation du genou a été effectuée de manière descriptive, mais également grâce à l'emploi d'une grille de score semi-quantitatif (**Tableau IX**). Ce score est adapté des critères de Mankin [397]. Nous avons une bonne expertise dans l'évaluation des lésions cartilagineuses à l'aide de ce score semi-quantitatif et son emploi est très répandu dans la littérature dans le domaine de l'arthrose. Le score maximal selon les critères modifiés de Mankin est de 16 par compartiment. Le score du cartilage a été réalisé dans les 4 compartiments suivants : fémur médial (FM) et latéral (FL) et tibia médial (TM) et latéral (TL) conduisant ainsi à un score maximal de 64 par genou. Les évaluations ont été réalisées par deux observateurs de manière indépendante et à l'aveugle.

**Tableau IX : Score histologique du cartilage et des remaniements osseux d'après le score modifié de Mankin.**

<b>CARTILAGE</b>			
<b>STRUCTURE (surface)</b>		<b>COLORATION AU BLEU DE TOLUIDINE</b>	
Normale	0	Homogène et intense (normale)	0
Surface irrégulière		Décoloration faible	1
avec pannus/fibrose	1	modérée	2
Fissures jusqu'à la zone de transition	2	sévère	3
la zone radiale	3	Pas de coloration notée	4
la zone calcifiée	4		
Désorganisation complète	5		
		<b>EPAISSEUR DE LA COUCHE DE CHONDROCYTES HYPERTROPHIQUES</b>	
<b>CELLULES (répartition)</b>		Normale	0
Normale	0	Modérée	1
Hypercellularité diffuse	1	Totale	2
Clusters	2		
Hypocellularité	3		
<b>REMANIEMENTS OSSEUX</b>			
<b>OSTEOIDES/CHONDROIDES</b>		<b>OSTEOLYSE</b>	
Pas de remaniement osseux	0	Non	0
Remaniements osseux	1	Oui	1

3.2.3.4 Analyses histologiques du degré d'inflammation de la membrane synoviale

Le degré d'inflammation de la membrane synoviale a été évalué à J28 et J56 en utilisant le score modifié de Rooney [398]. Ce score est basé sur l'évaluation de 6 critères histologiques sur une échelle de 0 à 4 (**Tableau X**). Ces critères sont 1) le nombre d'assises cellulaires, 2) le dépôt de fibrine, 3) la fibrose, 4) le nombre de vaisseaux par champ, 5) l'infiltration périvasculaire et 6) l'infiltration cellulaire diffuse. Le score maximal est de 24. Les évaluations ont été réalisées par deux observateurs de manière indépendante et à l'aveugle.

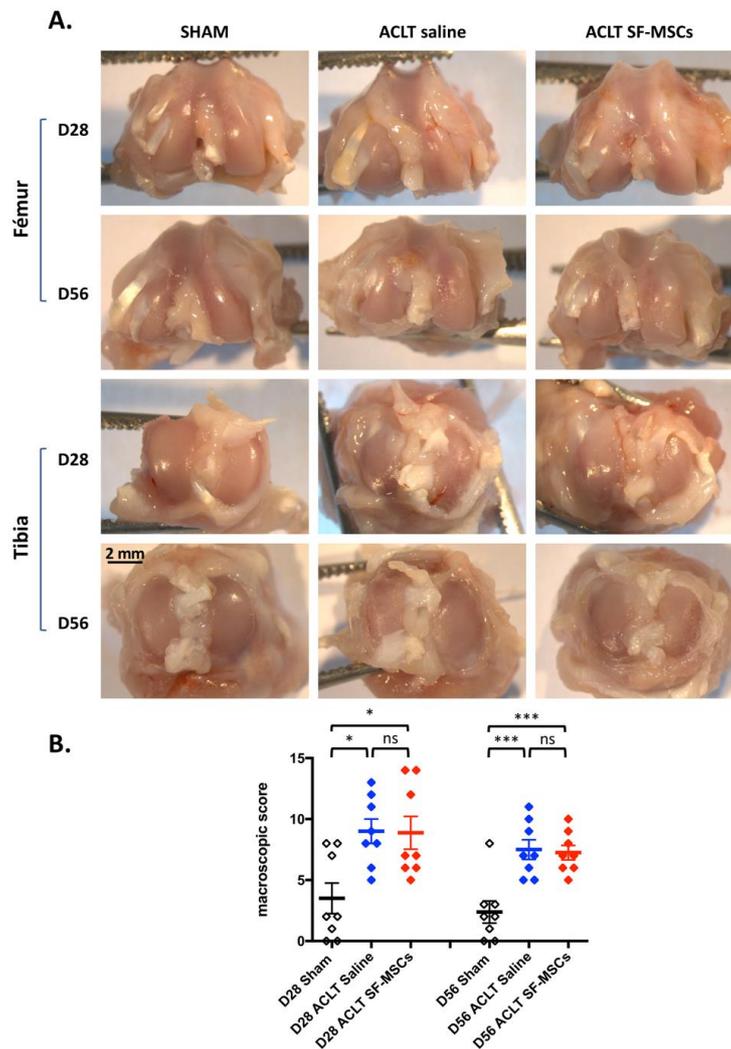
**Tableau X : Score histologique de la membrane synoviale d'après le score modifié de Rooney.**

<b>MEMBRANE SYNOVIALE</b>			
<b>NOMBRE D'ASSISES CELLULAIRES</b>		<b>NOMBRE DE VAISSEAUX/CHAMP</b>	
1 assise (normal)	0	2 à 3	0
2 à 3 assises	1	3 à 9	1
4 à 5 assises	2	10 à 15	2
5 à 10 assises	3	16 à 22	3
> 10 assises	4	>22	4
<b>DEPOT DE FIBRINE</b>		<b>INFILTRATION PERIVASCULAIRE</b>	
Pas de dépôt	0	0%	0
Faible	1	1 à 25%	1
Moyen	2	26 à 50%	2
Important	3	51 à 75%	3
Sévère	4	> 75%	4
<b>FIBROSE</b>		<b>INFILTRATION CELLULAIRE DIFFUSE</b>	
<10% surface/champ	0	0%	0
10 - 25% surface/champ	1	1 à 25%	1
26 - 50% surface/champ	2	26 à 50%	2
51 - 75% surface/champ	3	51 à 75%	3
> 75% surface/champ	4	> 75%	4

### 3.3 Résultats

#### 3.3.1 Observations macroscopiques

Les analyses macroscopiques ont été réalisées sur les fémurs et les tibias des rats issus des 3 groupes : Groupe A (SHAM + sérum physiologique), Groupe B (LCA + sérum physiologique) et Groupe C (LCA + cellules). Les observations ont été réalisées sur les 8 rats de chaque groupe, cependant, une seule image représentative est présentée. Les photos des articulations du genou droit sont présentées sur la **Figure 28A**. Nous avons également réalisé un score macroscopique selon le score modifié de Guingamp [396]. Les résultats sont présentés sur la **Figure 28B**.



**Figure 28 : L'injection de CSMs-LS ne prévient pas l'apparition de lésions arthrosiques au niveau macroscopique.**

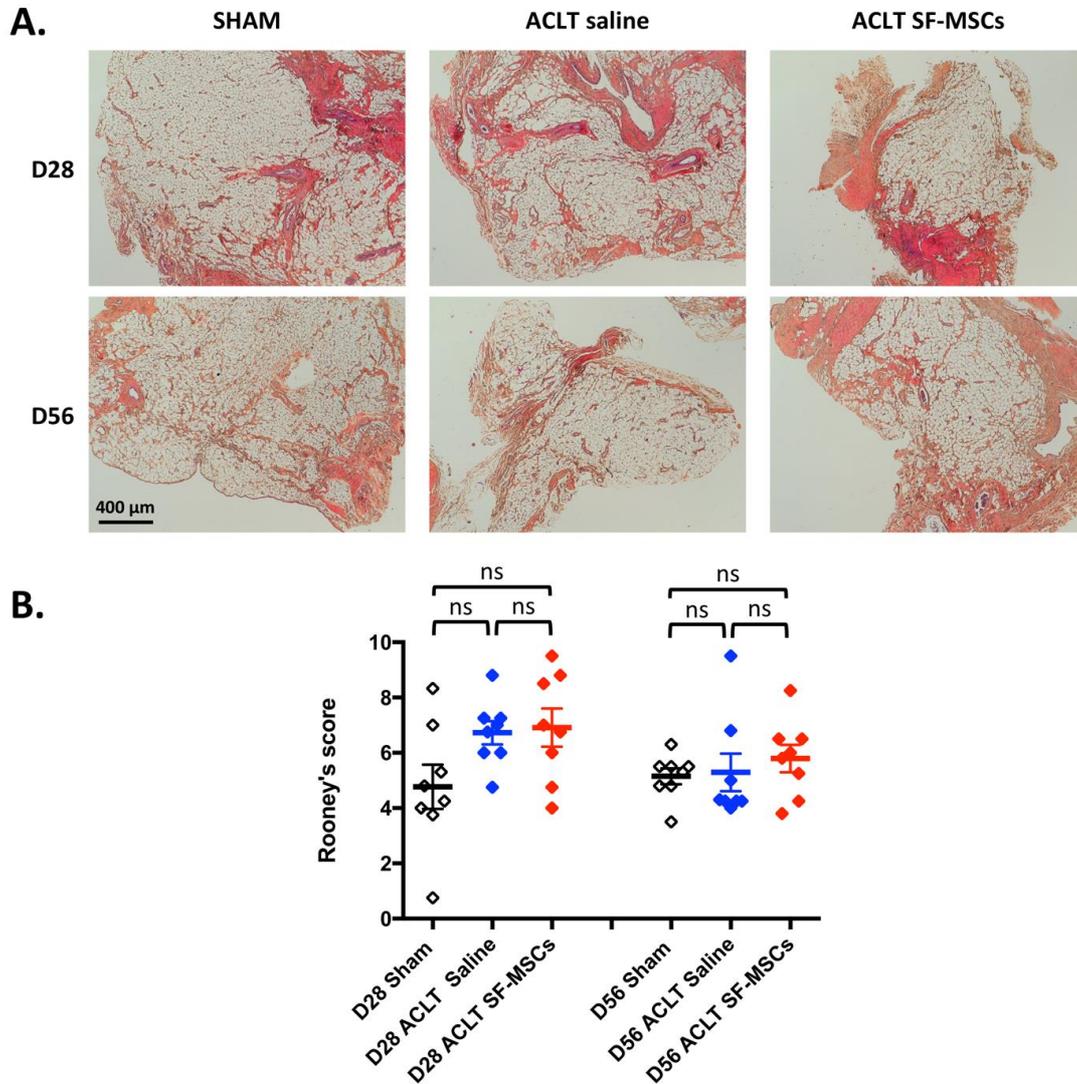
Les genoux des rats ont été disséqués de façon à isoler les fémurs et les tibias puis observés à la loupe binoculaire 28 (D28) et 56 (D56) jours après induction du modèle d'arthrose (A) pour les groupes SHAM (opération sans section du ligament croisé antérieur), ACLT saline (section du LCA et injection de sérum physiologique) et ACLT SF-MSCs (section du LCA et injection de CSMs-LS). La barre d'échelle représente 2 mm. Un score macroscopique a été réalisé (B). Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne +/- écart type (n=8). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test non paramétrique de Bonferroni.

Pour la condition témoin (SHAM), les fémurs et les tibias présentent un cartilage d'apparence normale quel que soit le temps d'étude (28 ou 56 jours). Concernant le modèle d'arthrose par section du ligament croisé antérieur (ACLT saline), nous observons sur les fémurs et les tibias de faibles érosions au niveau du condyle interne pour les deux temps d'étude. L'injection de cellules (ACLT SF-MSCs) ne permet pas d'éviter l'apparition des lésions arthrosiques. Ces analyses visuelles sont confirmées par le score macroscopique (**Figure 28B**). En effet, à J28 et à J56, le modèle de LCA va induire une hausse significative du score en comparaison au témoin SHAM. Cependant, aucune différence significative n'est observée entre le groupe ACLT saline et ACLT SF-MSCs.

### 3.3.2 Évaluation de l'inflammation synoviale

Une analyse histologique grâce une coloration HES a été réalisée sur les membranes synoviales des rats issues des 3 groupes : Groupe A (SHAM + sérum physiologique), Groupe B (LCA + sérum physiologique) et Groupe C (LCA + cellules). Les observations ont été réalisées sur les 8 rats de chaque groupe, cependant, une seule image représentative est présentée. Les résultats sont présentés sur la **Figure 29A**. Nous avons également réalisé un score modifié de Rooney [398] afin d'évaluer le degré d'inflammation synoviale. Les résultats sont présentés sur la **Figure 29B**.

Aucune différence de structure des membranes synoviales n'est observée entre les différents groupes ainsi que pour les différents temps d'étude. Nous n'observons ni fibrose, ni dépôt de fibrine, ni infiltration péri-vasculaire et cellulaire diffuse. Ces résultats sont confirmés par le score modifié de Rooney (**Figure 29B**) qui ne montre aucune différence significative.



**Figure 29 : Le modèle d'arthrose et l'injection de CSMs-LS n'induisent pas d'inflammation synoviale.**

Les membranes synoviales des rats pour les groupes SHAM (opération sans section du ligament croisé antérieur), ACLT saline (section du LCA et injection de sérum physiologique) et ACLT SF-MSCs (section du LCA et injection de CSMs-LS) ont été isolées, fixées puis incluses en paraffine 28 et 56 jours après induction du modèle d'arthrose. Des coupes sagittales ont été colorées par de l'Hématoxyline Éosine Safran (A). La barre d'échelle représente 400 $\mu$ m. Le degré d'inflammation synoviale a été évalué par un score histologique modifié de Rooney (B). Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne  $\pm$  écart type (n=8). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test non paramétrique de Bonferroni.

### 3.3.3 Évaluation des lésions arthrosiques

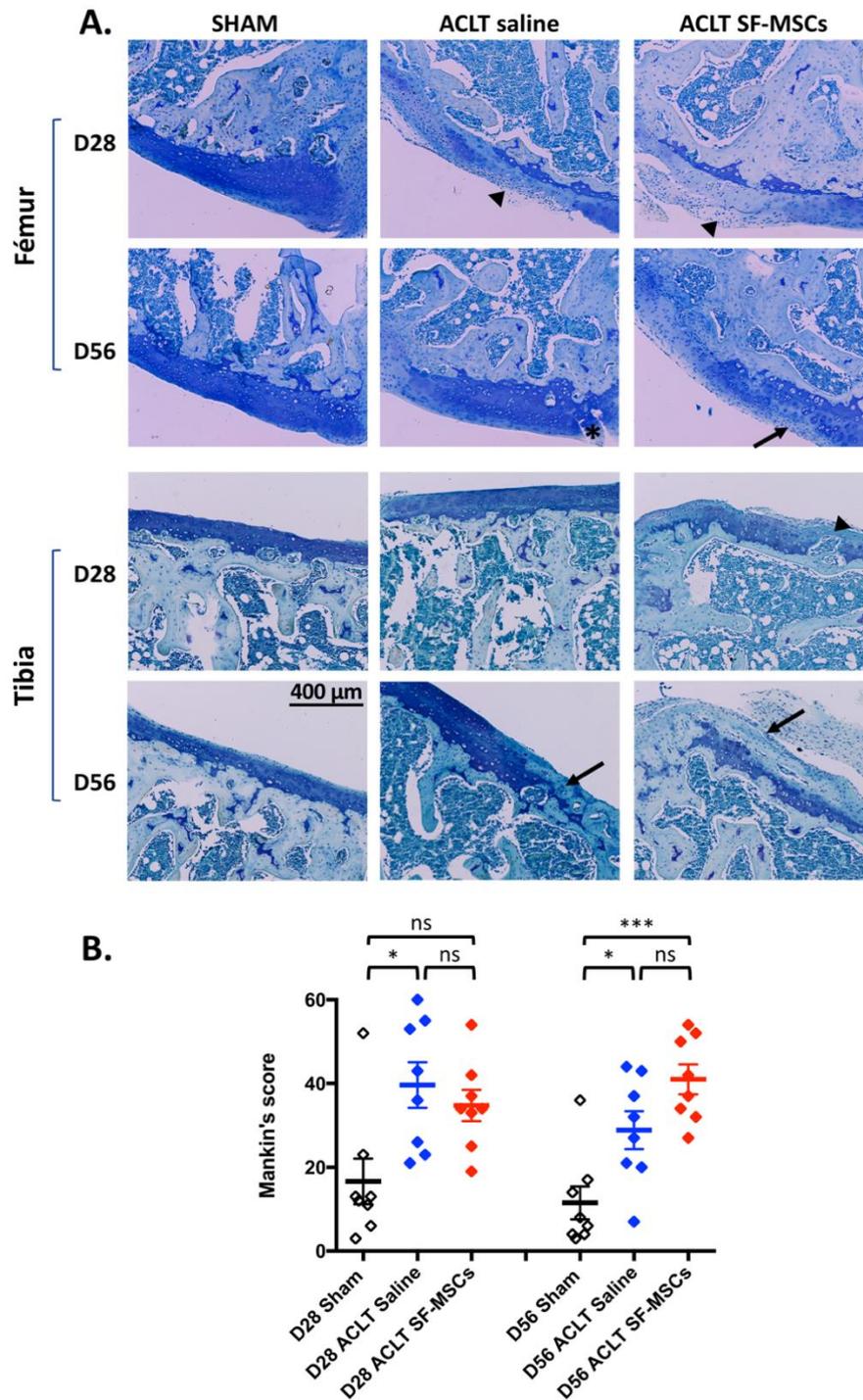
Une analyse histologique a été réalisée sur les fémurs et les tibias des rats issus des 3 groupes : Groupe A (SHAM + sérum physiologique), Groupe B (LCA + sérum physiologique) et Groupe C (LCA + cellules). Les observations ont été réalisées sur les 8 rats de chaque groupe, cependant, une seule image représentative de chaque groupe est présentée. Les résultats obtenus pour la coloration au bleu de toluidine sont présentés sur la **Figure 30A**. Nous avons également réalisé un score semi-quantitatif adapté des critères de Mankin [397] afin d'évaluer le degré des lésions cartilagineuses. Les résultats sont présentés sur la **Figure 30B**.

Pour le groupe SHAM, les condyles fémoraux internes et les plateaux tibiaux internes ne présentent aucune anomalie structurale. Le cartilage possède une surface lisse et nous n'observons pas de remaniement osseux pour les deux temps d'étude.

La section du LCA va entraîner après 28 jours une érosion de la surface du cartilage et une décoloration modérée du bleu de toluidine au niveau du condyle fémoral interne (pointe de flèche), mais aucune variation n'est observée au niveau du plateau tibial. Après 56 jours, une fissure est observée au niveau fémoral (astérisque) ainsi qu'un remaniement osseux au niveau tibial (flèche).

L'injection des cellules issues du liquide synovial dans notre modèle de lésions diffuses (ACLT SF-MSCs) est inopérante sur l'évolution de l'arthrose. Nous observons une érosion de la surface cartilagineuse et une décoloration forte du bleu de toluidine traduisant une baisse du contenu en protéoglycanes de la matrice cartilagineuse (pointe de flèche) après 28 jours au niveau fémoral. Des résultats similaires sont observés au niveau du plateau tibial avec également un remaniement osseux (pointe de flèche). 56 jours après l'induction du modèle, nous observons une légère décoloration au niveau fémoral (flèche) ainsi qu'une érosion de la surface articulaire, un remaniement osseux et une très forte décoloration au niveau du plateau tibial interne (flèche).

Les résultats obtenus à l'aide du score semi-quantitatif modifié de Mankin (**Figure 30B**) sont en accord avec nos observations. La section du ligament croisé antérieur entraîne une augmentation significative des lésions cartilagineuses à 28 et 56 jours. L'injection des cellules n'entraîne pas de modifications significatives du degré des lésions en comparaison au modèle de section du LCA (ACLT saline) à 28 comme à 56 jours.



**Figure 30 : L'injection de CSMs-LS ne permet pas de prévenir l'apparition de lésions arthrosiques au niveau histologique.**

Les fémurs et les tibias des rats pour les groupes SHAM (opération sans section du ligament croisé antérieur), ACLT saline (section du LCA et injection de sérum physiologique) et ACLT SF-MSCs (section du LCA et injection de CSMs-LS) ont été isolés, fixés, décalcifiés puis inclus en paraffine 28 et 56 jours après induction du modèle d'arthrose. Des coupes sagittales ont été colorées par du bleu de Toluidine (A). Les photos représentent les condyles fémoraux internes et les plateaux tibiaux internes. La barre d'échelle représente 400μm. La sévérité des lésions a été évaluée par un score histologique adapté de Rooney (B). Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne +/- écart type (n=8). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test non paramétrique de Bonferroni.

### 3.4 Discussion

---

Dans les parties précédentes, nous avons démontré que les cellules adhérentes issues du liquide synovial de patients atteints d'arthrose correspondent à la définition de cellules souches mésenchymateuses définies par l'ISCT [110]. Nous avons également montré que ces cellules possèdent des capacités de différenciation chondrogénique lorsqu'elles sont ensemencées dans une éponge de collagène sous l'influence de TGF- $\beta$ 1 et - $\beta$ 3 seul ou en association avec la BMP-2.

Ensuite, nous avons évalué les potentialités des CSMs issues du liquide synovial dans le cadre d'une thérapie cellulaire pour le traitement des lésions diffuses du cartilage induites par section du ligament croisé antérieur chez le rat "*nude*". Les résultats obtenus ont montré que deux injections intra-articulaires de 1 million de CSMs-LS ne permet pas de prévenir l'apparition des lésions arthrosiques. Malgré une absence d'effet préventif sur l'aggravation des lésions diffuses arthrosique, les injections de cellules n'ont pas engendré de réponse inflammatoire articulaire, de synovite ou de métaplasie.

Peu d'études expérimentales *in vivo* sont disponibles dans la littérature. Aucune étude n'a utilisé des CSMs-LS sur un modèle induit d'arthrose diffuse par section du ligament croisé antérieur isolé chez le rat. L'ensemble des études *in vivo* publiées ont été menées sur des défauts focaux de type chondraux ou ostéochondraux. Ces différents travaux ont mis en évidence des capacités de réparation des cellules lorsqu'elles sont associées avec des biomatériaux. Dans le cadre d'une greffe xénogénique, l'utilisation de CSMs-LS équines ensemencées dans des gels d'agarose a permis la réparation de défaut articulaire de 2 mm de diamètre au niveau du sillon trochléen chez le rat [225]. Le tissu de réparation obtenu était de type cartilage hyalin avec une forte expression de collagène de type II. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'utilisation de CSMs-LS humaines encapsulées dans un hydrogel réticulé à base de PEGDA et d'acide hyaluronique 8 semaines après implantation chez le rat [226]. De plus, l'association de CSMs-LS autologues avec du plasma riche en plaquettes dans un hydrogel thermosensible a permis de mettre en évidence de grandes capacités de réparation ainsi qu'une maturation en chondrocytes à 4 et 8 semaines après implantation chez le porc [224].

Enfin, des résultats similaires ont été observés chez le lapin avec l'injection de CSMs-LS autologues [223]. L'ensemble de ces études met donc en évidence des capacités de réparation des CSMs-LS dans le cadre de défaut cartilagineux. Les cellules d'origine synoviale semblent donc plus adaptées à la réparation de défauts cartilagineux plutôt que des lésions diffuses arthrosiques. En effet, l'injection par voie intra-articulaire de CSMs issues de la membrane synoviale dans un modèle de défaut ostéochondral niveau du sillon fémoral chez des rats Sprague Dawley a permis une réparation de type cartilage hyalin [188]. De plus, des résultats similaires ont été obtenus sur un modèle de lésions focales chez des souris C57BL6 après une injection unique de CSMs-MS allogéniques [191].

Un travail récent a montré qu'une seule injection de CSMs issues de la membrane synoviale était inefficace sur le développement de lésions arthrosiques dans un modèle d'arthrose par section du LCA chez le rat Lewis. Cependant, une injection hebdomadaire pendant 8 ou 12 semaines permettait de diminuer significativement le score OARSI [399]. De plus, il a été montré que le nombre de cellules injectées par voie intra-articulaire baissait rapidement après injections ce qui va donc limiter les effets bénéfiques des cellules dans l'articulation [400],

[401]. Le traitement des cellules avant injection avec des facteurs inflammatoires n'influence pas les capacités d'adhésion des cellules sur le cartilage dans un modèle d'arthrose induit par le MIA après injection chez le rat Wistar. Pour le même modèle, l'injection intra-articulaire de CSMs issues de la moelle osseuse allogénique a permis une diminution de la douleur, mais aucune efficacité n'a été constatée sur l'apparition des lésions arthrosiques [130]. Chez le lapin, un traitement des lésions à la chondroïtinase ABC a permis un meilleur attachement des cellules au cartilage 7 jours après injection [402].

Le préconditionnement cellulaire pourrait être une voie à explorer pour une meilleure efficacité en ingénierie cellulaire du cartilage par injection des cellules en intra-articulaire. Ce préconditionnement des cellules a déjà été utilisé en ingénierie tissulaire du cartilage afin de préparer les cellules à l'implantation. Chez le petit animal, la culture en hypoxie durant les phases d'expansion a permis d'obtenir, après implantation, une MEC cartilagineuse de meilleure qualité que les cellules cultivées en normoxie. De plus, les substituts cultivés en normoxie présentaient une hyperplasie plus importante [386]. Cependant, des résultats contradictoires sont trouvés dans la littérature. Dans leurs conditions expérimentales, Portron *et al.* ont montré que la culture en hypoxie n'impactait pas la qualité de la réparation cartilagineuse après implantation chez le lapin en comparaison à la normoxie [308]. Des résultats similaires ont récemment été obtenus chez le mouton [403]. Enfin, il a été montré, après implantation en sous cutané des substituts, que les CSMs étaient dans un environnement anoxique qui engendrait une adaptation métabolique des cellules (glycolyse anaérobie) et une mort rapide des cellules suite à l'épuisement de leur réserve de glucose [404]. Malgré des différences entre les techniques d'ingénierie tissulaire et cellulaire, un préconditionnement des cellules est nécessaire pour augmenter le temps de résidence des cellules au sein de l'articulation.

Notre modèle est basé sur l'injection de CSMs xénogéniques humaines chez le rat. Il a été montré dans la littérature que l'injection répétée de cellules souches mésenchymateuses allogéniques peut engendrer une réaction indésirable [405]. Pour ces raisons, nous avons choisi de travailler sur un modèle de rat "*nude*" immunodéprimé pour limiter le rejet lié à l'injection des cellules humaines (greffe xénogénique). Cette souche de rat présente des réactions inflammatoires réduites. Ainsi, la phase inflammatoire présente dans les phases précoces de ce modèle est quasi inexistante et par conséquent notre modèle d'arthrose par section du ligament croisé antérieur présente des lésions moins sévères que chez un rat Wistar [406]. Cette espèce a déjà été utilisée pour : 1) évaluer l'effet d'une implantation de chondrocytes humain de troisième génération dans un modèle associant un modèle d'arthrose par section du ligament croisé antérieur et un défaut focal du cartilage au niveau du sillon rotulien [407], 2) évaluer les propriétés régénératrices du cartilage des CSMs. Il a été montré que l'injection intra-articulaire de CSMs humaines étaient chondroprotectrices dans un modèle d'arthrose induit par une ménisectomie médiale [408], 3) évaluer les capacités de réparation de réparation de lésions diffuses de CSMs dérivées du muscle dans un modèle d'arthrose induite par le MIA chez le rat "*nude*" [409], [410].

Cependant, et de façon surprenante, aucune de ces études ne s'est intéressée à la synovite. Dans notre expérience, il n'y a pas de réaction inflammatoire notamment dans notre témoin positif (section du LCA + solution saline). Des expériences antérieures réalisées au laboratoire sur ce modèle chez des rats Wistar ont montrées une inflammation de la membrane synoviale dans le groupe LCA [411], [412]. Récemment, Leijts *et al.* ont montré l'absence de différence significative de l'attachement des CSMs de moelle osseuse sur le cartilage ou dans le tissu synovial dans des articulations de rats Wistar sains ou arthrosiques (induit par le MIA avec

une inflammation synoviale significative) [413]. Ces résultats suggèrent que l'inflammation synoviale n'est pas une condition nécessaire et obligatoire pour activer les propriétés trophiques des CSMs injectées ou implantées en site articulaire.

Enfin, la dose de CSMs injectée a été déterminée en fonction de la littérature. Cependant, il n'y a aucun consensus concernant la dose et le timing pour l'injection [414]. De plus, après une injection intra-articulaire, les CSMs, via leurs activités anti-inflammatoires et anti-apoptotiques, exercent une activité analgésique au détriment d'une protection articulaire structurelle [130], [415]. Actuellement, aucune étude clinique n'a été publiée sur la régénération du cartilage avec l'utilisation de CSMs-LS

### **3.5 Conclusions**

---

Malgré des capacités de différenciation chondrogénique montrées dans la partie 2 de ce travail de thèse, deux injections d'un million de CSMs issues du liquide synovial ne permettent pas de prévenir l'apparition des lésions diffuses dans un modèle d'arthrose induit par une section du ligament croisé antérieur. Cependant, nous avons montré l'innocuité de notre procédure expérimentale, car elle n'induit ni synovite ni métaplasie au sein de l'articulation.

