



**HAL**  
open science

# L'Ingénierie tissulaire du cartilage : effet de l'âge du donneur et des contraintes mécanique et chimique du microenvironnement

Ophélie Pollet

► **To cite this version:**

Ophélie Pollet. L'Ingénierie tissulaire du cartilage : effet de l'âge du donneur et des contraintes mécanique et chimique du microenvironnement. Autre. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSEC022 . tel-02068309

**HAL Id: tel-02068309**

**<https://theses.hal.science/tel-02068309>**

Submitted on 14 Mar 2019

**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.



N° d'ordre NNT : 2018LYSEC022

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON  
opérée au sein de l'Ecole centrale de Lyon**

**Ecole Doctorale N° 162  
Ecole doctorale Mécanique, Energétique, Génie civil, Acoustique**

**Spécialité de doctorat : Biomécanique**

**Soutenue le 19 septembre 2018, par :  
Ophélie POLLET**

---

**L'ingénierie tissulaire du cartilage : effet de  
l'âge du donneur et des contraintes mécanique  
et chimique du microenvironnement**

---

Devant le jury composé de :

CHABRAND Patrick	Professeur des universités, Université Aix-Marseille	Rapporteur
RACHIDI Walid	Maître de Conférences, HDR, Université de Grenoble	Rapporteur
BENSIDHOUM Morad	Chargé de recherche, CNRS, HDR, Université Paris-Dideront	Examineur
MITTON David	Directeur de recherche, IFSTTAR	Président du jury
BOULOCHER Caroline	Maître de Conférences, HDR VetAgro Sup	Co-directrice
HOC Thierry	Professeur des universités, Ecole Centrale de Lyon	Directeur
PINZANO Astrid	Chargée de recherche, CNRS, HDR, Université de Lorraine	Invitée



# Remerciements

---

« L'homme vraiment courageux suit son projet jusqu'à ce qu'il l'ait mené à bonne fin. L'adversité ne peut le détourner de sa route, il persiste malgré les caprices de la fortune, et arrive au but au moment où on le croyait perdu ». Proverbe oriental. Ce proverbe a oublié de mentionner toutes les personnes qui ont aidé l'homme à faire face à l'adversité.

Je voudrais commencer par remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir examiné mon travail et pour les échanges très enrichissants le jour de ma soutenance. Je remercie David Mitton de l'IFSTTAR pour avoir présidé ce jury, Patrick Chabrand de l'Université Aix-Marseille et Walid Rachidi de l'Université de Grenoble pour avoir accepté et exercé leur rôle de rapporteur et Morad Bensidhoum de l'Université Paris-Diderot pour celui d'examineur. Je remercie également Astrid Pinzano, pour sa présence le jour de ma soutenance et le projet qu'elle a choisi de partager avec nous. Je remercie tout particulièrement Thierry Hoc et Caroline Boulocher, pour leur encadrement de haute qualité et leur confiance qu'ils m'ont accordé tout au long de ces trois années (et plus).

Caroline, celle qui a bien compris que les animaux faisaient partie de mes projets professionnels et m'a permis d'y accéder, je l'en remercie. Mais également pour sa très grande réactivité et efficacité à relire les chapitres ou répondre aux questions. Je souhaiterais également remercier Thierry, qui m'a fait confiance il y a 6 ans en tant qu'ingénieur dans un domaine qui n'était pas le mien, la mécanique, et qui m'a poussé jusqu'au bout, moi qui ne voulais pas faire de thèse, afin de croire que j'en étais capable. J'ai beaucoup appris auprès de lui et je retiendrai notamment qu'il faut croire en ces projets et ces intuitions. Je souhaite les remercier tous les deux pour leur implication, leur disponibilité et leurs bons conseils. Mais aussi pour m'avoir accompagné dans toutes mes démarches outre-Atlantique.

Un énorme merci à tous mes collègues qui ont partagé mon quotidien et sans qui le travail n'aurait pas eu un si grand goût de plaisir. Merci à Guillaume, Catherine et Benoit pour ce quatuor de choc. Merci à Laurianne, d'avoir été la première à m'accueillir dans son bureau et pour ces discussions osseuses. Merci à Magali, pour la confiance cellulaire que tu m'as donné durant ta thèse et qui m'a démontré que tout est possible. Merci à Noëlie, pour ce dynamisme et cette passion pour le métier de maître de conférences. Merci à Witold, pour ces discussions collagéniques. Merci à

Thomas pour notre projet 'vétérinaire pour poisson rouge' et pour son soutien même de l'autre côté de l'Atlantique. Merci à Audrey pour son enthousiasme et son soutien sans faille jusqu'à la dernière ligne droite. Merci à Hélène, Emna et Kelig pour nos discussions en salle café. Merci à Mehdi pour cet apprentissage sur le touché et le ressenti. Merci à Cécile, pour sa bonne humeur et ses conseils pour les nombreux TPs. Merci à Romain pour toutes ses réponses *jaugiennes* et d'avoir été un ami quand il était possible pour lui de l'être. Merci à Aurélie, ou comme dirait certain « à une lettre prêt ça fait «Aufélie», pour avoir instauré les pauses rollers autour d'un sprite et d'un morceau de poisson mais surtout pour ces échanges sur des sujets tel que Matlab et la nanoindentation. Merci à Catherine pour sa grande sympathie et générosité, son expertise en Matlab et pour toutes les manip qu'on a faites ensemble. Merci à Sarah, toujours prête à relever les défis (envers et contre tous) et ces pauses café si précieuses. Merci également aux GC, avec qui les sujets de discussion étaient autres que la biologie durant les repas, notamment Eric et Nathanaël pour leur culture pierre sèche. Une mention spéciale pour Agathe et Benoît avec qui j'ai passé la majeure partie de mon temps. Merci à Benoît, qui a largement contribué à la très bonne ambiance dans l'équipe, et d'avoir formé « mon couple de travail ». Merci à Agathe, ou encore Liliane, pour sa joie de vivre, son dynamisme et son amitié à toute épreuve.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes avec qui j'ai travaillé en dehors du laboratoire : Particulièrement, Christel Henrionnet et Astrid Pinzano pour leur participation, leurs partages et leur aide sur les manips, le personnel du laboratoire d'histologie de l'école VetAgro Sup et plus précisément Sylvie et Sylvie, et enfin de nouveau un grand merci à Morad Bensidhoum pour sa présence indispensable et nos discussions culture cellulaire.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes, sans qui l'administratif et toutes les démarches liées à la thèse n'aurait pas été si simple et rapide. Merci à Béatrice Chervet, et à Helène Schoch, toujours très efficace et disponible. Un grand merci à Isabelle Tixier pour sa sympathie, son efficacité, sa disponibilité et sa présence à ma soutenance. Mais aussi je remercie toutes les personnes de l'administration de l'école VetAgro Sup qui ont toujours répondu présentes à toutes mes questions et demandes.

Mais que serait l'homme sans le soutien de sa famille, de ses colocataires et de ses amis ? Cette thèse n'aurait pas été la même sans leurs encouragements et leur soutien jusqu'au dernier jour démontrés par leur présence le grand jour ou par leurs messages.

# Table des matières

---

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>3</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>5</b>
<b>LEGENDE DES FIGURES</b> .....	<b>9</b>
<b>LEGENDE DES TABLEAUX</b> .....	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>13</b>
<b>PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>17</b>
I.    LE CARTILAGE ARTICULAIRE, UN TISSU CLE DE L'ARTICULATION DU GENOU .....	18
1.1. <i>L'os sous-chondral</i> .....	19
1.2. <i>Le cartilage articulaire</i> .....	20
a.    Structure du cartilage .....	21
b.    Composition du cartilage .....	24
c.    Fonction du cartilage .....	29
1.3. <i>Les ménisques</i> .....	30
1.4. <i>Le liquide synovial</i> .....	32
a.    Composition du liquide synovial .....	32
b.    Fonctions principales .....	34
1.5. <i>La membrane synoviale</i> .....	35
a.    Organisation et structure .....	35
b.    Fonction au sein de l'articulation diarthrose .....	37
II.    LES 'PERIPETIES' DU CARTILAGE AU SEIN DE L'ARTICULATION .....	39
2.1. <i>Un équilibre physiologique défini par la relation structure / fonction</i> .....	39
a.    La chondrogénèse .....	40
b.    Nutrition du cartilage .....	42
c.    La relation cellules - matrice extracellulaire .....	42
d.    Influence des contraintes mécaniques sur le métabolisme .....	43
e.    Le stress au sein du cartilage .....	46
2.2. <i>Un équilibre perturbé par l'environnement</i> .....	47
a.    Le vieillissement .....	48
b.    Facteurs de dégradation du cartilage .....	51
2.3. <i>La réparation et/ou la régénération du défaut cartilagineux</i> .....	53
a.    Les différents types de défauts cartilagineux .....	54
b.    Activité sportive et bonne santé du cartilage .....	55
c.    Lubrification / injection de viscosupplément .....	56
d.    Stimulation de la moelle osseuse .....	56
e.    Réalisation de greffes .....	57
f.    Injection de cellules directement dans le défaut articulaire .....	59
g.    Chirurgie .....	60
III.    L'INGENIERIE TISSULAIRE (IT) DU CARTILAGE .....	62
3.1. <i>Choix des Cellules</i> .....	62
a.    Culture des chondrocytes en vue de greffe autologue .....	62
b.    Les Cellules Multipotentes Mésoenchymateuse .....	63
3.2. <i>Choix des facteurs de croissance ou de différenciation</i> .....	67
3.3. <i>Choix du biomatériau</i> .....	72

a.	Propriétés du biomatériau .....	73
b.	Composition du biomatériau .....	73
c.	Structure des biomatériaux.....	76
3.4.	<i>Le modèle animal</i> .....	77
IV.	CARACTERISATION DU RESULTAT DE L'INGENIERIE TISSULAIRE .....	81
4.1.	<i>La microscopie confocale biphotonique</i> .....	81
4.2.	<i>Histologie et immunohistologie</i> .....	83
4.3.	<i>Caractérisation du métabolisme – Etude de l'expression génique par PCR</i> .....	86
4.4.	<i>La nanoindentation</i> .....	86
a.	Test d'indentation - relaxation .....	86
b.	Le cartilage, un tissu viscoélastique - modèle numérique.....	88
4.5.	<i>Tomographie de l'os sous-chondral – nanoscanner à rayons X</i> .....	90
V.	CONCLUSION.....	92
<b>PARTIE II : L'AGE DU DONNEUR DANS L'INGENIERIE TISSULAIRE – ETUDE <i>IN VITRO</i></b> .....		<b>95</b>
I.	INTRODUCTION.....	95
II.	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	99
2.1.	<i>Human mesenchymal stem cells</i> .....	99
2.2.	<i>Scaffold and in vitro experiments</i> .....	99
2.3.	<i>RNA Isolation &amp; RT-PCR</i> .....	100
2.4.	<i>Histology of in vitro tissue engineered substitute</i> .....	101
2.5.	<i>Immunohistochemistry of in vitro tissue engineered</i> .....	102
2.6.	<i>Mechanical testing</i> .....	102
2.7.	<i>Statistical analysis</i> .....	103
III.	RÉSULTATS .....	104
3.1.	<i>Morphologie et contraction des éponges</i> .....	104
3.2.	<i>Expression des genes par Rt-PCR quantitative</i> .....	104
3.3.	<i>Synthèse de la matrice extracellulaire (collagène de type II) dans les éponges de collagène avec ou sans TGF-<math>\beta</math>1</i> .....	106
3.4.	<i>Synthèse de la matrice extracellulaire (Glycosaminoglycanes) dans les éponges de collagène avec ou sans TGF-<math>\beta</math>1</i> .....	106
3.5.	<i>Propriétés mécaniques du greffon</i> .....	108
3.6.	<i>Corrélation entre les propriétés mécaniques et la quantité de GAGs et de collagène de type II...</i>	109
IV.	DISCUSSION .....	111
V.	CONCLUSION.....	114
<b>PARTIE III : L'AGE DU DONNEUR DANS L'INGENIERIE TISSULAIRE – ETUDE <i>IN VIVO</i></b> .....		<b>115</b>
I.	INTRODUCTION.....	115
II.	MATERIALS AND METHODS .....	118
2.1.	<i>Human mesenchymal stem cells</i> .....	118
2.2.	<i>Scaffold and in vitro experiments</i> .....	118
2.3.	<i>Animal experiments</i> .....	119
2.4.	<i>Sample preparation</i> .....	120
2.5.	<i>High-resolution X-ray computed tomography</i> .....	121
2.6.	<i>Nanoindentation test of articular cartilage</i> .....	121
2.7.	<i>Multiphoton imaging</i> .....	122
2.8.	<i>Histology of knee</i> .....	122
2.9.	<i>Statistical analysis</i> .....	123
III.	RESULTATS .....	124
3.1.	<i>Propriétés mécaniques et structurelles de l'éponge avant implantation</i> .....	124

3.2.	<i>Aspect macroscopique du cartilage articulaire et du défaut ostéocondral 28 jours après l'opération</i> .....	124
a.	Les condyles fémoraux et le défaut ostéocondral médial de la patte droite (patte opérée) .....	124
b.	Le plateau tibial de la patte droite (patte opérée) .....	125
c.	La rotule de la patte droite (patte opérée) .....	126
d.	La patte gauche, la patte non opérée .....	127
3.3.	<i>Aspect microscopique de la MEC du cartilage à la surface articulaire 28 jours après l'opération des fémurs et tibias</i> .....	128
a.	Les chondrons ou logettes articulaires du fémur .....	128
b.	Les chondrons ou logettes articulaires du tibia.....	130
3.4.	<i>Aspect macroscopique de la structure osseuse 28 jours après l'opération</i> .....	131
a.	Vue générale de la trochlée du fémur et du plateau tibial .....	131
b.	Epaisseur de la plaque sous-chondrale des condyles fémoraux .....	132
3.5.	<i>Propriétés mécaniques du cartilage articulaire à 28 jours</i> .....	133
a.	Propriétés mécaniques selon le condyle, la patte (opérée ou non) et l'âge du donneur.....	133
b.	Propriétés mécaniques du plateau tibial.....	134
3.6.	<i>Histologie de l'articulation après 28 jours</i> .....	135
a.	Histologie des fémurs.....	135
b.	Histologie des tibias .....	137
c.	Histologie des membranes synoviales .....	138
IV.	DISCUSSION .....	140
V.	CONCLUSION.....	145

**PARTIE IV : INFLUENCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX CHIMIQUES ET MECANIQUES SUR L'INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE – UNE ETUDE *IN VITRO* .....** 147

I.	INTRODUCTION.....	147
II.	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	152
2.1.	<i>Human mesenchymal stem cells</i> .....	152
2.2.	<i>Scaffold and in vitro experiments</i> .....	152
2.3.	<i>Mechanical stresses</i> .....	154
a.	Cyclic hydrostatic pressure system .....	154
b.	Dynamic Compression system .....	155
2.4.	<i>Mechanical testing of constructs</i> .....	156
2.5.	<i>Histology of in vitro tissue engineered substitutes</i> .....	156
2.6.	<i>Statistical analysis</i> .....	157
III.	RESULTATS .....	158
3.5.	<i>Morphologie du greffon issu de l'ITF</i> .....	158
a.	Aspect général.....	158
b.	Influence de l'environnement chimique .....	159
c.	Influence de l'environnement mécanique .....	160
d.	Influence du type de contrainte mécanique .....	162
e.	Combinaison de l'environnement mécanique et chimique .....	163
3.6.	<i>Aspect microscopique des fibres de collagène des greffons issus de l'ITF</i> .....	165
3.7.	<i>Comportement mécanique des greffons issus de l'ITF</i> .....	166
a.	Influence de l'environnement chimique sur le biomatériau .....	166
b.	Influence de l'environnement chimique sur les greffons obtenus.....	167
c.	Influence de la sollicitation mécanique sur les greffons obtenus .....	168
d.	Influence du type de sollicitation mécanique .....	170
e.	Combinaison de l'environnement mécanique et chimique .....	171
3.8.	<i>Comportement de la cellule</i> .....	171
a.	Influence de l'environnement chimique sans sollicitation mécanique .....	171
b.	Combinaison de l'environnement mécanique et chimique .....	172

IV. DISCUSSION .....	174
V. CONCLUSION.....	182
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>185</b>
<b>ANNEXE N°1 : DIAMETRE DES EPONGES DE LA PARTIE II .....</b>	<b>189</b>
<b>ANNEXE N° 2 : PHOTOGRAPHIES MACROSCOPIQUES DES FEMURS DE LA PATTE DROITE.....</b>	<b>190</b>
<b>ANNEXE N°3 : PHOTOGRAPHIES MACROSCOPIQUES DES TIBIAS DE LA PATTE DROITE.....</b>	<b>191</b>
<b>ANNEXE N°4 : PHOTOGRAPHIES MACROSCOPIQUES DES ROTULES DE LA PATTE DROITE .....</b>	<b>192</b>
<b>ANNEXE N°5 : PHOTOGRAPHIES MACROSCOPIQUES DES FEMURS, TIBIAS ET ROTULES DE LA PATTE GAUCHE .....</b>	<b>193</b>
<b>ANNEXE N°6 : RECONSTRUCTION 3D DE LA TROCHLEE FEMORALE DE LA PATTE DROITE .....</b>	<b>196</b>
<b>ANNEXE N°7 : RECONSTRUCTION 3D DE LA TROCHLEE FEMORALE DE LA PATTE GAUCHE.....</b>	<b>197</b>
<b>RECONSTRUCTION 3D DU PLATEAU TIBIAL DES DEUX PATTES .....</b>	<b>198</b>
<b>ANNEXE N°8 : FRACTION ELASTIQUE (F) ET MODULE A L'EQUILIBRE (<math>E_{EQ}</math>) DES CONDYLES FEMORAUX.....</b>	<b>199</b>
<b>ANNEXE N°9 : FRACTION ELASTIQUE (F) ET MODULE A L'EQUILIBRE (<math>E_{EQ}</math>) DU PLATEAU TIBIAL.....</b>	<b>200</b>
<b>ANNEXE N°10 : IMAGES MULTIPHOTON DE LA MEC DES EPONGES CULTIVEES AVEC LES DONNEURS AGES .</b>	<b>201</b>
<b>IMAGES MULTIPHOTON DE LA MEC DES EPONGES CULTIVEES AVEC LES DONNEURS JEUNES .....</b>	<b>202</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>203</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>214</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>214</b>