# **Conclusions et perspectives**

Dans ce travail de thèse, nous avons caractérisé les cellules issues du liquide synovial et de la membrane synoviale. Les conditions de culture nécessaires à l'obtention d'un substitut cartilagineux ont également été mises au point pour l'ensemble des contingents étudiés. Par contre, dans nos conditions expérimentales, nous avons montré que l'injection intra-articulaire de CSMs issues du liquide synovial ne permettait pas de prévenir l'apparition des lésions arthrosiques chez le rat "nude".

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des cellules lors des phases d'expansion. Malgré une hétérogénéité observée entre les différents patients étudiés, les cellules présentent les caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses. En effet, les cellules expriment les marqueurs de surface cellulaire CD73, CD90 et CD105, cocktail défini comme caractéristique des CSMs, ainsi que des capacités de différenciation vers les voies ostéogénique, adipogénique et chondrogénique. De plus, les cellules possèdent une expression relative très faible des gènes d'intérêt du cartilage traduisant la conservation du caractère indifférencié de nos CSMs lors des phases d'expansion en monocouche. Cette caractérisation peut être complétée par une analyse plus fine de nos cellules avec une étude du profil épitranscriptomique et protéomique des contingents cellulaires. Ainsi, nous pourrions définir un profil type de cellules permettant d'obtenir une différenciation optimale en trois dimensions parmi ces populations hétérogènes. De plus, cette signature moléculaire pourrait permettre de définir des marqueurs précoces du processus de différenciation chondrogénique en 3 dimensions et de la maîtriser en évitant un engagement des cellules vers l'hypertrophie.

Dans un second temps, nous avons défini les conditions environnementales optimales nécessaires à la production d'un substitut cartilagineux. Les CSMs provenant des différents contingents ont étéensemencées dans des éponges de collagène et cultivées pendant 28 jours. La chondrogenèse a été induite par l'utilisation de facteurs de croissance tels que TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 3 seuls ou en association avec la BMP-2 en conditions normoxique ou hypoxique. L'évaluation des substituts *in vitro* a montré des capacités de différenciation chondrogénique pour les trois contingents cellulaires. Malgré une différenciation chondrogénique moindre des CSMs d'origine synoviale (membrane synoviale et liquide synovial) en comparaison aux CSMs ostéomédullaires, il est intéressant de montrer les capacités de différenciation chondrogénique des CSMs-LS malgré le peu de cellules présentes initialement, rendant possible l'utilisation de ces cellules pour l'ingénierie du cartilage. De façon surprenante, et après 28 jours de culture, l'hypoxie n'a pas d'effet sur la synthèse matricielle au sein des biomatériauxensemencés avec les différentes sources de CSMs étudiées. De plus, nous n'avons pas montré de différence significative de l'induction de la différenciation chondrogénique par les différents facteurs de croissance utilisés. Quel que soit le type cellulaire étudié, le TGF- $\beta$ 1 seul associé à une culture en normoxie permet d'obtenir un substitut cartilagineux de bonne qualité. Enfin, aucune calcification n'a été observée pour les trois contingents cellulaires quelles que soient les conditions de culture. Le maintien du phénotype chondrogénique doit être évalué sur un temps de culture plus long (56 jours). L'hypoxie, connue pour assurer ce maintien, peut donc avoir un rôle à un stade plus tardif lors de la maturation *in vitro* du substitut. Les CSMs-MS sont également décrites comme moins propices à une hyperplasie osseuse que les CSMs issues de la moelle osseuse. De plus, le comportement *in vivo* des substituts doit être analysé par implantation intra-articulaire au sein de défauts chondraux chez le rat "nude" pour évaluer les capacités de réparation des substituts produits.

Dans un troisième temps, nous avons montré que deux injections intra-articulaires d'un million de CSMs-LS à 1 semaine d'intervalle n'ont pas permis de prévenir l'apparition des lésions

arthrosiques chez le rat *“nude”*. Cependant, nous avons montré l’innocuité de la procédure, car elle n’induit ni synovite ni métaplasie au sein de l’articulation. L’injection intra-articulaire de CSMs issues du liquide synovial n’avait jamais été testée auparavant. Certains paramètres sont aujourd’hui vivement discutés dans la communauté scientifique. Ainsi, la dose de cellules, le nombre d’injections et un préconditionnement lors de la phase d’expansion en monocouche pourront être adaptés pour voir des effets sur le développement des lésions arthrosique. Enfin, la majorité des études en ingénierie cellulaire du cartilage sont développées par une combinaison de cellules avec un hydrogel. L’acide hyaluronique, composant majeur du liquide synovial, nous apparait comme un supplément adapté pour l’injection des CSMs-LS mais d’autres suppléments peuvent être envisagés.

# **Publication dans une revue à comité de lecture**

RESEARCH

Open Access



# In vitro and in vivo potentialities for cartilage repair from human advanced knee osteoarthritis synovial fluid-derived mesenchymal stem cells

Paul Neybecker<sup>1</sup>, Christel Henrionnet<sup>1</sup>, Elise Pape<sup>1</sup>, Didier Mainard<sup>1,2</sup>, Laurent Galois<sup>1,2</sup>, Damien Loeuille<sup>1,3</sup>, Pierre Gillet<sup>1</sup> and Astrid Pinzano<sup>1,3\*</sup> 

## Abstract

**Background:** Mesenchymal stem cells (MSCs) are found in synovial fluid (SF) and can easily be harvested during arthrocentesis or arthroscopy. However, SF-MSC characterization and chondrogenicity in collagen sponges have been poorly documented as well as their hypothetical in vivo chondroprotective properties with intra-articular injections during experimental osteoarthritis (OA).

**Methods:** SF-MSCs were isolated from human SF aspirates in patients suffering from advanced OA undergoing total knee joint replacements. SF-MSCs at passage 2 (P2) were characterized by flow cytometry for epitope profiling. SF-MSCs at P2 were subsequently cultured in vitro to assess their multilineage potentials. To assess their chondrogenicity, SF-MSCs at P4 were seeded in collagen sponges for 4 weeks under various oxygen tensions and growth factors combinations to estimate their gene profile and matrix production. Also, SF-MSCs were injected into the joints in a nude rat anterior cruciate ligament transection (ACLT) to macroscopically and histologically assess their possible chondroprotective properties.

**Results:** We characterized the stemness (CD73+, CD90+, CD105+, CD34-, CD45-) and demonstrated the multilineage potency of SF-MSCs in vitro. Furthermore, the chondrogenic induction (TGF- $\beta$ 1  $\pm$  BMP-2) of these SF-MSCs in collagen sponges demonstrated a good capacity of chondrogenic gene induction and extracellular matrix synthesis. Surprisingly, hypoxia did not enhance matrix synthesis, although it boosted chondrogenic gene expression (*ACAN*, *SOX9*, *COL2A1*). Besides, intra-articular injections of xenogenic SF-MSCs did exert neither chondroprotection nor inflammation in ACLT-induced OA in the rat knee.

**Conclusions:** Advanced OA SF-MSCs seem better candidates for cell-based constructs conceived for cartilage defects rather than intra-articular injections for diffuse OA.

**Keywords:** Synovial fluid, Stem cells, Collagen sponge, Cartilage, Tissue engineering

\* Correspondence: [astrid.pinzano@univ-lorraine.fr](mailto:astrid.pinzano@univ-lorraine.fr)

<sup>1</sup>UMR 7365 CNRS-UL, IMoPA (Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire), Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus Beaulieu-Santé, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP 20199, 54505 Vandœuvre-Lès-Nancy, France

<sup>2</sup>Service de Rhumatologie, CHRU de Nancy, Hôpitaux de Bisbois, Bâtiment des Spécialités Médicales, 5 rue du Morvan, F54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Background

Articular cartilage has a very limited self-healing potential. Articular cartilage defects are a common problem in orthopedic surgery and can lead to osteoarthritis (OA). Many cells-based treatment strategies for cartilage lesions were developed, and autologous chondrocyte implantation (ACI) is a standard treatment for focal chondral lesions repair [1]. However, ACI has disadvantages and leads to the formation of fibrotic and hypertrophic cartilage and possible donor site morbidity by risk of OA development [2].

For cartilage engineering, chondrocytes, the unique specialized resident cells of cartilage, seem to be the best candidate. However, significant inconvenients of this contingent can be listed: cartilage biopsy is an invasive act, the number of chondrocytes is very low, and there is a rapid dedifferentiation during the monolayer cell expansion [3, 4]. For two decades, mesenchymal stem cells (MSCs) are studied as an interesting alternative source of cells for cartilage engineering due to their self-renewal capacity, their accessibility, and their multilineage differentiation capacity. MSCs can be isolated from different adult tissues such as bone marrow, adipose tissue, and synovium or from fetal tissues such as Wharton's jelly [3].

The synovial fluid (SF) also represents a novel source of cells for cartilage therapeutic approaches. In fact, SF is easily harvested during arthrocentesis, arthroscopy, or knee surgery. Many studies show the multilineage differentiation of cells from SF in human [5, 6], in horse [7], or in bovine SF [8]. Moreover, it was recently demonstrated that the chondrogenic differentiation is equivalent between equine bone marrow MSCs and equine SF-MSCs and even more potent in pigs [9, 10]. All these studies confirmed the stemness of SF cells, so-called SF-MSCs, in accordance with the criteria of the International Society for Cellular Therapy [11].

However, the SF-MSCs lineage of is not yet clearly elucidated but it is commonly accepted that their origin comes from different tissues in the knee, like cartilage or notably synovium tissue [12]. SF-MSCs are found at higher concentration in OA joint and in joint with meniscal or ligaments injuries than in healthy joints [6, 8, 12–14]. These SF-MSCs display several advantages: (i) they can be easily collected by knee joint puncture, a minimally invasive act, during the SF effusion; (ii) they allow to use autologous cells; (iii) they have already an articular commitment inherent to their joint origin and integrated joint constraints (hypoxia, mechanical stresses); and (iv) they show immunoregulatory and immunosuppressive properties [13, 15].

Concerning cartilage engineering, apart the cell source and the scaffold used, the quality of a chondral implant relies especially on two conditions: (i) the cocktail of growth factors used and (ii) the oxygen tension. Different studies showed that TGF- $\beta$  family stimulates MSCs-driven

chondrogenic differentiation [16–18]. On the other hand, many papers have demonstrated that a low-oxygen tension (3–5%) promotes MSC-driven chondrogenic differentiation [19–21].

The objective of this study is to explore the potentialities of an original cell source of MSCs derived from synovial fluid (SF-MSCs) from OA patients undergoing total knee joint replacement (i) to produce cartilage tissue-engineered substitutes to treat focal lesions of cartilage and (ii) the potentialities of intra-articular (i.a.) injections of SF-MSCs to treat experimental knee OA diffuse lesions in the rat. To this end, we isolated and characterized resident cells present in synovial fluid issued from OA patients. We investigated human OA SF-MSCs differentiation potential to produce cartilaginous tissue-engineered substitutes after 28 days inside 3D collagen sponges under the influence of growth factors (TGF- $\beta$ 1 and/or BMP-2) and oxygen tension (normoxia or hypoxia). Additionally, we studied the influence of repeated i.a. SF-MSCs injections in a model of anterior cruciate ligament transection in nude rats.

## Methods

### Isolation and expansion of mesenchymal stem cells issued from synovial fluid

Human synovial fluid from the knee was obtained from severe knee OA patients undergoing total knee replacement surgery (Kellgren Lawrence score 3–4). All subjects enrolled in this research have responded to an informed consent which has been approved by our Institutional Committee on Human Research (2014, July 10, #DC-2014-2148), and this protocol has been found acceptable by them.

SF samples were diluted at 1:6 in a proliferation medium and plated in 55-cm<sup>2</sup> Petri dishes. After 3 or 4 days, the medium was changed to remove the non-adherent cells. The cells were cultured in a proliferation medium containing Dulbecco's modified Eagle's medium with low glucose (DMEM-LG, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma), 1 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF, Miltenyi Biotec), 1% glutamine (Gibco), and 1% penicillin-streptomycin (Gibco). The dishes were cultured at 37 °C with 5% of humidified CO<sub>2</sub>. The medium was unchanged for the initial 3 days and then changed twice per week until confluence. The non-adherent cells were discarded with sequential changes of medium. When the adherent cells reached around 80% of confluence, MSCs were trypsinized (trypsin-EDTA 0.05% Gibco) and plated at a density of  $0.5 \times 10^6$  cells/flask. The medium was changed the following day and then every 2–3 days.

During the last passage (P3) before seeding the cells in collagen sponges, a pre-differentiation step was performed. SF-MSCs were cultured with differentiation medium composed of a Dulbecco's modified Eagle's

medium with high glucose (DMEM-HG, Gibco) supplemented with sodium pyruvate (110 µg/ml), bFGF (1 ng/ml), 1% penicillin-streptomycin (Gibco), and chondrogenic supplements: proline (40 µg/ml, Sigma), L-ascorbic acid-2-phosphate (50 µg/ml, Sigma), and dexamethasone ( $10^{-7}$  M, Sigma).

#### Flow cytometric analysis of SF-MSCs

At the end of the second passage, the cell samples were washed with a blocking solution (0.5% BSA (A-9667 Sigma Aldrich, France) in 1× PBS) and distributed at 500,000 cells by tube. The cells were centrifuged (300g, 5 min) and the pellets were resuspended in an immunoblotting solution containing either different pairs of antibodies [anti CD45 (BD Pharmingen)/anti CD34 (BD Pharmingen), anti CD73 (BD Pharmingen)/anti HLA-DR (Beckman Coulter), anti CD90 (Beckman Coulter)/anti-CD105 (Beckman Coulter)] or 100 µL of blocking solution as our negative control. After 45 min incubation (4 °C, in the dark), the cells were washed with PBS (Gibco) and centrifuged (300g, 5 min). Pellets were resuspended in 300 µL of PBS and tubes analyzed to flow cytometer (Gallios, Beckman Coulter).

#### Trilineage differentiation potential of SF-MSCs (pellets)

##### Chondrogenesis

After two monolayer passages, SF-MSCs were trypsinized and centrifuged ( $0.5 \times 10^6$  cells per pellet) at 300 g for 10 min in 15 mL tubes. Pellets were cultivated in a chondrogenic medium containing TGF-β1 (10 ng/mL, Miltenyi Biotec) in DMEM-HG (4.5 g/L, Invitrogen) supplemented with L-ascorbic acid 2-phosphate (50 µg/ml, Sigma), sodium pyruvate (100 mM, Invitrogen), proline (40 µg/ml, Sigma), dexamethasone ( $10^{-7}$  M, Sigma), 1% penicillin-streptomycin (Gibco), and ITS+premix (Beckton Dickinson) and supplemented with TGF-β1 (10 ng/mL, Miltenyi Biotec). After 28 days of culture, the pellets were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma) during 24 h at 4 °C, dehydrated, embedded in paraffin, and cut into 5-µm-thick sections with a microtome. Slides were stained with alcian blue to observe proteoglycan content.

##### Adipogenesis

After two monolayer passages, SF-MSCs were seeded in 24-well plates at 5000 cells per well and cultured in the adipogenic medium for 21 days. Adipogenic medium is composed by DMEM-HG (4.5 g/L; Gibco) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS, Sigma), 2 mM Glutamax (Gibco), 1% penicillin-streptomycin (Gibco) 110 µg/mL sodium pyruvate (Gibco), 1 µM dexamethasone (Sigma), 5 µg/mL insulin (Sigma), 500 µM isobutyl-methyl-xanthine (Sigma), and 0.2 mM indomethacin (Sigma). After 21 days of culture, the cells were washed with PBS twice, fixed with 4% paraformaldehyde

during 30 min, and rinsed with water with 60% isopropanol and were stained with Oil red O (Sigma) during 30 min to detect lipid vacuoles.

##### Osteogenesis

After two monolayer passages, SF-MSCs were seeded in 24-well plates at 10,000 cells per well and cultured in osteogenic medium for 21 days. Osteogenic medium is composed of high-D-glucose (4.5 g/L) DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS, Sigma), 2 mM glutamine (Gibco), 110 µg/mL sodium pyruvate (Gibco), 1% penicillin-streptomycin (Gibco), 50 µg/mL L-ascorbic acid 2-phosphate (Sigma), 100 nM dexamethasone (Sigma), and 10 mM β-glycerophosphate (Sigma). After 21 days of culture, the cells were washed with PBS (Gibco) and fixed with 4% paraformaldehyde during 30 min and calcium deposits were stained with Alizarin Red S (Sigma) during 5 min.

##### 3D cell seeding in collagen sponges

The biomaterials used are made of type III and I collagen sponges (95% of type I collagen; diameter 5 mm, thickness 2 mm) manufactured by "Symatèse Biomatériaux" company (Chaponost, France). The cells were seeded into sponges at P4 (passage 4) at the density of 0.5 million cells per sponges and plated in a 48-well plate at 37 °C in humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> (v/v). The sponges were divided into two groups and cultured in normoxia (20% O<sub>2</sub>, v/v) or in hypoxia (5% O<sub>2</sub>, v/v). The chondrogenic differentiation medium was DMEM-HG (4.5 g/L) supplemented with 1% glutamine (Gibco), 1% streptomycin and penicillin (Gibco), 40 µg/ml proline (Sigma), 50 µg/ml L-ascorbic acid-2-phosphate (Sigma),  $10^{-7}$  M dexamethasone (Sigma), and 1% sodium pyruvate (Gibco). For both groups (normoxia and hypoxia), the sponges were treated from day 3 either (i) with ITS 1% (Insulin-Transferrin-Selenium; ITS+premix, BD) as control, versus (ii) ITS 1% + 100 ng/mL BMP-2 (Miltenyi Biotec) or (iii) ITS 1% + 10 ng/mL TGF-β1 (Miltenyi Biotec) or (iv) ITS + TGF-β1 + BMP-2 in combination. The sponges were harvested on D28 for analysis.

##### Real-time RT-PCR analysis

After 28 days for each condition, the chondrogenic differentiation of SF-MSC was assessed by mRNA expression levels of RPS29 (housekeeping gene—NM\_001032), type II collagen (*COL2A1*—NM\_001844), isoform 2B (*COL11B*—NM\_033150.2), type I collagen (*COL1A1*—NM\_000088.3), aggrecan (*ACAN*—NM\_001135), versican (*VCAN*—NM\_001164098), *COMP* (NM\_000095), *SRY* (sex determining region Y)-box 9 (*SOX9*—NM\_000346), runt-related transcription factor 2 (*RUNX2*—NM\_001278478) and osteocalcin (*BGLAP*—NM\_199173). The total cell RNA was extracted using the RNeasy mini kit (QIAGEN),

according to the manufacturer's instructions. Quantitative real-time polymerase chain reaction primers are detailed in Table 1. The RNA was quantified spectrophotometrically and reverse transcribed with the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. After cDNA synthesis, quantitative RT-PCR was performed with a Lightcycler (Applied Biosystems). cDNA of each gene was obtained according to the manufacturer's instructions (Qiagen, purification kit), quantified, then diluted to obtain a standard curve of the  $10^{-3}$  to  $10^{-6}$  µg/mL range, which allows the quantification of the expression of the gene of interest. For each condition, the signal of the *RPS29* housekeeping gene was determined once for each cDNA sample, and this was used to normalize the results for all other genes. For standardization of gene expression levels, results were expressed as a ratio of the mRNA level of each gene of interest over the *RPS29* gene.

#### Biochemical analysis of cartilaginous tissue-engineered substitutes for GAG content

Sponge lysates obtained after digestion for molecular biology were used to determine GAGs content. This technique is based on a colorimetric assay using dimethylmethylene blue (DMB, Sigma) dye according to Goldberg's method [22]. The absorbance was measured at 525 nm with spectrophotometer (Dynatech) and compared to standard curve of chondroitin sulfate from shark cartilage.

#### Histological analysis of cartilaginous tissue-engineered substitutes

At D28, the collagen sponges were fixed with 4% PFA for 24 h at 4 °C, embedded in paraffin, and cut into 5-µm thick sections with Leica microtome (RM 2135, Leica). The slides were stained with Hematoxylin-?>Erythrosin (Sigma) for morphology, with alcian blue (Sigma) for proteoglycan content, with Sirius red (Sigma) for collagen content and observed with polarized light microscopy for collagen networks and visualized on optical microscope (DMD 108, Leica).

#### Immunohistochemical analysis of cartilaginous tissue-engineered substitutes

The immunohistochemistry was performed according to LSAB + kit (HRP, Dako) based on avidin-biotin techniques with antibodies for type I and type II collagens. A primary monoclonal antibodies collagen II (6B3, Labvision) was used at the dilution of 1/100. The paraffin-embedded tissue sections of 5 µm were deparaffinized through series of alcohols and treated with pepsin (0.4% w/v in 0.01 M HCl, pH 2.0) during 30 min at room temperature. Slides were then incubated with hydrogen peroxide block solution for 5 min to block endogenous peroxidase. After washing, 2% BSA solution was applied for 10 min at room temperature to block the unspecific epitopes. The primary antibody was added to

**Table 1** Primers used for RT-qPCR

Gene	Primer sequence	Annealing temperature (°C)	Amplicon size (bp)	Accession number
RPS29	Fwd 5'-AGATGGGTCACCGACGCTGTACTG-3'	60	73	NM_001032
	Rev 5'-AGACACGACAAGACCGAGAA-3'			
COL2A1	Fwd 5'-ATGACAATCTGGCTCCCAAC-3'	55	200	NM_001844
	Rev 5'-GAACCTGCTATTGCCCTCTG-3'			
COL2B	Fwd 5'-GCATGAGGGCGCGTAGAGA-3'	70	195	NM_033150.2
	Rev 5'-TGGTCTGGTTCGCGGACAT-3'			
COL1A1	Fwd 5'-AGGTGCTGATGGCTCTCCT-3'	60	104	NM_000088.3
	Rev 5'-GGACCACTTTCACCCCTGT-3'			
ACAN (Aggrecan)	Fwd 5'-TCGAGGACAGCGAGGCC-3'	63	85	NM_001135
	Rev 5'-TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA-3'			
VCAN (Versican)	Fwd 5'-TGTTCCCTCCACTACCCTTG-3'	62	122	NM_001164098
	Rev 5'-CTTCCACAGTGGGTGGTCTT-3'			
COMP	Fwd 5'-ACAAATGACGGAGTCCCTGAC-3'	60	115	NM_000095
	Rev 5'-TCTGCATCAAAGTCGTCTCTG-3'			
SOX9	Fwd 5'-GAGCAGACGCACATCTC-3'	55	118	NM_000346
	Rev 5'-CCTGGGGATTGCCCGA-3'			
RUN2	Fwd 5'-CCCCTGGCCCTCAAGGT-3'	60	73	NM_001278478
	Rev 5'-CGTTACCCGCCCATGACAGTA-3'			
BGLAP (OSTEOCALCIN)	Fwd 5'-GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT-3'	62	175	NM_199173
	Rev 5'-TCAGCCAACCTCGTACAGTC-3'			

each slide, and slides were incubated at room temperature in a humidified chamber for 1 h. Subsequently, the samples were incubated with a biotinylated linked secondary antibody for 45 min at room temperature. The peroxidase-labeled streptavidin was applied at room temperature for 30 min. Substrate-chromogen solution was prepared with diaminobenzidine (DAB, LSAB<sup>+</sup> kit, Dako), incubated to the specimen and monitored under a microscope for the desired stain intensity. Control groups for immunohistochemical analysis were performed under identical conditions on cartilage (see thereafter OA model) and on collagen sponge for positive control or without primary antibodies for negative control. Finally, the sections were counterstained with hematoxylin at 1/5 for 1 min (RAL, France).

#### Densitometry of glycosaminoglycans and type II collagen using ImageJ

The slides were observed by light microscopy (DMD 108, Leica). The transmitted light images were recorded and treated by a semi-quantitative purpose made method using image analysis software ImageJ to calculate the staining percentage area. Histological assessment of alcian blue stain and IHC marker for collagen type II was performed. For alcian blue stain, the TIFF images were opened with ImageJ. Then, the image was adjusted to color threshold from hue, saturation, and brightness (HSB) to blue (RGB mode) color space. All the good positions were first detected, and regions of interest (ROI) around each culture conditions were defined. alcian blue-positive regions in each culture were selected automatically by using local threshold. This threshold was identical across all biological and technical replicates within each experiment. For IHC percentage determination, the same procedure aforementioned was utilized with red color segmentation by threshold (RGB mode) image and was adjusted to color threshold set in hue, saturation, and brightness (HSB).

#### Rat experimental OA

To avoid any immunological conflict against the xenograft of human SF-MSC, 5-week-old nude male rats (RNU for Rowett nude, Charles River Laboratories) were used in this work. This athymic nude rat is deficient for T cells and shows depleted cell populations in thymus-dependent areas of peripheral lymphoid organs. RNU rats were housed in plastic cages with sawdust bedding that was enriched with nesting material and maintained at 21 °C with 12-h/12-h light/dark cycle. The animals were housed in groups of four animals per individual cage. Discomfort and welfare were evaluated daily by the animal caretakers. Rats were fed a standard diet and had access to tap water ad libitum. European ethical guidelines for the care and use of laboratory animals

have been respected throughout the study period. The experimental protocol was accepted by our local animal experimentation committee (CELMEA) the 10th of October 2016, under the reference APA-FIS#6624-2016042215241254. RNU rats underwent an anterior cruciate ligament transection (ACLT) under general anesthesia as previously described [23] on D0 (right knee). Simultaneously, a sham group underwent arthrotomy without ACLT. One week (D7) and 2 weeks (D14) after OA surgical induction, a SF-MSC suspension in saline (NaCl) was injected i.a. through the patellar ligament into the right knee joint at a concentration of one million cells/50 µL (ACLT + SF-MSCs, 16 rats). The sham (16 rats) and ACLT (16 rats) were injected with 50 µL of sterile saline only on D7 and D14. Body weight was recorded twice weekly during the experiment. Animals were euthanized by ketamine overdose on D28 (8 sham, 8 ACLT saline, and 8 ACLT SF-MSCs rats) and D56 (8 sham, 8 ACLT saline, and 8 ACLT SF-MSCs rats) under general anesthesia and then the joints collected for histological analysis.

#### Macroscopical analysis

All femurs were observed on a binocular magnifying glass in order to score cartilage lesions. Lesions have been graded as it follows: 0 = normal appearance; 1 = slight yellowish discoloration of the chondral surface; 2 = little cartilage erosions in load-bearing areas; 3 = large erosions extending down to the subchondral bone; and 4 = large erosions with large areas of subchondral bone exposure. Each of the chondral compartments of the knee (the medial and lateral femoral condyles, the medial and lateral tibial plateaus, the patella and the femoral groove) were graded separately and blindly by two observers (AP and CH).

#### Histological scoring

Specimens of femur, tibia, patella, and synovial membrane were fixed separately in formalin (VWR chemical). Femur, tibia, and patella were decalcified in 5% formic acid (Sigma) during 10 days, and all samples were dehydrated by a descending series of ethanol with the use of an automated tissue processing apparatus, embedded in paraffin, and cut into 5-µm-thick sections with Leica microtome (RM 2135, Leica).

The scoring of OA lesions was graded on a scale adapted from Mankin's score by two independent observers (AP and CH) in four compartments: medial and lateral part of the tibia and medial and lateral part of the femur. HES and toluidine blue stainings were used. This score ranged from 0 to 23 per compartment according to:

- The structure (0 = normal, 1 = pannus, 2 = surface irregularities, 3 = clefts to transitional zone, 4 = clefts

- to radial zone, 5 = clefts to calcified zone, 6 = complete disorganization),
- The cellularity (0 = normal, 1 = diffuse hypercellularity, 2 = cloning, 3 = hypocellularity), safranin O staining (0 = normal, 1 = slight reduction, 2 = moderate reduction, 3 = severe reduction, 4 = no staining),
  - The thickness of hypertrophic chondrocyte layer (0 = normal, 1 = moderate decrease, 2 = total decrease), Sirius red staining (0 = normal, 1 = intensification of the superficial layer, 2 = intensification until the middle zone, 3 = intensification until calcified zone),
  - The collagen network organization (polarized light microscopy of Sirius red) (0 = normal, 1 = intensification of superficial layer, 2 = intensification until middle zone, 3 = intensification until calcified zone),
  - The bone remodeling (0 = none, 1 = present)
  - The bone osteolysis (0 = none, 1 = present).

The inflammation of the synovial membrane was graded on a scale adapted from Rooney's score by two independent observers (AP and CH) in four fields of view. Six parameters were studied: (1) number of synovial lining cells, (2) surface fibrin deposition, (3) fibrosis, (4) blood vessel proliferation, (5) perivascular infiltrates, and (6) diffuse infiltrates of lymphocytes.

#### Statistical analysis

##### *In vitro data*

The results were performed for each condition (flow cytometry, multipotency, gene expression, 3D culture) in triplicate for three patients. For standardization of gene expression levels, results were expressed as a ratio of the mRNA level of each gene of interest over the *RPS29* gene at D28 with various oxygen concentrations and presented as mean  $\pm$  standard error to the mean. The significance was determined in a first step by a one-way ANOVA comparison with a Dunnett's post hoc test comparing TGF- $\beta$ 1, BMP-2, TGF- $\beta$ 1 + BMP-2 with our reference (ITS) separately in normoxia and hypoxia. In a second step, a significant interaction was assessed between both normoxia and hypoxia for all condition (ITS, TGF- $\beta$ 1, BMP-2, TGF- $\beta$ 1 + BMP-2) with a two way ANOVA followed with a Bonferroni's test to assess the influence of hypoxia versus normoxia for each condition. Statistics analysis were performed with GraphPad Prism\*.

##### *In vivo data*

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error to the mean. For each time point (D28 and D56), eight rats were studied for each condition: sham, ACLT saline, ACLT SF-MSCs. For the three scoring (macroscopy, Mankin's, and Rooney's scores), a one-way ANOVA

followed by a Bonferroni's post hoc test was performed. A *p* value less than 0.05 was considered significant.

## Results

### Characterization of human SF-MSCs

The characterization of surface epitopes on isolated SF cells was performed at the end of the second passage (P2) demonstrating, as expected [24], that the cells were negative for hematopoietic markers like CD34, CD45, and HLA-DR. Besides, SF-MSCs were strongly positive for CD73 and CD105 and also positive for CD90 (Fig. 1a).

### Multipotency of human SF-MSCs

A pellet culture system was used to evaluate the chondrogenic potential of the SF-MSCs. Histologically, SF-MSCs pellets treated with TGF- $\beta$ 1 exhibited a cartilage matrix synthesis highly stained with alcian blue (Fig. 1b). Additionally, SF-MSC monolayers were cultured in an osteogenic medium in order to evaluate their osteogenic differentiation. After 14 days of culture, we found calcium deposits with alizarin red S staining (Fig. 1b). SF-MSCs were also exposed to an adipogenic induction medium for 21 days and stained with Oil Red O. As expected, lipid vesicles were observed in these SF-MSCs (Fig. 1b).

### Gene profiles in SF-MSCs seeded collagen sponges on D28 under various conditions

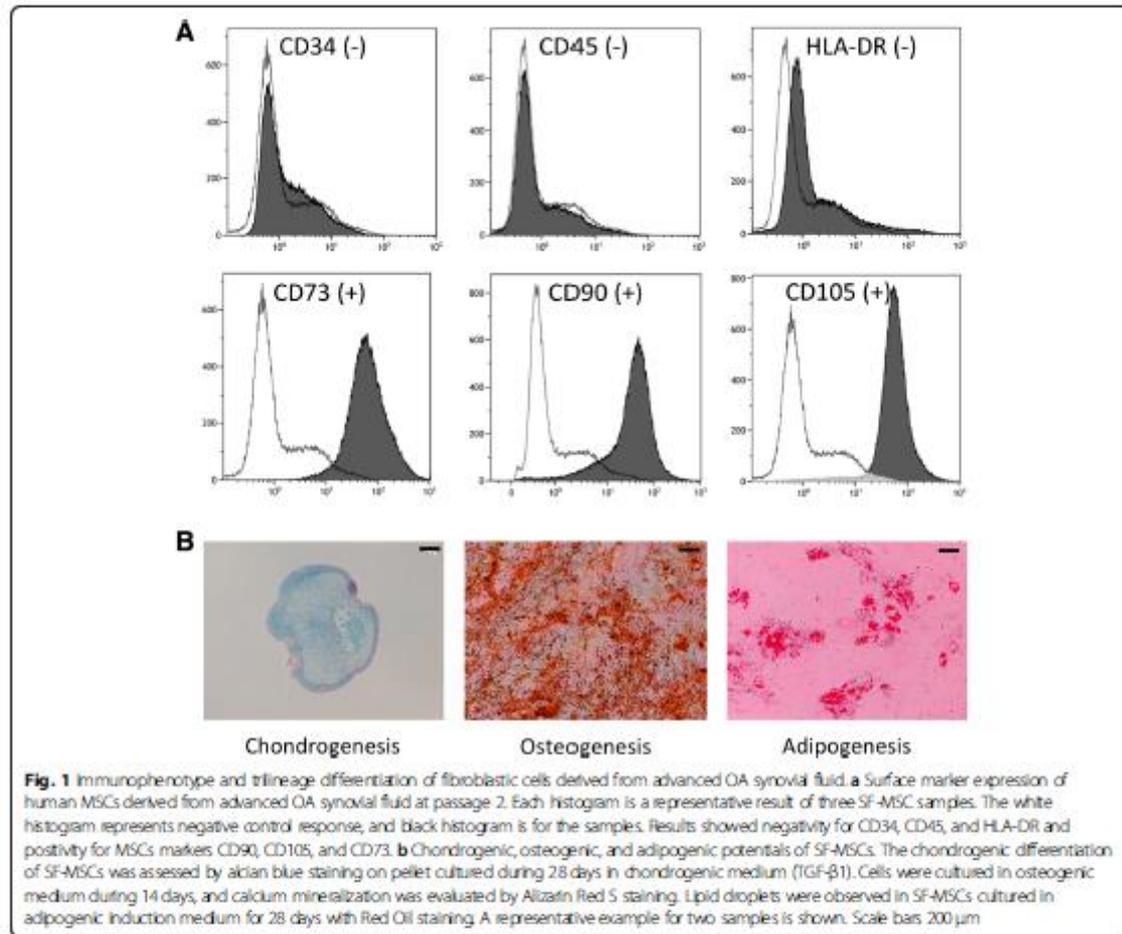
#### Chondrogenic genes expression (Fig. 2)

Aggrecan is a major component of the hyaline cartilage. Its gene expression (*ACAN*) is very low under ITS and BMP-2 exposure irrespective of the oxygen tension. In normoxia, only a slight significant *ACAN* overexpression (4.3-fold) was observed under TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 1 plus BMP2. On the other hand, under hypoxia, TGF- $\beta$ 1 alone (38.9 fold) or in combination with BMP-2 (53.7-fold) significantly strongly increased *ACAN* gene expression.

*COMP* (cartilage oligomeric matrix protein) is a marker of the hyaline cartilage involved in the assembly of the extracellular matrix. The *COMP* expression, in the ITS condition, was very low for both oxygen tensions. TGF- $\beta$ 1 alone or in association with BMP-2 strongly increased the *COMP* expression (79.27 and 69.3) similarly in both oxygen tensions. Again, BMP-2 alone did not significantly boost its expression.

*SOX9* is a transcription factor involved in the chondrocyte differentiation and the cartilage formation. TGF- $\beta$ 1 induced a slight significant increase (3.2-fold) of *SOX9* expression in normoxia. Hypoxia significantly boosted this overexpression (6.0-fold). Moreover, TGF- $\beta$ 1 + BMP-2 under normoxia and hypoxia, significantly increased *SOX9* expression (2.7- vs 5.4-fold).

Type II collagen, and particularly its IIB isoform, is specific of hyaline cartilage. Under normoxia, with TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 1 + BMP-2, a significant increase



was observed for *COL2A1* versus ITS. Hypoxia exerted a significant influence by significantly enhancing *COL2A1* expression for TGF- $\beta$ 1 alone (272.8-fold) or combined with BMP-2 (385.4-fold) conditions. A similar profile was observed for IIB isoform; hypoxia significantly potentiated the induction of this gene expression for TGF- $\beta$ 1 (34.8-fold) and TGF- $\beta$ 1 + BMP-2 (43.0 fold) conditions. BMP-2 alone was inefficient.

#### Fibrogenic genes expression

Type I collagen is present in fibrous tissues like fibrocartilage. Under normoxia, we observed a slight significant increase of *COL1A1* expression with TGF- $\beta$ 1 (64.0-fold) and TGF- $\beta$ 1 + BMP-2 (47.1). Besides, under hypoxia, a significant increase of *COL1A1* expression was induced by TGF- $\beta$ 1 (92.9-fold) and TGF- $\beta$ 1 + BMP-2 (150.1-fold). BMP-2 alone was inefficient.

Versican is a proteoglycan, which confers a fibrous character to its surrounding structure. Only TGF- $\beta$ 1, for both

oxygen tensions, led to a significant increase of *VCAN* expression (1.3- versus 2.5-fold). No significant influence of the oxygen tension was observed on this week expression.

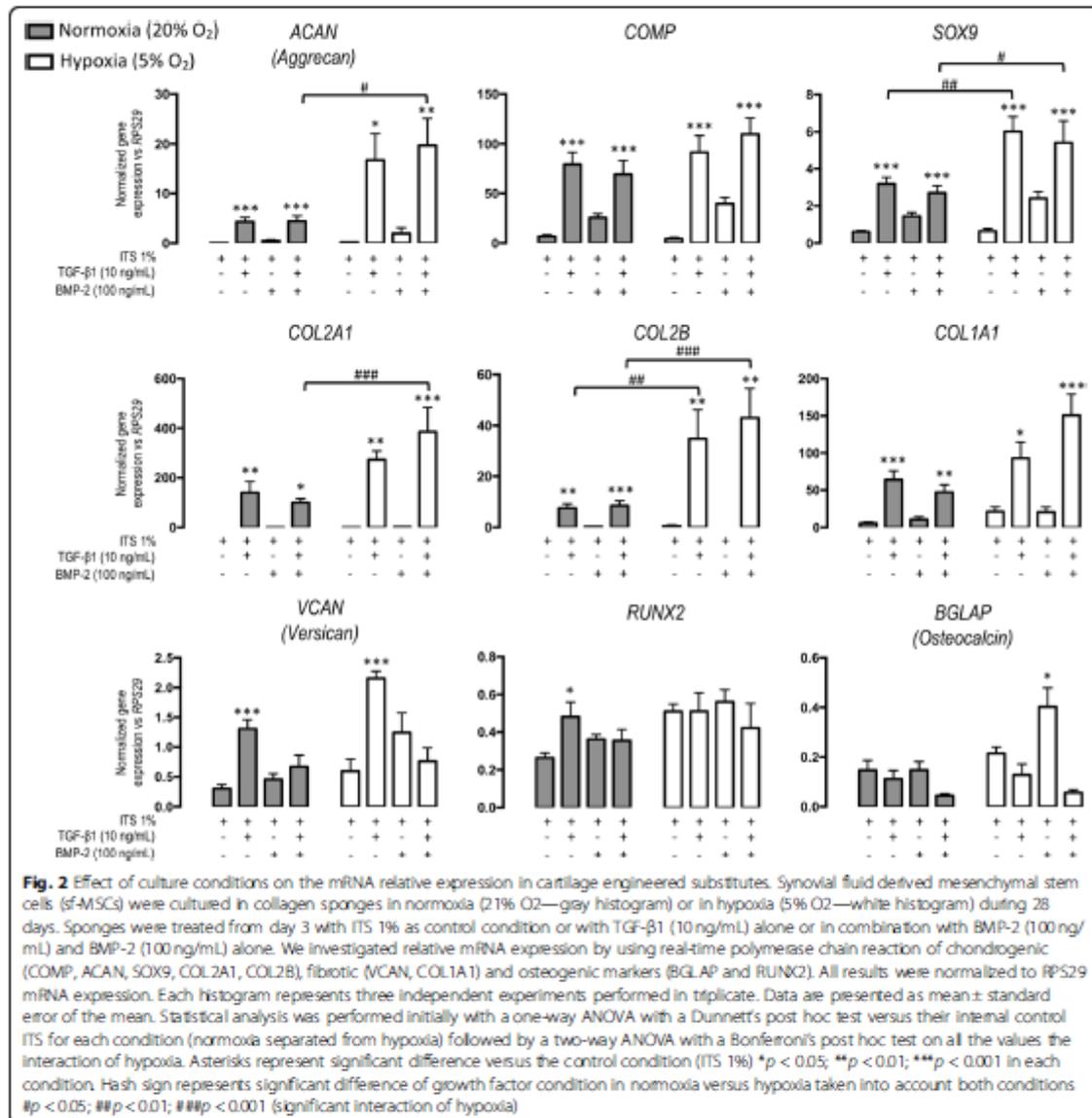
#### Osteogenic gene expression

Runx2 is a transcription factor involved in osteogenic differentiation. TGF- $\beta$ 1 alone significantly enhanced its very weak expression. Additionally, hypoxia did not influence *RLN2* gene expression. Interestingly, osteocalcin gene (*BGLAP*), a specific protein for bone tissue revealing bone terminal differentiation, was only enhanced under hypoxia for the BMP-2 condition (but with a very low fold).

#### Histology, immunohistochemistry, and GAG content of cartilaginous tissue-engineered substitutes on D28

##### Histology

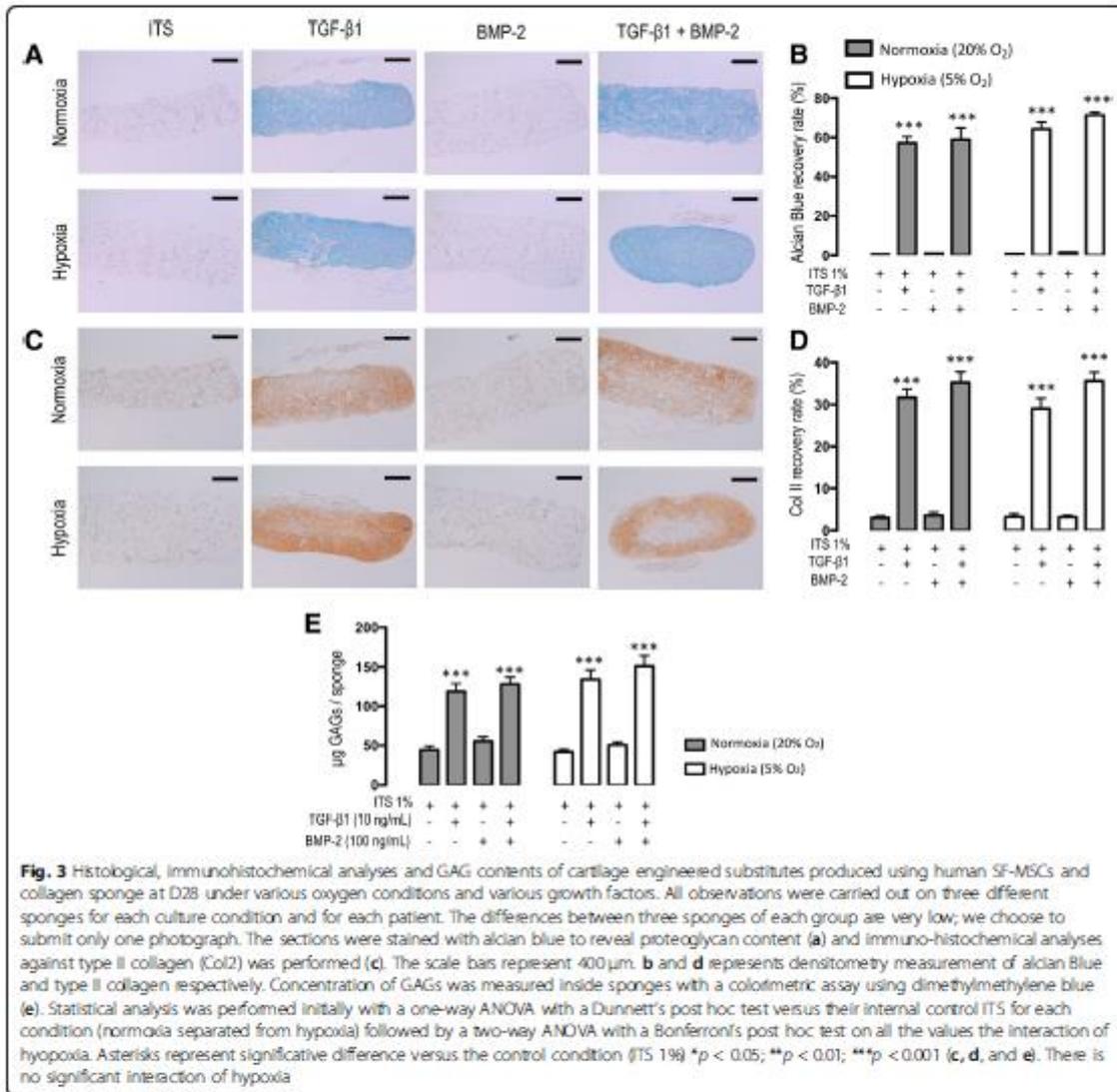
Hematoxylin-eosin-safran staining revealed no alteration of the cells. The cellular distribution within the sponges was homogeneous, and no mortality was observed for



the different conditions studied (data not shown). On D28, alcian blue (Fig. 3a, b) did not show any matrix synthesis for the ITS control (0.5%) and BMP-2 alone (0.97%, NS vs ITS) in normoxic conditions. TGF-β1 alone or in combination with BMP-2 significantly increased the proteoglycan content in the sponges with a similar fold (Fig. 3b, respectively 57.1% and 58.9%, *p* < 0.001 vs ITS). No significant interaction of oxygen tension was noted by densitometry measurement, as a similar profile was noted in hypoxia.

#### Immunohistochemistry (IHC)

A similar profile was observed on D28 for IHC with type II collagen labeling (Fig. 3c, b). No induction of matrix synthesis by ITS and BMP-2 alone was noted (3.4% vs 3.6%, respectively, NS), while TGF-β1 alone or in combination with BMP-2 induced significantly a strong synthesis similar to the hyaline cartilage ECM (31.7% and 35.3% respectively, *p* < 0.001 vs ITS). Again, the densitometry measurements did not show any significant interaction of hypoxia versus normoxia.



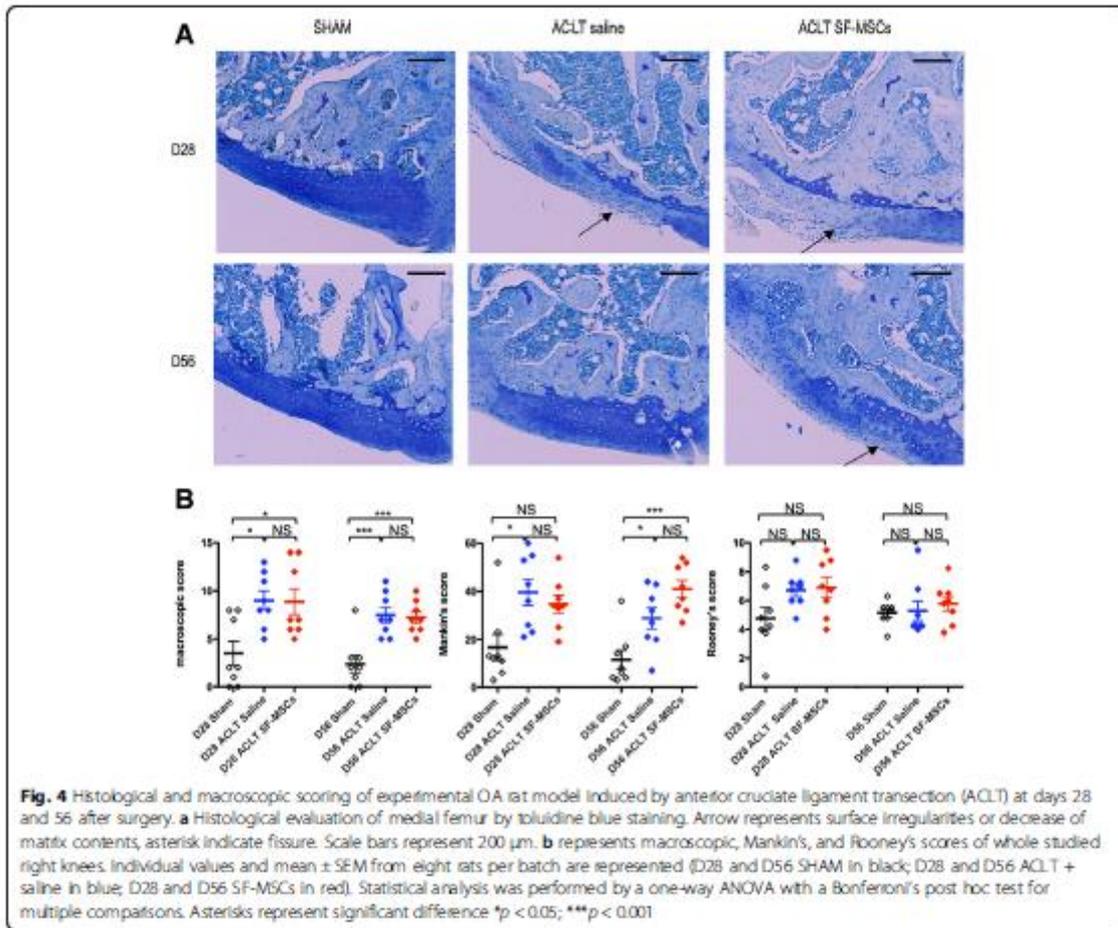
**GAG content**

As shown in Fig. 3e, under normoxia, the GAG content was low for both ITS and BMP-2 conditions (44.2µg and 55.5 µg, respectively, NS). Similarly, TGF-β1 alone or in combination with BMP-2 significantly enhanced GAG content in collagen sponges (respectively 118.5 µg and 150.9 µg, *p* < 0.001 vs ITS). Evenly, there was no significant interaction of hypoxia versus normoxia on the GAG content.

**Scaffold-free intra-articular injection of SF-MSCs in ACLT model**

For both times studied (D28 and D56), sham-operated right knees (*n* = 8 + 8) and naive left knees (*n* = 8 + 8)

displayed a similar scoring in terms of macroscopy, OA, and synovial scores (data not shown). This means the knee sham surgery and the two i.a. saline injections were not phlogistic and did not interfere with the natural articular growth. Besides, ACLT procedures induced a significant increase in macroscopic and Mankin's scores on D28 and D56 (Fig. 4). On another note, experimental OA did not generate a significant synovitis, which usually characterizes this model, particularly in the rat. This is probably inherent to the breed used for this study, a T cell-deficient RNU rat, and to its depleted cell populations in thymus-dependent areas of peripheral lymphoid organs being anti-inflammatory in nature. This also



probably contributes to the fact that our articular lesions were less severe when compared with our previous practice in historical records of experiments during ACLT-induced knee OA in Wistar rats. Furthermore, i.a. injections of SF-MSCs had no beneficial or detrimental influence on OA lesions and synovial scorings.

### Discussion

We demonstrated herein that end-stage OA synovial fluids obtained from knee joints contained adhering cells undergoing trilineage differentiation in vitro. Most of these cells expressed CD73, CD90, and CD105 and showed very low expression CD34, CD45, and HLA-DR, thus consistent with the phenotype of MSCs [11]. Furthermore, these SF-MSCs, when seeded in collagen sponges, exerted a chondrogenic potential under the influence of TGF- $\beta$ 1 in terms of gene expression and matrix production (GAGs and type II collagen). BMP-2 alone was ineffective. Surprisingly, hypoxia exerted little

to no influence on TGF- $\beta$ 1 triggered chondrogenicity. Finally, SF-MSCs, when injected intra-articularly during ACLT-induced OA in nude rat knee, are ineffective on structural OA-induced lesions.

Since the sixties, it has long been known that SF from arthritic patients of various conditions, including OA, contains cells capable of in vitro proliferation, but their phenotypic characterization and multipotentiality were demonstrated in 2004 [25]. Their origin has been debated: blood irrigation, shedding from synovium [26], especially type B synovial lining, disrupted superficial cartilage layer [27], subchondral bone, infra-patellar pad [28]. For a decade, the presence of SF-MSCs in normal SF, increasing in early human OA, has been demonstrated [8]. Physiologically, the cartilage homeostasis results from a balance between anabolism and catabolism. With this in mind, SF-MSCs are commonly thought to be originated from synovial tissue [29–31]. Furthermore, SF-MSCs gene expression profile is closely related to

cells derived from the synovial membrane [5, 12, 14, 32]. SF MSCs can participate to spontaneous cartilage regeneration at the damaged sites of limited chondral defects, or in ligament repair, in both clinical and experimental conditions, under the influence of cytokines and intra-articular growth factors [33] linked to the underlying pathological condition.

SF microenvironments can thus influence the expression of SF-MSC surface markers [34]. Our patients are all suffering from advanced OA requiring total knee joint replacement, and can be considered as a homogeneous group. In contrast, previous studies have demonstrated that the stage of the disease influences the chondrogenic capacity and the number of SF-MSCs, either experimentally [35, 36] or clinically [6, 12]. In our experimental conditions, archetypal cell-surface makers were positive: CD73, CD90, and CD105, combined with a negative immuno-reactivity for CD34, CD45, and HLA-DR as previously published [11]. These markers can be used to identify a homogeneous population of MSCs, although there are some divergences in the literature. CD105 has been promoted to select SF-MSCs with immuno-magnetic separation [37], as it binds TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3, but do not predict the chondrogenic potential of MSCs [38]. CD105 and CD90 are present on MSC surface and are lost during differentiation [39]. In addition, CD90+ MSCs predict a good chondrogenic potential [40, 41]. Besides, CD73 expression was observed [6, 9, 42] during synovium and SF MSCs expansions. Additionally, we confirmed that OA SF-MSCs had capabilities to differentiate into adipogenic, osteogenic, and chondrogenic lineages in agreement with the literature [5, 9, 10].

To date, the chondrogenicity of SF-MSCs was mostly studied within a pellet system for the proof concept of multipotency, but little has been reported to study the chondrogenic differentiation of SF-MSCs seeded 3D tissue-engineering constructs, e.g., collagen sponges. In fact, pellet system is a 3D structure based on a cell-cell interaction, while collagen sponge is a porous biomaterial allowing extracellular matrix synthesis. TGF and BMP are prone to enhance chondrogenesis of SF-MSCs [20, 43]. As well, the influence of hypoxia has been rarely studied [20]. Our results confirm the boosting effect of TGF- $\beta$ 1 on some chondrogenic gene expression (*ACAN*, *COL2A1*, *COMP*, *SOX9*) and extracellular matrix production (GAG, type II collagen) in SF-MSCs seeded collagen sponges on D28. Surprisingly, *ACAN* and *COL2A1* genes were weakly overexpressed during TGF- $\beta$ 1-driven 3D differentiation under normoxia. In a previous work conducted under normoxia with TGF- $\beta$ 1-driven differentiation of bone marrow MSCs-seeded collagen sponges, we noticed a highly significant genic over-expression of global type II collagen (495-fold versus ITS condition) and aggrecan (105.6-fold

versus ITS condition) [44]. We also observed that BMP-2 alone did not induce SF-MSC chondrogenic differentiation. In combination with TGF- $\beta$ 1, it did not enhance chondrogenic gene expression. In a similar study carried out on human cord blood MSCs-seeded sponges under normoxia for 14 days, the cocktail TGF- $\beta$ 1 + BMP-2 significantly upregulated *COL2A1* and *ACAN* [45]. As previously published in alginate beads [19] and collagen sponges [46], or in a scaffold-free manner [20], hypoxia promoted chondrogenic gene expression. In contrast, in our experimental conditions, low oxygen tension was without influence at the protein level (histology, immunohistochemistry, and GAG content). Interestingly, osteogenic genes were not significantly highly overexpressed, and there was no calcification in the tissue-engineered constructs.

One possible explanation of this peculiar chondrogenic commitment may be the physio-pathological microenvironment of the SF-MSCs used herein; all harvested in end-stage OA knees undergoing total knee joint replacement. In degenerative conditions, there is mainly a catabolic environment with a significant increase of TNF $\alpha$  and a significant decrease of TGF- $\beta$ 1 [28]. During OA, synovitis causes hypoxia [47], hypercapnia, and acidity in synovial fluid [48]. In addition, an increase in intra-articular SF volume causes a shift of local metabolism towards anaerobic glycolysis, thus contributing to the decrease of SF glucose levels [49]. Besides, synovial cavity damages correlates with fluctuating oxygen pressure in the joint, overproduction of free radical and lack of oxygen-processing enzymes and free radical scavenging molecules [50, 51]. Moreover, SF-MSCs are exposed to abnormal physical load in biomechanically OA-compromised joints [52]. This is very different in other studies conducted with bone marrow, Wharton's jelly, and adipose MSCs, all being resident in physiological conditions. In fact, intra-articular exposure to these pro-inflammatory agents [53] may either realize a SF-MSCs preconditioning (or priming) or alter their paracrine properties, thus accounting for their particular commitment [34].