# Légende des figures

---

Figure 1: Schéma de l'articulation du genou chez l'Homme (coupe sagitale).....	199
Figure 2 : Images de la jonction ostéocondrale.....	2020
Figure 3 : Schéma de la structure générale du cartilage articulaire humain chez l'adulte. ....	233
Figure 4: Schéma de Protéoglycane ou aggrécane. ....	277
Figure 5 : Représentation schématisée du réseau de collagène macrofibrillaire, des agrégats d'aggrécane et de l'acide hyaluronique.....	299
Figure 6 : Représentation des ménisques au sein de l'articulation du genou.....	31
Figure 7 : Schématisation de la membrane synoviale .....	366
Figure 8: Schématisation de l'organisation des cellules durant la chondrogénèse. ....	4141
Figure 9 : Schématisation de la relation entre la cellule et la matrice extracellulaire du cartilage : collagènes, protéoglycanes et molécules non collagéniques. ....	433
Figure 10 : Schématisation de la relation entre la cellule et son environnement mécanique.....	455
Figure 11 : Illustration de l'interaction entre la composition de la MEC, Les signaux de la MEC, l'activité biosynthétique des chondrocytes et les contraintes mécaniques. ....	477
Figure 12 : Coupe histologique du condyle fémoral humain d'une personne jeune de 40 ans, d'une personne âgée de 76 ans et d'une personne atteinte d'arthrose.....	533
Figure 13 : Schématisation de la réparation par microfracture.....	577
Figure 14 : Schématisation de la mosaïcoplastie.. ....	588
Figure 15 : Schématisation du principe d'un patch issu du périoste.....	599
Figure 16: Schéma décrivant les marqueurs importants durant le processus de chondrogenèse et de maturation des chondrocytes. ....	866
Figure 17 : Schéma représentant le comportement du fluide et le réarrangement du cartilage durant une expérience de contrainte-relaxation .....	877
Figure 18 : Schéma représentant le modèle de Maxwell généralisé à n branches .....	888
Figure 19 : RT-PCR réalisée sur les éponges avec les CSMh des donneurs jeunes ou âgés, avec ou sans TGF- $\beta$ 1, après 28 jours ou 56 jours de culture.....	1055
Figure 20 : Immunohistochimie de la production de la MEC du cartilage : Production du collagène de type II. ....	1066
Figure 21 : Histologie de la production de la MEC du cartilage : GAGs.....	Erreur ! Signet non défini.7
Figure 22 : Les graphiques représentent le volume total de GAGs par éponge .....	Erreur ! Signet non défini.8
Figure 23 : Module instantané, viscosité et contrainte du greffon.....	Erreur ! Signet non défini.9
Figure 24 : Corrélation entre le module instantané et la quantité de GAGs, Corrélation entre le module instantané et la teneur en collagène de type II. ....	Erreur ! Signet non défini.10
Figure 25 : Pictures of the osteochondral defect on the right femoral condyle.....	Erreur ! Signet non défini.9
Figure 26 : Photographie des condyles fémoraux de la patte droite (patte opérée)..	Erreur ! Signet non défini.4
Figure 27: Photographie du plateau tibial de la patte droite (patte opérée).....	Erreur ! Signet non défini.5
Figure 28 : Photographie de la face dorsale de la rotule de la patte droite (patte opérée) ....	Erreur ! Signet non défini.6
Figure 29: Photographie de l'articulation de la patte gauche (patte non opérée) : condyles fémoraux, le plateau tibial et la rotule .....	Erreur ! Signet non défini.7
Figure 30 : Images obtenues à partir d'un microscope confocal multiphoton de la surface articulaire du fémur .....	1288

Figure 31: graphique représentant l'aire moyenne et le nombre moyen de lacune chondrocytaire de la MEC à surface articulaire du fémur.....	1299
Figure 32 : graphique représentant l'aire moyenne et le nombre moyen de lacune chondrocytaire de la MEC des cartilages articulaires des condyles fémoraux en fonction de l'âge des donneurs.....	13030
Figure 33 : Image obtenue à partir d'un microscope confocal multiphoton de la surface articulaire du tibia. .....	13030
Figure 34 : Reconstruction 3D de l'extrémité distale (fémur) de la patte droite obtenue par rayon X. ....	13131
Figure 35 : image obtenue par rayon X d'un condyle fémoral de rat. ....	1322
Figure 36: graphique représentant la différence d'épaisseur entre la localisation 2 et la localisation 3 en fonction de l'âge du donneur.....	1333
Figure 37 : graphiques représentant le module instantané ( $E_{ins}$ ) en MPa du fémur selon le condyle, la patte (opérée ou non) et l'âge du donneur .....	1333
Figure 38: graphiques représentant le module instantané ( $E_{ins}$ ) en MPa du tibia selon le condyle, la patte (opérée ou non) et l'âge du donneur. ....	1344
Figure 39 : coupes histologiques des condyles fémoraux .....	1355
Figure 40: Graphiques représentant la qualité de réparation du tissu fémoral selon les condyles et l'âge du donneur .....	1366
Figure 41 : coupe histologique du plateau tibial. ....	1377
Figure 42 : graphiques représentant la qualité du tissu tibial selon les condyles et l'âge du donneur. ....	1377
Figure 43 : Photographie des membranes synoviales colorées avec l'HES .....	1388
Figure 44 : graphique représentant l'inflammation de la membrane synoviale entre le groupe âgé et le groupe jeune sur la patte droite et la patte gauche. ....	1399
Figure 45 : Schematic illustration of the laboratory system used to expose cells to cyclic hydrostatic pressure (CHP).....	1555
Figure 46 : Photography of sterile bioreactor (BOSE), with construct immersed in custom compression loading system.....	1566
Figure 47 : Photos des éponges à J1 et J28. ....	1588
Figure 48 : Représentation en box-plot de l'évolution du diamètre et de l'épaisseur des éponges.....	1599
Figure 49 : Graphique représentant l'influence de l'environnement chimique : TGF- $\beta$ et liquide synovial sur la morphologie des éponges : épaisseur et diamètre.....	1599
Figure 50 : Graphique représentant l'influence de l'environnement chimique : TGF- $\beta$ et liquide synovial sur le diamètre des éponges au bout de 28 jours de culture pour un groupe d'âge. ....	16060
Figure 51: Graphique représentant l'influence de l'environnement mécanique : sans et avec sollicitations mécaniques sur la morphologie des éponges : épaisseur et diamètre.....	16060
Figure 52: Graphique représentant de l'influence l'environnement mécanique : sans et avec sollicitations mécaniques sur le diamètre des éponges en fonction de l'âge du donneur .....	16161
Figure 53 : Graphique représentant l'influence de la contrainte mécanique : compression et pression hydrostatique sur la morphologie des éponges : épaisseur et diamètre .....	1622
Figure 54 : Graphique représentant l'influence de la contrainte mécanique : compression et pression hydrostatique sur le diamètre des éponges selon l'âge du donneur. ....	1633
Figure 55 : Graphique représentant l'influence de la combinaison des contraintes mécaniques et chimiques sur le diamètre des éponges: compression et pression hydrostatique .....	1633
Figure 56 : Graphique représentant l'influence de la combinaison des sollicitations mécanique et chimique sur le diamètre des éponges selon l'âge du donneur : compression et pression hydrostatique ; En présence de TGF- $\beta$ 1 ou de liquide synovial. ....	1644
Figure 57 : reconstruction 3D de la matrice de collagène de l'éponge et de la MEC.....	1655
Figure 58 : Comportement mécanique (module à l'équilibre $E_{eq}$ et viscosité) des éponges sans cellules ....	1677
Figure 59 : Comportement mécanique de l'éponge : module instantané $E_{ins}$ et viscosité en fonction de l'environnement chimique et de l'âge du donneur. ....	1677

Figure 60 : Comportement mécanique (module à l'équilibre $E_{eq}$ et viscosité) pour les éponges sans ou avec sollicitations mécaniques.....	1688
Figure 61 : Comportement mécanique de l'éponge : module à l'équilibre $E_{ins}$ et viscosité ; sans ou avec sollicitations mécaniques selon l'âge du donneur.....	1699
Figure 62 : Comportement mécanique de l'éponge (module instantané $E_{ins}$ et viscosité), en fonction de la contrainte appliquée..	17070
Figure 63 : Comportement mécanique de l'éponge : module instantané $E_{ins}$ et viscosité ; en fonction de la contrainte appliquée et de l'âge du donneur.....	17070
Figure 64 : Graphique représentant le module instantané $E_{ins}$ en MPa, de l'éponge, en fonction de la contrainte appliquée et de l'âge du donneur.....	17171
Figure 65 : Graphique représentant l'impact de l'âge sur les propriétés mécaniques de l'éponge en présence TGF- $\beta$ 1 ou de liquide synovial.....	17272
Figure 66 : Graphique représentant l'impact de l'âge sur les propriétés mécanique de l'éponge et sur le diamètre lorsque l'on combine contraintes mécanique et chimique.....	1733

---

# Légende des tableaux

---

Tableau 1: Composition et activité au sein du cartilage, de l'os sous-chondral et du liquide synovial dans le cas de vieillesse ou de l'arthrose .....	52
Tableau 2 : Liste des facteurs de croissance et de différenciation les plus utilisés dans l'ingénierie tissulaire et leurs effets sur les CSMs.. .....	72
Tableau 3 : Tableau résumant les différentes informations sur les modèles animaux les plus utilisés.....	79
Tableau 4 : 11 paramètres histologiques visant à apprécier la morphologie cellulaire, le contenu de la matrice, l'organisation du tissu et l'aspect du tissu avec les structures voisines. ....	84
Tableau 5 : Score de Rooney – Evaluation de l'inflammation de la membrane synoviale .....	85
Tableau 6 : Primers sequences for Rt-PCR .....	101

---

# Introduction générale

---

Le corps humain comprend environ 400 articulations lui donnant souplesse et mobilité mais ces articulations peuvent se dégrader et entraîner des douleurs articulaires. Dès l'enfance et jusqu'à un âge avancé, nous pouvons tous être confrontés aux douleurs articulaires. Elles peuvent être liées à un traumatisme, une inflammation ou un problème mécanique. L'une des principales causes de ces douleurs est liée à l'érosion du cartilage. Le cartilage est un tissu non innervé, dont le rôle est de protéger l'os des sollicitations mécaniques et de permettre le mouvement de l'articulation sans frottement ni usure. La réponse inflammatoire, qui est initiatrice ou conséquence du défaut cartilagineux, va toucher les autres tissus de l'articulation entraînant leur dégradation à leur tour et aggravant les lésions cartilagineuses. En plus d'être non innervé, le cartilage est un tissu non vascularisé, il a donc une capacité d'auto-régénération très faible en cas de dégradation [1], [2].

L'arthrose est la maladie articulaire la plus fréquente et une des plus connues, elle est liée à l'âge, et fait partie des 10 affections les plus invalidantes au monde. Elle entraîne une dégradation du cartilage articulaire plus ou moins rapide et est irréversible. La dégradation du cartilage touche de plus en plus de personnes et se retrouve de plus en plus chez les personnes plus jeunes ayant subi des traumatismes ou qui pratique des sports traumatiques, l'ostéochondrie disséquante est la pathologie la plus retrouvée chez ce groupe de personnes. Résoudre les problèmes de régénération du cartilage est donc un réel problème clinique pour toutes les catégories d'âge. Afin d'aider le cartilage à se régénérer plusieurs techniques ont déjà été développées mais aucune ne donne à l'heure actuelle des résultats satisfaisants : le tissu néoformé est souvent de mauvaise qualité au niveau de ses propriétés mécaniques car de nature fibreuse [3].

L'ingénierie tissulaire (IT) est l'une des techniques de réparation du cartilage les plus prometteuses. Elle consiste en l'association de 3 paramètres : les cellules, le biomatériau et les facteurs bioactifs

## Introduction générale

(facteurs de croissance et de différenciation). Jusqu'en 2015, La recherche s'est plus concentrée sur l'utilisation des chondrocytes plutôt que de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) avec ou sans biomatériau [4]. Les CSMs étant plus maniables, plus facile à obtenir et avec un grand pouvoir de différenciation, les CSMs sont devenues les cellules les plus utilisées.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est double i) analyser l'influence de l'âge du donneur de CSMs sur la qualité du greffon et de la réparation *in vitro* et *in vivo* dans un modèle animal, ii) modifier le protocole permettant la différenciation pour obtenir un greffon de meilleure qualité à la fois à travers l'environnement chimique en introduisant la présence de liquide synovial et à travers l'ajout de stimulations mécaniques de compression uniaxiale ou de pression hydrostatique, pour les deux classes d'âge du donneur.

Ainsi, le chapitre 1, bibliographique, a pour but d'introduire les caractéristiques du cartilage dans son ensemble, au sein de l'articulation, et de présenter les principales affections qui le touchent avant d'évoquer les thérapies actuelles. Enfin, les techniques employées par la suite pour caractériser au mieux les implants issus de l'IT, substitués au cartilage hyalin, et leur intégration dans l'hôte seront explicitées.

Le chapitre 2 vise à mettre en évidence l'importance de l'âge du donneur de cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh), dans l'IT du cartilage lors d'une étude *in vitro*. Le greffon sera caractérisé à travers ses propriétés mécaniques par un test d'indentation-relaxation et sur la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC) du cartilage, c'est-à-dire du collagène de type II et des glycosaminoglycanes (GAGs), visualisée par histologie et immunohistochimie.

Le chapitre 3 met en évidence l'importance de l'âge du donneur des CSMh sur l'intégration du greffon et la régénération du cartilage *in vivo* dans un modèle animal. Le modèle choisi est un modèle de rat NUDE (dépourvu de système immunitaire). Un défaut ostéochondral est réalisé chirurgicalement puis comblé avec un greffon issu de l'IT avec dans un cas des cellules de donneurs jeunes et dans un autre cas les cellules de donneurs âgés. La réparation est évaluée sur les propriétés

mécaniques, par un test d'indentation-relaxation, et structurales, par microscopie confocale et histologie, du cartilage de la zone lésée ainsi que les zones alentours. La structure de l'os sous-chondral sera également analysée par nanoscanner.

Le chapitre 4 a pour objectif d'aller plus loin dans l'IT classique en améliorant les conditions *in vitro* pour se rapprocher des conditions *in vivo*. Il s'agit d'IT fonctionnelle. Pour cela nous avons étudié deux paramètres : 1) des facteurs chimiques : liquide synovial ou TGF- $\beta$ 1, et/ou 2) des facteurs mécaniques : pression hydrostatique ou compression, l'âge du donneur restant un paramètre d'étude au centre du protocole. Les caractéristiques du greffon seront basées sur ses propriétés mécaniques par un test d'indentation-relaxation et sur la synthèse de la MEC du cartilage, c'est-à-dire le collagène de type II et les glycosaminoglycanes (GAGs), par microscopie confocale.

Enfin, nous terminerons ce manuscrit par une conclusion générale sur ce travail de thèse et les perspectives qu'il apporte pour de futures études.



# Partie I : Etude Bibliographique

---

Le cartilage a un rôle essentiel au sein de l'articulation : il protège les os en présence et autorise un mouvement fluide et sans frottement. Une articulation saine et fonctionnelle se base sur l'interaction de nombreux tissus (os, cartilage, liquide synovial, etc...). De multiples facteurs peuvent affecter le cartilage et résulter en un défaut du cartilage provoquant des douleurs articulaires et une perte fonctionnelle. Ces maladies touchent toutes les catégories d'âge de la population. En effet, l'arthrose est souvent associée à l'âge tandis que l'ostéochondrite disséquante affecte plus particulièrement les jeunes. Différentes solutions thérapeutiques sont développées afin de réparer ces défauts mais aucune à l'heure actuelle n'a réussi à régénérer un tissu dont les propriétés mécaniques et structurelles suffisent au fonctionnement normal de l'articulation.

Dans une première partie, l'articulation du genou sera présentée et notamment la structure et le rôle de chaque tissu dans le maintien d'une articulation saine. Dans une deuxième partie, le métabolisme et l'homéostasie du cartilage seront développés avec les modifications occasionnées lors de maladie ou les traumatismes, ainsi que les traitements possibles pour la reconstruction des défauts cartilagineux. La troisième partie porte sur l'ingénierie tissulaire (IT), un procédé d'avenir dans la thérapie du cartilage ainsi que sur les modèles animaux nécessaires à la compréhension *in vivo* de la réparation du cartilage et de l'intégration du greffon. Pour finir les techniques utilisées pour caractériser les greffons issus de l'IT avec ou sans phase d'implantation *in vivo* seront détaillées.

## I. Le cartilage articulaire, un tissu clé de l'articulation du genou

L'articulation du genou est une articulation très mobile permettant des mouvements amples, on la nomme donc articulation diarthrosique. Elle possède 3 segments osseux : le tibia et le fémur, ayant un rôle de structure portante, et la rotule. Elle se compose de deux systèmes articulaires : l'articulation fémoro-tibiale où s'articulent le plateau tibial (partie distale) et les condyles fémoraux (partie proximale) et l'articulation fémoro-patellaire où s'articulent la trochlée fémorale et la rotule (ou patella). Notre étude concerne plus particulièrement l'articulation portante, c'est à dire l'articulation fémoro-tibiale. La cavité articulaire (figure n°1), cœur de l'articulation du genou, est composée:

- ✚ De l'os sous-chondral (du tibia et du fémur)
- ✚ De cartilage articulaire, tissu viscoélastique qui permet la fluidité du mouvement et la protection des os en présence.
- ✚ De 2 ménisques, tissus fibrocartilagineux, situés entre le cartilage articulaire tibial et le fémoral, ayant un rôle d'amortisseur et de stabilité de l'articulation.
- ✚ Du liquide synovial, ultrafiltrat du plasma sanguin, ayant pour rôle la lubrification et la nutrition du cartilage.
- ✚ D'une membrane synoviale, tissu conjonctif richement vascularisé, responsable de la formation du liquide synovial et tapissant intimement la face interne de la cavité articulaire.

D'autres structures participent à la stabilisation de l'articulation dans son ensemble, au repos ou lors du mouvement:

- ✚ Des ligaments, tissu conjonctif fibreux, très résistant, reliant deux segments osseux ensemble
- ✚ Des tendons, tissu conjonctif fibreux, reliant les muscles et les os
- ✚ Des muscles, tissu conjonctif fibreux, permettant le maintien et le mouvement de l'articulation.

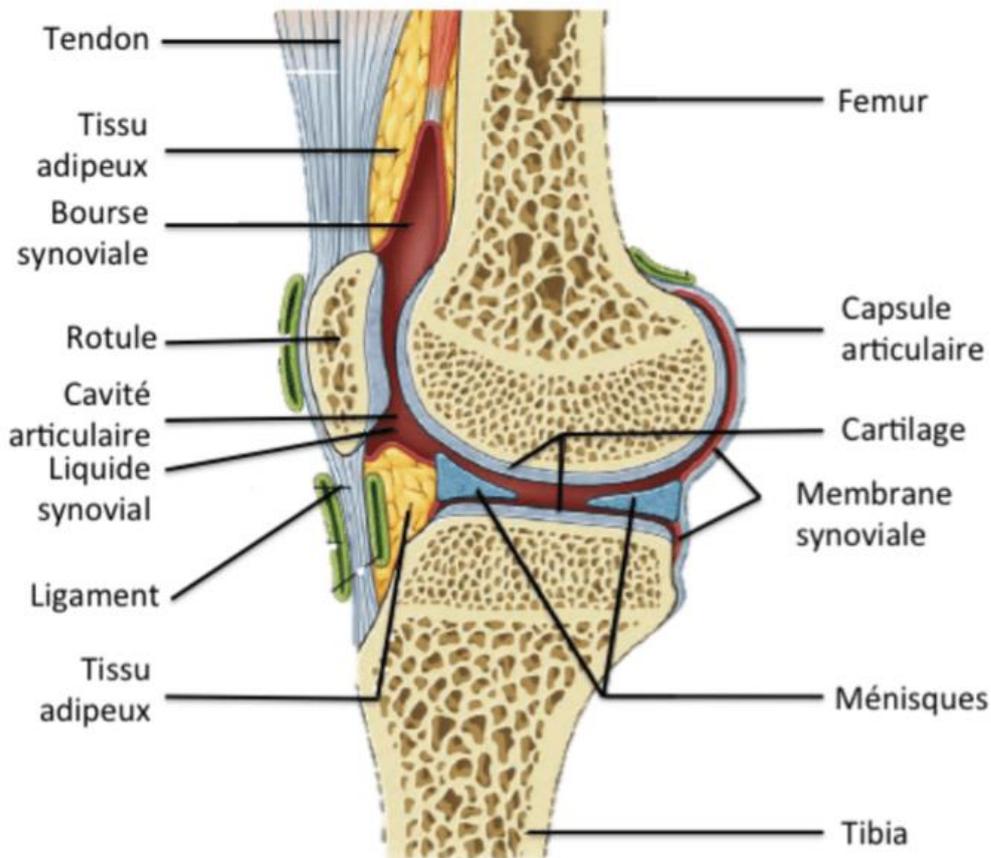


Figure 1: Schéma de l'articulation du genou chez l'Homme (coupe sagittale), adapté de Drake, Richard L et al, 2015 (Gray's Anatomie pour les étudiants). L'articulation est composée d'un tissu osseux, d'un tissu cartilagineux, de la membrane synoviale, du liquide synovial et des tissus élastiques (tendons et ligaments). <http://factuel.univ-lorraine.fr/node/5651>.

### 1.1. L'os sous-chondral

L'os sous-chondral est la structure sur laquelle se repose les autres éléments de l'articulation. C'est la partie osseuse des os longs (du tibia et du fémur) se trouvant directement sous le cartilage. Il est séparé en 2 entités anatomiques distinctes (figure n°2) [5]:

- ✚ la plaque sous-chondrale, composé d'os cortical, est relativement dense et peu vascularisée. Elle sépare l'os-sous chondral du cartilage calcifié (couche profonde du cartilage) par la ligne cimentante ('*cement line*').
- ✚ l'os trabéculaire sous-chondral, composé d'os spongieux, est très poreux, pourvu de terminaisons nerveuses, de vaisseaux sanguins et de moelle osseuse.

### 1.1 Le cartilage articulaire, un tissu clé de l'articulation du genou

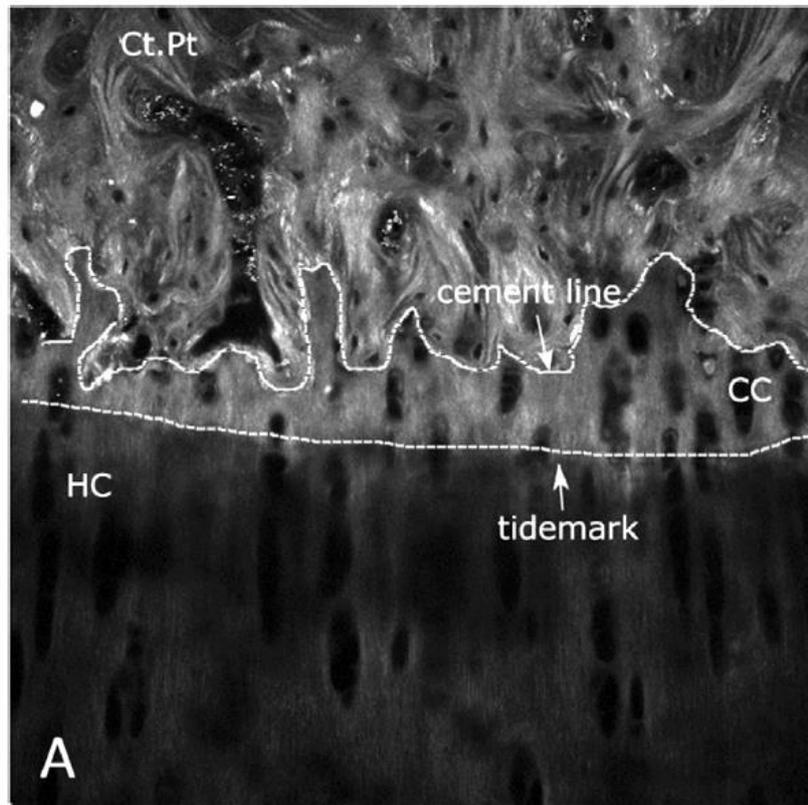


Figure 2 : Images obtenues par génération de seconde harmonique (SHG) de la jonction ostéochondrale mettant en évidence la matrice de collagène à une profondeur de 5  $\mu\text{m}$  sous la surface. Image représentant la structure articulaire saine d'un fémur de lapin. Ct.Pt: Plaque sous-chondrale, CC: Cartilage calcifié, HC: Cartilage hyalin. Pragnère *et al* (2018) [5].

D'un point de vue biomécanique, la plaque sous chondrale constitue une zone de transition entre le tissu cartilagineux et l'os trabéculaire et joue ainsi un rôle primordial dans l'amortissement des chocs en minimisant le stress mécanique du tissu cartilagineux. Il est montré qu'il existe une interaction étroite entre l'os et le cartilage au cours de la croissance et le développement mais également au cours de la dégénérescence du cartilage, mais cette interaction est insuffisamment comprise. Une étude réalisée par Hamann *et al* [6] montre en 2013, que sur les tibias et fémurs de rat âgés de 7 et 13 semaines, la croissance a diminué l'épaisseur du cartilage, mais parallèlement l'os sous-chondral sous-jacent s'est condensé due à l'ossification endochondrale. Cependant ces changements n'affectent pas les propriétés mécaniques du cartilage.

### 1.2. Le cartilage articulaire

Il existe plusieurs structures cartilagineuses dans l'organisme : cartilage hyalin, cartilage fibreux et cartilage élastique. Le cartilage hyalin est celui de l'articulation du genou, il a un aspect blanc, un peu translucide, lisse et luisant. Contrairement à la plupart des tissus, le cartilage articulaire est

hypocellulaire, aneural, alymphatique et avasculaire. Ces caractéristiques ne lui permettent pas l'apport et l'élimination de molécules ou de cellules par lui-même entraînant une capacité limitée dans la guérison et la réparation intrinsèque. Pour autant, son environnement mécanique est complexe, il doit faire face à des forces de cisaillement, de compression, de frottement et de pression hydrostatique. Pour les forces de frottement, le liquide synovial joue un rôle de lubrifiant entre les surfaces articulaires. C'est grâce à l'organisation de la matrice extracellulaire (MEC) que le cartilage va pouvoir résister à la traction et absorber les contraintes qu'il subit. La MEC est dense et principalement composé d'eau (80%) et de composés solides organiques : collagène (68%), protéoglycanes (22%) et autres protéines non-collagéniques (10%). Elle est également clairsemée de cellules spécialisées appelées chondrocytes [1], [2], [7]–[10].

#### a. Structure du cartilage

La structure du cartilage articulaire est très organisée et son épaisseur est variable notamment selon les espèces (environ 2 à 4 mm chez l'homme, 1mm chez le chien, 400µm chez le lapin et 100 µm chez la souris [11]), la localisation anatomique (fémur vs tibia et zone portante vs zone non portante) et l'âge [10].

La zone la plus superficielle est constituée d'une très fine couche acellulaire dénommée « *lamina splend*a » qui permet l'attache de macromolécules présentes dans le liquide synovial et qui constitue ainsi une couche protectrice et glissante pour celui-ci. Sous cette couche, se succèdent 4 zones qui sont distinctes par leur organisation, composition et fonction (figure n°3) [1]–[3], [7], [8], [12]:

- ✚ **La zone superficielle** : représente 10 à 20% de l'épaisseur. Elle contient une densité importante de chondrocytes petits et plats au sein d'un réseau de collagène de type II, dont les fibres fines (20 nm de diamètre), sont disposées parallèlement à la surface et d'une matrice riche en fibronectine mais pauvre en protéoglycanes. C'est la zone avec la plus forte teneur en eau. Cette organisation confère à cette zone une résistance aux forces de tension la dotant d'une capacité à répartir les forces de cisaillement, de traction et de compression,

## 1.1 Le cartilage articulaire, un tissu clé de l'articulation du genou

mais également d'agir comme un filtre aux macromolécules (maillage des fibres de collagène) protégeant le cartilage.

- ✚ **La zone médiane ou de transition** : représente 40 à 60 % de l'épaisseur. Elle est composée de gros chondrocytes sphériques inclus dans un réseau de collagène de type II dont les fibres n'ont pas d'orientation particulière
- ✚ **La zone profonde** : représente 30 % de l'épaisseur. Elle est composée de chondrocytes disposés en colonne orientée le long des fibres du réseau de collagène de type II. Les fibres sont épaisses (70 à 120 nm de diamètre) et orientées perpendiculairement à la surface. C'est la zone où la matrice est la plus riche en protéoglycanes. L'orientation des fibres lui permet d'absorber les chocs.
- ✚ **La zone calcifiée** : représente 5-10% de l'épaisseur. Elle est composée d'un faible nombre de chondrocytes qualifiés de chondrocytes hypertrophiés, i.e. avec un stade de différenciation avancé et une faible activité métabolique, au sein d'un réseau de fibres de collagène de type X orientées perpendiculairement à la surface. Elle a un rôle de barrière qui empêche les vaisseaux sanguins de pénétrer le cartilage tout en laissant passer certains constituants. Elle est le lien entre le cartilage (*via la tidemark*) et l'os sous-chondral (*via la cement line*).

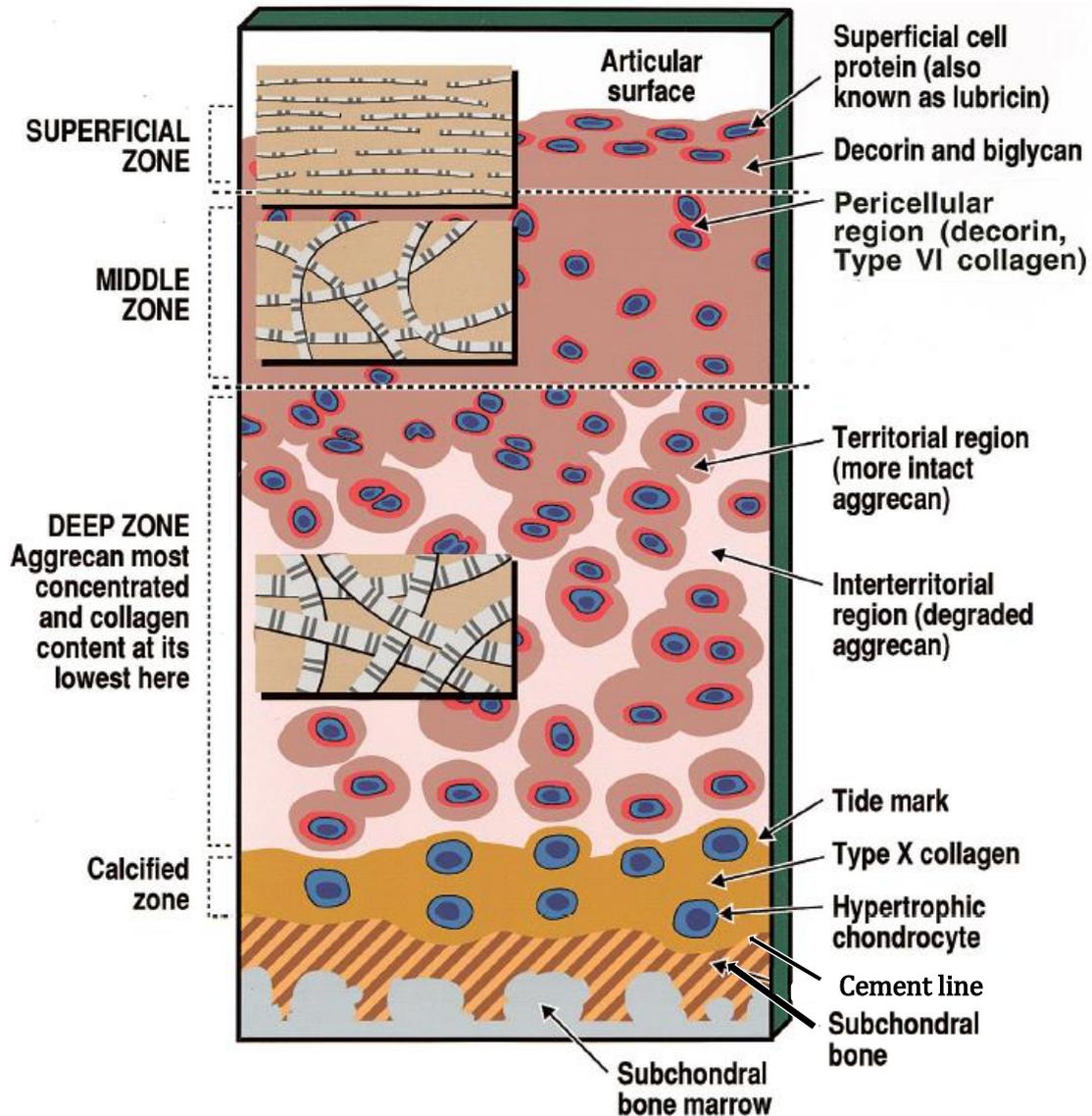


Figure 3 : Schéma de la structure générale du cartilage articulaire humain chez l'adulte. Représentation des zones, des régions et de la relation cartilage / os sous-chondral. Les encarts montrent les diamètres relatifs des macrofibrilles de collagène dans les différentes zones. Poole *et al* (2001) [8].

Au sein de ces 4 zones il existe 3 régions délimitées par rapport aux chondrocytes et leur composition [1]–[3], [7], [8], [12]:

- ✚ **La région péri-cellulaire** : entoure directement le chondrocyte et lui fournit une protection hydrodynamique lors de la compression. Elle est d'une épaisseur d'environ 2  $\mu\text{m}$  chez l'homme. Le chondrocyte forme avec la matrice de cette région, une entité appelée 'chondron'. Les molécules y sont très concentrées. Ce sont des molécules de collagène de

## 1.1 Le cartilage articulaire, un tissu clé de l'articulation du genou

type VI et d'acide hyaluronique attachées aux protéines de la matrice : les protéoglycanes (aggrécanes) et autres protéines non collagéniques (decorine). Le chondrocyte adapte son activité métabolique en fonction de l'information issue de cette région et qui est perçue par les intégrines (protéines de surface membranaire).

✚ **La région territoriale** : elle est juste au-delà de la région péri-cellulaire. Elle est constituée de fibres de collagène de type II dont le diamètre dépend de la profondeur et un grand nombre de molécules de grande taille comme les agrégats de protéoglycanes (riches en sulfate de chondroïtine).

✚ **La région interterritoriale** : c'est la dernière région, la plus éloignée du chondrocyte, dont le volume est le plus important des 3 régions et qui est présente uniquement dans la zone profonde. Elle est composée de collagène de type II dont les fibres ont le plus gros diamètre et d'une forte concentration d'agrégat de protéoglycanes (riches en sulfate de kératane).

Ensemble, ces composants aident à retenir l'eau au sein de la MEC et avec l'orientation des fibres de collagène dans les différentes zones, au maintien de ses propriétés mécaniques. [10]

### b. Composition du cartilage

Le cartilage articulaire est formé d'une matrice extracellulaire (MEC) au sein de laquelle baignent des cellules, les chondrocytes qui occupent 10% du volume. Cette matrice est composée d'une phase liquide à 80% d'eau et d'ions inorganiques (sodium, calcium, chlorure et potassium) et d'une phase solide à 20% de matière organique : collagène, protéoglycanes (PGs) et autres protéines. Elle est également riche en cations qui équilibrent les charges négatives des PGs :

#### L'eau

60% à 80% du poids humide du cartilage hyalin est de l'eau qui circule librement dans le cartilage de l'articulation. Cela contribue à ses propriétés mécaniques (résistance à la compression, lubrification des surfaces) et à la nutrition des chondrocytes par diffusion [1]–[3], [8], [12], [13].

### **Les chondrocytes**

Les chondrocytes varient en nombre et en forme, en fonction de la couche de la plaque cartilagineuse. Il n'y pas de contact cellules-cellules, ils mesurent entre 30 à 40  $\mu\text{m}$  de diamètre, fonctionnent principalement en anaérobie, ne migrent pas et ne se multiplient pas ou peu dans un cartilage normal. Les chondrocytes sont fixés à la MEC et sont responsables de la production, de l'organisation et de la maintenance de la MEC [1]–[3], [7], [9], [12]. Leur activité métabolique varie selon les différentes couches du cartilage. En effet, ils reçoivent des signaux mécaniques et physico-chimiques transmis par la matrice extracellulaire et y répondent en effectuant un équilibre entre les processus anaboliques (synthèse des constituants de la MEC) et cataboliques (dégradation de la MEC) [1]–[3], [7], [9], [10]. Ces processus comprennent la synthèse de protéines matricielles (collagène de type II, protéoglycanes et protéines non collagéniques), de protéases, d'inhibiteurs de protéases, de facteurs de transcription, inflammatoire et de croissance [3], [9]. Afin de réaliser leur métabolisme, les chondrocytes trouvent ce dont ils ont besoin à partir du liquide synovial par diffusion à travers le cartilage : de petites molécules et principalement de glucose.

### **Les collagènes**

Chaque molécule de collagène est composée de trois chaînes  $\alpha$  polypeptidiques dont l'assemblage forme une triple ou super hélice droite, sécrétée par la cellule sous la forme de procollagène. La forme biologique active est le collagène fibrillaire, cela va donc nécessiter plusieurs étapes de maturation post-traductionnelle [1], [8]. Le rôle principal du collagène au sein de la MEC est la résistance à la traction et à la compression [3]. Le cartilage articulaire est composé de plusieurs types de collagène :

- ✚ Le collagène de type II : le plus représentatif de la MEC du cartilage, 80% à 90% du collagène total. Il est celui qui définit l'architecture de base du cartilage. Il est présent dans toute la MEC d'épaisseur et d'orientation des fibres variables [1], [7], [8].