To date, there is no published clinical study regarding SF-MSC-based cartilage regeneration [54] and very few in vivo experimental studies are available [54], especially in rodents. To the best of our knowledge, one xenogenic study has been conducted in the rat knee (2-mm-diameter articular defect in trochlear groove) by using equine SF-MSC-seeded agarose constructs. This study was successful in terms of in vivo evaluation and type II collagen expression [55]. Besides, human SF-MSCs (mild OA, arthroscopic flushing) encapsulated in a one-step rapid cross-linked hydrogel significantly ameliorates cartilage defects in rat knee after 8 weeks [56]. Another study was conducted in porcine knee chondral defects with autologous porcine SF-MSCs mixed with platelet-rich plasma

and thermosensitive hydrogel, demonstrating a great ability for chondrocyte regeneration and maturation at 4 and 8 weeks after implantation [57]. Similar results were reported in rabbits with autologous SF-MSCs [58]. No experimental protocol has yet been conducted with SF-MSCs in experimental diffuse (ACLT) induced OA. One recent work, conducted with synovial membrane-MSCs during ACLT in the Lewis rat showed that a single injection was ineffective but weekly injections significantly improve OARSI score at 8 and 12 weeks [59]. A previous work in mono-iodoacetate-induced OA showed that the priming with inflammatory factors did not influence the migration or adhesion capacity of human MSCs to OA synovium after intra-articular injection in the rat knee [34]. During this model of diffuse OA, intra-articular injections of allogenic bone marrow MSCs were effective on pain but not on OA lesions [60]. Cartilage repair thus seems a better indication than diffuse OA for synovial tissue derived MSCs. Accordingly, allogenic rat synovium-derived MSCs have been successfully intra-articularly injected for an osteochondral defect model in the femoral groove in Sprague-Dawley rats [61]. Similar beneficial results were reported in C57BL6 mice with focal knee lesions with a single injection of allogenic synovium MSCs [62].

We used nude rats to avoid an adverse response after repeated intra-articular injection of xenogenic mesenchymal stem cells, which was previously observed with allogenic MSCs [63]. This breed has already been used to assess the success of a third-generation human chondrocyte implantation in a mixed model combining ACLT and knee focal defect in the patella groove [64]. Two weeks after ACLT, OA lesions were depicted macroscopically. Interestingly, human MSCs injected intra-articularly were chondroprotective in a compartmental OA model in nude rat knee induced by medial meniscectomy [65]. Similar results were reported with human-induced pluripotent stem cell injected in a calibrated focal lesion performed in immuno-compromised rat knees [66]. Nude rats were also used to evaluate the regenerative properties of muscle-derived MSCs in the MIA model [67, 68]. In all these studies, none paid attention to synovitis. We were surprised by the low-grade knee synovitis in our experimental conditions in the control group (saline), contrasting with our previous experience in Wistar rats, assessed by histology and MRI [23, 69, 70]. Nevertheless, OA scoring was significantly more severe in ACLT-OA group versus sham group. A blessing in disguise, intra-articular injections of human SF-MSCs did induce neither chondroprotective effect, nor phlogistic/metaplastic reactions in the synovium. Similarly, no synovitis was depicted in knee nude rats OA induced by a meniscal tear on D28 [71]. Nevertheless, as previously described in Wistar rats knees by Leijts [34], describing no significant difference in

human bone MSCs attachment to synovium between OA (MIA) and healthy rat knees, this may suggest that a previous synovitis is not an obligatory prerequisite to activate exogenous MSC's trophic properties after intra-articular injection or implantation. Additionally, the number of MSCs injected have been determined according to the literature, although there is no real consensus on the ideal dose and timing of injections [72]. After intra-articular injection and homing, MSCs probably exert their symptomatic beneficial analgesic properties [60, 73], at least, by their paracrine anti-inflammatory and anti-apoptotic activities, rather than a structural articular protection.

### Conclusion

The use of SF-MSCs is advantageous due to their easy harvesting during arthrocentesis or arthroscopy. The number of SF-MSCs is low in physiological conditions but notably increases in osteoarthritic conditions. In this study, we have characterized the stemness and demonstrated the multilineage potency of human advanced OA SF-MSCs. Furthermore, the chondrogenic induction (TGFβ1 alone or in combination with BMP2) of these SF-MSCs in collagen sponges demonstrates a good capacity of chondrogenic gene induction and extracellular matrix synthesis. Surprisingly, probably due to previous priming by inflammatory SF microenvironment, hypoxia did not enhance matrix synthesis, although it boosted chondrogenic gene expression (*ACAN*, *SOX9*, *COL2A1*). This is a promising result for cell-based constructs dedicated for cartilage defects. Besides, scaffold-free intra-articular injections of xenogenic SF-MSCs did not produce any beneficial or detrimental influence on articular lesions in ACLT-induced OA in the nude rat knee.

### Abbreviations

3D: Three-dimensional; AB: Alcian blue; ACAN: Aggrecan; ACI: Autologous chondrocyte implantation; ACLT: Anterior cruciate ligament transection; ACP: Articular cartilage progenitor; bFGF: Basic fibroblast growth factor; BGLAP: Osteocalcin; BMP-2: Bone morphogenetic protein-2; BSA: Bovine serum albumin; CD: Cluster differentiation; cDNA: Complementary deoxyribonucleic acid; COL1A1: Type I collagen; COL2A1: Type II collagen; COL2B: Type II B collagen; COMP: Cartilage oligomeric matrix protein; D28: Day 28; DAB: Diaminobenzidine; DMB: Dimethylblue; DMEM-HG: Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose; DMEM-LG: Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose; ECM: Extracellular matrix; FBS: Fetal bovine serum; GAGs: Glycosaminoglycans; HES: Hematoxylin, eosin, and saffron stain; HLA-DR: Human leukocyte antigen - antigen D related; HSB: Hue, saturation and brightness; Ia: Intra-articular; IHC: Immunohistochemistry; ITS: Insulin, transferrin, selenium; mRNA: Messenger ribonucleic acid; MSCs: Mesenchymal stem cells; NaCl: Sodium chloride; OA: Osteoarthritis; P2: Passage 2; P3: Passage 3; P4: Passage 4; PBS: Phosphate-buffered saline; PFA: Paraformaldehyde; RGB: Red, green and blue; RNA: Ribonucleic acid; ROI: Region of interest; RP29: Ribosomal protein S29; RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction; RUNX2: Runt related transcription factor 2; SF: Synovial fluid; SF-MSCs: Synovial fluid derived mesenchymal stem cells; SOX9: Sex determining region Y-box 9; TGF-β1: Transforming growth factor-β1; TNFα: Tumor necrosis factor alpha; VCAN: Versican

**Acknowledgements**

The authors thank Emille ROEDER, PhD, for the English editing of this manuscript. We thank the nursing staff of Chirurgie Orthopédique & Traumatologique and Centre Emile Gallé, CHRU Nancy, for their assistance in the provision of clinical material.

**Funding**

Dedicated funding from "Société Française de Rhumatologie" supported this work. Paul NEYBECKER is supported by a PhD scholarship granted by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research (MENESR).

**Availability of data and materials**

The datasets taken during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Authors' contributions**

PN and EP contributed to the experimental design, cell and tissue culture, biochemical analyses, animal model, histological analyses, statistical analyses, and manuscript preparation. DL, LG, and DM contributed to SF collection, study conception, results analysis, and manuscript preparation. AP, CH, and PG supervised the study conception, experimental design, cell and tissue culture, biochemical analyses, animal model processing, histological analyses, statistical analyses, and manuscript revision and editing. All authors read and approved the manuscript.

**Ethics approval and consent to participate**

The clinical protocol was approved by the ethical committee of our university hospital. The experimental study in the rat was approved by our local Ethical Committee for the Animal studies and validated by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Publisher's Note**

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Author details**

<sup>1</sup>UMR 7365 QNR5-UL, IIMoPA (Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire), Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus Brabois-Santé, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP 20199, 54505 Vandœuvre-Lès-Nancy, France. <sup>2</sup>Service de Chirurgie Orthopédique, Traumatologique et Arthroscopique, CHRU Nancy, 29 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny CO 60034, F54035 Nancy, France. <sup>3</sup>Service de Rhumatologie, CHRU de Nancy, Hôpitaux de Brabois, Bâtiment des Spécialités Médicales, 5 rue du Morvan, F54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

Received: 14 September 2018 Revised: 29 October 2018

Accepted: 9 November 2018 Published online: 28 November 2018

**References**

- Yasui Y, Ando W, Shimomura K, Koizumi K, Ryota C, Hamamoto S, et al. Scaffold-free, stem cell-based cartilage repair. *J Clin Orthop Trauma*. 2016; 7(3):157–63.
- Harris JD, Siston RA, Brophy RH, Lattermann C, Carey JL, Flanagan DC. Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation—a systematic review. *Osteoarthr Cartil*. 2011;19(7):779–91.
- Zingler C, Carl HD, Swoboda B, Krinner S, Hennig F, Gebel K. Limited evidence of chondrocyte outgrowth from adult human articular cartilage. *Osteoarthr Cartil*. 2016;24(1):124–8.
- Ma B, Lejten JC, Wu L, Kip M, van Bitterswijk CA, Post JN, et al. Gene expression profiling of differentiated human articular chondrocytes in monolayer culture. *Osteoarthr Cartil*. 2013;21(4):599–603.
- Kojama N, Okubo Y, Nakao K, Osawa K, Fujimura K, Bessho K. Pluripotency of mesenchymal cells derived from synovial fluid in patients with temporomandibular joint disorder. *Life Sci*. 2011;89(19–20):741–7.
- Matsukura Y, Muneta T, Tsuji K, Koga H, Sekiya I. Mesenchymal stem cells in synovial fluid increase after meniscus injury. *Clin Orthop Relat Res*. 2014; 472(5):1357–64.
- Fulber J, Maria DA, da Silva LC, Massoco CO, Agreste F, Baccarin RY. Comparative study of equine mesenchymal stem cells from healthy and injured synovial tissues: an in vitro assessment. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:35.
- Jones EA, Crawford A, English A, Henshaw K, Mundy J, Corscadden D, et al. Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level. *Arthritis Rheum*. 2008;50(6):1731–40.
- Lee W-J, Hah Y-S, Ock S-A, Lee J-H, Jeon R-H, Park J-S, et al. Cell source-dependent in vivo immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow and synovial fluid of minipigs. *Exp Cell Res*. 2015;333(2):273–88.
- Ando W, Kutcher JJ, Krawetz R, Sen A, Nakamura N, Frank CB, et al. Clonal analysis of synovial fluid stem cells to characterize and identify stable mesenchymal stromal cell/mesenchymal progenitor cell phenotypes in a porcine model: a cell source with enhanced commitment to the chondrogenic lineage. *Cytotherapy*. 2014;16(6):776–88.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Saper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
- Sekiya I, Ojima M, Suzuki S, Yamaga M, Horie M, Koga H, et al. Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2012;30(6):943–9.
- Garcia J, Wright K, Roberts S, Kuiper JH, Mangham C, Richardson J, et al. Characterisation of synovial fluid and infrapatellar fat pad derived mesenchymal stromal cells: the influence of tissue source and inflammatory stimulus. *Sci Rep*. 2016;6:24295. <https://doi.org/10.1038/srep24295>.
- Morito T, Muneta T, Hara K, Ju Y-I, Mochizuki T, Makino H, et al. Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology*. 2008;47(8):1137–43.
- Hagmann S, Gottebarm T, Müller T, Baesig A-M, Gantz S, Dreher T, et al. The influence of bone marrow and synovium-derived mesenchymal stromal cells from osteoarthritis patients on regulatory T cells in co-culture. *Clin Exp Immunol*. 2013;173(3):454–62.
- Shintani N, Hurskier EB. Differential effects of dexamethasone on the chondrogenesis of mesenchymal stromal cells: influence of microenvironment, tissue origin and growth factor. *Eur Cell Mater*. 2011;22: 302–19 discussion 19–20.
- Freyria AM, Mallein-Gerin F. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. *Injury*. 2012;43(3):259–65.
- Green JD, Tollemar V, Dougherty M, Yan Z, Yin L, Ye J, et al. Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: implications in cartilage regeneration and tissue engineering. *Genes & Diseases*. 2015;2(4):307–27.
- Henionnet C, Liang G, Roeder E, Dossot M, Wang H, Magdalon J, et al. Hypoxia for mesenchymal stem cell expansion and differentiation: the best way for enhancing TGF $\beta$ -induced chondrogenesis and preventing calcifications in alginate beads. *Tissue Eng Part A*. 2017;23(17–18):913–22.
- Yasui Y, Chijimatsu R, Hart DA, Koizumi K, Sugita N, Shimomura K, et al. Preparation of scaffold-free tissue-engineered constructs derived from human synovial mesenchymal stem cells under low oxygen tension enhances their chondrogenic differentiation capacity. *Tissue Eng Part A*. 2016;22(5–6):490–500.
- Adesida AB, Mulet-Serra A, Jmha NM. Hypoxia mediated expansion and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. 2012;3(2):9.
- Goldberg RL, Kolbas LM. An improved method for determining proteoglycans synthesized by chondrocytes in culture. *Connect Tissue Res*. 1990;24(3–4):265–75.
- Goebel JC, Bolbos R, Pham M, Galois L, Rengle A, Loeuille D, et al. 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;49(9):1654–64.
- de Sousa EB, Casado PI, Moura Neto V, Duarte ME, Aguiar DP. Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(5):112.

25. Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Maikham AF, Emery P, et al. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(3):817–27.
26. De Bari C, Dell'Accio F, Tyranowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001; 44(8):1928–42.
27. Douthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan M, Rooney P, Evans DJ, et al. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 6):889–97.
28. Bravo B, Arguello JM, Gortazar AR, Forriol F, Vaquero J. Modulation of gene expression in infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Cartilage*. 2018;9(1):55–62.
29. Dai L, Pessler F, Chen LX, Clayburne G, Schumacher HR. Detection and initial characterization of synovial lining fragments in synovial fluid. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45(5):533–7.
30. Yip S, Zheng YH, Wuj L, Yi Z, Z-g Z. Synovium fragment-derived cells exhibit characteristics similar to those of dissociated multipotent cells in synovial fluid of the temporomandibular joint. *PLoS One*. 2014;9(7):e101896.
31. Yao Y, Li ZY, Zhang H, Zheng YH, Mai LX, Liu WJ, et al. Synovial fluid-derived synovial fragments represent an improved source of synovial mesenchymal stem cells in the temporomandibular joint. *Int J Mol Med*. 2018;41(1):173–83.
32. Kim YS, Lee HJ, Yeo JE, Kim YI, Choi YJ, Koh YG. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from synovial fluid in patients with osteochondral lesion of the talus. *Am J Sports Med*. 2015;43(2):399–406.
33. Kim YK, Kim SG, Kim BS, Lee JY, Yun PY, Bae JH, et al. Analysis of the cytokine profiles of the synovial fluid in a normal temporomandibular joint preliminary study. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012;40(8):e337–41.
34. Leijts MJ, van Buul GM, Verhaar JA, Hoogduijn MJ, Bos PK, van Osch GJ. Pre-treatment of human mesenchymal stem cells with inflammatory factors or hypoxia does not influence migration to osteoarthritic cartilage and synovium. *Am J Sports Med*. 2017;45(5):1151–61.
35. Burk J, Glauche SM, Behm W, Crovace A, Francisco E, Hillmann A, et al. Characterisation and intracellular labelling of mesenchymal stromal cells derived from synovial fluid of horses and sheep. *Vet J*. 2017;222:1–8.
36. Murata D, Miyakoshi D, Hatazoe T, Miura N, Tokunaga S, Fujiki M, et al. Multipotency of equine mesenchymal stem cells derived from synovial fluid. *Vet J*. 2014;202(1):53–61.
37. Haranova D, Tothova T, Sertisky M, Amrichova J, Rosocha J. Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells. *Folia Biol (Praha)*. 2011; 57(3):119–24.
38. Geary MA, Narcisi R, Focke K, van der Linden R, Brama PA, van Osch GJ. Expression of CD105 on expanded mesenchymal stem cells does not predict their chondrogenic potential. *Osteoarthr Cartil*. 2016;24(5):868–72.
39. Chen XD, Qian HY, Nell L, Satomura K, Horowitz MC. Thy-1 antigen expression by cells in the osteoblast lineage. *J Bone Miner Res*. 1999;14(3):362–75.
40. Ogata Y, Mabuchi Y, Yoshida M, Suto EG, Suzuki N, Muneta T, et al. Purified human synovium mesenchymal stem cells as a good resource for cartilage regeneration. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129096.
41. Ja Z, Liang Y, Xu X, Li X, Liu Q, Ou Y, et al. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from synovial fluid by magnetic-activated cell sorting (MACS). *Cell Biol Int*. 2018;42(3):262–71.
42. Tan AR, Alegre-Aguarón E, O'Connell GD, VandenBerg CD, Aaron RK, Vunjak-Novakovic G, et al. Passage-dependent relationship between mesenchymal stem cell mobilization and chondrogenic potential. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(2):319–27.
43. Chen Y, Caporali E, Stewart M. Bone morphogenetic protein 2 stimulates chondrogenesis of equine synovial membrane-derived progenitor cells. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2016;29(5):378–85.
44. Roeder E, Henriotnet C, Goebel JC, Gambier N, Beuf O, Genier D, et al. Dose-response of superparamagnetic iron oxide labeling on mesenchymal stem cells chondrogenic differentiation: a multi-scale in vitro study. *PLoS One*. 2014;9(5):e98451.
45. Gomez-Leduc T, Hervieu M, Legendre F, Bouyoucef M, Gruchy N, Poulain L, et al. Chondrogenic commitment of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in collagen matrices for cartilage engineering. *Sci Rep*. 2016;6:32786.
46. Gomez-Leduc T, Desance M, Hervieu M, Legendre F, Ollitrault D, de Vienne C, et al. Hypoxia is a critical parameter for chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in type III collagen sponges. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1933. <https://doi.org/10.3390/ijms18091933>.
47. Stevens CR, Williams RB, Farrell AJ, Blake DR. Hypoxia and inflammatory synovitis: observations and speculation. *Ann Rheum Dis*. 1991;50(2):124–32.
48. Kolfoed H. Synovitis causes hypoxia and acidity in synovial fluid and subchondral bone. *Injury*. 1986;17(6):391–4.
49. Niinikoski J, Erola S. Postoperative synovial fluid. Metabolic response to meniscectomy or synovectomy. *Acta Orthop Scand*. 1977;48(2):129–37.
50. Maneesh M, Jayalekshmi H, Suma T, Chatterjee S, Chakrabarti A, Singh TA. Evidence for oxidative stress in osteoarthritis. *Indian J Clin Biochem*. 2005; 20(1):129–30.
51. Franz A, Joseph L, Mayer C, Harmsen JF, Schrupf H, Frobel J, et al. The role of oxidative and nitrosative stress in the pathology of osteoarthritis: novel candidate biomarkers for quantification of degenerative changes in the knee joint. *Orthop Rev (Pavia)*. 2018; 10(2):7460.
52. Mobasheri A, Kalamegam G, Musumeci G, Batt ME. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas*. 2014;78(3):188–98.
53. Zayed MN, Schumacher J, Misk N, Dhar MS. Effects of pro-inflammatory cytokines on chondrogenesis of equine mesenchymal stromal cells derived from bone marrow or synovial fluid. *Vet J*. 2016;217:26–32.
54. Huang YZ, Xie HQ, Stini A, Parolini O, Zhang Y, Deng L, et al. Mesenchymal stem/progenitor cells derived from articular cartilage, synovial membrane and synovial fluid for cartilage regeneration: current status and future perspectives. *Stem Cell Rev*. 2017;13(5):575–86.
55. Zayed M, Newby S, Misk N, Donnell R, Dhar M. Xenogenic implantation of equine synovial fluid-derived mesenchymal stem cells leads to articular cartilage regeneration. *Stem Cells Int*. 2018;2018:1073705.
56. Li J, Huang Y, Song J, Li X, Zhang X, Zhou Z, et al. Cartilage regeneration using arthroscopic flushing fluid-derived mesenchymal stem cells encapsulated in a one-step rapid cross-linked hydrogel. *Acta Biomater*. 2018;79:202–15.
57. Chiang C-W, Chen W-C, Liu H-W, Chen C-H. Application of synovial fluid mesenchymal stem cells: platelet-rich plasma hydrogel for focal cartilage defect. *J Exp Clin Med*. 2014;6(4):118–24.
58. Jia Z, Liu Q, Liang Y, Li X, Xu X, Ouyang K, et al. Repair of articular cartilage defects with intra-articular injection of autologous rabbit synovial fluid-derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med*. 2018;16:123.
59. Ozeki N, Muneta T, Koga H, Nakagawa Y, Mizuno M, Tsuji K, et al. Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats. *Osteoarthr Cartil*. 2016;24(6):1061–70.
60. van Buul GM, Sebelt M, Leijts MJ, Bos PK, Waarsing JH, Kops N, et al. Mesenchymal stem cells reduce pain but not degenerative changes in a mono-iodoacetate rat model of osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2014;32(9): 1167–74.
61. Hori J, Dele M, Kobayashi T, Yasunaga Y, Kawamata S, Ochi M. Articular cartilage repair using an intra-articular magnet and synovium-derived cells. *J Orthop Res*. 2011;29(4):531–8.
62. Mak J, Jablonski CL, Leonard CA, Dunn JF, Raharjo E, Matyas JR, et al. Intra-articular injection of synovial mesenchymal stem cells improves cartilage repair in a mouse injury model. *Sci Rep*. 2016;6:23076.
63. Joswig A-J, Mitchell A, Cummings KJ, Levine GJ, Gregory CA, Smith R, et al. Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8:42.
64. Kuroda T, Matsumoto T, Mifune Y, Fukui T, Kubo S, Matsushita T, et al. Therapeutic strategy of third-generation autologous chondrocyte implantation for osteoarthritis. *Ups J Med Sci*. 2011;116(2):107–14.
65. Yuan X, Wei Y, Villasante A, Ng JJD, Aronac DE, Chao PG, et al. Stem cell delivery in tissue-specific hydrogel enabled meniscal repair in an orthotopic rat model. *Biomaterials*. 2017;132:59–71.
66. Kotaka S, Wakitani S, Shimamoto A, Kamei N, Sawa M, Adachi N, et al. Magnetic targeted delivery of induced pluripotent stem cells promotes articular cartilage repair. *Stem Cells Int*. 2017;2017:9514719. <https://doi.org/10.1155/2017/9514719>.
67. Mifune Y, Matsumoto T, Takayama K, Ota S, Li H, Meszaro LB, et al. The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair. *Osteoarthr Cartil*. 2013;21(1):175–85.

68. Matsumoto T, Cooper GM, Gharabeh B, Meszaros LB, Li G, Usas A, et al. Cartilage repair in a rat model of osteoarthritis through intraarticular transplantation of muscle-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 4 and soluble Flt-1. *Arthritis Rheum.* 2009;60(5):1390–405.
69. Galois L, Etienne S, Gossin L, Watrin-Pinzano A, Coumil-Henrionnet C, Loeuille D, et al. Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthr Cartil.* 2004;12(10):779–86.
70. Galois L, Etienne S, Henrionnet C, Scala-Bertola J, Gossin L, Mainard D, et al. Ambivalent properties of hyaluronate and hylan during post-traumatic OA in the rat knee. *Biomed Mater Eng.* 2012;22(4):235–42.
71. King W, Bendele A, Marchl T, Woodell-May J. Human blood-based anti-inflammatory solution inhibits osteoarthritis progression in a meniscal-tear rat study. *J Orthop Res.* 2017;35(10):2260–8.
72. Zayed M, Adair S, Ursini T, Schumacher J, Misk N, Dhar M. Concepts and challenges in the use of mesenchymal stem cells as a treatment for cartilage damage in the horse. *Res Vet Sci.* 2018;118:317–23.
73. Chang YH, Wu KC, Liu HW, Chu TY, Ding DC. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells reduce monosodium iodoacetate-induced apoptosis in cartilage. *C J Yi Xue Za Zhi.* 2018;30(2):71–80.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

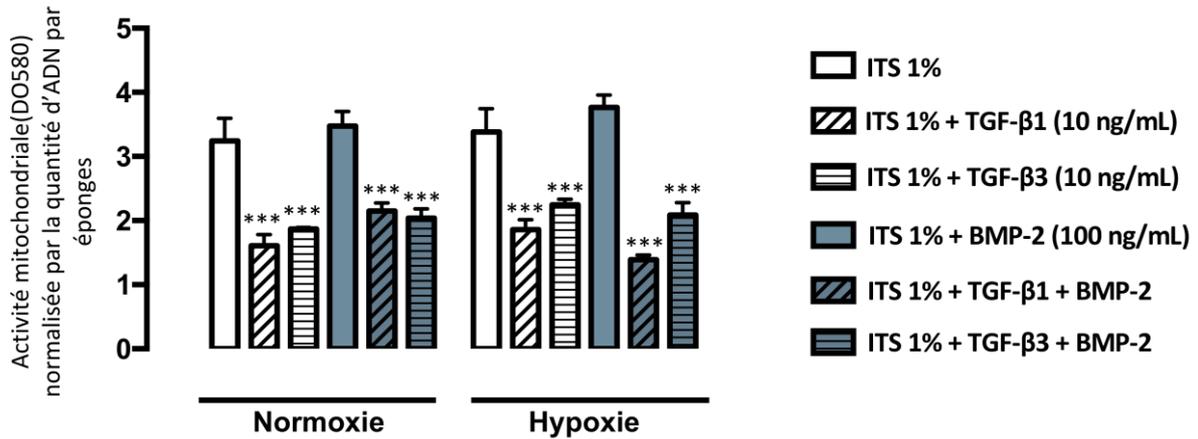
Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



# **Annexes**

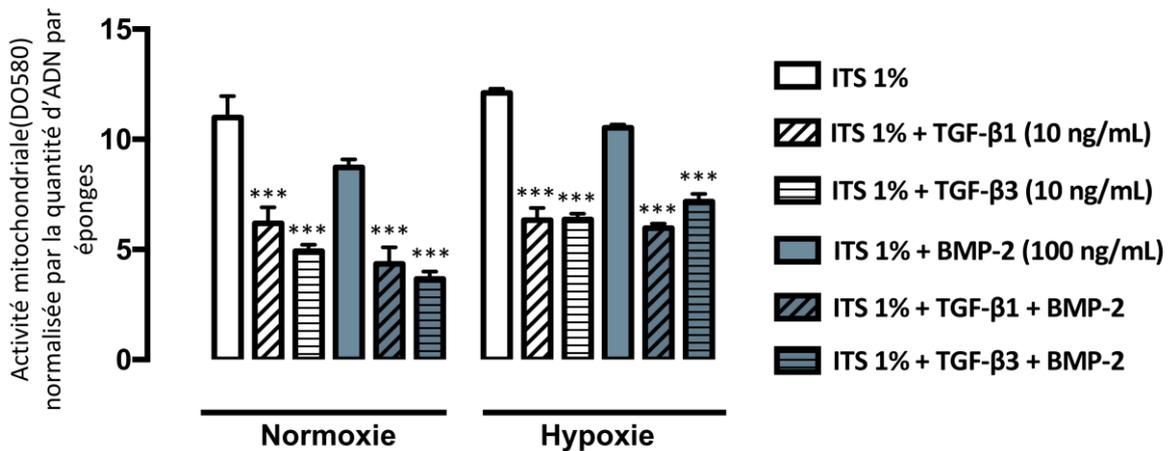
**Annexe A : Tableau des différentes amorces utilisées lors de RT-qPCR.**

Gene		Séquence de l'amorce	Température d'hybridation (°C)	Taille de l'amplicon (pb)	Numéro accession
<i>RPS29</i>	Fwd	5'-AGATGGGTCACCAGCAGCTGTACTG-3'	60	73	NM_001032
	Rev	5'-AGACACGACAAGAGCGAGAA-3'			
<i>COL2A1</i>	Fwd	5'-ATGACAATCTGGCTCCCAAC-3'	55	200	NM_001844
	Rev	5'-GAACCTGCTATTGCCCTCTG-3'			
<i>COL2B</i>	Fwd	5'-GCATGAGGGCGCGGTAGAGA-3'	70	195	NM_033150.2
	Rev	5'-TGGTCCTGGTTGCCGGACAT-3'			
<i>COL1A1</i>	Fwd	5'-AGGTGCTGATGGCTCTCCT-3'	60	104	NM_000088.3
	Rev	5'-GGACCACTTTCACCCTTGT-3'			
<i>ACAN</i> ( <i>Aggrecan</i> )	Fwd	5'-TCGAGGACAGCGAGGCC-3'	63	85	NM_001135
	Rev	5'-TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA-3'			
<i>VCAN</i> ( <i>Versican</i> )	Fwd	5'-TGTCCTCCCACTACCCTTG-3'	62	122	NM_001164098
	Rev	5'-CTCCACAGTGGGTGGTCTT-3'			
<i>COMP</i>	Fwd	5'-ACAATGACGGAGTCCTGAC-3'	60	115	NM_000095
	Rev	5'-TCTGCATCAAAGTCGTCTG-3'			
<i>SOX9</i>	Fwd	5'-GAGCAGACGCACATCTC-3'	55	118	NM_000346
	Rev	5'-CCTGGGATTGCCCGA-3'			
<i>RUNX2</i>	Fwd	5'-CCCGTGGCCTTCAAGGT-3'	60	73	NM_001278478
	Rev	5'-CGTTACCCGCCATGACAGTA-3'			
<i>BGLAP</i> ( <i>Osteocalcin</i> )	Fwd	5'-GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT-3'	62	175	NM_199173
	Rev	5'-TCAGCCAACCTCGTCACAGTC-3'			
<i>COL10A1</i>	Fwd	5'-GCTAAGGGTGAAAGGGGTTTC-3'	60	118	NM_000493
	Rev	5'-CTCCAGGATCACCTTTGGA-3'			



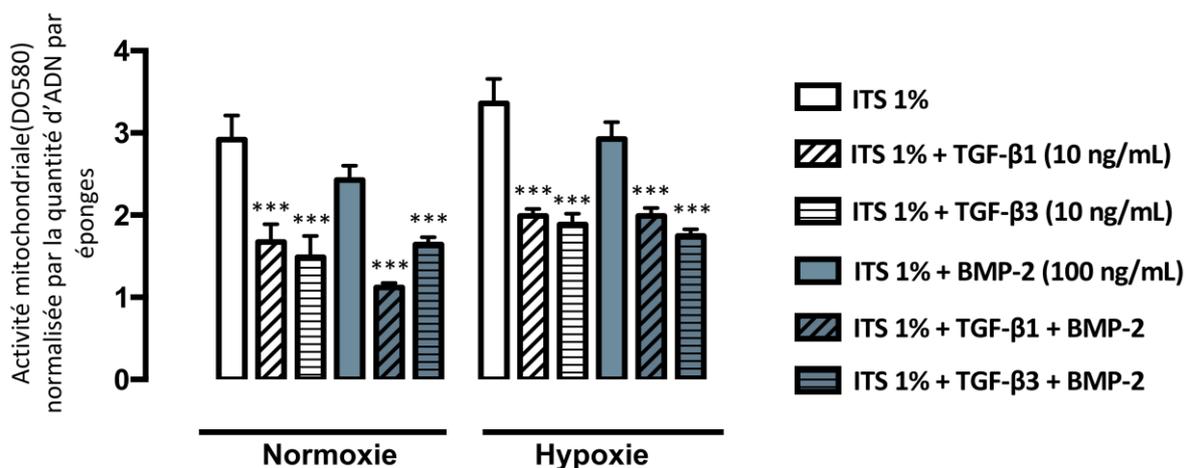
**Annexe B : L'utilisation des TGF-βs seuls ou en association avec la BMP-2 induit une diminution de l'activité mitochondriale normalisée par la quantité d'ADN dans les biomatériaux fonctionnalisés avec des CSMs issues de la moelle osseuse.**

L'activité mitochondriale a été évaluée par un test MTT et la quantité d'ADN par un dosage Hoechst. Les analyses ont été réalisées après 28 jours de différenciation sous l'influence de différents facteurs de croissance (TGF-β1, TGF-β3 et/ou BMP-2) en normoxie et en hypoxie. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA 1 facteur suivi d'un test a posteriori de Dunnett pour évaluer l'effet des facteurs de croissance vs la condition témoin (\*\*\*) puis d'une ANOVA 2 facteurs suivie d'un test a posteriori de Tukey afin d'évaluer l'effet de la tension en oxygène.



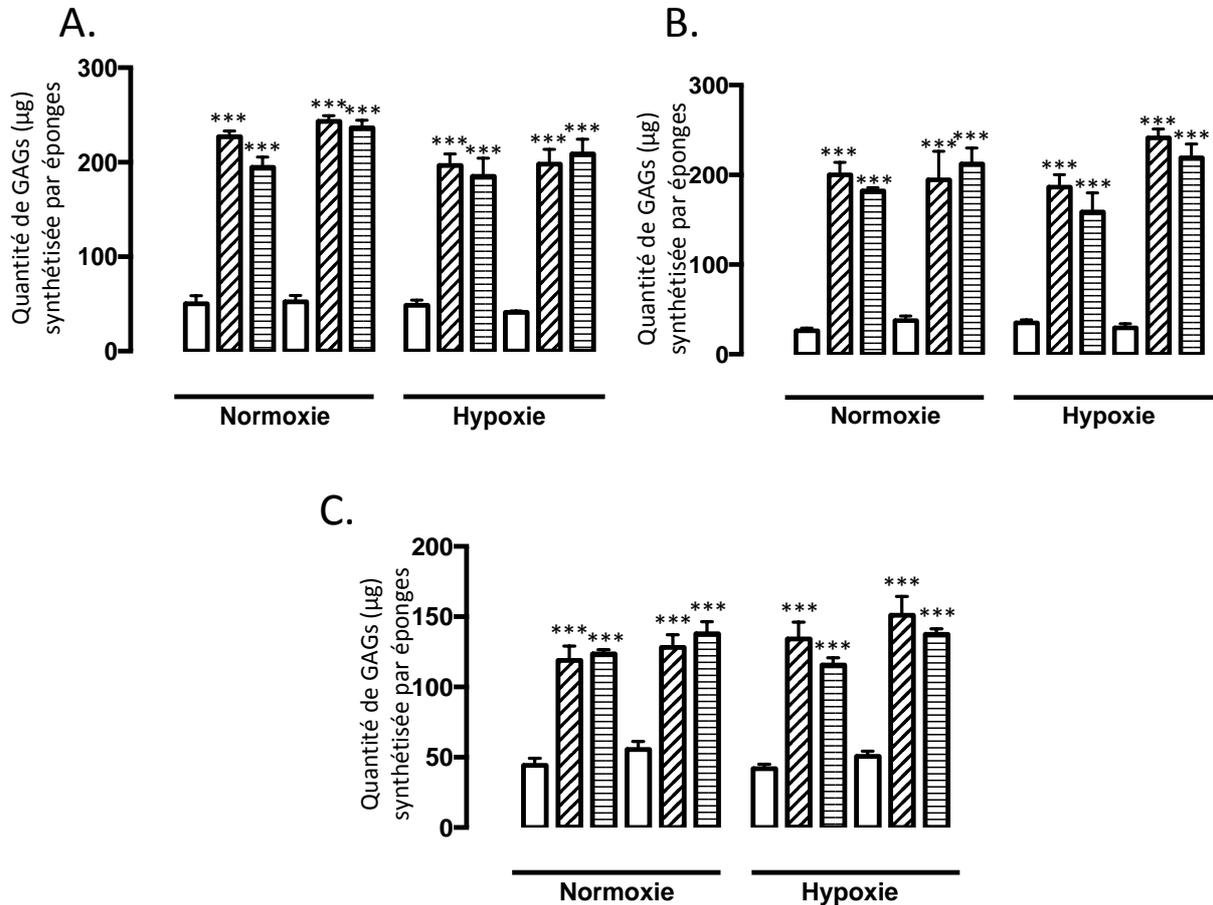
**Annexe C : L'utilisation des TGF-βs seuls ou en association avec la BMP-2 induit une diminution de l'activité mitochondriale normalisée par la quantité d'ADN dans les biomatériaux fonctionnalisés avec des CSMs issues de la membrane synoviale.**

L'activité mitochondriale a été évaluée par un test MTT et la quantité d'ADN par un dosage Hoechst. Les analyses ont été réalisées après 28 jours de différenciation sous l'influence de différents facteurs de croissance (TGF-β1, TGF-β3 et/ou BMP-2) en normoxie et en hypoxie. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA 1 facteur suivi d'un test a posteriori de Dunnett pour évaluer l'effet des facteurs de croissance vs la condition témoin (\*\*\*) puis d'une ANOVA 2 facteurs suivie d'un test a posteriori de Tukey afin d'évaluer l'effet de la tension en oxygène.



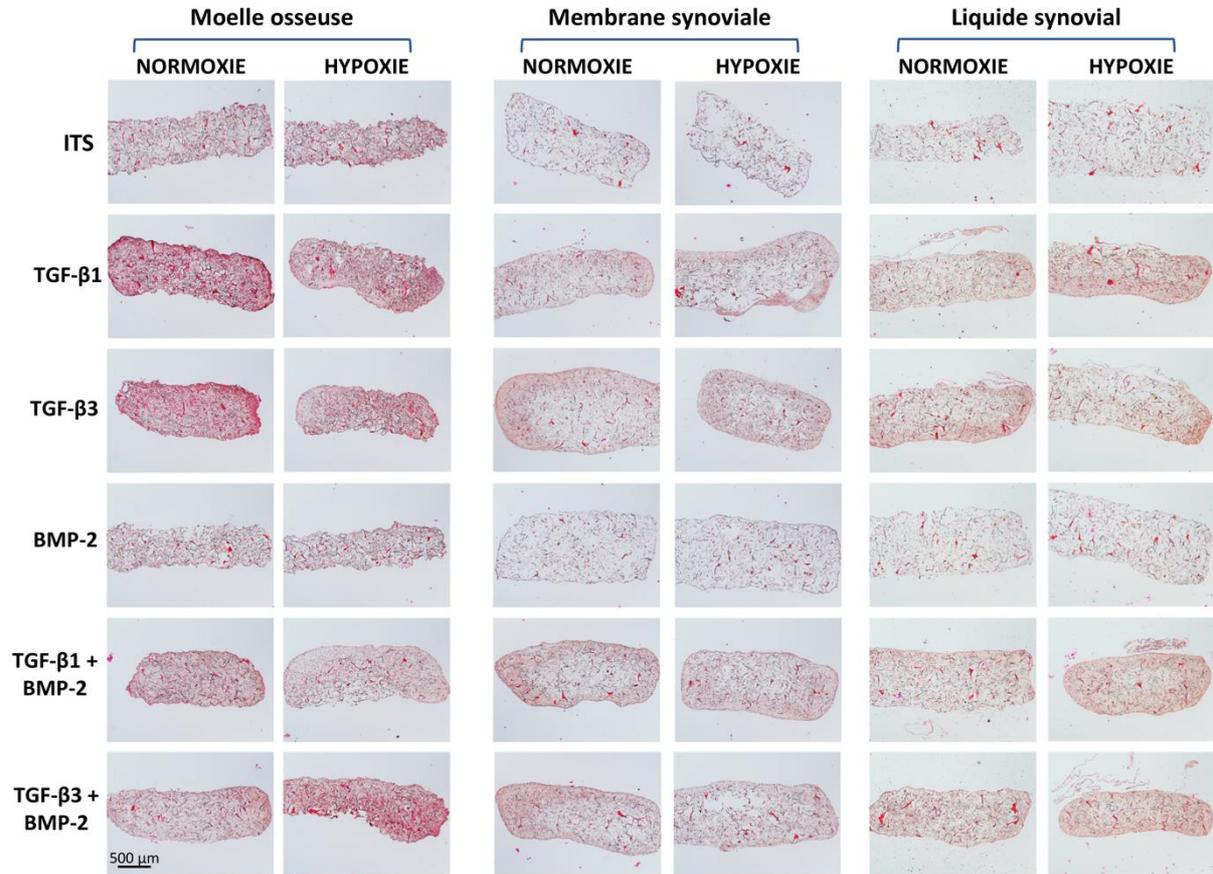
**Annexe D : L'utilisation des TGF-βs seuls ou en association avec la BMP-2 induit une diminution de l'activité mitochondriale normalisée par la quantité d'ADN dans les biomatériaux fonctionnalisés avec des CSMs issues du liquide synovial.**

L'activité mitochondriale a été évaluée par un test MTT et la quantité d'ADN par un dosage Hoechst. Les analyses ont été réalisées après 28 jours de différenciation sous l'influence de différents facteurs de croissance (TGF-β1, TGF-β3 et/ou BMP-2) en normoxie et en hypoxie. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA 1 facteur suivi d'un test a posteriori de Dunnett pour évaluer l'effet des facteurs de croissance vs la condition témoin (\*\*\*) puis d'une ANOVA 2 facteurs suivie d'un test a posteriori de Tukey afin d'évaluer l'effet de la tension en oxygène.



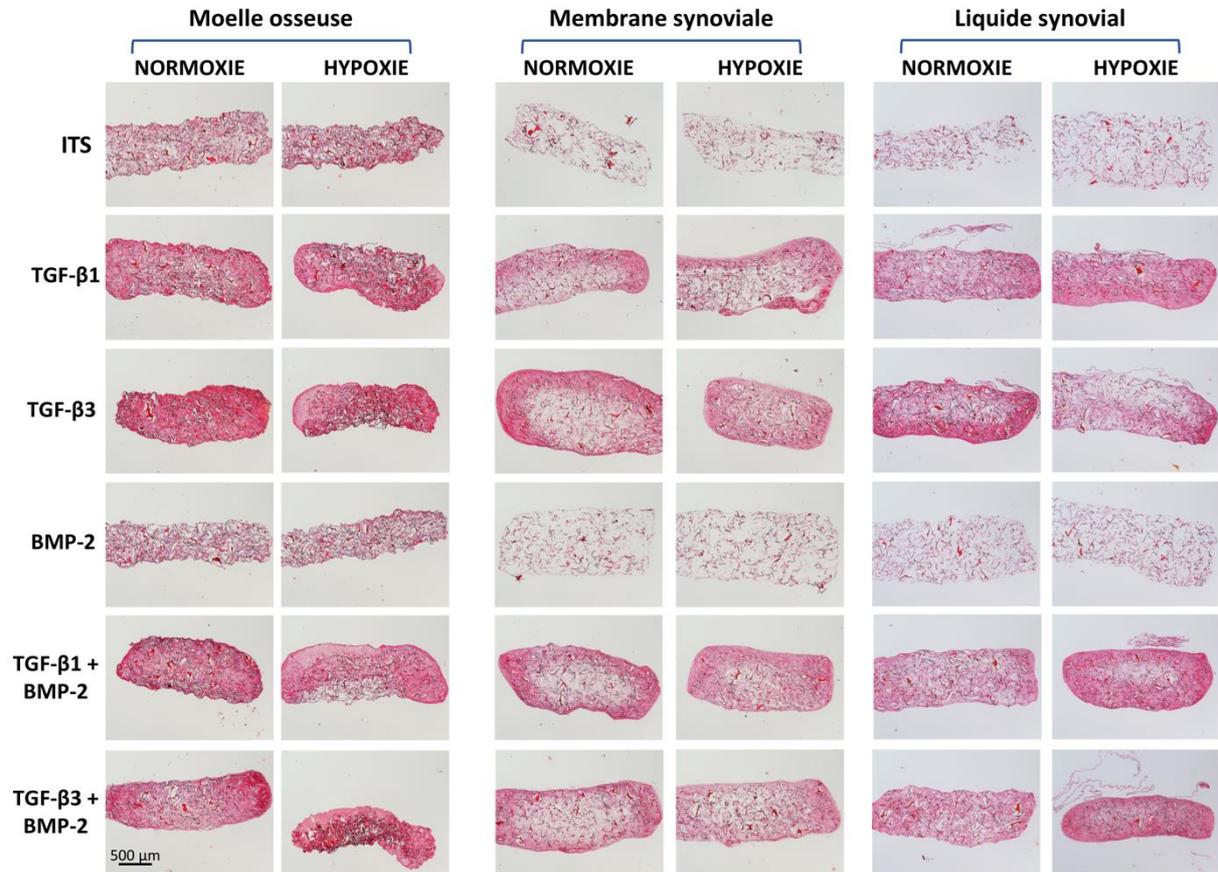
**Annexe E : L'hypoxie n'a pas d'effet significatif sur la quantité de GAGs synthétisée au sein des substituts.**

La quantité de GAGs a été évaluée par un test de Goldberg. Les analyses ont été réalisées après 28 jours de différenciation sous l'influence de différents facteurs de croissance (TGF-β1, TGF-β3 et/ou BMP-2) en normoxie et en hypoxie. A. Quantité de GAGs pour les CSMs-MO B. quantité de GAGs pour les CSMs-MS C. quantité de GAGs pour les CSMs-LS. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA 1 facteur suivi d'un test a posteriori de Dunnett pour évaluer l'effet des facteurs de croissance vs la condition témoin (\*\*p<0,001) puis d'une ANOVA 2 facteurs suivie d'un test a posteriori de Tukey afin d'évaluer l'effet de la tension en oxygène.



**Annexe F : Analyse histologique par coloration Hématoxyline-Erythrosine-Safran (HES).**

Les biomatériaux ont été fonctionnalisés avec des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide. Après 28 jours de différenciation sous l'influence de facteurs de croissance (TGF-β 1, TGF-β 3 et/ou BMP-2) et de la tension en oxygène (Normoxie-Hypoxie), les biomatériaux ont été fixés puis inclus en paraffine. Des coupes sagittales ont été colorées à l'Hématoxyline-Erythrosine-Safran (HES) afin d'évaluer la structure globale des éponges. La barre d'échelle représente 500 μm.



**Annexe G : Analyse histologique par coloration au rouge Sirius.**

Les biomatériaux ont été fonctionnalisés avec des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse, de la membrane synoviale et du liquide. Après 28 jours de différenciation sous l'influence de facteurs de croissance (TGF-β 1, TGF-β 3 et/ou BMP-2) et de la tension en oxygène (Normoxie-Hypoxie), les biomatériaux ont été fixés puis inclus en paraffine. Des coupes sagittales ont été colorées au rouge Sirius afin d'évaluer le contenu en collagène. La barre d'échelle représente 500 μm.

# **Références bibliographiques**

- [1] C. B. Carballo, Y. Nakagawa, I. Sekiya, et S. A. Rodeo, « Basic Science of Articular Cartilage », *Clin. Sports Med.*, vol. 36, n° 3, p. 413- 425, juill. 2017.
- [2] D. D. Frisbie, H. E. McCarthy, C. W. Archer, M. F. Barrett, et C. W. McIlwraith, « Evaluation of Articular Cartilage Progenitor Cells for the Repair of Articular Defects in an Equine Model », *J. Bone Jt. Surg.*, vol. 97, n° 6, p. 484- 493, mars 2015.
- [3] J. A. Buckwalter et H. J. Mankin, « Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions », *Instr. Course Lect.*, vol. 47, p. 477- 486, 1998.
- [4] A. Benninghoff, « Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion », *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, vol. 2, n° 5, p. 783- 862, nov. 1925.
- [5] A. J. Sophia Fox, A. Bedi, et S. A. Rodeo, « The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function », *Sports Health*, vol. 1, n° 6, p. 461- 468, nov. 2009.
- [6] A. M. Bhosale et J. B. Richardson, « Articular cartilage: structure, injuries and review of management », *Br. Med. Bull.*, vol. 87, p. 77- 95, 2008.
- [7] J. Martel-Pelletier, C. Boileau, J.-P. Pelletier, et P. J. Roughley, « Cartilage in normal and osteoarthritis conditions », *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 22, n° 2, p. 351- 384, avr. 2008.
- [8] D. R. Eyre, D. M. Brickley-Parsons, et M. J. Glimcher, « Predominance of type I collagen at the surface of avian articular cartilage », *FEBS Lett.*, vol. 85, n° 2, p. 259- 263, janv. 1978.
- [9] E. Aubert-Foucher, N. Mayer, M. Padeloup, A. Pagnon, D. Hartmann, et F. Mallein-Gerin, « A unique tool to selectively detect the chondrogenic IIB form of human type II procollagen protein », *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*, vol. 34, p. 80- 88, févr. 2014.
- [10] N. A. Zelenski *et al.*, « Type VI Collagen Regulates Pericellular Matrix Properties, Chondrocyte Swelling, and Mechanotransduction in Mouse Articular Cartilage: TYPE VI COLLAGEN AND MECHANOTRANSDUCTION IN CARTILAGE », *Arthritis Rheumatol.*, vol. 67, n° 5, p. 1286- 1294, mai 2015.
- [11] University of Washington, Dept. of Orthopaedics and Sports Medicine, Box 356500, Seattle, WA 98195-6500 USA, D. Eyre, M. Weis, et J.-J. Wu, « Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? », *Eur. Cell. Mater.*, vol. 12, p. 57- 63, nov. 2006.
- [12] M. D. Smith, « Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints », *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 62, n° 4, p. 303- 307, avr. 2003.
- [13] P. L. van Lent et W. B. van den Berg, « Mesenchymal stem cell therapy in osteoarthritis: advanced tissue repair or intervention with smouldering synovial activation? », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 15, n° 2, p. 112, 2013.
- [14] H. P. Kitamura, H. Yanase, H. Kitamura, et T. Iwanaga, « Unique localization of protein gene product 9.5 in type B synoviocytes in the joints of the horse », *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, vol. 47, n° 3, p. 343- 352, mars 1999.
- [15] T. Iwanaga, M. Shikichi, H. Kitamura, H. Yanase, et K. Nozawa-Inoue, « Morphology and Functional Roles of Synoviocytes in the Joint », *Arch. Histol. Cytol.*, vol. 63, n° 1, p. 17- 31, 2000.
- [16] P. I. Mapp, « Innervation of the synovium. », *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 54, n° 5, p.

398- 403, mai 1995.

- [17] M. D. Smith, « The normal synovium », *Open Rheumatol. J.*, vol. 5, p. 100- 106, 2011.
- [18] A. Wang, A. Essner, et G. Schmidig, « The effects of lubricant composition on in vitro wear testing of polymeric acetabular components », *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 68B, n° 1, p. 45- 52, 2004.
- [19] T. Kitano, G. A. Ateshian, V. C. Mow, Y. Kadoya, et Y. Yamano, « Constituents and pH changes in protein rich hyaluronan solution affect the biotribological properties of artificial articular joints », *J. Biomech.*, vol. 34, n° 8, p. 1031- 1037, août 2001.
- [20] S. Ghosh, D. Choudhury, N. S. Das, et B. Pinguan-Murphy, « Tribological role of synovial fluid compositions on artificial joints - a systematic review of the last 10 years: TRIBOLOGICAL ROLE OF SYNOVIAL FLUID COMPOSITIONS ON ARTIFICIAL JOINTS », *Lubr. Sci.*, vol. 26, n° 6, p. 387- 410, oct. 2014.
- [21] K. Hjelle, E. Solheim, T. Strand, R. Muri, et M. Brittberg, « Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies », *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg. Off. Publ. Arthrosc. Assoc. N. Am. Int. Arthrosc. Assoc.*, vol. 18, n° 7, p. 730- 734, sept. 2002.
- [22] W. Widuchowski, J. Widuchowski, et T. Trzaska, « Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies », *The Knee*, vol. 14, n° 3, p. 177- 182, juin 2007.
- [23] A. Arøen *et al.*, « Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies », *Am. J. Sports Med.*, vol. 32, n° 1, p. 211- 215, févr. 2004.
- [24] R. M. Hembry *et al.*, « Immunolocalization of matrix metalloproteinases in partial-thickness defects in pig articular cartilage. A preliminary report », *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 83-A, n° 6, p. 826- 838, juin 2001.
- [25] T. Yamamoto *et al.*, « Fibroblast growth factor-2 promotes the repair of partial thickness defects of articular cartilage in immature rabbits but not in mature rabbits », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 12, n° 8, p. 636- 641, août 2004.
- [26] W. W. Curl, J. Krome, E. S. Gordon, J. Rushing, B. P. Smith, et G. G. Poehling, « Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies », *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg. Off. Publ. Arthrosc. Assoc. N. Am. Int. Arthrosc. Assoc.*, vol. 13, n° 4, p. 456- 460, août 1997.
- [27] R. S. Sellers *et al.*, « Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) », *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 82, n° 2, p. 151- 160, févr. 2000.
- [28] M. Terajima *et al.*, « Temporal Changes in Collagen Cross-Links in Spontaneous Articular Cartilage Repair », *Cartilage*, vol. 3, n° 3, p. 278- 287, juill. 2012.
- [29] D. K. Bae, K. H. Yoon, et S. J. Song, « Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees », *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg. Off. Publ. Arthrosc. Assoc. N. Am. Int. Arthrosc. Assoc.*, vol. 22, n° 4, p. 367- 374, avr. 2006.
- [30] S. N. Redman, S. F. Oldfield, et C. W. Archer, « Current strategies for articular cartilage repair », *Eur. Cell. Mater.*, vol. 9, p. 23- 32; discussion 23-32, avr. 2005.
- [31] D. Figueroa, R. Calvo, A. Vaisman, M. A. Carrasco, C. Moraga, et I. Delgado, « Knee chondral lesions: incidence and correlation between arthroscopic and magnetic resonance findings », *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg. Off. Publ. Arthrosc. Assoc. N. Am. Int. Arthrosc.*

Assoc., vol. 23, n° 3, p. 312- 315, mars 2007.

[32] S. P. Oakley et M. N. Lassere, « A critical appraisal of quantitative arthroscopy as an outcome measure in osteoarthritis of the knee », *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 33, n° 2, p. 83- 105, oct. 2003.

[33] R. E. Outerbridge, « The etiology of chondromalacia patellae », *J. Bone Joint Surg. Br.*, vol. 43-B, p. 752- 757, nov. 1961.

[34] J. A. Beguin, J. F. Héron, J. P. Sabatier, B. Locker, et G. Souquières, « [Arthroscopy of the knee. Diagnostic value. 1005 cases] », *Nouv. Presse Med.*, vol. 11, n° 49, p. 3619- 3621, déc. 1982.

[35] R. F. Loeser, « Aging and Osteoarthritis: The Role of Chondrocyte Senescence and Aging Changes in the Cartilage Matrix », *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.*, vol. 17, n° 8, p. 971- 979, août 2009.

[36] M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, et L. Peterson, « Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation », *N. Engl. J. Med.*, vol. 331, n° 14, p. 889- 895, oct. 1994.

[37] G. Bentley, J. S. Bhamra, P. D. Gikas, J. A. Skinner, R. Carrington, et T. W. Briggs, « Repair of osteochondral defects in joints – How to achieve success », *Injury*, vol. 44, p. S3- S10, janv. 2013.

[38] M. Brittberg, L. Peterson, E. Sjögren-Jansson, T. Tallheden, et A. Lindahl, « Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments », *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 85-A Suppl 3, p. 109- 115, 2003.

[39] L. Peterson, H. S. Vasiliadis, M. Brittberg, et A. Lindahl, « Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up », *Am. J. Sports Med.*, vol. 38, n° 6, p. 1117- 1124, juin 2010.

[40] A. Pareek, J. L. Carey, P. J. Reardon, L. Peterson, M. J. Stuart, et A. J. Krych, « Long-Term Outcomes after Autologous Chondrocyte Implantation », *Cartilage*, vol. 7, n° 4, p. 298- 308, oct. 2016.

[41] C. Vinatier, D. Mrugala, C. Jorgensen, J. Guicheux, et D. Noël, « Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors », *Trends Biotechnol.*, vol. 27, n° 5, p. 307- 314, mai 2009.

[42] M. Demoor *et al.*, « Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1840, n° 8, p. 2414- 2440, août 2014.

[43] C. B. Weinberg et E. Bell, « A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells », *Science*, vol. 231, n° 4736, p. 397- 400, janv. 1986.

[44] C. H. Lee, A. Singla, et Y. Lee, « Biomedical applications of collagen », *Int. J. Pharm.*, vol. 221, n° 1- 2, p. 1- 22, juin 2001.

[45] J. Iwasa, L. Engebretsen, Y. Shima, et M. Ochi, « Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering », *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, vol. 17, n° 6, p. 561- 577, juin 2009.

[46] L. Galois, A.-M. Freyria, D. Herbage, et D. Mainard, « [Cartilage tissue engineering:

state-of-the-art and future approaches] », *Pathol. Biol. (Paris)*, vol. 53, n° 10, p. 590- 598, déc. 2005.

[47] T. M. Freyman, I. V. Yannas, et L. J. Gibson, « Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering », *Prog. Mater. Sci.*, vol. 46, n° 3, p. 273- 282, janv. 2001.

[48] F. J. O'Brien, B. A. Harley, I. V. Yannas, et L. J. Gibson, « The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds », *Biomaterials*, vol. 26, n° 4, p. 433- 441, févr. 2005.

[49] A. Gigante, C. Bevilacqua, A. Ricevuto, M. Mattioli-Belmonte, et F. Greco, « Membrane-seeded autologous chondrocytes: cell viability and characterization at surgery », *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, vol. 15, n° 1, p. 88- 92, janv. 2007.

[50] A.-M. Freyria *et al.*, « Comparative Phenotypic Analysis of Articular Chondrocytes Cultured within Type I or Type II Collagen Scaffolds », *Tissue Eng. Part A*, vol. 15, n° 6, p. 1233- 1245, oct. 2008.

[51] S. Wakitani *et al.*, « Embryonic stem cells form articular cartilage, not teratomas, in osteochondral defects of rat joints », *Cell Transplant.*, vol. 13, n° 4, p. 331- 336, 2004.

[52] Y. Zhang, F. Wang, J. Chen, Z. Ning, et L. Yang, « Bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus bone marrow nucleated cells in the treatment of chondral defects », *Int. Orthop.*, vol. 36, n° 5, p. 1079- 1086, mai 2012.

[53] P. Angele *et al.*, « Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices », *Biomaterials*, vol. 25, n° 14, p. 2831- 2841, juin 2004.

[54] M. Zscharnack *et al.*, « Repair of chronic osteochondral defects using predifferentiated mesenchymal stem cells in an ovine model », *Am. J. Sports Med.*, vol. 38, n° 9, p. 1857- 1869, sept. 2010.

[55] B. Marquass *et al.*, « Matrix-associated implantation of predifferentiated mesenchymal stem cells versus articular chondrocytes: in vivo results of cartilage repair after 1 year », *Am. J. Sports Med.*, vol. 39, n° 7, p. 1401- 1412, juill. 2011.

[56] C. Vepari et D. L. Kaplan, « Silk as a Biomaterial », *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, n° 8- 9, p. 991- 1007, 2007.