## 1.1 Le cartilage articulaire, un tissu clé de l'articulation du genou

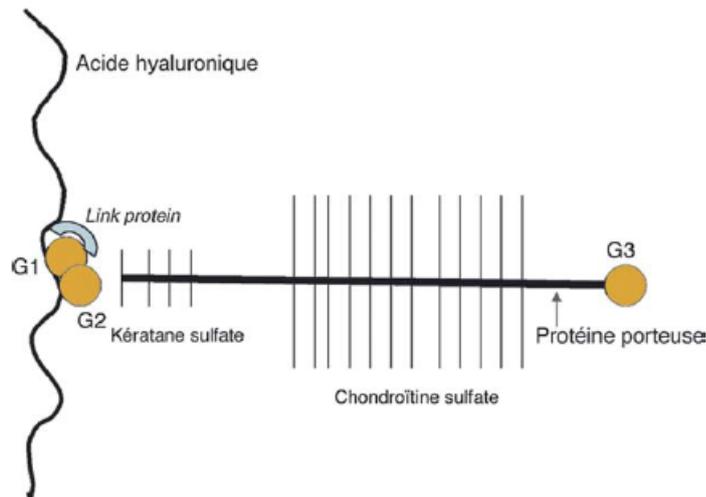
- ✚ Le collagène de type IX : il se lie de manière covalente à l'extérieur des fibres du collagène de type II. Il sert de connecteur entre les différentes fibres et entre les fibres et les protéoglycanes, stabilisant ainsi le réseau collagénique tridimensionnel [1], [7], [8].
- ✚ Le collagène de type XI : il se localise à l'intérieur des fibres de collagène II dont il est indissociable. Il contrôle probablement l'organisation tridimensionnelle et le diamètre des fibres [1], [7], [8].
- ✚ Le collagène microfibrillaire de type VI : il forme des réseaux filamenteux fortement ramifiés et est situé dans la matrice péri-cellulaire. Il participe à l'attachement des chondrocytes sur les macromolécules de la matrice mais ne se lie pas directement au collagène de type II [1], [7], [8].
- ✚ Le collagène de type X : il est présent autour des chondrocytes hypertrophiés de la zone calcifiée du cartilage articulaire. Il est sécrété par les chondrocytes hypertrophiés et aide à l'absorption des chocs [7].
- ✚ Le collagène de type III : il est situé dans une zone peri-cellulaire diffuse autour des chondrocytes [7].

Le collagène de types II, IX et XI sont spécifiques au cartilage et sont réticulés ensemble dans un réseau qui forme le cadre de la matrice extracellulaire en lui donnant sa forme et contribuant à sa résistance [1], [7], [8].

### **Les protéoglycanes**

Les protéoglycanes sont produits par les chondrocytes puis sécrétés dans la matrice. Ils sont constitués : d'une protéine centrale (*'core protein'*) sur laquelle sont liés de manière covalente des glycosaminoglycanes (GAGs). Les GAGs sont des molécules disaccharidiques, dont les deux types principaux du cartilage hyalin sont la chondroïtine sulfate (type 4 et type 6) et la kératine sulfate.

Ces protéoglycane sont ensuite associés à l'acide hyaluronique (un GAG non sulfaté), via la région N-terminale de la protéine centrale, de manière non covalente par des protéines de liaison '*link protein*' qui stabilisent cette chaîne (figure n°4) [1], [3], [7], [8], [10].



**Figure 4: Protéoglycane ou agrégane.** Sur la protéine centrale s'attachent les kératanes sulfates dans la région N-terminale et les chondroïtines sulfates dans la région C-terminale. Il existe des domaines globulaires sur la protéine centrale : G1 et G2 (portion N-terminale) et G3 (portion C-terminale). Le domaine G1 s'attache à une molécule d'acide hyaluronique et cette liaison est stabilisée par une protéine (*link protein*). Chevalier *et al* (2005) [1].

Le protéoglycane le plus retrouvé dans le cartilage hyalin est l'aggrécane, il représente 90% de la masse totale des protéoglycane du cartilage. Ensuite les grands protéoglycane non agrégés représentent un peu moins de 10 % et les petits protéoglycane environ 3 %. L'aggrécane est constitué d'une protéine centrale sur laquelle est fixée environ 100 molécules de chondroïtine sulfate et 30 molécules de kératane sulfate. Plus de 300 molécules d'aggrécane peuvent s'associer à une même molécule d'acide hyaluronique et former ainsi des superaggrégats de poids moléculaire très élevé. Cet assemblage avec l'acide hyaluronique s'effectue sur la face externe de la membrane cytoplasmique des chondrocytes sur laquelle les molécules d'acide hyaluronique sont ancrées via une molécule d'adhésion, le CD44 [1]. Cette relation cellule - matrice extracellulaire, joue un rôle important pour le métabolisme des chondrocytes et le maintien de la matrice extracellulaire [8].

### *1.1 Le cartilage articulaire, un tissu clé de l'articulation du genou*

Les GAGs contiennent au minimum une charge négative sur leur groupement carboxyle ou sulfate, faisant de ces molécules de longues chaînes anioniques, repoussant les molécules négatives et captant les ions positifs de la matrice tel que  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^+$  qui attirent par la suite les molécules d'eau [1]. Cette hydratation des aggrécanes est seulement partielle car le gonflement de ces molécules est limité par le réseau fibrillaire de collagène. C'est ainsi que lors d'une compression, la balance électrique négative, limite l'expulsion d'eau et d'ions positifs et lors d'une relaxation, l'eau et les ions positifs expulsés, sont réintroduits dans le réseau. Cette résistance à la compression est d'autant plus forte dans la couche profonde avec la concentration en aggrécanes qui augmente [1], [3], [7], [9], [10].

#### ***Protéines non-collagéniques***

Les protéines non collagéniques sont aussi appelées 'glue intercollagénique' car elle permet l'assemblage et l'adhésion des molécules entre elles, c'est-à-dire l'adhésion des fibres de collagène entre elles, les liaisons protéoglycane-collagène ou avec les facteurs de croissance et l'interaction des chondrocytes avec la matrice. Parmi ces protéines on retrouve la chondroadhérine (CHAD), l'anchorine CII, les petits protéoglycane riche en leucine (3% de la masse totale des PGs) : la décorine, le biglycane, les perlecanes, etc... et les thrombospondines, en particulier la *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP) [1], [2], [7], [8], [12].

Toutes ces structures sont en interactions les unes avec les autres pour l'homéostasie du cartilage (figure n°5)

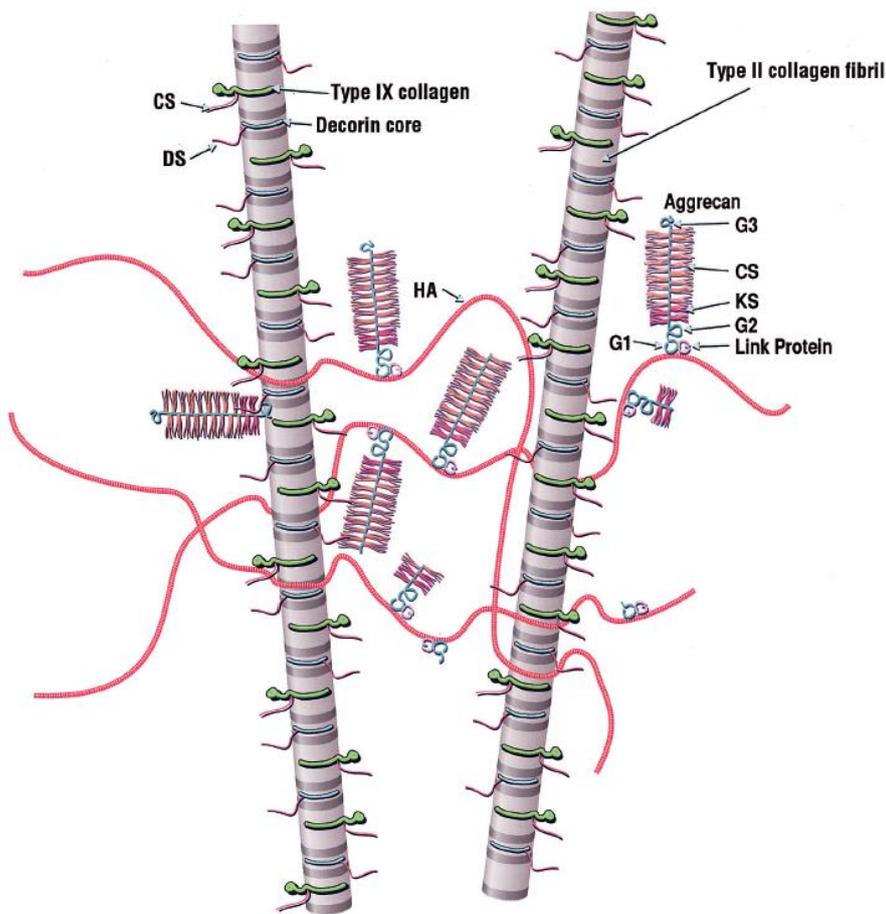


Figure 5 : Représentation schématique du réseau de collagène macrofibrillaire, des agrégats d'aggrécane et de l'acide hyaluronique. Poole *et al* (2001) [8].

### c. Fonction du cartilage

Si on zoome sur la matrice, ses principales fonctions sont [1], [3]:

- ✚ Protéger les chondrocytes des contraintes mécaniques de l'environnement et maintenir leur phénotype
- ✚ Stocker les molécules nécessaires au métabolisme du chondrocyte : certaines cytokines, facteurs de croissance, etc...
- ✚ Déterminer le type de nutriment (sélection par la taille moléculaire), la concentration et la diffusion des nutriments aux chondrocytes

## 1.1 Le cartilage articulaire, un tissu clé de l'articulation du genou

- ✚ Agir comme messenger mécanique et chimique pour les cellules : modification du pH, défaut de transport des nutriments, modifications des liaisons cellules-matrice (grâce aux intégrines)

En prenant le cartilage dans sa globalité, ses fonctions sont de [1]–[3], [9], [12] :

- ✚ Fournir une surface lisse et lubrifiée afin de faciliter le glissement des segments osseux avec un coefficient de friction (frottement) extrêmement faible.
- ✚ Agir comme un amortisseur : il est considéré comme un tissu viscoélastique, grâce à l'hydrophilie des PGs, et déformable, lui apportant sa résistance à la compression.
- ✚ Minimiser les pressions sur l'os sous-chondral en répartissant et en transmettant les charges dans toute l'articulation.

La structure et la composition du cartilage lui assure ses propriétés mécaniques spéciales : sa résistance à la traction (grâce aux collagènes) et la résistance à la compression (grâce aux protéoglycanes : agrécans) permet par les interactions matrice-cellules (grâce aux protéines non collagéniques) [2], [8].

### 1.3. Les ménisques

La particularité de l'articulation du genou est la présence de ménisques au nombre de deux. On parle de pièces complémentaires. Ce sont des tissus fibrocartilagineux en forme de croissant situés entre le tibia et le fémur (un sous chaque condyle), figure n°6, ayant un rôle d'amortisseur, de répartition des charges pour les deux segments osseux et de les stabiliser.

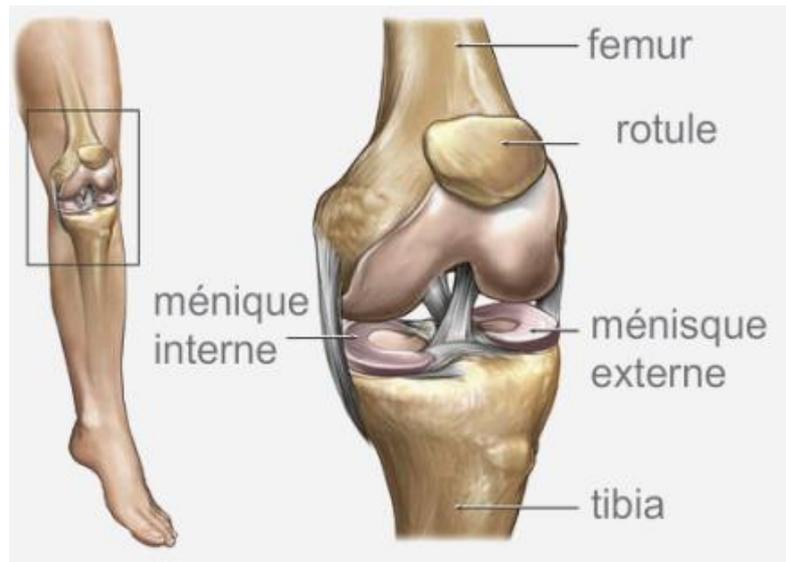


Figure 6 : Représentation des ménisques au sein de l'articulation du genou. [http://www.chirurgie-orthopedique-nice.com/arthrose\\_prothese\\_genou.html](http://www.chirurgie-orthopedique-nice.com/arthrose_prothese_genou.html).

Sains, ils sont blancs, brillants et lisse. L'innervation, la vascularisation, la structure et la composition n'est pas uniforme et dépendent de la localisation. Par exemple, la vascularisation est plus importante sur la face externe qu'interne rendant difficile l'autoréparation de la zone interne. Il est composé de 72% d'eau et de 28% de matière organique : les cellules et la MEC méniscale. La MEC méniscale est divisée en une partie fibrillaire composée principalement de collagène (type I et type II) et non fibrillaire composée principalement de protéoglycanes (PGs).

Sa composition et sa structure font du ménisque un matériau viscoélastique et l'inhomogénéité de sa structure lui confère un comportement mécanique hétérogène et anisotrope [14], [15], avec pour rôles :

- ✚ Répartition des efforts : cisaillement, tension et compression
- ✚ Stabilité du genou par sa forme concave d'un côté (côté fémur) et plat de l'autre (côté tibia)
- ✚ Absorption des chocs et diminution des vibrations grâce à ses propriétés viscoélastiques
- ✚ Limitation du frottement permis par la lubrification, une protéine retrouvée dans le liquide synovial (LS), qui permet le glissement des surfaces articulaires (cartilage/ménisque, cartilage/cartilage) entre elles.

#### **1.4. Le liquide synovial**

Le cartilage articulaire et le ménisque sont en contact avec un liquide au sein de l'articulation nommé liquide synovial (LS), ou synovie, produit par la membrane synoviale. C'est un liquide biologique visqueux, de couleur transparente ou jaune pâle (dans une articulation saine) et présent en très faible quantité.

Le LS est un ultrafiltrat du sérum et est composé à 85% d'eau, d'électrolytes, de protéines de poids moléculaire faible, de glucose, de glycoprotéines (lubricine) et de glycosaminoglycanes (acide hyaluronique) sécrété par les synoviocytes de type B de la membrane synoviale [1], [9], [16]–[18].

Ses fonctions sont de réduire la friction en lubrifiant l'articulation, d'absorber les chocs, de fournir de l'oxygène et des nutriments (glucose et facteurs de croissance) aux chondrocytes du cartilage articulaire et d'éliminer le dioxyde de carbone et les déchets métaboliques [1], [9], [16]–[18].

##### ***a. Composition du liquide synovial***

###### ***Les protéines***

Les protéines du liquide synovial proviennent soit du plasma, soit d'une synthèse locale par les cellules de la membrane synoviale, du cartilage et des ménisques. On retrouve donc au sein du LS les mêmes protéines que dans le sérum mais à des concentrations différentes dû à la perméabilité sélective de la membrane synoviale qui laisse passer les protéines de poids moléculaire faible par diffusion. Ainsi il y a moins d'albumines, moins d'immuno-globulines, moins d'enzymes (phosphatases, aldolases, amino-transférases) et des inhibiteurs de métalloprotéinases [9], [18]. Les protéines issues du plasma sont donc en faible quantité (15 et 20 g/L) et ont un poids moléculaire très faible (moyenne de 67 kDa) [9]. Les protéines ont pour rôle de véhiculer des substances nutritives ou immunitaires, d'équilibrer les pressions osmotiques extracellulaires et intracellulaires. L'absence de grosses protéines telles que la fibrinogène, empêche le LS de coaguler.

### **L'acide hyaluronique**

L'acide hyaluronique (AH) est synthétisé par les synoviocytes de type B de la membrane synoviale. C'est un glycosaminoglycane (GAG) non sulfaté (ou mucopolysaccharide) de haut poids moléculaire (5000 kDa). Il est composé d'une longue chaîne di-saccharidique : acide glycuronique et N-acétylglucosamine, en unités répétées. L'AH est très hydrophile, dans le LS, il n'est pas uni à des protéines comme la plupart des autres GAGs (pour former un protéoglycane) mais il s'associe aux molécules d'eau pour former un gel visqueux. La concentration et le degré de polymérisation de l'AH définissent donc la viscosité du LS. Il est présent à forte concentration (3 g/L) et ne peut pas pénétrer dans le cartilage du fait de son haut poids moléculaire [9], [18]. Son rôle est principalement de lubrification de la surface articulaire [9], [19].

### **La lubricine**

La lubricine est le produit du gène proteoglycan 4 (*Prg4*) exprimé par les synoviocytes de type B de la membrane synoviale. C'est une protéine de poids moléculaire moyen (227 kDa) présente à une concentration de 0.05 à 0.35 g/L. Sa structure chimique lui confère un rôle d'adhésif moléculaire, d'anti-oxydant lipidique et de lubrifiant [9], [19]. La lubricine est aujourd'hui reconnue comme étant un protecteur articulaire majeur.

### **Les lipides**

Les lipides synoviaux sont présents à une concentration très faible pour un mélange de différents lipides (3 g/L) et ont un faible poids moléculaire (0.75 kDa) [9]. Ce sont des triglycérides, du cholestérol ou des phospholipides tansio-actif (SAPL). Dans une articulation saine, les phospholipides s'organiseraient en multicouches planes (3 à 7 bicouches lipidiques empilées sur la surface du cartilage et emprisonnent entre elles le liquide synovial) ou en vésicules lipidiques. Cette organisation structurale serait responsable de leurs propriétés lubrifiantes, qui augmentent avec le nombre de couche. Néanmoins, la structure de ces agrégats lipidiques est très instable et dépend des

### *1.1 Le cartilage articulaire, un tissu clé de l'articulation du genou*

propriétés physico-chimiques du LS (sels, pH, température, pression hydrostatique, pression osmotique, tension en oxygène) [9], [18].

Le liquide synovial contient également des phagocytes (issues de la membrane synoviale) qui éliminent les microorganismes et les débris issus de l'usure normale ou de la déchirure de l'articulation.

#### ***b. Fonctions principales***

##### ***Nutrition***

Le cartilage articulaire étant avascularisé, il n'est pas approvisionné en sang. Le liquide synovial, contient environ 300 éléments/mm<sup>3</sup>, et va donc fournir les molécules nécessaires au métabolisme des chondrocytes. Seules les « petites » molécules peuvent pénétrer le cartilage par simple diffusion, les « grosses » molécules ne peuvent pénétrer que sous l'effet de la compression intermittente qui s'exerce au cours des mouvements. Les macromolécules (comme l'albumine ou les immunoglobulines) ne peuvent pas pénétrer les mailles serrées de la surface cartilagineuse. L'accès des différentes molécules aux chondrocytes au travers de l'espace extracellulaire dépend de leur encombrement stérique mais aussi de leur charge. Le glucose est le principal substrat énergétique du chondrocyte. Il est essentiellement dégradé par la voie de la glycolyse anaérobie puis converti en glucosamine pour la synthèse des protéoglycanes [1], [16], [18], [19].

##### ***Lubrification, limitation des frottements et absorption des chocs***

Le LS possède une grande capacité de lubrification grâce à la combinaison de 3 composants : l'acide hyaluronique, la lubricine et les SAPL. Des études sur la lubricine ont montrées qu'elle permettait au liquide synovial d'absorber de l'énergie de déformation, puis de se déformer et de la dissiper lentement. En effet la lubricine augmente le degré d'entropie d'une molécule d'AH qui la rend plus flexible. La lubrification a un rôle de chondroprotection et de diminution de l'usure prématurée des surface articulaire [19].

Le LS adapte ses propriétés en fonction des contraintes ressenties. En effet, le LS est un liquide non newtonien, il forme un gel avec l'eau, déformable qui se comporte comme un matériau visqueux lors de mouvement à basse fréquence et comme un matériau élastique lors de mouvement à haute fréquence [17], [20], [21]. Ces propriétés physiques particulières sont permises par l'association de l'acide hyaluronique et de la lubricine. Cela permet donc au LS d'amortir les chocs tout en permettant un mouvement quasi sans frottement et ainsi de protéger le cartilage.

### ***Elimination des déchets métaboliques***

Les substances issues du métabolisme sont éliminées du LS par le système lymphatique.

## **1.5. La membrane synoviale**

### ***a. Organisation et structure***

La membrane synoviale est une fine membrane située entre la cavité articulaire et la capsule articulaire. Sur sa face interne, elle s'organise en replis ou franges dans les zones peu soumises aux contraintes mécaniques et à un aspect plus lisse et brillant dans les régions sollicitées. Elle est divisée en deux couches, (figure n°7) [20]–[23] :

- ✚ L'intima ou couche bordante est en contact direct avec la cavité articulaire. C'est une couche continue de 1 à 3 couches de cellules dites synoviocytes (20-40 µm chez l'homme en coupe transversale). Les synoviocytes sont de deux types :
  - Des macrophages dites de type A, en plus grande quantité ayant pour rôle l'élimination des déchets du LS
  - Des fibroblastes dites de type B, impliqués dans l'élaboration du LS, de l'acide hyaluronique (AH) et de la lubricine
- ✚ La sub-intima est en contact avec la capsule articulaire. C'est un tissu conjonctif lâche sous-jacent constitué de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Il est muni d'une MEC composée de

## 1.1 Le cartilage articulaire, un tissu clé de l'articulation du genou

fibre de collagène, de GAGs, de PGs et de glycoprotéines (GPs) contenant quelques fibroblastes (jusqu'à 5mm d'épaisseur chez l'homme en coupe transversale)

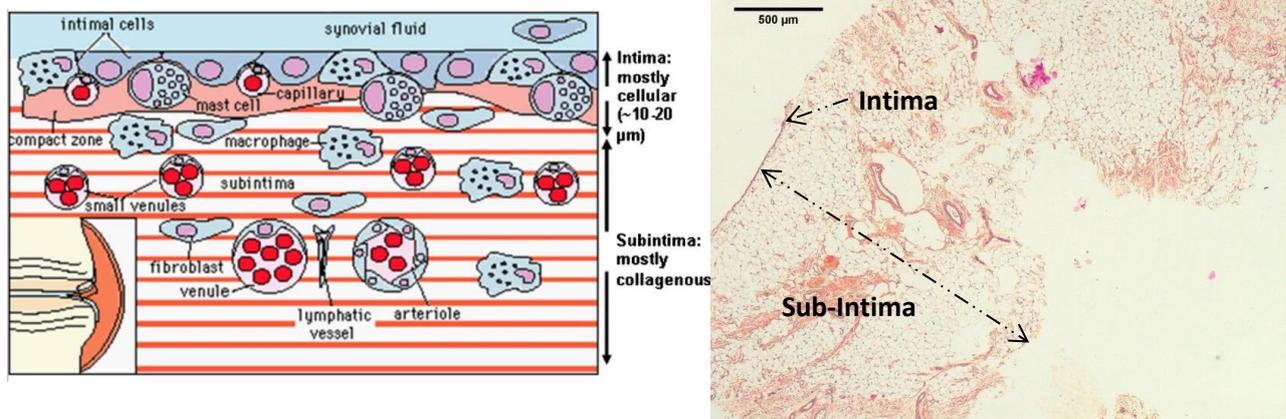


Figure 7 : A – Schématisation de la membrane synoviale. Tiwari et al (2010) [23] ; B- coupe histologique (coloration HES) de la membrane synoviale d'une patte saine de rat NUDE (échelle 500µm).

La membrane synoviale contient des fibres non myélinisées qui suivent les vaisseaux sanguins et pénètrent dans la couche bordante, transmettant les sensations douloureuses.

Il existe trois types de membrane synoviale qui coexistent et classées selon la structure de la couche sous-intimale [20], [21] :

- ✚ Aréolaire, la forme la plus spécialisée, organisée de couche de cellules reposant sur un tissu conjonctif lâche, riche en capillaires, en surface et un tissu plus adipeux en profondeur
- ✚ Adipeuse, organisée avec une couche de cellules synoviales et d'un réseau superficiel de capillaires reposant sur un tissu adipeux abondant
- ✚ Fibreuse, une couche discontinue de cellules synoviales reposant sur un tissu fibreux, fréquente dans les petites articulations des doigts.

Une dernière couche appelée sub-synovial située entre la sub-intima et la capsule articulaire est composée d'une petite quantité de liquide, généralement riche en hyaluronane (AH), qui fournit une surface non-adhérente entre les éléments du tissu.

### ***b. Fonction au sein de l'articulation diarthrose***

La membrane synoviale au sein de l'articulation du genou remplit plusieurs fonctions :

- ✚ Rôle de barrière sélective aux molécules dans l'élaboration du liquide synovial afin de maintenir une stabilité de l'articulation
- ✚ Permettre la nutrition et la lubrification du cartilage
- ✚ Fonction de défense, de cicatrisation et de réponse immunitaire

#### ***Filtre sélectif***

La concentration en biopolymères (GAGs, PGs et GPs) dans l'intima est un facteur régissant la résistance hydraulique et la perméabilité aux macromolécules contrôlant le trafic moléculaire, sous l'effet des pressions hydrostatique et osmotique. En effet, elle permet la rétention des molécules avec un poids moléculaire élevé, comme la lubricine ou l'acide hyaluronique, tout en empêchant les protéines plasmatiques à poids moléculaire élevé d'entrer et de se déposer sur la surface articulaire tandis que l'eau et les petites molécules comme les facteurs de croissance et les cytokines diffusent facilement à travers la membrane. Il existe d'autres systèmes comme dans le cas du glucose qui pénètre grâce à un système de transport actif [20]–[22], [24]. Cela permet de conserver une viscosité et une composition identique au cours du temps.

#### ***Nutrition et lubrification du cartilage***

Les molécules présentes dans le liquide synovial vont permettre de fournir les éléments nécessaires aux chondrocytes pour leur métabolisme, par diffusion au sein du cartilage. Ces molécules, principalement l'AH et la lubricine sont responsables de la viscosité du LS entraînant la lubrification du cartilage et diminuant le frottement. Par ailleurs, la synthèse de lubricine et de l'AH est augmentée par le mouvement articulaire [20], [21].

## 1.1 Le cartilage articulaire, un tissu clé de l'articulation du genou

### **Fonction de défense, de cicatrisation et de réponse immunitaire**

L'acide hyaluronique module la production de fibroblastes et stimule la formation du tissu cicatriciel. Il jouerait un rôle dans le transport de facteurs de croissance dans le tissu néoformé, favorisant ainsi les processus de cicatrisation. Il module également la réponse inflammatoire en diminuant la production de prostaglandine E2 et de radicaux libres et la rétention des monocytes macrophages dans la membrane synoviale. Ces cellules macrophagiques, lorsqu'elles sont activées, sécrètent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL-1) et le *tumor necrosis factor- $\beta$*  (TNF- $\beta$ ) qui vont amplifier la réponse inflammatoire. Dans des conditions normales ces macrophages ont pour rôle l'élimination des débris et des organismes étrangers [20]. Ce rôle de défense contre les agressions extérieures joué par la membrane synoviale lui vaut de pouvoir être considérée comme un organe immunitaire.

## II. Les 'péripiétés' du cartilage au sein de l'articulation

Le cartilage articulaire est le carrefour de l'articulation grâce aux étroites relations qu'il entretient avec l'os sous-chondral, le liquide synovial et la membrane synoviale. De ce point de vue, la préservation de la structure et la bonne santé du cartilage articulaire sont des priorités pour la préservation de la santé de l'articulation elle-même. En effet, il est reconnu que les lésions du cartilage articulaire sont une cause de morbidité due notamment à la douleur et qui entraîne l'immobilisation. Sa structure unique, spécifique, hautement organisée et complexe rend le traitement et la réparation ou la régénération des défauts difficiles et donc un challenge médical majeur avec un impact sociétal important.

### 2.1. Un équilibre physiologique défini par la relation structure / fonction

Les chondrocytes sont les cellules du cartilage qui, en situation physiologique, permettent de maintenir un équilibre dynamique entre la synthèse et la dégradation des protéines de la matrice cartilagineuse. Cette homéostasie est assurée par de nombreux facteurs, dont les contraintes mécaniques et les facteurs de croissance. Ces différents facteurs vont réguler les synthèses chondrocytaires en particulier pour [1] :

- ✚ Les protéines matricielles de structure (collagènes, protéoglycanes, glycoprotéines)
- ✚ Les protéases (métalloprotéases, aggrécinases, cathepsines)
- ✚ Les inhibiteurs de protéases (inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases, activateur du plasminogène).

Le cartilage adulte étant avascularisé, les chondrocytes reçoivent les éléments nécessaires à leur métabolisme directement *via* le liquide synovial ou indirectement *via* la vascularisation de l'os sous-chondral à travers un système de canaux de la plaque corticale.

## 1.2 Les 'péripiétés' du cartilage au sein de l'articulation

### a. La chondrogénèse

La mise en place de la structure du cartilage articulaire durant l'embryogénèse (formation de l'embryon) se fait par étapes : condensation des cellules du mésenchyme, différenciation des cellules chondroprogénitrices, puis migration, prolifération et maturation avant de finir par l'hypertrophie des chondrocytes. Le processus qui transforme les cellules souches en chondrocytes est appelé la chondrogénèse. Au cours de ce processus, les cellules des zones du cartilage sont identifiables morphologiquement et par leur contenu moléculaire [25] :

Tout commence par la condensation des cellules du mésenchyme mésodermique, un tissu conjonctif embryonnaire dérivé de la somatopleure (un des deux feuilletts du mésoblaste), qui donne le tissu conjonctif adulte du cartilage articulaire, de la majorité des os et des muscles. Ces cellules expriment les collagènes de type I, III et V. Dans un deuxième temps, les cellules chondroprogénitrices du mésenchyme mésodermique vont subir une différenciation, elles expriment les collagènes de type II (la forme d'épissage IIa [Col2a1 (IIa)]) et le facteur de transcription Sox9 (principal déterminant au début de la chondrogénèse car il est responsable de la transcription des gènes). La maturation continue jusqu'à obtenir des chondrocytes ronds et qui expriment les collagènes de type II (la forme d'épissage IIb [Col2a1 (IIb)]), IX, et XI, ainsi que le facteur de transcription Sox9 et les aggrécanes de haut poids moléculaire. A ce stade, les chondrocytes s'aplatissent et forment des colonnes parallèles à l'axe de croissance longitudinale des membres. Deux options pour leur devenir : soit 1) les chondrocytes restent des cellules au repos pour former le cartilage articulaire, soit 2) le chondrocytes prolifèrent, rentrent dans un cycle de maturation pour devenir des chondrocytes hypertrophiés qui expriment le collagène de type I, X, ainsi que le facteur de transcription Runx2, les phosphatases alcalines (aide à la formation des cristaux d'hydroxyapatites), VRGF (facteur angiogénique) et les aggrécanes de bas poids moléculaire. La phase finale est l'apoptose des cellules selon un processus appelé ossification endochondrale, où le cartilage hypertrophique est remplacé par l'os. Les chondrocytes en mourant et en se dégradant, laissent une matrice de cartilage résiduelle qui sert alors de matrice pour le dépôt des minéraux et la formation osseuse par invasion des ostéoblastes et

des ostéoclastes. Les cellules de cette zone expriment le collagène de type I, l'ostéocalcine, osteonectine et ostéopontine. Parallèlement, le cartilage dégradé devient vascularisé par les vaisseaux sanguins environnants pour établir la cavité de la moelle osseuse [7], [25]–[27]. Figure n°8 [28].

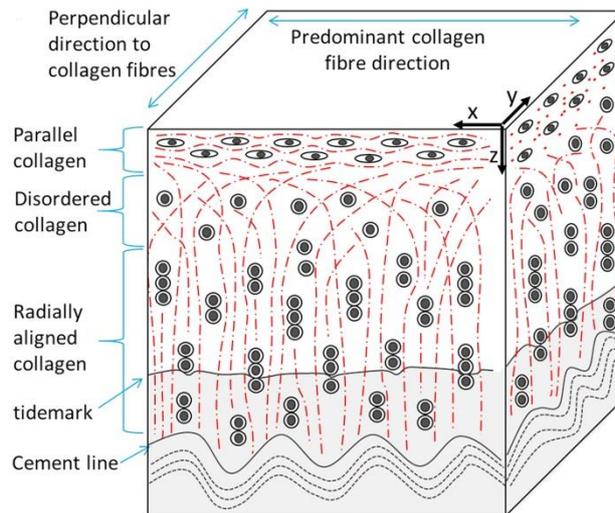


Figure 8: Schématisation de l'organisation des cellules durant la chondrogénèse. Mansfield *et al* (2015) [28].

Les deux facteurs de transcription essentiels sont Sox9 et Runx2 pour la formation du cartilage articulaire et hypertrophié respectivement. Dans un premier temps, Runx2 est soumis à une inhibition directe par Sox9, puis les signaux TGF- $\beta$  et BMP vont réguler la signalisation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par l'activation de Runx2 [26].

Les chondrocytes restés au repos après la différenciation des CSMs dans le cartilage, sont dans un état stationnaire avec un métabolisme faible mais continu permettant de maintenir la synthèse du collagène, des protéoglycanes et autres molécules non collagéniques [7], [26], [27].

On voit ainsi l'intrication du développement du cartilage et de l'os ainsi que leurs liens anatomiques étroits.

### **b. Nutrition du cartilage**

Le cartilage articulaire adulte ne possède ni vaisseaux sanguins, ni vaisseaux lymphatiques ni nerfs, il obtient les molécules dont il a besoin par d'autres moyens.

La nutrition de la couche superficielle du cartilage articulaire est réalisée par le liquide synovial qui va fournir au cartilage l'eau, les nutriments tels que les électrolytes, les petites molécules et le glucose ainsi que l'oxygène. Pour atteindre les chondrocytes, les nutriments du liquide synovial doivent passer à travers un système de double diffusion du à l'organisation du réseau de collagène et de la *lamina splend*a.

La nutrition du cartilage articulaire des couches plus profondes est réalisée à travers la plaque sous-chondrale et par diffusion *via* le cartilage calcifié qui joue un rôle de filtre également.

### **c. La relation cellules - matrice extracellulaire**

Les chondrocytes interagissent avec la matrice environnante *via* des récepteurs membranaires, les intégrines ou l'antigène CD 44. [7], [27] Figure n°9.

- ✚ Les intégrines fonctionnent comme des mécanorécepteurs et sont responsables de la survie cellulaire : un changement de ces intégrines et/ou de l'environnement péri-cellulaire entraîne des modifications cellulaires, dans un premier temps métabolique (effets cataboliques et anaboliques) puis phénotypique.
- ✚ La molécule CD44 permet l'interaction cellules/matrice *via* l'acide hyaluronique (AH) qui est lié avec des agrégats de protéoglycanes de la MEC. Cette interaction améliore également l'adhérence des chondrocytes à la matrice.

Des facteurs de la MEC libérés par les chondrocytes suite à divers stimuli peuvent avoir un effet positif ou négatif pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Par exemples, les cytokines peuvent se lier aux récepteurs de la membrane cellulaire et stimuler les effets cataboliques et/ou anaboliques. Ils peuvent également améliorer et/ou retarder la division des chondrocytes et agir sur la synthèse

et/ou la dégradation de la matrice (production et activation d'enzymes protéolytiques, telles que les collagénases et protéoglycanases [7].

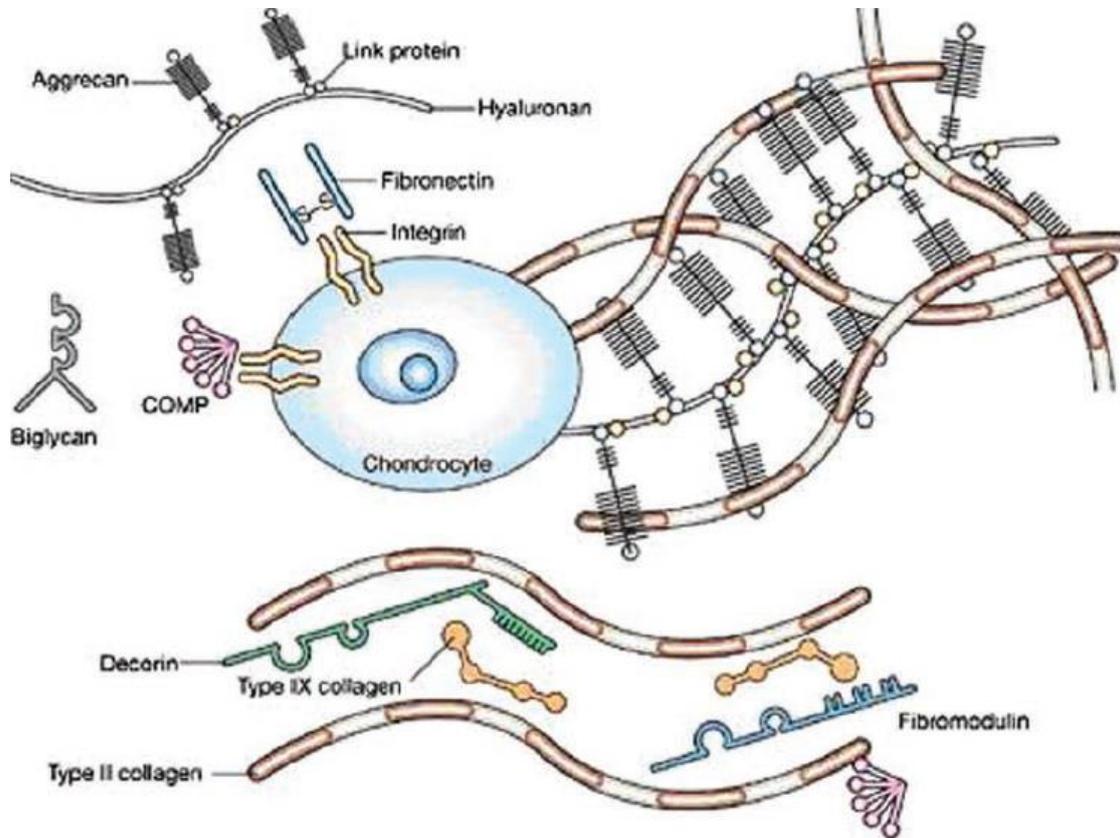


Figure 9 : Schématisation de la relation entre la cellule et la matrice extracellulaire du cartilage : collagènes, protéoglycanes et molécules non collagéniques. Fox *et al* (2009) [2].