[57] H.-J. Jin, J. Chen, V. Karageorgiou, G. H. Altman, et D. L. Kaplan, « Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats », *Biomaterials*, vol. 25, n° 6, p. 1039- 1047, mars 2004.

[58] R. Seda Tigli *et al.*, « Comparative chondrogenesis of human cell sources in 3D scaffolds », *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 3, n° 5, p. 348- 360, juill. 2009.

[59] F. Li, Y.-Z. Chen, Z.-N. Miao, S.-Y. Zheng, et J. Jin, « Human placenta-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin biomaterial in the repair of articular cartilage defects », *Cell. Reprogramming*, vol. 14, n° 4, p. 334- 341, août 2012.

[60] X. Ding *et al.*, « Integrated trilayered silk fibroin scaffold for osteochondral differentiation of adipose-derived stem cells », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, n° 19, p. 16696- 16705, oct. 2014.

[61] C. Domm, M. Schünke, K. Christesen, et B. Kurz, « Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension », *Osteoarthr.*

*Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.*, vol. 10, n° 1, p. 13- 22, janv. 2002.

[62] B. Shen, A. Wei, H. Tao, A. D. Diwan, et D. D. F. Ma, « BMP-2 enhances TGF-beta3-mediated chondrogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in alginate bead culture », *Tissue Eng. Part A*, vol. 15, n° 6, p. 1311- 1320, juin 2009.

[63] A. T. Mehlhorn *et al.*, « Mesenchymal stem cells maintain TGF-beta-mediated chondrogenic phenotype in alginate bead culture », *Tissue Eng.*, vol. 12, n° 6, p. 1393- 1403, juin 2006.

[64] C. S. D. Lee, E. Watkins, O. A. Burnsed, Z. Schwartz, et B. D. Boyan, « Tailoring Adipose Stem Cell Trophic Factor Production with Differentiation Medium Components to Regenerate Chondral Defects », *Tissue Eng. Part A*, vol. 19, n° 11- 12, p. 1451- 1464, juin 2013.

[65] Y. Park, M. Sugimoto, A. Watrin, M. Chiquet, et E. B. Hunziker, « BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 13, n° 6, p. 527- 536, juin 2005.

[66] M. Spoliti, P. Iudicone, R. Leone, A. De Rosa, F. R. Rossetti, et L. Pierelli, « In vitro release and expansion of mesenchymal stem cells by a hyaluronic acid scaffold used in combination with bone marrow », *Muscles Ligaments Tendons J.*, vol. 2, n° 4, p. 289- 294, oct. 2012.

[67] C. Chung et J. A. Burdick, « Influence of Three-Dimensional Hyaluronic Acid Microenvironments on Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis », *Tissue Eng. Part A*, vol. 15, n° 2, p. 243- 254, févr. 2009.

[68] B. Grigolo *et al.*, « Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAff 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis », *Biomaterials*, vol. 23, n° 4, p. 1187- 1195, févr. 2002.

[69] H. Tan, Y. Gong, L. Lao, Z. Mao, et C. Gao, « Gelatin/chitosan/hyaluronan ternary complex scaffold containing basic fibroblast growth factor for cartilage tissue engineering », *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 18, n° 10, p. 1961- 1968, oct. 2007.

[70] Y. A. (Kyungpook N. U. Lee *et al.*, « Redifferentiation of Dedifferentiated Chondrocytes on Chitosan Membranes and Involvement of PKC $\alpha$  and p38 MAP Kinase », *Mol. Cells*, 2007.

[71] Y. Han, Y. Wei, S. Wang, et Y. Song, « Cartilage regeneration using adipose-derived stem cells and the controlled-released hybrid microspheres », *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.*, vol. 77, n° 1, p. 27- 31, janv. 2010.

[72] D. Kazemi, K. Shams Asenjan, N. Dehdilani, et H. Parsa, « Canine articular cartilage regeneration using mesenchymal stem cells seeded on platelet rich fibrin: Macroscopic and histological assessments », *Bone Jt. Res.*, vol. 6, n° 2, p. 98- 107, févr. 2017.

[73] J. E. J. Bekkers *et al.*, « Single-stage cell-based cartilage regeneration using a combination of chondrons and mesenchymal stromal cells: comparison with microfracture », *Am. J. Sports Med.*, vol. 41, n° 9, p. 2158- 2166, sept. 2013.

[74] L. S. Moreira-Teixeira et L. Wu, « Cartilage Tissue Engineering », *Cartil. Tissue Eng.*, p. 14. 2011

- [75] D. Puppi, F. Chiellini, A. M. Piras, et E. Chiellini, « Polymeric materials for bone and cartilage repair », *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, n° 4, p. 403- 440, avr. 2010.
- [76] M. Jagielski *et al.*, « The Influence of IL-10 and TNF $\alpha$  on Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stromal Cells in Three-Dimensional Cultures », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, n° 9, p. 15821- 15844, sept. 2014.
- [77] X. Z. Zhou, V. Y. Leung, Q. R. Dong, K. M. Cheung, D. Chan, et W. W. Lu, « Mesenchymal stem cell-based repair of articular cartilage with polyglycolic acid-hydroxyapatite biphasic scaffold », *Int. J. Artif. Organs*, vol. 31, n° 6, p. 480- 489, juin 2008.
- [78] L. Cui *et al.*, « Repair of articular cartilage defect in non-weight bearing areas using adipose derived stem cells loaded polyglycolic acid mesh », *Biomaterials*, vol. 30, n° 14, p. 2683- 2693, mai 2009.
- [79] G.-I. Im, H.-J. Kim, et J. H. Lee, « Chondrogenesis of adipose stem cells in a porous PLGA scaffold impregnated with plasmid DNA containing SOX trio (SOX-5,-6 and -9) genes », *Biomaterials*, vol. 32, n° 19, p. 4385- 4392, juill. 2011.
- [80] C.-H. Lu *et al.*, « Improved chondrogenesis and engineered cartilage formation from TGF- $\beta$ 3-expressing adipose-derived stem cells cultured in the rotating-shaft bioreactor », *Tissue Eng. Part A*, vol. 18, n° 19- 20, p. 2114- 2124, oct. 2012.
- [81] E. López-Ruiz *et al.*, « Chondrocytes extract from patients with osteoarthritis induces chondrogenesis in infrapatellar fat pad-derived stem cells », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 21, n° 1, p. 246- 258, janv. 2013.
- [82] P. H. Ousema *et al.*, « The inhibition by interleukin 1 of MSC chondrogenesis and the development of biomechanical properties in biomimetic 3D woven PCL scaffolds », *Biomaterials*, vol. 33, n° 35, p. 8967- 8974, déc. 2012.
- [83] C. K. Abrahamsson *et al.*, « Chondrogenesis and mineralization during in vitro culture of human mesenchymal stem cells on three-dimensional woven scaffolds », *Tissue Eng. Part A*, vol. 16, n° 12, p. 3709- 3718, déc. 2010.
- [84] H.-J. Kim, J.-H. Lee, et G.-I. Im, « Chondrogenesis using mesenchymal stem cells and PCL scaffolds », *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 92, n° 2, p. 659- 666, févr. 2010.
- [85] P. C. Kreuz *et al.*, « Repair of focal cartilage defects with scaffold-assisted autologous chondrocyte grafts: clinical and biomechanical results 48 months after transplantation », *Am. J. Sports Med.*, vol. 39, n° 8, p. 1697- 1705, août 2011.
- [86] G.-I. Im et J. H. Lee, « Repair of osteochondral defects with adipose stem cells and a dual growth factor-releasing scaffold in rabbits », *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 92, n° 2, p. 552- 560, févr. 2010.
- [87] M. Morille, K. Toupet, C. N. Montero-Menei, C. Jorgensen, et D. Noël, « PLGA-based microcarriers induce mesenchymal stem cell chondrogenesis and stimulate cartilage repair in osteoarthritis », *Biomaterials*. 2016
- [88] J. M. Patrascu *et al.*, « Polyglycolic acid-hyaluronan scaffolds loaded with bone marrow-derived mesenchymal stem cells show chondrogenic differentiation in vitro and cartilage repair in the rabbit model », *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 101, n° 7, p. 1310- 1320, oct. 2013.

- [89] A. M. Haleem et C. R. Chu, « Advances in Tissue Engineering Techniques for Articular Cartilage Repair », *Oper. Tech. Orthop.*, vol. 20, n° 2, p. 76- 89, juin 2010.
- [90] B. K. Babur *et al.*, « The interplay between chondrocyte redifferentiation pellet size and oxygen concentration », *PloS One*, vol. 8, n° 3, p. e58865, 2013.
- [91] L. Siminovitch, E. A. McCulloch, et J. E. Till, « The distribution of colony-forming cells among spleen colonies », *J. Cell. Comp. Physiol.*, vol. 62, n° 3, p. 327- 336, déc. 1963.
- [92] B. D. Simons et H. Clevers, « Strategies for Homeostatic Stem Cell Self-Renewal in Adult Tissues », *Cell*, vol. 145, n° 6, p. 851- 862, juin 2011.
- [93] M. Stojkovic, M. Lako, T. Strachan, et A. Murdoch, « Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells », *Reprod. Camb. Engl.*, vol. 128, n° 3, p. 259- 267, sept. 2004.
- [94] W. S. Toh, E. H. Lee, et T. Cao, « Potential of human embryonic stem cells in cartilage tissue engineering and regenerative medicine », *Stem Cell Rev.*, vol. 7, n° 3, p. 544- 559, sept. 2011.
- [95] S. Pilichi *et al.*, « Treatment with embryonic stem-like cells into osteochondral defects in sheep femoral condyles », *BMC Vet. Res.*, vol. 10, déc. 2014.
- [96] K. Okita, T. Ichisaka, et S. Yamanaka, « Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells », *Nature*, vol. 448, n° 7151, p. 313- 317, juill. 2007.
- [97] J. Yu *et al.*, « Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells », *Science*, vol. 318, n° 5858, p. 1917- 1920, déc. 2007.
- [98] H. Outani, M. Okada, A. Yamashita, K. Nakagawa, H. Yoshikawa, et N. Tsumaki, « Direct Induction of Chondrogenic Cells from Human Dermal Fibroblast Culture by Defined Factors », in *PloS one*, 2013.
- [99] R. M. Guzzo, V. Scanlon, A. Sanjay, R.-H. Xu, et H. Drissi, « Establishment of Human cell Type-Specific iPS cells with Enhanced Chondrogenic Potential », *Stem Cell Rev. Rep.*, vol. 10, p. 820- 829, 2014.
- [100] Y. A. Rim *et al.*, « Different Chondrogenic Potential among Human Induced Pluripotent Stem Cells from Diverse Origin Primary Cells », *Stem Cells International*, 2018. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/9432616/ref/>. [Consulté le: 05-oct-2018].
- [101] N. Tsumaki, M. Okada, et A. Yamashita, « iPS cell technologies and cartilage regeneration », *Bone*, vol. 70, p. 48- 54, janv. 2015.
- [102] M. F. Pittenger *et al.*, « Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells », *Science*, vol. 284, n° 5411, p. 143- 147, avr. 1999.
- [103] C. De Bari, F. Dell'Accio, P. Tylzanowski, et F. P. Luyten, « Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane », *Arthritis Rheum.*, vol. 44, n° 8, p. 1928- 1942, août 2001.
- [104] E. A. Jones *et al.*, « Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 50, n° 3, p. 817- 827, mars 2004.

- [105] P. A. Zuk *et al.*, « Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies », *Tissue Eng.*, vol. 7, n° 2, p. 211- 228, avr. 2001.
- [106] E. Anitua, M. Troya, et M. Zaldueño, « Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine », *Cytotherapy*, vol. 20, n° 4, p. 479- 498, avr. 2018.
- [107] F. Rossignoli *et al.*, « Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood », *BioMed Res. Int.*, vol. 2013, p. 901821, 2013.
- [108] O. Trohatou et M. G. Roubelakis, « Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine: Past, Present, and Future », *Cell. Reprogramming*, vol. 19, n° 4, p. 217- 224, août 2017.
- [109] H.-S. Wang *et al.*, « Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord », *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 22, n° 7, p. 1330- 1337, 2004.
- [110] M. Dominici *et al.*, « Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement », *Cytotherapy*, vol. 8, n° 4, p. 315- 317, 2006.
- [111] K. D. McElreavey, A. I. Irvine, K. T. Ennis, et W. H. McLean, « Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord », *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 19, n° 1, p. 29S, févr. 1991.
- [112] C.-Y. Fong *et al.*, « Derivation efficiency, cell proliferation, freeze-thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton's jelly stem cells », *Reprod. Biomed. Online*, vol. 21, n° 3, p. 391- 401, sept. 2010.
- [113] K. Gauthaman *et al.*, « Extra-embryonic human Wharton's jelly stem cells do not induce tumorigenesis, unlike human embryonic stem cells », *Reprod. Biomed. Online*, vol. 24, n° 2, p. 235- 246, févr. 2012.
- [114] L. Reppel *et al.*, « Chondrogenic induction of mesenchymal stromal/stem cells from Wharton's jelly embedded in alginate hydrogel and without added growth factor: an alternative stem cell source for cartilage tissue engineering », *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 6, déc. 2015.
- [115] J. Chung, M. Song, C.-W. Ha, J.-A. Kim, C.-H. Lee, et Y.-B. Park, « Comparison of articular cartilage repair with different hydrogel-human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell composites in a rat model », *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 5, n° 2, p. 39, 2014.
- [116] S. Kazemnejad, M. Khanmohammadi, N. Baheiraei, et S. Arasteh, « Current State of Cartilage Tissue Engineering using Nanofibrous Scaffolds and Stem Cells », *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, vol. 9, n° 2, p. 50- 65, juin 2017.
- [117] K. Bieback, S. Kern, H. Klüter, et H. Eichler, « Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood », *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 22, n° 4, p. 625- 634, 2004.
- [118] R. Secunda, R. Vennila, A. M. Mohanashankar, M. Rajasundari, S. Jeswanth, et R. Surendran, « Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study », *Cytotechnology*, vol. 67, n° 5, p. 793- 807, oct. 2015.

- [119] A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhjan, et K. S. Lalykina, « The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells », *Cell Tissue Kinet.*, vol. 3, n° 4, p. 393- 403, oct. 1970.
- [120] M. Owen et A. J. Friedenstein, « Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors », *Ciba Found. Symp.*, vol. 136, p. 42- 60, 1988.
- [121] A. I. Caplan, « Mesenchymal stem cells », *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.*, vol. 9, n° 5, p. 641- 650, sept. 1991.
- [122] S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, et K. Bieback, « Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue », *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 24, n° 5, p. 1294- 1301, mai 2006.
- [123] M. M. Bonab, K. Alimoghaddam, F. Talebian, S. H. Ghaffari, A. Ghavamzadeh, et B. Nikbin, « Aging of mesenchymal stem cell in vitro », *BMC Cell Biol.*, p. 7, 2006.
- [124] D. G. Phinney et L. Sensebé, « Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts », *Cytotherapy*, vol. 15, n° 2, p. 140- 145, févr. 2013.
- [125] E.-R. Chiang, H.-L. Ma, J.-P. Wang, C.-L. Liu, T.-H. Chen, et S.-C. Hung, « Allogeneic Mesenchymal Stem Cells in Combination with Hyaluronic Acid for the Treatment of Osteoarthritis in Rabbits », *PLOS ONE*, vol. 11, n° 2, p. e0149835, févr. 2016.
- [126] G. Desando *et al.*, « Short-Term Homing of Hyaluronan-Primed Cells: Therapeutic Implications for Osteoarthritis Treatment », *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 24, n° 2, p. 121- 133, 2018.
- [127] M. Sato *et al.*, « Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of Hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 14, n° 1, p. R31, 2012.
- [128] J. M. Murphy, D. J. Fink, E. B. Hunziker, et F. P. Barry, « Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 48, n° 12, p. 3464- 3474, déc. 2003.
- [129] A. M. Suhaeb, S. Naveen, A. Mansor, et T. Kamarul, « Hyaluronic acid with or without bone marrow derived-mesenchymal stem cells improves osteoarthritic knee changes in rat model: a preliminary report », *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 50, n° 6, p. 383- 390, juin 2012.
- [130] G. M. van Buul *et al.*, « Mesenchymal stem cells reduce pain but not degenerative changes in a mono-iodoacetate rat model of osteoarthritis », *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.*, vol. 32, n° 9, p. 1167- 1174, sept. 2014.
- [131] S. Wakitani *et al.*, « Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage », *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 76, n° 4, p. 579- 592, avr. 1994.
- [132] B. Grigolo *et al.*, « Osteoarthritis treated with mesenchymal stem cells on hyaluronan-based scaffold in rabbit », *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 15, n° 4, p. 647- 658, déc. 2009.
- [133] B. Sridharan, A. D. Laflin, M. A. Holtz, D. M. Pacicca, N. K. Wischmeier, et M. S. Detamore, « In vivo evaluation of stem cell aggregates on osteochondral regeneration », *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.*, vol. 35, n° 8, p. 1606- 1616, 2017.
- [134] M. Itokazu *et al.*, « Transplantation of Scaffold-Free Cartilage-Like Cell-Sheets Made from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair: A Preclinical Study », *Cartilage*, vol. 7, n° 4, p. 361- 372, oct. 2016.

- [135] Y. Qi, Y. Du, W. Li, X. Dai, T. Zhao, et W. Yan, « Cartilage repair using mesenchymal stem cell (MSC) sheet and MSCs-loaded bilayer PLGA scaffold in a rabbit model », *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA*, vol. 22, n° 6, p. 1424- 1433, juin 2014.
- [136] J. S. Wayne, C. L. McDowell, K. J. Shields, et R. S. Tuan, « In vivo response of polylactic acid-alginate scaffolds and bone marrow-derived cells for cartilage tissue engineering », *Tissue Eng.*, vol. 11, n° 5- 6, p. 953- 963, juin 2005.
- [137] M. J. Oedayrajsingh-Varma *et al.*, « Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure », *Cytotherapy*, vol. 8, n° 2, p. 166- 177, 2006.
- [138] B. T. Estes, B. O. Diekman, J. M. Gimble, et F. Guilak, « Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype », *Nat. Protoc.*, vol. 5, n° 7, p. 1294- 1311, juill. 2010.
- [139] A. M. Adams, E. M. Arruda, et L. M. Larkin, « Use of adipose-derived stem cells to fabricate scaffoldless tissue-engineered neural conduits in vitro », *Neuroscience*, vol. 201, p. 349- 356, janv. 2012.
- [140] P. Van Pham *et al.*, « Activated platelet-rich plasma improves adipose-derived stem cell transplantation efficiency in injured articular cartilage », *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 4, n° 4, p. 91, août 2013.
- [141] C. Feng *et al.*, « Efficacy and Persistence of Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Combined with Hyaluronic Acid in Osteoarthritis After Intra-articular Injection in a Sheep Model », *Tissue Eng. Part A*, vol. 24, n° 3- 4, p. 219- 233, 2018.
- [142] L. C. Hermeto *et al.*, « Effects of intra-articular injection of mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma in a rabbit model of osteoarthritis », *Genet. Mol. Res. GMR*, vol. 15, n° 3, sept. 2016.
- [143] S.-Y. Tsai, Y.-C. Huang, L.-L. Chueh, L.-S. Yeh, et C.-S. Lin, « Intra-articular transplantation of porcine adipose-derived stem cells for the treatment of canine osteoarthritis: A pilot study », *World J. Transplant.*, vol. 4, n° 3, p. 196- 205, sept. 2014.
- [144] K. Masuoka *et al.*, « Tissue engineering of articular cartilage with autologous cultured adipose tissue-derived stromal cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane sealing in rabbits », *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 79, n° 1, p. 25- 34, oct. 2006.
- [145] J. L. Dragoo *et al.*, « Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells », *Tissue Eng.*, vol. 13, n° 7, p. 1615- 1621, juill. 2007.
- [146] H.-N. Zhang, L. Li, P. Leng, Y.-Z. Wang, et C.-Y. Lv, « Uninduced adipose-derived stem cells repair the defect of full-thickness hyaline cartilage », *Chin. J. Traumatol. Zhonghua Chuang Shang Za Zhi*, vol. 12, n° 2, p. 92- 97, avr. 2009.
- [147] K. Zhang *et al.*, « Repair of an articular cartilage defect using adipose-derived stem cells loaded on a polyelectrolyte complex scaffold based on poly(l-glutamic acid) and chitosan », *Acta Biomater.*, vol. 9, n° 7, p. 7276- 7288, juill. 2013.

- [148] J. Shi *et al.*, « Nanoparticle delivery of the bone morphogenetic protein 4 gene to adipose-derived stem cells promotes articular cartilage repair in vitro and in vivo », *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg. Off. Publ. Arthrosc. Assoc. N. Am. Int. Arthrosc. Assoc.*, vol. 29, n° 12, p. 2001-2011.e2, déc. 2013.
- [149] Z. J. Wang *et al.*, « Repair of articular cartilage defects by tissue-engineered cartilage constructed with adipose-derived stem cells and acellular cartilaginous matrix in rabbits », *Genet. Mol. Res. GMR*, vol. 13, n° 2, p. 4599- 4606, juin 2014.
- [150] W. J. F. M. Jurgens *et al.*, « One-step surgical procedure for the treatment of osteochondral defects with adipose-derived stem cells in a caprine knee defect: a pilot study », *BioResearch Open Access*, vol. 2, n° 4, p. 315- 325, août 2013.
- [151] S. P. Grogan *et al.*, « Identification of markers to characterize and sort human articular chondrocytes with enhanced in vitro chondrogenic capacity », *Arthritis Rheum.*, vol. 56, n° 2, p. 586- 595, févr. 2007.
- [152] S. Alsalameh, R. Amin, T. Gemba, et M. Lotz, « Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage », *Arthritis Rheum.*, vol. 50, n° 5, p. 1522- 1532, mai 2004.
- [153] E. Kozhemyakina *et al.*, « Identification of a Prg4-expressing articular cartilage progenitor cell population in mice », *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ*, vol. 67, n° 5, p. 1261- 1273, mai 2015.
- [154] D. Pretzel *et al.*, « Relative percentage and zonal distribution of mesenchymal progenitor cells in human osteoarthritic and normal cartilage », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 13, n° 2, p. R64, avr. 2011.
- [155] X. Su *et al.*, « CD146 as a new marker for an increased chondroprogenitor cell sub-population in the later stages of osteoarthritis: CD146 USED FOR CHONDROPROGENITORS », *J. Orthop. Res.*, vol. 33, n° 1, p. 84- 91, janv. 2015.
- [156] R. Williams *et al.*, « Identification and Clonal Characterisation of a Progenitor Cell Sub-Population in Normal Human Articular Cartilage », *PLoS ONE*, vol. 5, n° 10, p. e13246, oct. 2010.
- [157] W. H. Choi *et al.*, « Fetal Cartilage-Derived Cells Have Stem Cell Properties and Are a Highly Potent Cell Source for Cartilage Regeneration », *Cell Transplant.*, vol. 25, n° 3, p. 449- 461, 2016.
- [158] A. Salamon *et al.*, « Articular cartilage-derived cells hold a strong osteogenic differentiation potential in comparison to mesenchymal stem cells in vitro », *Exp. Cell Res.*, vol. 319, n° 18, p. 2856- 2865, nov. 2013.
- [159] H. E. McCarthy, J. J. Bara, K. Brakspear, S. K. Singhrao, et C. W. Archer, « The comparison of equine articular cartilage progenitor cells and bone marrow-derived stromal cells as potential cell sources for cartilage repair in the horse », *Vet. J. Lond. Engl.* 1997, vol. 192, n° 3, p. 345- 351, juin 2012.
- [160] P. Marcus, C. De Bari, F. Dell'Accio, et C. W. Archer, « Articular Chondroprogenitor Cells Maintain Chondrogenic Potential but Fail to Form a Functional Matrix When Implanted Into Muscles of SCID Mice », *CARTILAGE*, vol. 5, n° 4, p. 231 - 240, oct. 2014.
- [161] P. S. Rosen, P. H. Pritzker, J. Greenbaum, R. C. Holgate, et A. M. Noyek, « Synovial

chondromatosis affecting the temporomandibular joint. Case report and literature review », *Arthritis Rheum.*, vol. 20, n° 2, p. 736- 740, mars 1977.

[162] H. Maurice, M. Crone, et I. Watt, « Synovial chondromatosis », *J. Bone Joint Surg. Br.*, vol. 70, n° 5, p. 807- 811, nov. 1988.

[163] T. B. Kurth, F. Dell'accio, V. Crouch, A. Augello, P. T. Sharpe, et C. De Bari, « Functional mesenchymal stem cell niches in adult mouse knee joint synovium in vivo », *Arthritis Rheum.*, vol. 63, n° 5, p. 1289- 1300, mai 2011.

[164] F. Vandenabeele *et al.*, « Morphological and immunocytochemical characterization of cultured fibroblast-like cells derived from adult human synovial membrane », *Arch. Histol. Cytol.*, vol. 66, n° 2, p. 145- 153, mai 2003.

[165] T. Hermida-Gómez *et al.*, « Quantification of cells expressing mesenchymal stem cell markers in healthy and osteoarthritic synovial membranes », *J. Rheumatol.*, vol. 38, n° 2, p. 339- 349, févr. 2011.

[166] B. A. Jones et M. Pei, « Synovium-Derived Stem Cells: A Tissue-Specific Stem Cell for Cartilage Engineering and Regeneration », *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 18, n° 4, p. 301- 311, mars 2012.

[167] T. Mochizuki *et al.*, « Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans », *Arthritis Rheum.*, vol. 54, n° 3, p. 843- 853, mars 2006.

[168] S. Y. Lee, T. Nakagawa, et A. H. Reddi, « Mesenchymal progenitor cells derived from synovium and infrapatellar fat pad as a source for superficial zone cartilage tissue engineering: analysis of superficial zone protein/lubricin expression », *Tissue Eng. Part A*, vol. 16, n° 1, p. 317- 325, janv. 2010.

[169] D. Harvanová, T. Tóthová, M. Sarišský, J. Amrichová, et J. Rosocha, « Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells », *Folia Biol. (Praha)*, vol. 57, n° 3, p. 119- 124, 2011.

[170] A. Karystinou *et al.*, « Distinct mesenchymal progenitor cell subsets in the adult human synovium », *Rheumatol. Oxf. Engl.*, vol. 48, n° 9, p. 1057- 1064, sept. 2009.

[171] B. Bilgen, Y. Ren, M. Pei, R. K. Aaron, et D. McK. Ciombor, « CD14-Negative Isolation Enhances Chondrogenesis in Synovial Fibroblasts », *Tissue Eng. Part A*, vol. 15, n° 11, p. 3261- 3270, nov. 2009.

[172] Y. Ogata *et al.*, « Purified Human Synovium Mesenchymal Stem Cells as a Good Resource for Cartilage Regeneration », *PLOS ONE*, vol. 10, n° 6, p. e0129096, juin 2015.

[173] Y. Kohno *et al.*, « Yields and chondrogenic potential of primary synovial mesenchymal stem cells are comparable between rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients », *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 8, n° 1, déc. 2017.

[174] Y. Kohno *et al.*, « Comparison of mesenchymal stem cells obtained by suspended culture of synovium from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis », *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 19, n° 1, p. 78, mars 2018.

- [175] I. Futami *et al.*, « Isolation and characterization of multipotential mesenchymal cells from the mouse synovium », *PLoS One*, vol. 7, n° 9, p. e45517, 2012.
- [176] T. Kurth *et al.*, « Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate », *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.*, vol. 15, n° 10, p. 1178- 1189, oct. 2007.
- [177] C. H. Jo, H. J. Ahn, H. J. Kim, S. C. Seong, et M. C. Lee, « Surface characterization and chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells derived from synovium », *Cytotherapy*, vol. 9, n° 4, p. 316- 327, 2007.
- [178] H. Yoshimura, T. Muneta, A. Nimura, A. Yokoyama, H. Koga, et I. Sekiya, « Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle », *Cell Tissue Res.*, vol. 327, n° 3, p. 449- 462, mars 2007.
- [179] Y. Sakaguchi, I. Sekiya, K. Yagishita, et T. Muneta, « Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source », *Arthritis Rheum.*, vol. 52, n° 8, p. 2521- 2529, août 2005.
- [180] A. R. Tan *et al.*, « Passage-dependent relationship between mesenchymal stem cell mobilization and chondrogenic potential », *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.*, vol. 23, n° 2, p. 319- 327, févr. 2015.
- [181] E. J. Kubosch, E. Heidt, P. Niemeyer, A. Bernstein, N. P. Südkamp, et H. Schmal, « In-vitro chondrogenic potential of synovial stem cells and chondrocytes allocated for autologous chondrocyte implantation - a comparison : Synovial stem cells as an alternative cell source for autologous chondrocyte implantation », *Int. Orthop.*, vol. 41, n° 5, p. 991- 998, mai 2017.
- [182] A. Yokoyama, I. Sekiya, K. Miyazaki, S. Ichinose, Y. Hata, et T. Muneta, « In vitro cartilage formation of composites of synovium-derived mesenchymal stem cells with collagen gel », *Cell Tissue Res.*, vol. 322, n° 2, p. 289- 298, nov. 2005.
- [183] D. Hatsushika *et al.*, « Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 22, n° 7, p. 941- 950, juillet 2014.
- [184] M. Horie *et al.*, « Implantation of Allogenic Synovial Stem Cells Promotes Meniscal Regeneration in a Rabbit Meniscal Defect Model »:, *J. Bone Jt. Surg.-Am. Vol.*, vol. 94, n° 8, p. 701- 712, avr. 2012.
- [185] N. Ozeki *et al.*, « Synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration augmented by an autologous Achilles tendon graft in a rat partial meniscus defect model », *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 33, n° 6, p. 1927- 1938, juin 2015.
- [186] M. Horie *et al.*, « Intra-articular Injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect », *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 27, n° 4, p. 878- 887, avr. 2009.
- [187] Y. Nakagawa *et al.*, « Synovial mesenchymal stem cells promote healing after meniscal repair in microminipigs », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 23, n° 6, p. 1007- 1017, juin 2015.
- [188] J. Hori, M. Deie, T. Kobayashi, Y. Yasunaga, S. Kawamata, et M. Ochi, « Articular cartilage repair using an intra-articular magnet and synovium-derived cells », *J. Orthop. Res.*, vol. 29, n° 4, p. 531- 538, avr. 2011.