#### d. Influence des contraintes mécaniques sur le métabolisme

Le cartilage articulaire possède des propriétés mécaniques particulières lui permettant de répondre aux contraintes mécaniques de son environnement. En effet il s'agit d'un tissu viscoélastique : ses propriétés dépendent du temps lorsqu'il est soumis à une charge ou une déformation constante. Ces propriétés sont également anisotropes : elles varient avec la distance par rapport à la surface du tissu et avec le site sur l'articulation [2], [29]. Ses propriétés vis-a-vis des contraintes mécaniques sont à relier à son organisation spatiale en trois phases:

- ✚ Une phase solide, composée d'un réseau dense de fibres de collagène et une concentration élevée d'agrégats de protéoglycanes ;
- ✚ Une phase fluide aqueuse ;

## 1.2 Les 'péripiétés' du cartilage au sein de l'articulation

- ✚ Une phase ionique avec des électrolytes dissous dans l'eau qui permettent de neutraliser la charge de la matrice solide (liée à la charge négative des protéoglycanes)

Les contraintes physiologiques de l'articulation sont comprises entre 3 et 10 MPa avec une déformation de l'ordre de 15 à 20%. De plus, les contraintes sont dites dynamiques : chez l'homme, la cadence de marche est généralement de 1 Hz. La charge n'est pas uniforme sur toute la surface du cartilage, il existe un gradient de contrainte et de pression. Certains facteurs font varier ces valeurs de contraintes au sein de l'articulation comme l'âge, le sexe ou les maladies [27], [29]–[31].

### ***La mécanotransduction ou mécanorégulation***

Les événements mécano-électrochimiques détectés par les chondrocytes à travers la matrice sont la compression, la pression hydrodynamique / osmotique, l'écoulement du fluide (cisaillement), l'écoulement d'ions (courant électrique) comme illustrés sur la figure n°10. Ces événements influencent la réponse des chondrocytes. C'est ce que l'on appelle la mécanotransduction [7], [10], [25], [27], les mécanismes précis par lesquels cela est produit dans le cartilage ne sont pas encore bien élucidés. La mécanotransduction se traduit par une régulation à la hausse et/ou à la baisse de processus intracellulaires tels que l'activation de facteurs de transcription ou la régulation de gènes qui entraînent l'apoptose ou la différenciation. Pour détecter les signaux mécaniques, il existe des mécanorécepteurs à la surface des chondrocytes. Les mécanorécepteurs chondrocytaires comprennent les canaux ioniques activés par étirement, le récepteur à l'AH : CD44, l'annexine V (un récepteur du collagène de type II) et les intégrines (dont il existe plusieurs types sur les chondrocytes). Par exemple, on a pu observer que les intégrines sont réceptives aux signaux autocrines et paracrines tels que les facteurs de croissance de la famille TGF- $\beta$ . Il a été démontré que les chondrocytes sécrètent du TGF- $\beta$  et régulent à la hausse les récepteurs du TGF- $\beta$  en réponse à une stimulation mécanique [32].

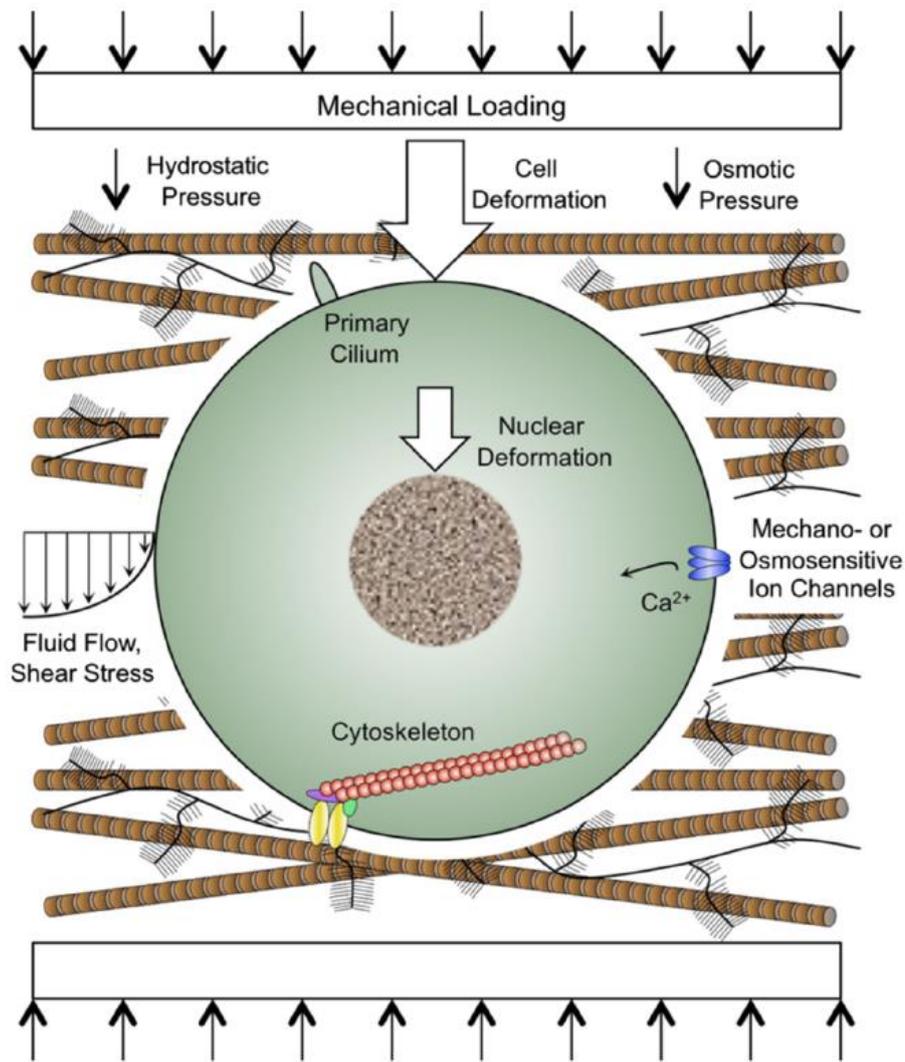


Figure 10 : Schématisation de la relation entre la cellule et son environnement mécanique. La charge articulaire y compris la pression osmotique et hydrostatique et l'écoulement des fluides, produit des tensions tissulaires complexes, qui conduisent à la déformation nucléaire et génère des facteurs biophysiques indirects. Les transducteurs de signaux mécaniques dans les chondrocytes et les CSMs comprennent les canaux ioniques, le cil primaire, le noyau et le cytosquelette. O'connor *et al* (2013) [33].

En plus de ces récepteurs membranaires, il a été mis en évidence l'existence de cils primaires chondrocytaires comme mécanorécepteurs [33]. Ces cils font  $8\mu\text{m}$  et ont montré des intégrines sur leur surface, permettant une liaison directe avec les fibres de collagènes dans la matrice péri-cellulaire. Egalement, la compression du tissu pendant la phase de chargement (marche, course, etc..) pourrait entraîner une déformation du cil.

## 1.2 Les 'péripiétés' du cartilage au sein de l'articulation

### **Rôle des contraintes mécaniques**

Le plus important est le maintien de la qualité de la matrice : L'équilibre entre les processus anaboliques et cataboliques est fortement influencé par le type de contrainte que le cartilage va subir [34].

Le deuxième est un effet chondroprotecteur : les conditions de charge dans une gamme physiologique vont bloquer la production de médiateurs cataboliques (iNOS, COX-2, NO, PGE2) induites par les cytokines inflammatoires (IL-1) et restaurer les processus anaboliques [34].

Le dernier est structural : l'épaisseur du cartilage est dépendant de la charge mécanique. Il est plus épais dans les régions subissant des grandes pressions et plus fin dans les zones subissant des forces de traction. Les mécanismes d'activation des chondrocytes en réponse à la stimulation mécanique impliquent des voies de signalisation qui sont spécifiques aux types de contraintes [34], [35].

#### **e. Le stress au sein du cartilage**

Le cartilage est soumis à deux principaux stress qui agissent sur l'équilibre structural du cartilage [25] :

- ✚ Le stress mécanique : la détection de forces mécaniques par les chondrocytes conduit à de profonds changements de la physiologie des tissus articulaires. Cependant, une charge mécanique dynamique et modérée est nécessaire pour l'homéostasie normale du cartilage. En effet le chargement statique d'explants de cartilage en culture conduit à la suppression du métabolisme des chondrocytes par une réduction de la synthèse des agrécanes et du collagène. Un chargement dynamique (c'est-à-dire oscillatoire) à la fréquence articulaire a un effet anabolique. En fonction de la fréquence, de la durée et de l'ampleur, les réponses cellulaires sont soit cataboliques soit anaboliques. L'absence totale de charge à des effets cataboliques et une diminution de la MEC du cartilage est observée.

- ✚ Le stress hypoxique: l'oxygène est nécessaire au métabolisme cellulaire normal et une carence en oxygène conditionne la fonction chondrocytaire. Par exemple, dans les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) et les chondrocytes, l'environnement hypoxique inhibe la prolifération, mais augmente la production d'ECM grâce au gène codant HIF-1 $\alpha$ .

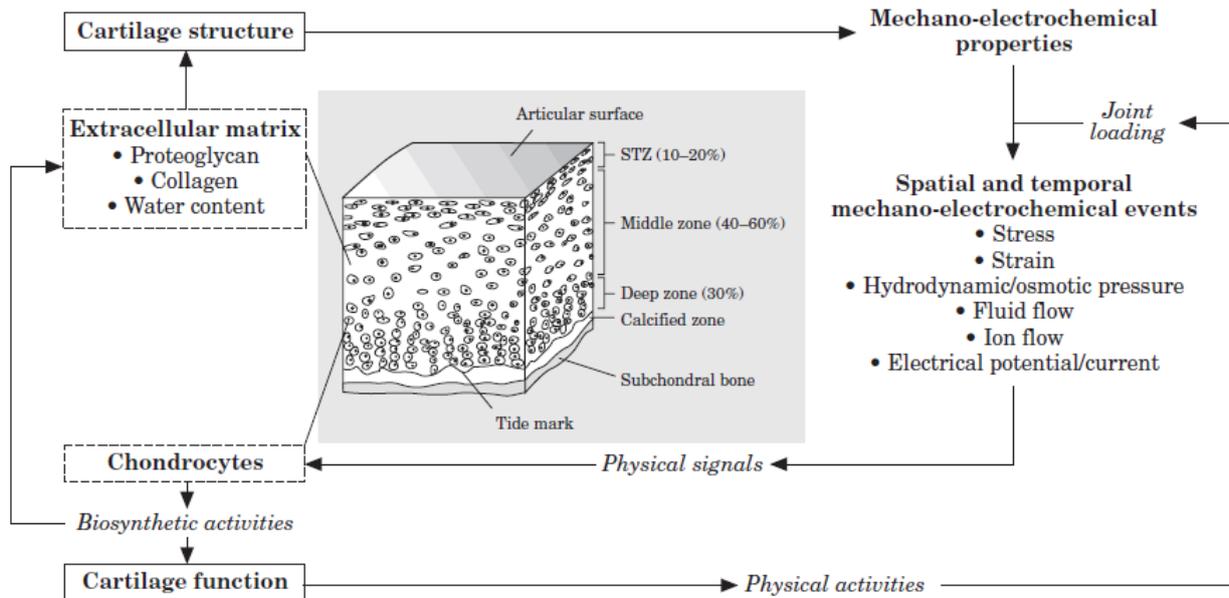


Figure 11 : Illustration de l'interaction entre la composition de la MEC, Les signaux de la MEC, l'activité biosynthétique des chondrocytes et les contraintes mécaniques. Mow et al (1999) [31].

Le cartilage subit des stress «normaux» qui sont nécessaires à son équilibre et des stress dit « pathologique » : fracture, ossification hétérotopique (présence d'un tissu dans un endroit où il ne devrait pas se trouver normalement), facteurs environnementaux comme les métaux lourds et la fumée de cigarette. Ces stress pathologiques vont influencer les chondrocytes à synthétiser des molécules qui vont déséquilibrer sa structure du aux molécules chimiques (métaux lourd, fumée de cigarette, etc..) ou aux contraintes anormales (fracture, ossification anormale, etc...).

## 2.2. Un équilibre perturbé par l'environnement

Les défauts cartilagineux entraînent un déséquilibre de l'articulation. Ce déséquilibre est le résultat des réponses aux contraintes subies par les chondrocytes. Il existe plusieurs facteurs de déséquilibre de l'environnement du cartilage: les traumatismes articulaires, le vieillissement, la dégradation d'un

## 1.2 Les 'péripathies' du cartilage au sein de l'articulation

autre tissu de l'articulation, des facteurs environnementaux anormaux et les maladies articulaires comme l'ostéochondrite disséquante. Il peut en résulter un amincissement du cartilage, une fibrillation ou fissuration pouvant aller jusqu'à sa disparition, on parle d'érosion du cartilage.

### a. Le vieillissement

Les composants principaux du cartilage lui confèrent une protection contre le vieillissement physiologique (on parle de sénescence). En effet :

- ✚ L'absence de vascularisation, limite l'effet des facteurs extérieurs nuisibles sur la matrice du cartilage
- ✚ L'absence de prolifération des chondrocytes à l'âge adulte, signifie qu'il n'y a pas d'épuisement cellulaire et donc pas d'apoptose
- ✚ Un renouvellement très lent de la matrice car ses constituants, le collagène de type II et les GAGs, ont une demi-vie autour de 100 ans. Par conséquent, le chondrocyte ne s'épuise pas à synthétiser de la matière.

Cependant, les chondrocytes sont régulés par différents facteurs de croissance (FGFb, TGF- $\beta$ , IGF-1) et contraintes mécaniques. Un déséquilibre de ces facteurs pourrait réenclencher le processus de maturation du chondrocyte, c'est à dire la prolifération puis la mort par apoptose.

Si on regarde de plus près le cartilage d'individus âgés, on observe des :

- ✚ Modifications macroscopiques: le cartilage prend une couleur jaunâtre avec l'âge, devient moins brillant et perd en déformabilité, témoin d'une augmentation de rigidité. Au-delà de 60 ans, la présence d'érosion du cartilage de la rotule est quasi constante (> 80 %) et le plus souvent asymptomatique [1], [2], [10], [13].
- ✚ Modifications histologiques: le cartilage sénescence présente une perte de régularité dans l'organisation spatiale des fibres de collagène, une zone calcifiée amincie et des irrégularités

au niveau de la ligne cémentante avec des invaginations plus importante de la plaque sous-chondrale [5] ainsi qu'une diminution du nombre de chondrocytes (jusqu'à 50%) en particulier dans les zones profondes [1], [2], [8], [13]. Les différents auteurs ne sont pas d'accord sur le fait qu'une diminution de l'épaisseur du cartilage soit une caractéristique des individus âgés.

✚ Modifications biochimiques [4]–[6], [13], [39]:

- Protéoglycanes (PGs): leurs taux de synthèse sont modifiés avec une augmentation de la synthèse des sulfates de kératanes et une diminution de la synthèse des chondroïtines sulfate. La population d'aggrécanes devient donc hétérogène (la taille et le nombre de PGs n'est plus le même) entraînant une baisse de l'hydrophilie des protéoglycanes, modifiant les propriétés poroélastiques du cartilage.
- Acide hyaluronique : le poids moléculaire de l'AH devient plus bas entraînant une liaison moins résistante avec le chondrocyte. Le taux de ramification des aggrécanes devient moins important entraînant une protéolyse augmentée.
- Eau : la teneur en eau est diminuée [3], [10], [13].
- Fibres de collagènes : le réseau de collagène subit des remaniements importants avec l'âge. Les collagénases sont plus présentes et contribuent à la fibrillation et à l'érosion de la MEC.

✚ Modification du *turn-over* de la MEC: on observe une diminution de l'anabolisme de la matrice associée à une augmentation du catabolisme dans les zones macroscopiquement anormales du cartilage sénescant. À l'inverse, au sein des zones de cartilage macroscopiquement « normal », le *turn-over* de la matrice n'est pas modifié significativement [4]–[7], [9], [11], [13], [40].

En raison de ces modifications liées à l'âge, la réparation du cartilage diminue au-delà de l'âge de 50 ans [1], [2], ainsi:

## 1.2 Les 'péripiétés' du cartilage au sein de l'articulation

- En cas de fracture, le risque d'évolution vers l'arthrose est multiplié par 3 ;
- Les contraintes mécaniques ont moins d'impact sur la synthèse des GAGs, il y en a donc un nombre plus faible entraînant une MEC de moins bonne qualité;
- On observe un changement de concentration à la fois de collagène et de GAGs avec des pontages anormaux qui apparaissent entre les protéines (principalement entre les fibres de collagènes), ainsi qu'une minéralisation de la MEC. Ces changements modifient les propriétés mécaniques du cartilage en le rendant plus rigide et donc plus fragile/cassant [13], [36] ;
- Les cytokines pro-inflammatoires stimulent la production de métalloprotéases des chondrocytes sénescents augmentant à leur tour le taux de dégradation des fibres de collagènes [1], [7], [13], [36] ;
- La réponse des chondrocytes aux facteurs de croissance baisse, notamment au TGF- $\beta$  et à l'IGF-1 [13] ;
- L'apoptose chondrocytaire augmente due au vieillissement physiologique cellulaire [1], [13].

Au sein de l'articulation d'individus âgés, le vieillissement des tissus articulaires autres que le cartilage se produit également, modifiant tout l'équilibre de l'articulation : perte de la trophicité musculaire (sarcopénie), modifications biochimiques et structurales des ligaments croisés, calcification des ménisques et augmentation de densité de l'os sous-chondral [37].

En résumé, les changements majeurs dus à l'âge sont : une épaisseur réduite du cartilage, une réduction de la densité cellulaire, une protéolyse augmentée et une synthèse réduite des constituants de la matrice, un changement dans la structure des GAGs et du collagène de type II entraînant une augmentation de la rigidité. Les changements extracellulaires (MEC) et cellulaires (chondrocytes) se combinent, conduisant à un dysfonctionnement biomécanique et une destruction du tissu [13]. Cependant, il existe des variations dans le niveau de dégradation du cartilage liée à

l'âge résultant à des symptômes plus ou moins handicapants pour l'individu [10]. De plus, les signes du vieillissement ressemblent aux signes que l'on retrouve chez les individus atteints d'arthrose mais pour autant, la vieillesse (senescence) n'entraîne pas forcément la pathologie de l'arthrose. Il y a donc d'autres facteurs responsables des maladies articulaires que le vieillissement tissulaire et la dégénérescence du cartilage[1].

### ***b. Facteurs de dégradation du cartilage***

Il existe dans l'environnement des facteurs qui naturellement vont modifier l'équilibre osmotique du cartilage :

#### ***Traumatisme :***

Un traumatisme articulaire peut être caractérisé soit par un impact soudain, rapide et lourd sur la surface de l'articulation soit par une charge répétitive. Ces traumatismes peuvent créer des dommages directs ou indirects aux chondrocytes, en provoquant la dégénérescence puis la mort cellulaire. Une perturbation de la matrice de collagène est également observée conduisant à une hydratation accrue, une fissuration du cartilage et un épaississement de l'os sous-chondral. L'impact n'est pas forcément visible macroscopiquement [3].

#### ***Mauvais alignement de l'articulation :***

Un mauvais alignement entraîne une charge anormale de l'articulation avec des contraintes locales excessives sur le cartilage menant à une dégénérescence précoce [3].

#### ***Osteochondrite disséquante :***

L'osteochondrite disséquante (OCD) correspond à un fragment d'os sous-chondral non ossifié surmonté de cartilage qui se détache chez des individus de moins de 25 ans généralement, soit suite à un traumatisme mineur soit de manière spontanée. Il en résulte un défaut ostéocartilagineux dans des sites spécifiques. Le fragment se retrouve alors libre dans l'articulation où il crée un environnement inflammatoire. Cela se caractérise par un gonflement de l'articulation accompagné

## 1.2 Les 'péripathies' du cartilage au sein de l'articulation

de douleur lors d'activité physique. La douleur va entraîner une diminution de la mobilité lors de la progression de la pathologie.

### Maladies principales :

- ✚ L'arthrite est une maladie inflammatoire qui touche plusieurs articulations simultanément dont elle détruit petit à petit les tissus par les facteurs inflammatoires. C'est une maladie douloureuse surtout au repos. La déformation est dite chaude car la déformation s'accompagne de signes physiques.
- ✚ L'arthrose est qualifiée de mécanique ou inflammatoire suite à l'étude de la cause et des facteurs déclenchant la maladie. Initialement, le cartilage s'amincit et l'os sous-chondral se densifie, puis le cartilage articulaire s'abîme peu à peu jusqu'à disparaître laissant les os à l'air libre créant des lésions osseuses par frottement. C'est une maladie extrêmement douloureuse lorsque l'articulation n'a pas été en mouvement durant un laps de temps. La déformation est dite froide car la dégradation ne s'accompagne pas de signes physiques.

En résumé : Il est difficile de faire la différence entre vieillesse et arthrose. Les signes qui aident à faire la différence sont résumés dans le tableau ci-dessous :

<b>cartilage sénescence (vieillesse)</b>	<b>Cartilage arthrosique</b>
Diminution de l'hydratation	Augmentation de l'hydratation
Concentration des protéoglycanes inchangée	Concentration des protéoglycanes diminuée
Concentration en collagène de type II inchangée	Concentration en collagène de type II augmentée
Prolifération des chondrocytes inchangée ou diminuée	Prolifération des chondrocytes augmentée
Activité métabolique inchangée	Activité métabolique augmentée
Os sous-chondral normal	Os sous-chondral épaissi
Viscosité du LS diminuée : concentration en acide hyaluronique diminuée	Viscosité du LS diminuée : poids moléculaire de l'acide hyaluronique diminué
Concentration en protéines et en cellules du LS inchangée	Concentration en protéines et cellules plus élevée : présence de cytokines pro-inflammatoires, d'enzymes cataboliques et de protéines à haut poids moléculaire du sang

Tableau 1: Composition et activité au sein du cartilage, de l'os sous-chondral et du liquide synovial dans le cas de la vieillesse (à gauche) ou de l'arthrose (à droite).

La figure n°12 illustre l'aspect histologique d'un cartilage sain jeune, sain âgé et arthrosique.

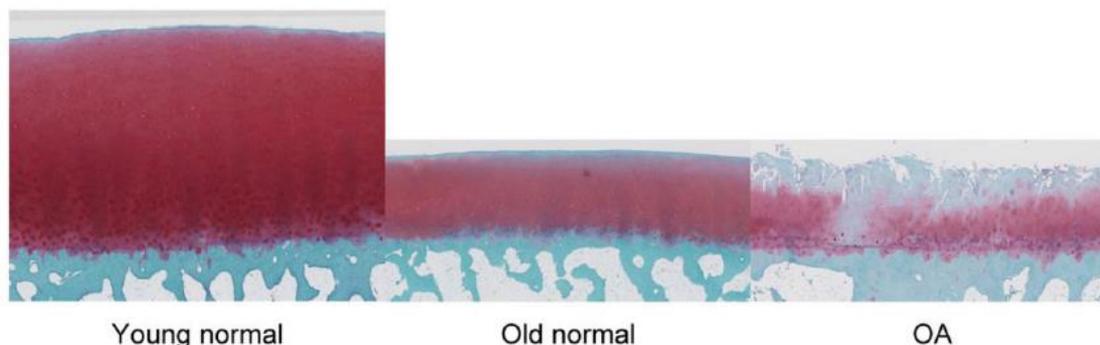


Figure 12 : Coupe histologique du condyle fémoral humain - Coloration Safranine O. A gauche, d'une personne jeune de 40 ans, au centre, d'une personne âgée de 76 ans et à droite, d'une personne atteinte d'arthrose âgée de 88 ans. Chez le donneur âgé, on observe une réduction de la hauteur du tissu et une réduction de l'intensité de la couleur mais pas de défaut structural à la surface. Chez le donneur atteint d'arthrose, on observe une perte de la zone superficielle et une partie de la zone intermédiaire, une fibrillation jusque dans les zones profondes. Image prise au microscope x2.5. Lotz *et al* (2012) [13].

### 2.3. La réparation et/ou la régénération du défaut cartilagineux

Suite aux lésions du cartilage, le processus de chondrogenèse, se caractérisant par le recrutement des cellules progénitrices, la différenciation chondrogénique, la prolifération, la maturation et l'hypertrophie des chondrocytes, est réinitié sur le site de la lésion.

On distingue deux types de lésions : le traumatisme qui n'endommage pas les cellules permettant la restauration du cartilage, et la destruction mécanique de la matrice et des cellules, dont la réparation dépend de plusieurs facteurs.

Il est important de faire la différence entre la réparation et la régénération du cartilage. La réparation est la restauration d'une surface articulaire endommagée avec un tissu néo-cartilagineux, qui ressemble au cartilage natif, mais ne duplique pas nécessairement sa structure, sa composition et sa fonction. La régénération est la formation de tissu, indiscernable du cartilage articulaire natif [3], [38].

Bien que le cartilage soit avascularisé, la réparation est possible dans certains cas mais dans la majorité des cas le cartilage néoformé est de nature fibreuse et de mauvaise qualité.

## 1.2 Les 'péripiétés' du cartilage au sein de l'articulation

Dans le cas du vieillissement de l'articulation qui aboutit à l'arthrose, la pose de prothèse, à l'heure d'aujourd'hui, est la seule méthode durable qui fournit une bonne qualité de vie. Cependant la durée de vie de celle-ci étant courte, les candidats idéaux sont des personnes âgées de plus de 60 ans [3]. Il est donc nécessaire de trouver des techniques permettant de repousser l'intervention au maximum [29].

### a. Les différents types de défauts cartilagineux

Les défauts sont caractérisés par deux paramètres :

- ✚ La profondeur: qui divise les défauts en deux catégories :
  - Le défaut chondral : Il ne touche pas l'os sous-chondral : il manque soit toute la surface du cartilage jusqu'à l'os sous-chondral soit une épaisseur partielle du cartilage. Ces défauts ne se réparent pas spontanément.
  - Le défaut ostéochondral : il est constitué d'un défaut de cartilage d'épaisseur totale et d'une partie de l'os sous-chondral sous-jacent. La réparation de ces défauts conduit à la formation d'un cartilage de type fibrocartilage[3], [39]. Ces défauts se réparent spontanément.
- ✚ La surface : C'est un facteur important lors de la réponse pour la réparation. En effet, la réparation du cartilage articulaire dépend des étendues de la lésion, qui sont mesurées par le volume et la surface. De plus, les défauts de petite taille, 1mm de diamètre, sont moins susceptibles d'affecter la répartition des contraintes sur l'os sous-chondral, et progressent très lentement [3]. Alors que des défauts articulaires plus grands que 2- 4 mm de diamètre guérissent rarement même avec un mouvement passif [39].

En général, la profondeur de la blessure est liée à l'âge. Enfants et adolescents développent des lésions ostéochondrales, alors que les adultes développent des lésions chondrales, peut-être à cause de la zone calcifiée qui serait bien développée [3] ou à cause de la lésion (arthrose pour les adultes et OCD pour les enfants).

Comme vu précédemment, dans le cas des blessures ostéochondrales, la guérison spontanée est possible. Le défaut atteint la moelle osseuse de l'os sous chondral et le passage des cellules et des molécules bioactives nécessaires à la réparation peuvent coloniser le défaut et le réparer [40].

La réparation se passe en 3 phases [12]: dans un premier temps, le sang s'échappe des vaisseaux sanguins endommagés, formant un hématome, et par la suite un caillot. Au sein de ce caillot se trouve divers facteurs de croissance et cytokines, induisant la migration, la prolifération et la différenciation des cellules souches multipotentes de la zone. La deuxième phase est la phase inflammatoire : la perméabilité de la paroi vasculaire augmente entraînant la formation d'un réseau de fibrine dense, qui contient les cellules inflammatoires et multipotentes. La concentration en acide hyaluronique augmente également dans le liquide synovial [7]. La dernière phase est le remodelage, elle est la phase la plus longue. Le tissu fibrineux mûrit et se contracte, pour créer une cicatrice.

Pour une bonne guérison, plusieurs facteurs sont à prendre en compte : poids et activité physique, morphologie des membres, stabilité de l'articulation, l'avancement du traumatisme ou de la maladie et l'âge.

### ***b. Activité sportive et bonne santé du cartilage***

La prévention des défauts cartilagineux passe par la pratique d'un sport régulier de manière non traumatisante pour l'articulation. En effet, le mouvement et les contraintes mécaniques assurent la fonctionnalité du cartilage en maintenant son métabolisme cellulaire et son comportement mécanique. Les contraintes mécaniques physiologiques sont chondroprotectrices : elles augmentent la synthèse et la concentration des PGs et des GAGs et augmentent l'épaisseur du cartilage. Une autre conséquence est l'hydratation de la matrice extracellulaire, conférant au cartilage une grande résistance mécanique et par conséquent une plus grande résistance à la déformation. Ces mécanismes réduisent le risque de dégradation du cartilage quand il est soumis à une forte demande mécanique [7], [10]. L'immobilisation est donc un facteur aggravant des lésions du cartilage car elle

## 1.2 Les 'péripiétés' du cartilage au sein de l'articulation

entraîne la perte des composants de la MEC et donc une résistance à la déformation de mauvaise qualité.

### c. *Lubrification / injection de viscosupplément*

L'injection d'acide hyaluronique (AH) de poids moléculaire variable dans l'articulation est utilisée afin de soulager les symptômes dus à la dégénérescence de l'articulation [41]. Son utilisation associée à d'autres méthodes comme l'autogreffe ostéocondrale donne des résultats positifs. Corvelli *et al* [42] montrent que l'AH est capable de diminuer le coefficient de frottement autant que le liquide synovial. Cependant l'efficacité clinique dépend des individus : la tribologie articulaire ne dépend pas que d'une molécule mais bien de l'interaction entre les différents acteurs moléculaires qui agissent au bon endroit et au bon moment [9].

### d. *Stimulation de la moelle osseuse*

Il est conseillé avant toute intervention de stimulation de réaliser un lavage afin d'éliminer les cytokines, les *tumor necrosis factor- $\beta$*  et les métalloprotéases de l'articulation ainsi que les produits de dégradation, les débris cartilagineux et les cristaux irritant la membrane synoviale.

Sur le principe, la stimulation de la moelle osseuse conduit à la formation d'un «super caillot» ou d'un caillot de fibrine à la surface d'un défaut chondral. Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse migrent dans le super caillot qui sert de biomatériau afin de mettre en place le processus de chondrogénèse et de fabrication de la MEC. Le fibrocartilage obtenu est constitué de collagène de type II très fragile [3], [38], [41], [43].

### **Microfracture**

C'est la méthode la plus courante pour le défaut chondral. La procédure consiste à la création de bords perpendiculaires stables du cartilage sain autour du défaut puis de plusieurs trous pénétrant dans la plaque sous-chondrale, espacés de 3-4 mm (figure n°13). La zone à traiter doit être comprise entre 2 et 4 cm<sup>2</sup>. Cette technique est populaire parmi les sportifs et une étude réalisée sur 7 ans

montre que les résultats sont mieux chez les individus ayant moins de 35 ans. La surface néo-cartilagineuse est cependant biomécaniquement inférieure et moins durable que le cartilage hyalin natif [3], [38], [41], [43].

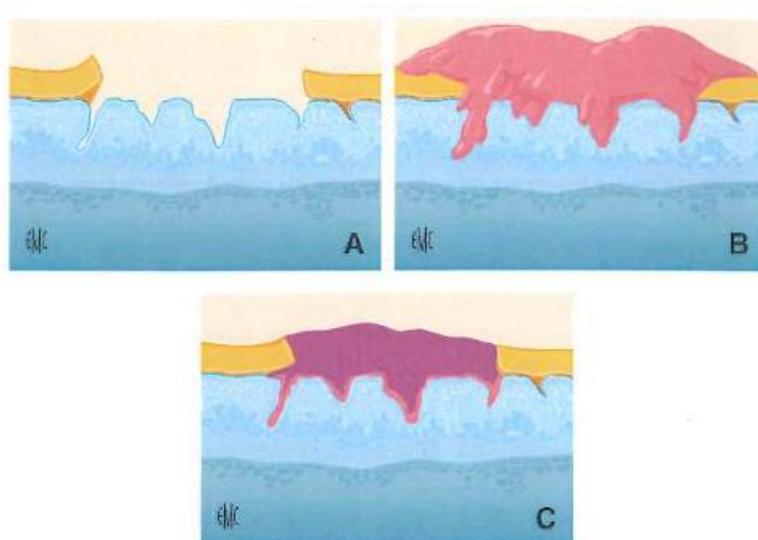


Figure 13 : Schématisation de la réparation par microfracture. A: la lésion est régularisée avec des perforations multiples dans l'os, B: formation d'un caillot sanguin, C transformation du caillot en fibrocartilage. Versier *et al* (2014) [43].

### ***Débridement articulaire et forage***

Cette technique consiste en un forage de l'os sous-chondral, après une élimination soignée de tous les morceaux de cartilage [3], [38], [41], [43].

### ***Spongialisation***

Une excision du cartilage endommagé avec l'os sous-chondral impliqué jusqu'à la partie spongieuse est réalisée. Cette technique présente 79% de bons résultats avec les défauts du cartilage de la patella [3].

### ***e. Réalisation de greffes***

#### ***Mosaïcoplastie***

Ce traitement est utilisé pour traiter aussi bien un défaut chondral qu'ostéochondral. Elle est la technique de référence en France : des greffons ostéochondraux cylindriques sont récoltés dans la

## 1.2 Les 'péripiétés' du cartilage au sein de l'articulation

zone non portante de l'articulation du genou. Ces greffons sont ensuite utilisés pour remplir le défaut (espacement de 1mm entre chaque greffon) afin de créer une «mosaïque» (figure n°14). Ces greffons fournissent une surface portante stable et ferme. Les espaces entre les greffons sont remplis par du fibrocartilage [3], [38], [41], [43], [44]. Cependant, de nombreux auteurs ont décrit ces espaces en tant qu'«espaces morts» qui diminuent la stabilité des greffons. De plus il y a un problème avec la morbidité du site donneur. Hangody *et al* [45] recommande pour éviter la morbidité du site donneur, de limiter la zone traitée entre 1 et 4 cm<sup>2</sup> et un espacement de 3 mm entre chaque site donneur [43]. Hangody *et al* a étudié sur 10 ans environ 900 défauts et obtient des résultats excellents avec 92%, 87% et 79% de réussite pour le condyle fémoral, le plateau tibial et les articulations patello-fémorales, respectivement.

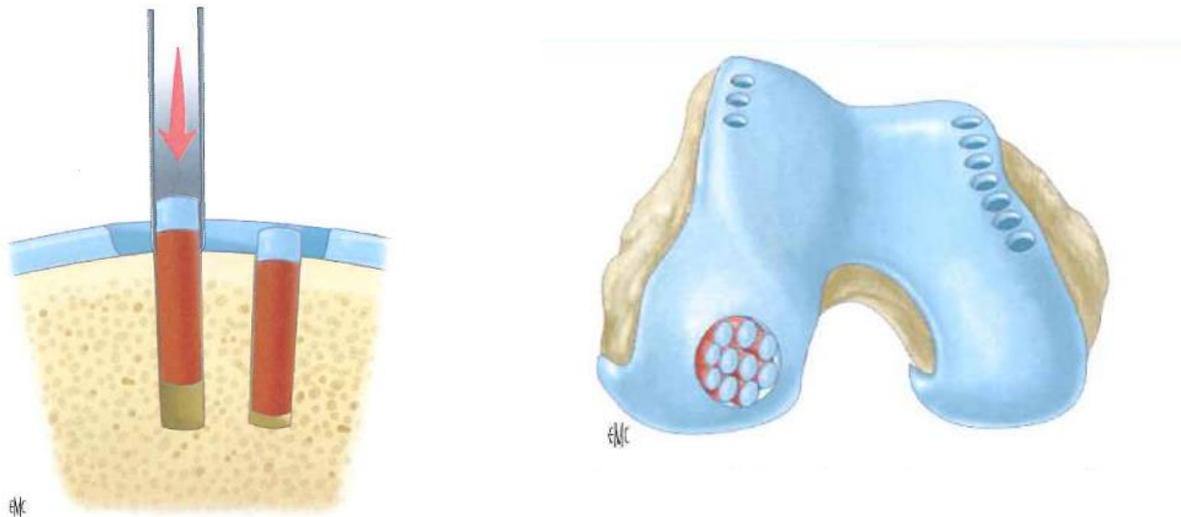


Figure 14 : Schématisation de la mosaïcoplastie. A gauche, coupe transversale du défaut et insertion des greffons. A droite, aspect de l'articulation à la fin de la procédure: des défauts ostéocondraux dans la partie non portante (en général la trochlée) et un défaut rempli au maximum dans la partie portante. Versier *et al* (2014) [43].