- [189] T. Nakamura *et al.*, « Arthroscopic, histological and MRI analyses of cartilage repair after a minimally invasive method of transplantation of allogeneic synovial mesenchymal stromal cells into cartilage defects in pigs », *Cytotherapy*, vol. 14, n° 3, p. 327- 338, mars 2012.
- [190] H. Koga *et al.*, « Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 10, n° 4, p. R84, 2008.
- [191] J. Mak *et al.*, « Intra-articular injection of synovial mesenchymal stem cells improves cartilage repair in a mouse injury model », *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 23076, mars 2016.
- [192] C. De Bari, F. Dell'Accio, et F. P. Luyten, « Failure of in vitro-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage in vivo », *Arthritis Rheum.*, vol. 50, n° 1, p. 142- 150, janv. 2004.
- [193] T. Vinardell, E. J. Sheehy, C. T. Buckley, et D. J. Kelly, « A comparison of the functionality and in vivo phenotypic stability of cartilaginous tissues engineered from different stem cell sources », *Tissue Eng. Part A*, vol. 18, n° 11- 12, p. 1161- 1170, juin 2012.
- [194] H. Koga *et al.*, « Synovial Stem Cells Are Regionally Specified According to Local Microenvironments After Implantation for Cartilage Regeneration », *STEM CELLS*, vol. 25, n° 3, p. 689- 696, nov. 2006.
- [195] M. Pei, F. He, B. M. Boyce, et V. L. Kish, « Repair of full-thickness femoral condyle cartilage defects using allogeneic synovial cell-engineered tissue constructs », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 17, n° 6, p. 714- 722, juin 2009.
- [196] J.-C. Lee, H. J. Min, H. J. Park, S. Lee, S. C. Seong, et M. C. Lee, « Synovial Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells Supported by Platelet-Rich Plasma Can Repair Osteochondral Defects in a Rabbit Model », *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.*, vol. 29, n° 6, p. 1034- 1046, juin 2013.
- [197] J.-C. Lee *et al.*, « Synovium-derived mesenchymal stem cells encapsulated in a novel injectable gel can repair osteochondral defects in a rabbit model », *Tissue Eng. Part A*, vol. 18, n° 19- 20, p. 2173- 2186, oct. 2012.
- [198] W. Ando *et al.*, « Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells », *Biomaterials*, vol. 28, n° 36, p. 5462- 5470, décembre 2007.
- [199] K. Shimomura *et al.*, « The influence of skeletal maturity on allogenic synovial mesenchymal stem cell-based repair of cartilage in a large animal model », *Biomaterials*, vol. 31, n° 31, p. 8004- 8011, nov. 2010.
- [200] H. Fujie *et al.*, « Zone-specific integrated cartilage repair using a scaffold-free tissue engineered construct derived from allogenic synovial mesenchymal stem cells: Biomechanical and histological assessments », *J. Biomech.*, vol. 48, n° 15, p. 4101- 4108, nov. 2015.
- [201] W. Ando *et al.*, « Detection of abnormalities in the superficial zone of cartilage repaired using a tissue engineered construct derived from synovial stem cells », *Eur. Cell. Mater.*, vol. 24, p. 292- 307, sept. 2012.
- [202] J. Cai *et al.*, « Association Between Infrapatellar Fat Pad Volume and Knee Structural Changes in Patients with Knee Osteoarthritis », *J. Rheumatol.*, vol. 42, n° 10, p. 1878- 1884, oct. 2015.

- [203] B. Chuckpaiwong, H. C. Charles, V. B. Kraus, F. Guilak, et J. A. Nunley, « Age-associated increases in the size of the infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis as measured by 3T MRI », *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.*, vol. 28, n° 9, p. 1149- 1154, sept. 2010.
- [204] J. Mace, W. Bhatti, et S. Anand, « Infrapatellar fat pad syndrome: a review of anatomy, function, treatment and dynamics », *Acta Orthop. Belg.*, vol. 82, n° 1, p. 94- 101, mars 2016.
- [205] G. P. Doner et F. R. Noyes, « Arthroscopic resection of fat pad lesions and infrapatellar contractures », *Arthrosc. Tech.*, vol. 3, n° 3, p. e413-416, juin 2014.
- [206] M. Q. Wickham, G. R. Erickson, J. M. Gimble, T. P. Vail, et F. Guilak, « Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee », *Clin. Orthop.*, n° 412, p. 196- 212, juill. 2003.
- [207] P. Hindle, N. Khan, L. Biant, et B. Péault, « The Infrapatellar Fat Pad as a Source of Perivascular Stem Cells with Increased Chondrogenic Potential for Regenerative Medicine », *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 6, n° 1, p. 77- 87, janv. 2017.
- [208] R. J. F. C. do Amaral, H. V. Almeida, D. J. Kelly, F. J. O'Brien, et C. J. Kearney, « Infrapatellar Fat Pad Stem Cells: From Developmental Biology to Cell Therapy », *Stem Cells Int.*, vol. 2017, p. 6843727, 2017.
- [209] A. J. Roelofs *et al.*, « Joint morphogenetic cells in the adult mammalian synovium », *Nat. Commun.*, vol. 8, p. 15040, mai 2017.
- [210] E. A. Jones *et al.*, « Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level », *Arthritis Rheum.*, vol. 58, n° 6, p. 1731- 1740, juin 2008.
- [211] Y. S. Kim, H. J. Lee, J. E. Yeo, Y. I. Kim, Y. J. Choi, et Y. G. Koh, « Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from synovial fluid in patients with osteochondral lesion of the talus », *Am. J. Sports Med.*, vol. 43, n° 2, p. 399- 406, févr. 2015.
- [212] W.-J. Lee *et al.*, « Cell source-dependent in vivo immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow and synovial fluid of minipigs », *Exp. Cell Res.*, vol. 333, n° 2, p. 273- 288, mai 2015.
- [213] T. Morito *et al.*, « Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans », *Rheumatology*, vol. 47, n° 8, p. 1137- 1143, août 2008.
- [214] Y. Matsukura, T. Muneta, K. Tsuji, H. Koga, et I. Sekiya, « Mesenchymal stem cells in synovial fluid increase after meniscus injury », *Clin. Orthop.*, vol. 472, n° 5, p. 1357- 1364, mai 2014.
- [215] I. Sekiya *et al.*, « Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis », *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.*, vol. 30, n° 6, p. 943- 949, juin 2012.
- [216] C. Zhou, H. Zheng, D. Seol, Y. Yu, et J. A. Martin, « Gene expression profiles reveal that chondrogenic progenitor cells and synovial cells are closely related », *J. Orthop. Res.*, vol. 32, n° 8, p. 981- 988, août 2014.
- [217] N. Koyama, Y. Okubo, K. Nakao, K. Osawa, K. Fujimura, et K. Bessho, « Pluripotency of mesenchymal cells derived from synovial fluid in patients with temporomandibular joint

disorder », *Life Sci.*, vol. 89, n° 19- 20, p. 741- 747, nov. 2011.

[218] A. A. F. Prado, P. O. Favaron, L. C. L. C. da Silva, R. Y. A. Baccarin, M. A. Miglino, et D. A. Maria, « Characterization of mesenchymal stem cells derived from the equine synovial fluid and membrane », *BMC Vet. Res.*, vol. 11, p. 281, nov. 2015.

[219] J. Fülber, D. A. Maria, L. C. L. C. da Silva, C. O. Massoco, F. Agreste, et R. Y. A. Baccarin, « Comparative study of equine mesenchymal stem cells from healthy and injured synovial tissues: an in vitro assessment », *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 7, n° 1, p. 35, 2016.

[220] W. Ando *et al.*, « Clonal analysis of synovial fluid stem cells to characterize and identify stable mesenchymal stromal cell/mesenchymal progenitor cell phenotypes in a porcine model: a cell source with enhanced commitment to the chondrogenic lineage », *Cytotherapy*, vol. 16, n° 6, p. 776- 788, juin 2014.

[221] J. Garcia *et al.*, « Characterisation of synovial fluid and infrapatellar fat pad derived mesenchymal stromal cells: The influence of tissue source and inflammatory stimulus », *Sci. Rep.*, vol. 6, avr. 2016.

[222] S. Hagmann *et al.*, « Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells », *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 14, p. 223, 2013.

[223] Z. Jia *et al.*, « Repair of articular cartilage defects with intra-articular injection of autologous rabbit synovial fluid-derived mesenchymal stem cells », *J. Transl. Med.*, vol. 16, p. 123, mai 2018.

[224] C.-W. Chiang, W.-C. Chen, H.-W. Liu, et C.-H. Chen, « Application of Synovial Fluid Mesenchymal Stem Cells: Platelet-rich Plasma Hydrogel for Focal Cartilage Defect », *J. Exp. Clin. Med.*, vol. 6, n° 4, p. 118- 124, août 2014.

[225] M. Zayed, S. Newby, N. Misk, R. Donnell, et M. Dhar, « Xenogenic Implantation of Equine Synovial Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells Leads to Articular Cartilage Regeneration », *Stem Cells Int.*, vol. 2018, p. 1073705, 2018.

[226] J. Li *et al.*, « Cartilage regeneration using arthroscopic flushing fluid-derived mesenchymal stem cells encapsulated in a one-step rapid cross-linked hydrogel », *Acta Biomater.*, août 2018.

[227] Z. Jia *et al.*, « Repair of osteochondral defects using injectable chitosan-based hydrogel encapsulated synovial fluid-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model », *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 99, p. 541- 551, juin 2019.

[228] G. R. Martin, « The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs », *Genes Dev.*, vol. 12, n° 11, p. 1571- 1586, juin 1998.

[229] S. Hagmann *et al.*, « FGF-2 addition during expansion of human bone marrow-derived stromal cells alters MSC surface marker distribution and chondrogenic differentiation potential », *Cell Prolif.*, vol. 46, n° 4, p. 396- 407, août 2013.

[230] M. Chiou, Y. Xu, et M. T. Longaker, « Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 343, n° 2, p. 644- 652, mai 2006.

- [231] J. Li et M. Pei, « Optimization of an in vitro three-dimensional microenvironment to reprogram synovium-derived stem cells for cartilage tissue engineering », *Tissue Eng. Part A*, vol. 17, n° 5- 6, p. 703- 712, mars 2011.
- [232] W. S. Khan, S. R. Tew, A. B. Adesida, et T. E. Hardingham, « Human infrapatellar fat pad-derived stem cells express the pericyte marker 3G5 and show enhanced chondrogenesis after expansion in fibroblast growth factor-2 », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 10, n° 4, p. R74, 2008.
- [233] G. Bianchi *et al.*, « Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2 », *Exp. Cell Res.*, vol. 287, n° 1, p. 98- 105, juill. 2003.
- [234] M. Bianchessi, Y. Chen, S. Durgam, H. Pondenis, et M. Stewart, « Effect of Fibroblast Growth Factor 2 on Equine Synovial Fluid Chondroprogenitor Expansion and Chondrogenesis », *Stem Cells Int.*, vol. 2016, 2016.
- [235] L. A. Solchaga, K. Penick, V. M. Goldberg, A. I. Caplan, et J. F. Welter, « Fibroblast growth factor-2 enhances proliferation and delays loss of chondrogenic potential in human adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells », *Tissue Eng. Part A*, vol. 16, n° 3, p. 1009- 1019, mars 2010.
- [236] J. H. Kim, M. C. Lee, S. C. Seong, K. H. Park, et S. Lee, « Enhanced proliferation and chondrogenic differentiation of human synovium-derived stem cells expanded with basic fibroblast growth factor », *Tissue Eng. Part A*, vol. 17, n° 7- 8, p. 991- 1002, avr. 2011.
- [237] T. Pizzute, J. Li, Y. Zhang, M. E. Davis, et M. Pei, « Fibroblast Growth Factor Ligand Dependent Proliferation and Chondrogenic Differentiation of Synovium-Derived Stem Cells and Concomitant Adaptation of Wnt/Mitogen-Activated Protein Kinase Signals », *Tissue Eng. Part A*, vol. 22, n° 15- 16, p. 1036- 1046, août 2016.
- [238] T. Cheng, C. Yang, N. Weber, H. T. Kim, et A. C. Kuo, « Fibroblast growth factor 2 enhances the kinetics of mesenchymal stem cell chondrogenesis », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 426, n° 4, p. 544- 550, oct. 2012.
- [239] D. Correa *et al.*, « Sequential exposure to fibroblast growth factors (FGF) 2, 9 and 18 enhances hMSC chondrogenic differentiation », *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.*, vol. 23, n° 3, p. 443- 453, mars 2015.
- [240] S. Weiss, T. Hennig, R. Bock, E. Steck, et W. Richter, « Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells », *J. Cell. Physiol.*, vol. 223, n° 1, p. 84- 93, avr. 2010.
- [241] I. H. Hung, K. Yu, K. J. Lavine, et D. M. Ornitz, « FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod », *Dev. Biol.*, vol. 307, n° 2, p. 300- 313, juill. 2007.
- [242] V. Govindarajan et P. A. Overbeek, « FGF9 can induce endochondral ossification in cranial mesenchyme », *BMC Dev. Biol.*, vol. 6, n° 1, p. 7, févr. 2006.
- [243] D. Davidson *et al.*, « Fibroblast Growth Factor (FGF) 18 Signals through FGF Receptor 3 to Promote Chondrogenesis », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 21, p. 20509- 20515, mai 2005.
- [244] E. E. Moore *et al.*, « Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 13, n° 7, p. 623- 631, juill. 2005.

- [245] J. M. Lopes et M. Larbier, « 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.*, vol. 34, n° 2, p. 157- 164, 1994.
- [246] K. W. Ng *et al.*, « Amino acids supply in culture media is not a limiting factor in the matrix synthesis of engineered cartilage tissue », *Amino Acids*, vol. 35, n° 2, p. 433- 438, août 2008.
- [247] B. Johnstone, T. M. Hering, A. I. Caplan, V. M. Goldberg, et J. U. Yoo, « In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells », *Exp. Cell Res.*, vol. 238, n° 1, p. 265- 272, janv. 1998.
- [248] J. U. Yoo *et al.*, « The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells », *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 80, n° 12, p. 1745- 1757, déc. 1998.
- [249] R. Chijimatsu *et al.*, « Impact of dexamethasone concentration on cartilage tissue formation from human synovial derived stem cells in vitro », *Cytotechnology*, janv. 2018.
- [250] N. Shintani et E. B. Hunziker, « Differential effects of dexamethasone on the chondrogenesis of mesenchymal stromal cells: influence of microenvironment, tissue origin and growth factor », *Eur. Cell. Mater.*, vol. 22, p. 302- 319; discussion 319-320, 2011.
- [251] A. E. Grigoriadis, J. N. Heersche, et J. E. Aubin, « Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone », *J. Cell Biol.*, vol. 106, n° 6, p. 2139- 2151, juin 1988.
- [252] A. Derfoul, G. L. Perkins, D. J. Hall, et R. S. Tuan, « Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes », *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 24, n° 6, p. 1487- 1495, juin 2006.
- [253] L. Bian, A. M. Stoker, K. M. Marberry, G. A. Ateshian, J. L. Cook, et C. T. Hung, « Effects of Dexamethasone on the Functional Properties of Cartilage Explants During Long-Term Culture », *Am. J. Sports Med.*, vol. 38, n° 1, p. 78- 85, janv. 2010.
- [254] M. Kim, S. T. Garrity, D. R. Steinberg, G. R. Dodge, et R. L. Mauck, « Role of dexamethasone in the long-term functional maturation of MSC-laden hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering », *J. Orthop. Res.*, vol. 36, n° 6, p. 1717- 1727, juin 2018.
- [255] E. M. Florine, R. E. Miller, R. M. Porter, C. H. Evans, B. Kurz, et A. J. Grodzinsky, « Effects of Dexamethasone on Mesenchymal Stromal Cell Chondrogenesis and Aggrecanase Activity: Comparison of Agarose and Self-Assembling Peptide Scaffolds », *Cartilage*, vol. 4, n° 1, p. 63- 74, janv. 2013.
- [256] B. L. Roach, A. Kelmendi-Doko, E. C. Balutis, K. G. Marra, G. A. Ateshian, et C. T. Hung, « Dexamethasone Release from Within Engineered Cartilage as a Chondroprotective Strategy Against Interleukin-1 $\alpha$  », *Tissue Eng. Part A*, vol. 22, n° 7- 8, p. 621- 632, avr. 2016.
- [257] G. J. Cardinale et S. Udenfriend, « Prolyl hydroxylase », *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, vol. 41, n° 0, p. 245- 300, 1974.
- [258] C. Farquharson, J. L. Berry, E. B. Mawer, E. Seawright, et C. C. Whitehead, « Ascorbic acid-induced chondrocyte terminal differentiation: the role of the extracellular matrix and 1,25-dihydroxyvitamin D », *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 76, n° 2, p. 110- 118, juin 1998.

- [259] J. J. Jeffrey et G. R. Martin, « The role of ascorbic acid in the biosynthesis of collagen II. Site and nature of ascorbic acid participation », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 121, n° 2, p. 281- 291, juin 1966.
- [260] M. A. Asnaghi *et al.*, « Chondrogenic differentiation of human chondrocytes cultured in the absence of ascorbic acid », *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 12, n° 6, p. 1402- 1411, juin 2018.
- [261] T. M. Temu, K.-Y. Wu, P. A. Gruppuso, et C. Phornphutkul, « The mechanism of ascorbic acid-induced differentiation of ATDC5 chondrogenic cells », *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 299, n° 2, p. E325-334, août 2010.
- [262] N. H. Priddy, J. L. Cook, J. M. Kreeger, J. L. Tomlinson, et D. J. Steffen, « Effect of ascorbate and two different media on canine chondrocytes in three-dimensional culture », *Vet. Ther. Res. Appl. Vet. Med.*, vol. 2, n° 1, p. 70- 77, 2001.
- [263] K.-M. Choi *et al.*, « Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation », *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 105, n° 6, p. 586- 594, juin 2008.
- [264] Y. Sato *et al.*, « Synergistic effect of ascorbic acid and collagen addition on the increase in type 2 collagen accumulation in cartilage-like MSC sheet », *Cytotechnology*, vol. 69, n° 3, p. 405- 416, juin 2017.
- [265] J. D. Green *et al.*, « Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering », *Genes Dis.*, vol. 2, n° 4, p. 307- 327, décembre 2015.
- [266] M. B. Goldring, K. Tsuchimochi, et K. Ijiri, « The control of chondrogenesis », *J. Cell. Biochem.*, vol. 97, n° 1, p. 33- 44, janv. 2006.
- [267] M. A. Cleary, G. J. V. M. van Osch, P. A. Brama, C. A. Hellingman, et R. Narcisi, « FGF, TGF $\beta$  and Wnt crosstalk: embryonic to in vitro cartilage development from mesenchymal stem cells », *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 9, n° 4, p. 332- 342, 2015.
- [268] P. M. van der Kraan, E. N. Blaney Davidson, A. Blom, et W. B. van den Berg, « TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: Modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 17, n° 12, p. 1539- 1545, déc. 2009.
- [269] E. N. Blaney Davidson, P. M. van der Kraan, et W. B. van den Berg, « TGF-beta and osteoarthritis », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 15, n° 6, p. 597- 604, juin 2007.
- [270] A.-M. Freyria et F. Mallein-Gerin, « Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors », *Injury*, vol. 43, n° 3, p. 259- 265, mars 2012.
- [271] L. A. Fortier, J. U. Barker, E. J. Strauss, T. M. McCarrel, et B. J. Cole, « The role of growth factors in cartilage repair », *Clin. Orthop.*, vol. 469, n° 10, p. 2706- 2715, oct. 2011.
- [272] S. D. Thorpe, C. T. Buckley, T. Vinardell, F. J. O'Brien, V. A. Campbell, et D. J. Kelly, « The response of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to dynamic compression following TGF-beta3 induced chondrogenic differentiation », *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 38, n° 9, p. 2896- 2909, sept. 2010.
- [273] M. B. Mueller *et al.*, « Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF-beta isoforms and chondrogenic conditioning », *Cells Tissues Organs*, vol. 192, n° 3, p.

158- 166, 2010.

[274] F. Wei *et al.*, « Activation of Indian hedgehog promotes chondrocyte hypertrophy and upregulation of MMP-13 in human osteoarthritic cartilage », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 20, n° 7, p. 755- 763, juill. 2012.

[275] J. L. Puetzer, J. N. Petite, et E. G. Lobo, « Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue », *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 16, n° 4, p. 435- 444, août 2010.

[276] I. Sekiya, B. L. Larson, J. T. Vuoristo, R. L. Reger, et D. J. Prockop, « 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.*, vol. 320, n° 2, p. 269- 276, mai 2005.

[277] Y. I. Kim *et al.*, « Overexpression of TGF- $\beta$ 1 enhances chondrogenic differentiation and proliferation of human synovium-derived stem cells », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 450, n° 4, p. 1593- 1599, août 2014.

[278] S. Shirasawa, I. Sekiya, Y. Sakaguchi, K. Yagishita, S. Ichinose, et T. Muneta, « In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells », *J. Cell. Biochem.*, vol. 97, n° 1, p. 84- 97, janv. 2006.

[279] J. Qi, A. Chen, H. You, K. Li, D. Zhang, et F. Guo, « Proliferation and chondrogenic differentiation of CD105-positive enriched rat synovium-derived mesenchymal stem cells in three-dimensional porous scaffolds », *Biomed. Mater. Bristol Engl.*, vol. 6, n° 1, p. 015006, févr. 2011.

[280] A. T. Mehlhorn *et al.*, « Chondrogenesis of adipose-derived adult stem cells in a polylactide-co-glycolide scaffold », *Tissue Eng. Part A*, vol. 15, n° 5, p. 1159- 1167, mai 2009.

[281] R. S. Tıǧlı, C. Cannizaro, M. Gümüşderelioǧlu, et D. L. Kaplan, « Chondrogenesis in perfusion bioreactors using porous silk scaffolds and hESC-derived MSCs », *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 96A, n° 1, p. 21- 28, 2011.

[282] T. Nakagawa, S. Y. Lee, et A. H. Reddi, « Induction of chondrogenesis from human embryonic stem cells without embryoid body formation by bone morphogenetic protein 7 and transforming growth factor beta1 », *Arthritis Rheum.*, vol. 60, n° 12, p. 3686- 3692, déc. 2009.

[283] P. C. Bessa, M. Casal, et R. L. Reis, « Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery) », *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 2, n° 2- 3, p. 81- 96, avr. 2008.

[284] D. Correa et S. A. Lietman, « Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions », *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 62, p. 67- 77, févr. 2017.

[285] S. Chubinskaya et K. E. Kuettner, « Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 35, n° 9, p. 1323- 1340, sept. 2003.

[286] T. Gründer *et al.*, « Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 12, n° 7, p. 559- 567, juill. 2004.

- [287] N. Shintani et E. B. Hunziker, « 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.*, vol. 56, n° 6, p. 1869- 1879, juin 2007.
- [288] M. C. Ronzière, E. Perrier, F. Mallein-Gerin, et A.-M. Freyria, « Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells », *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 20, n° 3, p. 145- 158, 2010.
- [289] R. M. Guzzo, J. Gibson, R.-H. Xu, F. Y. Lee, et H. Drissi, « Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondroprogenitor cells », *J. Cell. Biochem.*, vol. 114, n° 2, p. 480- 490, févr. 2013.
- [290] U. Nöth *et al.*, « Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels », *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 83, n° 3, p. 626- 635, déc. 2007.
- [291] N. Shintani, K. A. Siebenrock, et E. B. Hunziker, « 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*, vol. 8, n° 1, p. e53086, 2013.
- [292] Y. Chen, M. Bianchessi, H. Pondenis, et M. Stewart, « Phenotypic characterization of equine synovial fluid-derived chondroprogenitor cells », *Stem Cell Biol. Res.*, vol. 3, n° 1, p. 1, mars 2016.
- [293] S.-H. Kwon *et al.*, « Modulation of BMP-2-induced chondrogenic versus osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by cell-specific extracellular matrices », *Tissue Eng. Part A*, vol. 19, n° 1- 2, p. 49- 58, janv. 2013.
- [294] L. Lin *et al.*, « Articular cartilage repair using dedifferentiated articular chondrocytes and bone morphogenetic protein 4 in a rabbit model of articular cartilage defects », *Arthritis Rheum.*, vol. 58, n° 4, p. 1067- 1075, avr. 2008.
- [295] A. M. Craft, J. S. Rockel, Y. Nartiss, R. A. Kandel, B. A. Alman, et G. M. Keller, « Generation of articular chondrocytes from human pluripotent stem cells », *Nat. Biotechnol.*, vol. 33, n° 6, p. 638- 645, juin 2015.
- [296] S. A. Lietman, M. Yanagishita, T. K. Sampath, et A. H. Reddi, « Stimulation of proteoglycan synthesis in explants of porcine articular cartilage by recombinant osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) », *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 79, n° 8, p. 1132- 1137, août 1997.
- [297] I. A. Silver, « Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites », *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 271, n° 912, p. 261- 272, juill. 1975.
- [298] J. E. Lafont, S. Talma, C. Hopfgarten, et C. L. Murphy, « Hypoxia Promotes the Differentiated Human Articular Chondrocyte Phenotype through SOX9-dependent and -independent Pathways », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 8, p. 4778- 4786, févr. 2008.
- [299] S. Provot *et al.*, « Hif-1 $\alpha$  regulates differentiation of limb bud mesenchyme and joint development », *J. Cell Biol.*, vol. 177, n° 3, p. 451- 464, mai 2007.
- [300] E. Duval, S. Leclercq, J.-M. Elissalde, M. Demoor, P. Galéra, et K. Boumédiène, « 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.*, vol. 60, n° 10, p. 3038- 3048, oct. 2009.

[301] F. Moussavi-Harami, Y. Duwayri, J. A. Martin, F. Moussavi-Harami, et J. A. Buckwalter, « Oxygen effects on senescence in chondrocytes and mesenchymal stem cells: consequences for tissue engineering », *Iowa Orthop. J.*, vol. 24, p. 15- 20, 2004.

[302] W. L. Grayson, F. Zhao, B. Bunnell, et T. Ma, « Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 358, n° 3, p. 948- 953, juill. 2007.

[303] A. Krinner, M. Zscharnack, A. Bader, D. Drasdo, et J. Galle, « Impact of oxygen environment on mesenchymal stem cell expansion and chondrogenic differentiation », *Cell Prolif.*, vol. 42, n° 4, p. 471- 484, août 2009.

[304] M. Zscharnack, C. Poesel, J. Galle, et A. Bader, « Low oxygen expansion improves subsequent chondrogenesis of ovine bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogel », *Cells Tissues Organs*, vol. 190, n° 2, p. 81- 93, 2009.

[305] L. B. Boyette, O. A. Creasey, L. Guzik, T. Lozito, et R. S. Tuan, « Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells display enhanced clonogenicity but impaired differentiation with hypoxic preconditioning », *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 3, n° 2, p. 241- 254, févr. 2014.

[306] J. R. Choi *et al.*, « Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 448, n° 2, p. 218- 224, mai 2014.

[307] Y. Xu, P. Malladi, M. Chiou, E. Bekerman, A. J. Giaccia, et M. T. Longaker, « In vitro expansion of adipose-derived adult stromal cells in hypoxia enhances early chondrogenesis », *Tissue Eng.*, vol. 13, n° 12, p. 2981- 2993, déc. 2007.

[308] S. Portron *et al.*, « 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*, vol. 8, n° 4, p. e62368, avr 2013.

[309] C. Merceron *et al.*, « Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells », *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, vol. 298, n° 2, p. C355- C364, nov. 2009.

[310] A. B. Adesida, A. Mulet-Sierra, et N. M. Jomha, « Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells », *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 3, n° 2, p. 9, 2012.

[311] J. Müller, K. Benz, M. Ahlers, C. Gaissmaier, et J. Mollenhauer, « Hypoxic conditions during expansion culture prime human mesenchymal stromal precursor cells for chondrogenic differentiation in three-dimensional cultures », *Cell Transplant.*, vol. 20, n° 10, p. 1589- 1602, 2011.

[312] C. Henrionnet *et al.*, « \* Hypoxia for Mesenchymal Stem Cell Expansion and Differentiation: The Best Way for Enhancing TGF $\beta$ -Induced Chondrogenesis and Preventing Calcifications in Alginate Beads », *Tissue Eng. Part A*, vol. 23, n° 17- 18, p. 913- 922, sept. 2017.

[313] S. Portron *et al.*, « Inverse regulation of early and late chondrogenic differentiation by oxygen tension provides cues for stem cell-based cartilage tissue engineering », *Cell. Physiol.*

*Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, vol. 35, n° 3, p. 841- 857, 2015.

[314] F. Legendre *et al.*, « Enhanced hyaline cartilage matrix synthesis in collagen sponge scaffolds by using siRNA to stabilize chondrocytes phenotype cultured with bone morphogenetic protein-2 under hypoxia », *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 19, n° 7, p. 550- 567, juill. 2013.

[315] C. B. Foldager *et al.*, « Combined 3D and hypoxic culture improves cartilage-specific gene expression in human chondrocytes », *Acta Orthop.*, vol. 82, n° 2, p. 234- 240, avr. 2011.

[316] F. Legendre *et al.*, « Enhanced chondrogenesis of bone marrow-derived stem cells by using a combinatory cell therapy strategy with BMP-2/TGF- $\beta$ 1, hypoxia, and COL1A1/HtrA1 siRNAs », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, déc. 2017.

[317] S. Munir, C. B. Foldager, M. Lind, V. Zachar, K. Søballe, et T. G. Koch, « Hypoxia enhances chondrogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in scaffold-free and scaffold systems », *Cell Tissue Res.*, vol. 355, n° 1, p. 89- 102, janv. 2014.

[318] W. S. Khan, A. B. Adesida, et T. E. Hardingham, « Hypoxic conditions increase hypoxia-inducible transcription factor 2 $\alpha$  and enhance chondrogenesis in stem cells from the infrapatellar fat pad of osteoarthritis patients », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 9, n° 3, p. R55, 2007.

[319] C. T. Buckley, T. Vinardell, et D. J. Kelly, « Oxygen tension differentially regulates the functional properties of cartilaginous tissues engineered from infrapatellar fat pad derived MSCs and articular chondrocytes », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 18, n° 10, p. 1345- 1354, oct. 2010.

[320] Y. Yasui *et al.*, « Preparation of Scaffold-Free Tissue-Engineered Constructs Derived from Human Synovial Mesenchymal Stem Cells Under Low Oxygen Tension Enhances Their Chondrogenic Differentiation Capacity », *Tissue Eng. Part A*, vol. 22, n° 5- 6, p. 490- 500, mars 2016.

[321] C. Holzwarth *et al.*, « Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells », *BMC Cell Biol.*, vol. 11, p. 11, janv. 2010.

[322] S. Portron *et al.*, « Inverse Regulation of Early and Late Chondrogenic Differentiation by Oxygen Tension Provides Cues for Stem Cell-Based Cartilage Tissue Engineering », *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 35, n° 3, p. 841- 857, 2015.

[323] M. Pei, D. Chen, J. Li, et L. Wei, « Histone deacetylase 4 promotes TGF-beta1-induced synovium-derived stem cell chondrogenesis but inhibits chondrogenically differentiated stem cell hypertrophy », *Differ. Res. Biol. Divers.*, vol. 78, n° 5, p. 260- 268, déc. 2009.

[324] T. Gómez-Leduc *et al.*, « Chondrogenic commitment of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in collagen matrices for cartilage engineering », *Sci. Rep.*, vol. 6, n° 1, déc. 2016.

[325] L. Pilgaard *et al.*, « Transcriptional signature of human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) preconditioned for chondrogenesis in hypoxic conditions », *Exp. Cell Res.*, vol. 315, n° 11, p. 1937- 1952, juill. 2009.

[326] F. Davatchi, B. S. Abdollahi, M. Mohyeddin, F. Shahram, et B. Nikbin, « Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients », *Int J Rheum Dis*,

vol. 14, 2011.

[327] F. Davatchi, B. Sadeghi Abdollahi, M. Mohyeddin, et B. Nikbin, « Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis: 5 years follow-up of three patients », *Int. J. Rheum. Dis.*, vol. 19, n° 3, p. 219- 225, mars 2016.

[328] A. Vega *et al.*, « Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial », *Transplantation*, vol. 99, n° 8, p. 1681, août 2015.

[329] R. Soler *et al.*, « Final results of a phase I-II trial using ex vivo expanded autologous Mesenchymal Stromal Cells for the treatment of osteoarthritis of the knee confirming safety and suggesting cartilage regeneration », *The Knee*, vol. 23, n° 4, p. 647- 654, août 2016.

[330] L. Orozco *et al.*, « Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study », *Transplantation*, vol. 95, 2013.

[331] L. Orozco *et al.*, « Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: two-year follow-up results », *Transplantation*, vol. 97, 2014.

[332] M. Emadedin *et al.*, « Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis », *Arch Iran Med*, vol. 15, 2012.

[333] M. Emadedin *et al.*, « Long-Term Follow-up of Intra-articular Injection of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Patients with Knee, Ankle, or Hip Osteoarthritis », *Arch. Iran. Med.*, vol. 18, n° 6, p. 336- 344, juin 2015.

[334] M. Al-Najar *et al.*, « Intra-articular injection of expanded autologous bone marrow mesenchymal cells in moderate and severe knee osteoarthritis is safe: a phase I/II study », *J. Orthop. Surg.*, vol. 12, p. 190, déc. 2017.

[335] K. L. Wong, K. B. Lee, B. C. Tai, P. Law, E. H. Lee, et J. H. Hui, « Injectable cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in varus knees with cartilage defects undergoing high tibial osteotomy: a prospective, randomized controlled clinical trial with 2 years' follow-up », *Arthroscopy*, vol. 29, 2013.

[336] J. M. Lamo-Espinosa *et al.*, « Intra-articular injection of two different doses of autologous bone marrow mesenchymal stem cells versus hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: multicenter randomized controlled clinical trial (phase I/II) », *J. Transl. Med.*, vol. 14, p. 246, août 2016.

[337] P. K. Gupta *et al.*, « Efficacy and safety of adult human bone marrow-derived, cultured, pooled, allogeneic mesenchymal stromal cells (Stempeucel®): preclinical and clinical trial in osteoarthritis of the knee joint », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 18, n° 1, déc. 2016.

[338] R. Bastos *et al.*, « Intra-articular injections of expanded mesenchymal stem cells with and without addition of platelet-rich plasma are safe and effective for knee osteoarthritis », *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA*, vol. 26, n° 11, p. 3342- 3350, nov. 2018.

[339] C. T. Vangsness, J. Farr, J. Boyd, D. T. Dellaero, C. R. Mills, et M. LeRoux-Williams, « Adult human mesenchymal stem cells delivered via intra-articular injection to the knee following partial medial meniscectomy: a randomized, double-blind, controlled study », *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 96, n° 2, p. 90- 98, janv. 2014.

[340] S. Wakitani, K. Imoto, T. Yamamoto, M. Saito, N. Murata, et M. Yoneda, « Human

autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 10, 2002.

[341] R. Kuroda *et al.*, « Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 15, 2007.

[342] S. Wakitani, M. Nawata, K. Tensho, T. Okabe, H. Machida, et H. Ohgushi, « Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees », *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 1, 2007.

[343] A. M. Haleem *et al.*, « The clinical use of human culture-expanded autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplanted on platelet-rich fibrin glue in the treatment of articular cartilage defects: a pilot study and preliminary results », *Cartilage*, vol. 1, 2010.

[344] C. Kasemkijwattana, S. Hongeng, S. Kesprayura, V. Rungsinaporn, K. Chaipinyo, et K. Chansiri, « Autologous bone marrow mesenchymal stem cells implantation for cartilage defects: two cases report », *J Med Assoc Thai*, vol. 94, 2011.

[345] M. Richter et S. Zech, « Matrix-associated stem cell transplantation (MAST) in chondral defects of foot and ankle is effective », *Foot Ankle Surg*, vol. 19, 2013.

[346] C. H. Jo *et al.*, « Intra-Articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Proof-of-Concept Clinical Trial », *STEM CELLS*, vol. 32, n° 5, p. 1254- 1266, mai 2014.

[347] C. H. Jo *et al.*, « Intra-articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A 2-Year Follow-up Study », *Am. J. Sports Med.*, vol. 45, n° 12, p. 2774- 2783, oct. 2017.

[348] Y.-M. Pers *et al.*, « Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial », *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 5, n° 7, p. 847- 856, juill. 2016.

[349] Y. Song *et al.*, « Human adipose-derived mesenchymal stem cells for osteoarthritis: a pilot study with long-term follow-up and repeated injections », *Regen. Med.*, vol. 13, n° 3, p. 295- 307, 2018.

[350] P. D. Nguyen *et al.*, « Comparative Clinical Observation of Arthroscopic Microfracture in the Presence and Absence of a Stromal Vascular Fraction Injection for Osteoarthritis », *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 6, n° 1, p. 187- 195, janv. 2017.

[351] Y. S. Kim *et al.*, « Mesenchymal stem cell implantation in osteoarthritic knees: is fibrin glue effective as a scaffold? », *Am J Sports Med*, vol. 43, 2015.

[352] Y. S. Kim *et al.*, « Assessment of clinical and MRI outcomes after mesenchymal stem cell implantation in patients with knee osteoarthritis: a prospective study », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 24, 2016.

[353] Y. S. Kim, Y. J. Choi, et Y. G. Koh, « Mesenchymal stem cell implantation in knee osteoarthritis: an assessment of the factors influencing clinical outcomes », *Am. J. Sports Med.*, vol. 43, n° 9, p. 2293- 2301, sept. 2015.

[354] Y.-G. Koh, O.-R. Kwon, Y.-S. Kim, Y.-J. Choi, et D.-H. Tak, « Adipose-Derived

Mesenchymal Stem Cells With Microfracture Versus Microfracture Alone: 2-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial », *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg. Off. Publ. Arthrosc. Assoc. N. Am. Int. Arthrosc. Assoc.*, vol. 32, n° 1, p. 97- 109, janv. 2016.

[355] Y.-G. Koh et Y.-J. Choi, « Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis », *The Knee*, vol. 19, n° 6, p. 902- 907, déc. 2012.

[356] Y. G. Koh *et al.*, « Mesenchymal stem cell injections improve symptoms of knee osteoarthritis », *Arthroscopy*, vol. 29, 2013.

[357] Y. Jiang *et al.*, « Human Cartilage-Derived Progenitor Cells From Committed Chondrocytes for Efficient Cartilage Repair and Regeneration », *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 5, n° 6, p. 733- 744, juin 2016.

[358] I. Sekiya, T. Muneta, M. Horie, et H. Koga, « Arthroscopic Transplantation of Synovial Stem Cells Improves Clinical Outcomes in Knees With Cartilage Defects », *Clin. Orthop. Relat. Res.*, p. 1- 11, avr. 2015.

[359] I. Akgun *et al.*, « Matrix-induced autologous mesenchymal stem cell implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation in the treatment of chondral defects of the knee: a 2-year randomized study », *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, vol. 135, n° 2, p. 251- 263, févr. 2015.

[360] K. L. Blanc, C. Tammik, K. Rosendahl, E. Zetterberg, et O. Ringdén, « HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells », *Exp. Hematol.*, vol. 31, n° 10, p. 890- 896, oct. 2003.

[361] E. A. Jones *et al.*, « Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells », *Arthritis Rheum.*, vol. 46, n° 12, p. 3349- 3360, déc. 2002.

[362] M. Krampera *et al.*, « HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation », *Blood*, vol. 106, n° 1, p. 59- 66, juill. 2005.

[363] C. Cournil-Henrionnet *et al.*, « Phenotypic analysis of cell surface markers and gene expression of human mesenchymal stem cells and chondrocytes during monolayer expansion », *Biorheology*, vol. 45, n° 3- 4, p. 513- 526, 2008.

[364] A. Wiesmann, H.-J. Bühring, C. Mentrup, et H.-P. Wiesmann, « Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation », *Head Face Med.*, vol. 2, p. 8, 2006.

[365] S. Giovannini, J. Diaz-Romero, T. Aigner, P. Mainil-Varlet, et D. Nestic, « Population doublings and percentage of S100-positive cells as predictors of in vitro chondrogenicity of expanded human articular chondrocytes », *J. Cell. Physiol.*, vol. 222, n° 2, p. 411- 420, févr. 2010.

[366] A. Muraglia, R. Cancedda, et R. Quarto, « Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model », *J. Cell Sci.*, vol. 113 ( Pt 7), p. 1161- 1166, avr. 2000.

[367] D. Campioni *et al.*, « A decreased positivity for CD90 on human mesenchymal stromal cells (MSCs) is associated with a loss of immunosuppressive activity by MSCs », *Cytometry B Clin. Cytom.*, vol. 76, n° 3, p. 225- 230, mai 2009.

- [368] P. A. Sotiropoulou, S. A. Perez, M. Salagianni, C. N. Baxevanis, et M. Papamichail, « Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells », *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 24, n° 2, p. 462- 471, févr. 2006.
- [369] J. J. Bara, R. G. Richards, M. Alini, et M. J. Stoddart, « Concise Review: Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Change Phenotype Following In Vitro Culture: Implications for Basic Research and the Clinic », *STEM CELLS*, vol. 32, n° 7, p. 1713- 1723, juill. 2014.
- [370] C. B. Chang, S. A. Han, E. M. Kim, S. Lee, S. C. Seong, et M. C. Lee, « Chondrogenic potentials of human synovium-derived cells sorted by specific surface markers », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 21, n° 1, p. 190- 199, janv. 2013.
- [371] T. Nagase *et al.*, « Analysis of the chondrogenic potential of human synovial stem cells according to harvest site and culture parameters in knees with medial compartment osteoarthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 58, n° 5, p. 1389- 1398, mai 2008.
- [372] R. J. Krawetz, Y. E. Wu, L. Martin, J. B. Rattner, J. R. Matyas, et D. A. Hart, « Synovial fluid progenitors expressing CD90+ from normal but not osteoarthritic joints undergo chondrogenic differentiation without micro-mass culture », *PLoS One*, vol. 7, n° 8, p. e43616, 2012.
- [373] Z. Jia *et al.*, « Isolation and characterisation of human mesenchymal stem cells derived from synovial fluid by magnetic activated cell sorting (MACS) », *Cell Biol. Int.*, oct. 2017.
- [374] M. A. Cleary, R. Narcisi, K. Focke, R. van der Linden, P. a. J. Brama, et G. J. V. M. van Osch, « Expression of CD105 on expanded mesenchymal stem cells does not predict their chondrogenic potential », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 24, n° 5, p. 868- 872, mai 2016.
- [375] E. Roeder *et al.*, « Dose-Response of Superparamagnetic Iron Oxide Labeling on Mesenchymal Stem Cells Chondrogenic Differentiation: A Multi-Scale In Vitro Study », *PLoS ONE*, vol. 9, n° 5, p. e98451, mai 2014.
- [376] H. Christel *et al.*, « Expression of chondrogenic genes by undifferentiated vs. differentiated human mesenchymal stem cells using array technology », *Biomed. Mater. Eng.*, n° 3- 4, p. 175–181, 2010.
- [377] M. J. Birket *et al.*, « A reduction in ATP demand and mitochondrial activity with neural differentiation of human embryonic stem cells », *J. Cell Sci.*, vol. 124, n° Pt 3, p. 348- 358, févr. 2011.
- [378] A.-M. Freyria, S. Courtes, et F. Mallein-Gerin, « [Differentiation of adult human mesenchymal stem cells: chondrogenic effect of BMP-2] », *Pathol. Biol. (Paris)*, vol. 56, n° 5, p. 326- 333, juill. 2008.
- [379] Y. Chen, E. Caporali, et M. Stewart, « Bone morphogenetic protein 2 stimulates chondrogenesis of equine synovial membrane-derived progenitor cells », *Vet. Comp. Orthop. Traumatol. VCOT*, vol. 29, n° 5, p. 378- 385, sept. 2016.
- [380] V. Rosen, J. Nove, J. J. Song, R. S. Thies, K. Cox, et J. M. Wozney, « Responsiveness of clonal limb bud cell lines to bone morphogenetic protein 2 reveals a sequential relationship between cartilage and bone cell phenotypes », *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 9, n° 11, p. 1759- 1768, nov. 1994.
- [381] C. Vinatier et J. Guicheux, « Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments », *Ann. Phys. Rehabil. Med.*, vol. 59, n° 3, p. 139- 144, juin

2016.

[382] K. Pelttari *et al.*, « 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.*, vol. 54, n° 10, p. 3254- 3266, oct. 2006.

[383] A. Pievani *et al.*, « Comparative analysis of multilineage properties of mesenchymal stromal cells derived from fetal sources shows an advantage of mesenchymal stromal cells isolated from cord blood in chondrogenic differentiation potential », *Cytotherapy*, vol. 16, n° 7, p. 893- 905, juill. 2014.

[384] B. O. Diekman, C. R. Rowland, D. P. Lennon, A. I. Caplan, et F. Guilak, « Chondrogenesis of Adult Stem Cells from Adipose Tissue and Bone Marrow: Induction by Growth Factors and Cartilage-Derived Matrix », *Tissue Eng. Part A*, vol. 16, n° 2, p. 523- 533, févr. 2010.

[385] B. D. Markway, H. Cho, J. Zilberman-Rudenko, P. Holden, A. McAlinden, et B. Johnstone, « Hypoxia-inducible factor 3-alpha expression is associated with the stable chondrocyte phenotype », *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.*, vol. 33, n° 11, p. 1561- 1570, nov. 2015.

[386] J. Leijten, N. Georgi, L. Moreira Teixeira, C. A. van Blitterswijk, J. N. Post, et M. Karperien, « Metabolic programming of mesenchymal stromal cells by oxygen tension directs chondrogenic cell fate », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, n° 38, p. 13954- 13959, sept. 2014.

[387] Y. Isobe *et al.*, « Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp », *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, juill. 2015.

[388] B. Bravo, J. M. Argüello, A. R. Gortazar, F. Forriol, et J. Vaquero, « Modulation of Gene Expression in Infrapatellar Fat Pad-Derived Mesenchymal Stem Cells in Osteoarthritis », *Cartilage*, vol. 9, n° 1, p. 55- 62, janv. 2018.

[389] C. R. Stevens, R. B. Williams, A. J. Farrell, et D. R. Blake, « Hypoxia and inflammatory synovitis: observations and speculation. », *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 50, n° 2, p. 124- 132, févr. 1991.

[390] H. Kofoed, « Synovitis causes hypoxia and acidity in synovial fluid and subchondral bone », *Injury*, vol. 17, n° 6, p. 391- 394, nov. 1986.

[391] A. Mobasheri, G. Kalamegam, G. Musumeci, et M. E. Batt, « Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions », *Maturitas*, vol. 78, n° 3, p. 188- 198, juill. 2014.

[392] J. Niinikoski et S. Einola, « Postoperative synovial fluid. Metabolic response to meniscectomy or synovectomy », *Acta Orthop. Scand.*, vol. 48, n° 2, p. 129- 137, 1977.

[393] M. Maneesh, H. Jayalekshmi, T. Suma, S. Chatterjee, A. Chakrabarti, et T. A. Singh, « Evidence for oxidative stress in osteoarthritis », *Indian J. Clin. Biochem. IJCB*, vol. 20, n° 1, p. 129- 130, janv. 2005.

[394] A. Franz *et al.*, « The role of oxidative and nitrosative stress in the pathology of osteoarthritis: Novel candidate biomarkers for quantification of degenerative changes in the

- knee joint », *Orthop. Rev.*, vol. 10, n° 2, p. 7460, juin 2018.
- [395] M. N. Zayed, J. Schumacher, N. Misk, et M. S. Dhar, « Effects of pro-inflammatory cytokines on chondrogenesis of equine mesenchymal stromal cells derived from bone marrow or synovial fluid », *Vet. J.*, vol. 217, p. 26- 32, nov. 2016.
- [396] C. Guingamp, P. Gegout-Pottie, L. Philippe, B. Terlain, P. Netter, et P. Gillet, « Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry », *Arthritis Rheum.*, vol. 40, n° 9, p. 1670- 1679, sept. 1997.
- [397] H. J. Mankin, « The response of articular cartilage to mechanical injury », *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 64, n° 3, p. 460- 466, mars 1982.
- [398] M. Rooney *et al.*, « Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 31, n° 8, p. 956- 963, août 1988.
- [399] N. Ozeki *et al.*, « Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats », *Osteoarthritis Cartilage*, 2016.
- [400] M. ter Huurne *et al.*, « Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 64, n° 11, p. 3604- 3613, 2012.
- [401] M. Horie *et al.*, « Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 20, n° 10, p. 1197- 1207, oct. 2012.
- [402] J.-C. Lee, H. J. Min, S. Lee, S. C. Seong, et M. C. Lee, « Effect of chondroitinase ABC on adhesion and behavior of synovial membrane-derived mesenchymal stem cells in rabbit partial-thickness chondral defects: chABC AUGMENTS THE ATTACHMENT OF CELLS ON DEFECTS », *J. Orthop. Res.*, vol. 31, n° 8, p. 1293- 1301, août 2013.
- [403] T. D. Bornes, A. B. Adesida, et N. M. Jomha, « Articular Cartilage Repair with Mesenchymal Stem Cells After Chondrogenic Priming: A Pilot Study », *Tissue Eng. Part A*, vol. 24, n° 9- 10, p. 761- 774, 2018.
- [404] A. Moya *et al.*, « Human Mesenchymal Stem Cell Failure to Adapt to Glucose Shortage and Rapidly Use Intracellular Energy Reserves Through Glycolysis Explains Poor Cell Survival After Implantation », *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 36, n° 3, p. 363- 376, 2018.
- [405] A.-J. Joswig *et al.*, « Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model », *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 8, p. 42, févr. 2017.
- [406] J. C. Goebel *et al.*, « 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 », *Rheumatol. Oxf. Engl.*, vol. 49, n° 9, p. 1654- 1664, sept. 2010.
- [407] T. Kuroda *et al.*, « Therapeutic strategy of third-generation autologous chondrocyte implantation for osteoarthritis », *Ups. J. Med. Sci.*, vol. 116, n° 2, p. 107- 114, mai 2011.
- [408] X. Yuan *et al.*, « Stem cell delivery in tissue-specific hydrogel enabled meniscal repair in an orthotopic rat model », *Biomaterials*, vol. 132, p. 59- 71, juill. 2017.

- [409] Y. Mifune *et al.*, « The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 21, n° 1, p. 175- 185, janv. 2013.
- [410] T. Matsumoto *et al.*, « Cartilage repair in a rat model of osteoarthritis through intraarticular transplantation of muscle-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 4 and soluble Flt-1 », *Arthritis Rheum.*, vol. 60, n° 5, p. 1390- 1405, mai 2009.
- [411] L. Galois *et al.*, « Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 12, n° 10, p. 779- 786, oct. 2004.
- [412] L. Galois *et al.*, « Ambivalent properties of hyaluronate and hylan during post-traumatic OA in the rat knee », *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 22, n° 4, p. 235- 242, 2012.
- [413] M. J. C. Leijts, G. M. van Buul, J. A. N. Verhaar, M. J. Hoogduijn, P. K. Bos, et G. J. V. M. van Osch, « Pre-Treatment of Human Mesenchymal Stem Cells With Inflammatory Factors or Hypoxia Does Not Influence Migration to Osteoarthritic Cartilage and Synovium », *Am. J. Sports Med.*, vol. 45, n° 5, p. 1151- 1161, avr. 2017.
- [414] M. Zayed, S. Adair, T. Ursini, J. Schumacher, N. Misk, et M. Dhar, « Concepts and challenges in the use of mesenchymal stem cells as a treatment for cartilage damage in the horse », *Res. Vet. Sci.*, vol. 118, p. 317- 323, mars 2018.
- [415] Y.-H. Chang, K.-C. Wu, H.-W. Liu, T.-Y. Chu, et D.-C. Ding, « Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells reduce monosodium iodoacetate-induced apoptosis in cartilage », *Tzu-Chi Med. J.*, vol. 30, n° 2, p. 71- 80, 2018.

## **Caractérisation et étude des potentialités des cellules souches mésenchymateuses d'origine synoviale dans le traitement des lésions focales et diffuses du cartilage**

**Résumé.** Le cartilage articulaire est un tissu avasculaire et non innervé, ce qui lui confère des capacités de réparation très limitées. Les traitements chirurgicaux actuels ne permettent pas d'obtenir un tissu de réparation similaire au cartilage natif. Les recherches s'orientent depuis de nombreuses années vers l'ingénierie cellulaire et tissulaire du cartilage selon le type de lésions à traiter, focale ou diffuse. Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) constituent une source cellulaire intéressante pour l'ingénierie du cartilage. Elles sont facilement accessibles et ont des potentialités de différenciation chondrogénique. Les CSMs issues de la moelle osseuse sont les plus étudiées et constituent la référence. D'autres sources de CSMs sont également très prometteuses. Notre choix s'est porté sur les CSMs issues de la membrane synoviale et du liquide synovial. Ces deux tissus articulaires présentent l'avantage de pouvoir être prélevés facilement lors d'un examen arthroscopique et leurs CSMs sont adaptées au microenvironnement (hypoxie, inflammation) de l'articulation.

Ce travail de thèse a porté sur l'étude de deux sources cellulaires d'origine synoviale dans le traitement des lésions focales et diffuses du cartilage. Ces CSMs d'origine synoviale ont d'abord été caractérisées selon leurs phénotypes et leurs capacités de différenciation vers les voies ostéogénique, adipogénique et chondrogénique, par rapport aux CSMs issues de la moelle osseuse. Ensuite, les capacités chondrogéniques de ces CSMs synoviales destinées à produire un substitut cartilagineux consacré aux traitements des lésions focales du cartilage articulaire ont été étudiées. Les CSMs ont été ensemencées dans un biomatériau collagénique et différentes conditions environnementales (facteurs de croissance et oxymétrie) ont été évaluées afin de définir les conditions de culture les plus appropriées. La chondrogenèse a été induite avec succès par l'utilisation de facteurs de croissance tels que TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 3 seuls ou en association avec la BMP-2. L'hypoxie n'a pas montré d'effet bénéfique sur la synthèse matricielle au sein des substituts cartilagineux.

Enfin, nous avons évalué les capacités des CSMs issues du liquide synovial humain à traiter les lésions diffuses du cartilage induites par un modèle de section du ligament croisé antérieur chez le rat athymique. Les deux injections intra-articulaires de CSMs issues du liquide synovial à 1 et 2 semaines après chirurgie n'ont pas permis de prévenir les lésions arthrosiques.

**Mots Clés :** Cartilage - Arthrose - Cellules souches mésenchymateuses - Différenciation chondrogénique - Ingénierie tissulaire - Liquide synovial

## **Characterization and study of synovial mesenchymal stem cells abilities in treatment of focal and diffuse lesions of cartilage**

**Abstract.** Joint cartilage is avascular and not innervated, which gives it very limited repair capabilities. Current surgical treatments do not provide repair tissue similar to native cartilage. For many years, research has been focused on cellular and tissue engineering of cartilage depending on the type of lesions to be treated, focal or diffuse. Mesenchymal stem cells (MSCs) are an interesting cellular source for cartilage engineering. They are easily accessible and have the potential for chondrogenic differentiation. MSCs from bone marrow are the most studied and are the gold-standard. Other MSCs sources of are also very promising. We chose MSCs from the synovial membrane and synovial fluid. These both joint tissues have the advantage of being easily retrievable during arthroscopic examination and their MSCs are adapted to the microenvironment (hypoxia, inflammation) of the joint.

This thesis work focused on the study of two cellular sources of synovial origin in the treatment of focal and diffuse cartilage lesions. These synovial-derived MSCs were first characterized according to their phenotypes and their ability to differentiate to the osteogenic, adipogenic and chondrogenic pathways, compared to bone marrow derived MSCs. Then, the chondrogenic capacities of these synovial MSCs to produce a cartilage substitute for the treatment of focal lesions of joint cartilage were studied. The MSCs were seeded in a collagenic biomaterial and different environmental conditions (growth factors and oximetry) were evaluated to define the most appropriate culture conditions. Chondrogenesis has been induced with success by the use of growth factors such as TGF- $\beta$ 1 or TGF- $\beta$ 3 alone or in combination with BMP-2. Hypoxia has not exerted a beneficial effect on matrix synthesis in cartilage substitutes.

Finally, we evaluated the ability of CSMs from human synovial fluid to treat diffuse cartilage lesions induced by an anterior cruciate ligament section model in athymic rats. The two intra-articular injections of synovial fluid MSCs, 1 and 2 weeks after surgery did not prevent osteoarthritic lesions.

**Keywords:** Cartilage - Osteoarthritis - Mesenchymal stem cells - Chondrogenic differentiation - Tissue engineering - Synovial fluid