### **Greffes périostées**

Le périoste (tissu conjonctif périphérique de l'os en dehors des surfaces articulaires) a un potentiel de chondrogenèse et d'ostéogenèse, ce qui fait de lui une membrane biologique idéale pour la réparation du défaut chondral pouvant aller jusqu'à 4cm<sup>2</sup>, figure n°15. Une étude sur le long terme

(51 mois) montre 76% de réussite. L'inconvénient est la possibilité de calcification du périoste [3], [38], [43], [46].

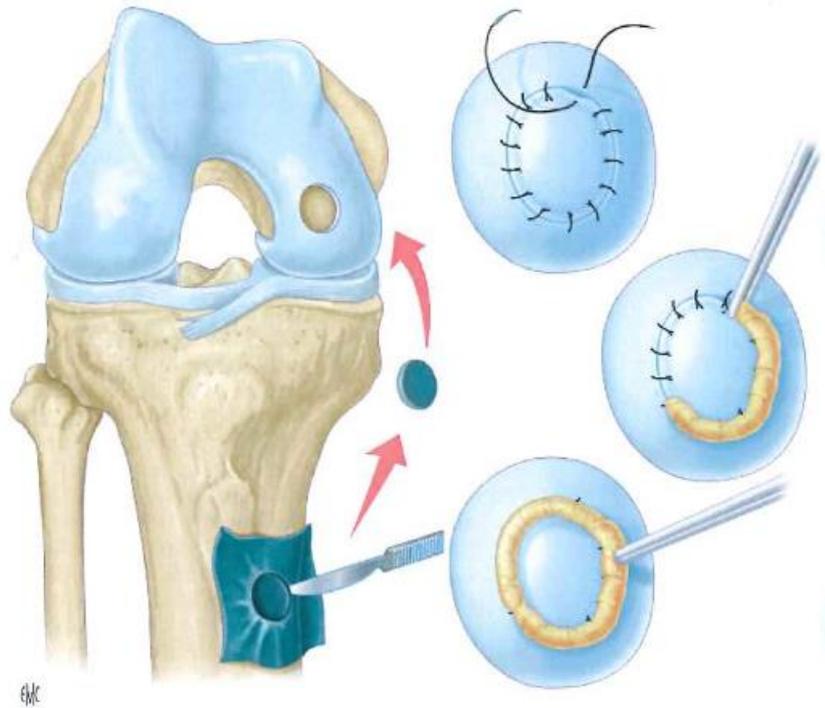


Figure 15 : Schématisation du principe d'un patch issu du périoste. Versier *et al* (2014) [43].

### ***Greffes périchondrales***

Des bandes autologues du périchondre (tissu conjonctif qui recouvre le cartilage en dehors de certains cartilages comme le cartilage articulaire) sont prélevées et disposées dans la zone lésée, pour traiter le défaut chondral. Une colle à base de fibrine agit comme un adhésif. Une étude réalisée sur le long terme (52 mois) montre 38% de réussite [3], [47].

### ***f. Injection de cellules directement dans le défaut articulaire***

#### ***Les chondrocytes (ACI autologous chondrocyte implantation)***

La greffe autologue de chondrocytes est actuellement utilisée pour les lésions cartilagineuses de patients jeunes car les chondrocytes de patients âgés deviennent sénescents et perdent leur potentiel catabolique. La technique consiste à prélever un petit morceau de cartilage d'une zone non

## *1.2 Les 'péripiétés' du cartilage au sein de l'articulation*

portante. Après isolation enzymatique des cellules, elles sont cultivées *in vitro* sous les conditions les plus optimales. Après 2-3 semaines, l'articulation est ouverte, le défaut chondral est recouvert d'un patch périosté puis la suspension cellulaire est injectée sous ce patch. Après un suivi de 39 mois, cette technique présente un taux de réussite de 70%. Des études histologiques ont montré que le cartilage néoformé était de type hyalin contenant toujours une petite portion de fibrocartilage mais de bonne qualité au niveau histologique [3], [38], [41], [43], [46], [47].

### ***Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs)***

Le principe est le même que la technique précédente mais avec des CSMs de la moelle osseuse. De bons résultats sont observés avec un défaut inférieur à 6 cm<sup>2</sup> [3], [38], [47]. Les chondrocytes perdent leur potentiel chondrogénique avec l'âge et leur nombre est faible au sein de l'articulation. Les CSMs, capable de se différencier en chondrocytes, non impactées par l'âge, facile à prélever et en grande quantité est une alternative prometteuse aux chondrocytes.

Dans les deux cas, l'injection de cellules peut se faire directement dans le défaut sous le patch ou à travers une matrice - un biomatériau.

## ***g. Chirurgie***

### ***Prothèse partielle ou totale du genou***

La prothèse est soit unicompartmentale, soit totale. Elle est accessible en majorité aux personnes ayant un âge supérieur à 60 ans et limitée pour les personnes plus jeunes due à la durée de vie du matériau de la prothèse qui est supérieur à 20 ans dans 70% des cas. Les prothèses sont adaptées à la morphologie du genou de la personne afin de faciliter la récupération.

## ***Ostéotomie***

L'ostéotomie est habituellement réservée à l'arthrose précoce. Le principe est la section chirurgicale d'un os long, pour en modifier son axe, sa taille ou sa forme, afin de redistribuer la charge articulaire. Cette technique permet d'éviter les charges de pression de contact sur la surface du cartilage [3].

Les choix thérapeutiques pour pallier aux blessures du cartilage, doivent prendre en compte plusieurs facteurs : le type de lésion, la localisation, la taille, la profondeur, l'âge du patient, etc... En dépit d'un nombre de méthodes différentes décrites, aucune n'a été capable de régénérer un néo-cartilage similaire de par sa structure et de par ses fonctions du cartilage articulaire natif. Une technique pleine de ressource, prometteuse et pas encore exploitée jusqu'au bout est l'ingénierie tissulaire.

### III. L'Ingénierie Tissulaire (IT) du cartilage

L'ingénierie tissulaire (IT) du cartilage est une triade qui repose sur 3 constituants majeurs : des cellules, un biomatériau ou une matrice destinée à contenir ou à délivrer les cellules et des facteurs bioactifs plus précisément des facteurs de croissance et de différenciation. *In vitro*, l'IT consiste à tester et à combiner ces 3 éléments afin d'obtenir un greffon mimant le tissu. Le meilleur candidat pour la thérapie, doit répondre à plusieurs critères déterminants : les propriétés biomécaniques, durabilité du tissu néofabriqué, biocompatibilité et intégration à l'hôte et au tissu environnant. Pour répondre à ces questions, le modèle animal est le meilleur moyen de comprendre comment fonctionne cette triade et chaque élément de cette triade, une fois dans l'environnement *in vivo* [41], [47].

#### 3.1. Choix des Cellules

De plus en plus on se tourne vers l'utilisation de ses propres cellules pour guérir : on parle de greffe autologue. La source de cellules pour les greffes autologues est une question pertinente : doit-on directement utiliser les chondrocytes d'un cartilage qui peut être lésé ou passer par d'autres types cellulaires comme les cellules souches dont on sait qu'elles sont capables de suivre le processus de chondrogénèse.

##### a. Culture des chondrocytes en vue de greffe autologue

Les chondrocytes sont les cellules du cartilage, à première vue, elles semblent être les cellules les plus adaptées à la fabrication d'un nouveau cartilage. De plus, elle montre de bons résultats (comme vu au paragraphe 2.3.f) dans les procédures d'injection de cellules ACI, directement dans le défaut sous un pansement constitué du périoste.

La procédure pour récolter les chondrocytes consiste à prélever un morceau de cartilage dans les zones non portantes (procédure invasive) puis de les isoler par digestion enzymatique de la matrice. Une fois recueillis, les chondrocytes vont être cultivés en monocouches pendant 15-21 jours avant de

les intégrer dans le biomatériau sélectionné. L'injection de cellule dans le biomatériau est appelée l'ensemencement. Dans ces conditions, ils peuvent proliférer librement jusqu'à obtenir le nombre suffisant [3].

L'inconvénient est que les chondrocytes se dédifférencient en cellules présentant un phénotype fibroblastique, accompagné d'une diminution de la synthèse du collagène de type II et des protéoglycanes puisqu'elles expriment les gènes du collagène de type I. Cependant une fois dans un environnement tridimensionnel, les cellules peuvent se redifférencier à nouveau.

Un autre inconvénient est la faible concentration en chondrocytes dans le cartilage. Il est donc nécessaire de prélever plusieurs morceaux de cartilage ou de les faire se proliférer plus longtemps.

Dans une étude réalisée sur des lapins par Caplan *et al*, les chondrocytes implantés dans le défaut ostéochondral généré à partir du cartilage de bonne qualité, ne montrent pas de reconstruction de la plaque sous-chondrale sauf si des CSMs non différenciées étaient utilisées [48].

En résumé, afin de prélever les chondrocytes, il est nécessaire de pratiquer une procédure invasive, donc génération d'un défaut chondral, et la quantité et la spécificité de la cellule (culture en 3D) rend la culture de chondrocytes *in vitro* plus contraignante. De plus dans le cas d'un défaut ostéochondral ils ne peuvent pas fabriquer d'os.

### **b. Les Cellules Multipotentes Mésoenchymateuse**

Il est important de faire attention à l'emploi du terme cellules souches. On distingue plusieurs types de cellules souches selon leurs capacités de différenciation :

- ✚ Les cellules souches totipotentes : Ce sont les cellules issues de l'ovule fécondé ou les cellules issues des premières divisions de l'œuf jusqu'au quatrième jour (morula). Ces cellules sont les seules à permettre le développement d'un individu au complet à condition d'être placées *in-vivo* pour permettre la bonne orientation des cellules. C'est donc impossible *in-vitro*.

### 1.3 L'ingénierie tissulaire (IT) du cartilage

- ✚ Les cellules souches pluripotentes, dont font partie les cellules embryonnaires ES (embryonnaires souches) : Elles proviennent de la masse cellulaire interne de l'œuf, au stade de 64 cellules. Elles ont vocation à former tous les tissus de l'organisme, mais ne peuvent donner un individu. Des cellules pluripotentes peuvent être artificiellement créées à partir de cellules différenciées grâce à l'ajout de certains facteurs de transcription, ce sont les cellules souche pluripotentes induites ;
- ✚ Les cellules souches multipotentes : Ce sont des cellules présentes dans l'embryon ou dans l'organisme adulte. Elles sont à l'origine de plusieurs types de cellules différenciées tout en conservant leur capacité à s'autorenouveler mais elles sont déjà engagées dans une certaine direction.
- ✚ Les cellules souches unipotentes ne peuvent produire qu'un seul type cellulaire, tout en s'autorenouvelant.

Les cellules souches utilisées afin d'obtenir des cellules spécifiques du cartilage sont donc les cellules souches totipotentes embryonnaires (ESs) ou les cellules souches multipotentes mésenchymateuses (CSMs) présente durant toute la vie de l'individu. Dans la littérature on retrouve plusieurs noms pour les cellules souches mésenchymateuses (CSMs): marrow stromal cells, mesenchymal stem cell, mesenchymal stromal cell ou multipotent stromal cells.

Il existe différentes sources de CSMs [49], [50]:

- ✚ La moelle osseuse : C'est la source la plus utilisée et étudiée et il est facile de collecter les cellules lors d'opération ou par simple aspiration.
- ✚ Sang périphérique : C'est une source facilement disponible, mais peu d'études ont été réalisées afin de la comparer avec les autres sources.
- ✚ Tissu synovial : C'est la source de CSMs où les cellules ont montré *in vitro* la plus grande capacité chondrogénique [51]. Le désavantage est le milieu dans lequel elles vivent qui peut avoir une influence en cas de maladie par exemple

- ✚ Placenta et cordon ombilical : C'est une source facile d'accès et non invasive, qui présente une haute capacité à se différencier et aucun pouvoir immunogène. De plus il existe des banques facilitant l'accès un peu plus.
- ✚ Tissu adipeux : C'est un tissu abondant, il est donc facile de prélever les cellules et la procédure est non invasive. Cependant c'est la source de CSMs qui a la plus faible capacité chondrogénique.

Le Comité des cellules souches mésenchymateuses et tissulaires de la société Internationale pour la thérapie cellulaire propose des critères minimaux pour définir les CSMs humaines afin de standardiser une caractérisation plus uniforme des CSMs [52], [53]:

- ✚ Adhérence au plastique dans des conditions de culture standard
- ✚ Exprimer des antigènes à la surface cellulaire : CD73, CD90 et CD105 et ne pas exprimer les marqueurs hématopoïétiques : CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a et HLA-DR (*human leukocyte antigen*) [54]
- ✚ Peut se différencier en 3 types cellulaires (adipocytes, ostéoblastes et chondroblastes) [59]– [61].

Certaines CSMs sont faciles d'accès, généralement par aspiration de la moelle osseuse. Leur isolation et expansion *in vitro* est rapide et facile. Elles présentent une inhibition de contact, il est donc important de faire attention durant l'expansion. Elles ont une capacité à moduler le système immunitaire et à réparer les tissus tout en exerçant une activité anti-fibrotique [53], [57]. En effet Nauta *et al* montrent le pouvoir immunomodulateur et leur immunogénicité *in vitro* et *in vivo* [58].

Plusieurs études ont montré l'efficacité [57] :

- ✚ *In vitro* : les CSMs ont été cultivées en pellet (culot de cellules pour obtenir un environnement 3D) ou sur divers biomatériaux de composition et structure différentes. Une

### 1.3 L'ingénierie tissulaire (IT) du cartilage

étude histologique montre la présence d'une matrice extracellulaire qui ressemble au cartilage hyalin.

- ✚ *In vivo* dans un modèle animal : les modèles animaux ont fourni une évaluation pré-clinique *in vivo* des CSMs dans le traitement d'un défaut du cartilage articulaire chondral ou ostéochondral chez les petits animaux tels que rat, lapins et chez les grands animaux tels que les moutons, les chèvres, les cochons et les chevaux. Le tissu issu de la réparation comporte une couche fibreuse superficielle et une matrice ressemblant au cartilage articulaire en profondeur. Les matrices implantées (ensemencées avec des CSMs) étaient pré-cultivées *in vitro* pendant 2 à 3 semaines avant l'implantation.
- ✚ Etude clinique : deux études cliniques ont comparé la transplantation de CSMs à la transplantation de chondrocytes. Les résultats histologiques ont indiqué que les deux procédures étaient capables de resurfer les défauts.

A des fins thérapeutiques, l'utilisation d'une biobanque permet de contrôler la qualité et de normaliser des produits avec plusieurs lots de la même préparation cellulaire approuvée par les autorités réglementaires. Plusieurs facteurs sont à prendre en compte pour la reproductibilité [52]:

- ✚ Le moyen de les identifier
- ✚ La standardisation de la production (densité cellulaire, nombre de passage, temps de culture, milieu de culture, etc...)
- ✚ La standardisation au niveau de la conservation par la cryoconservation. Moll *et al* ont montré que les CSMs pouvaient réagir par un «choc thermique» en réponse à la cryoconservation qui supprimerait leurs propriétés immunomodulatrices [59].
- ✚ L'âge du donneur est très controversé. Selon Pittenger *et al* et Naaldijk *et al* l'âge n'a pas d'influence [55], [60], alors que Duscher *et al* montrent une diminution des capacités des CSMs avec l'âge [61].

D'après Reinholz *et al*, l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire nécessite une source de cellules présente en grande quantité afin de fournir un nombre suffisant de cellules pour combler le défaut [39]. Ces cellules doivent avoir le potentiel de devenir des chondrocytes. Les CSMs ont une capacité proliférative accrue et peuvent être différenciées de manière reproductible en chondrocytes [55]. Le prélèvement des CSMs ne nécessite pas de blessure du cartilage articulaire sur un autre site. De plus, les cellules qui combler naturellement le défaut sont des CSMs [40]. Autant de paramètres qui montrent que les CSMs sont de bons candidats pour l'ingénierie tissulaire. Des études montrent que la pré-culture des CSMs sur un biomatériau, de gel de collagène par exemple, avant implantation avait de meilleurs résultats histologiques [62]. Cette pré-culture des CSMs à la différenciation chondrogénique nécessite un traitement avec des facteurs bioactifs : les facteurs de croissance et de différenciation.

### 3.2. Choix des facteurs de croissance ou de différenciation

La différenciation chondrogénique des CSMs est contrôlée par divers facteurs intrinsèques et extrinsèques. La différenciation des CSMs est l'acquisition d'une fonction et d'une morphologie spécialisées et définitives. Les facteurs de croissance et de différenciation jouent un rôle important dans ce processus. Ce sont des polypeptides biologiquement actifs et dans le cartilage hyalin, ces facteurs régulent l'homéostasie, l'intégrité et son développement [39], [63].

Il en existe un grand nombre dans l'organisme mais les plus étudiés et documentés pour l'ingénierie tissulaire du cartilage sont les facteurs de croissance de la superfamille TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), IGF (*Insulin Growth Factor*) et le facteur de transcription de la famille SOX (*Sex determining Region on Y*).

### 1.3 L'ingénierie tissulaire (IT) du cartilage

#### **Superfamille de TGF- $\beta$**

Dans la superfamille de TGF- $\beta$  on retrouve TGF- $\beta$  (transforming Growth Factor- $\beta$ ) mais aussi BMPs (Bone morphodenic protein) et GDFs (Growth differentiation factor). Ils jouent un rôle dans la prolifération, différenciation, l'apoptose mais aussi dans la régulation du système immunitaire et l'activation des enzymes responsables du catabolisme de la MEC [66]–[70] :

✚ **Les TGF- $\beta$**  : il existe 3 isoformes : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3. Elles modulent la prolifération, la différenciation et la production de la MEC du cartilage des CSMs :

- TGF- $\beta$ 1 améliore la chondrogénèse [50]: il agit en régulant de manière négative l'expression du gène du collagène de type I et de manière positive les gènes du collagène de type II et de l'aggrécane [63]. De plus, il agit contre l'activité catabolique du médiateur inflammatoire IL-1 *in vivo* [65].
- TGF- $\beta$ 2 améliore la chondrogénèse [50]
- TGF- $\beta$ 3 induit la chondrogénèse et augmente la production de la MEC du cartilage en particulier la synthèse des GAGs sulfatés [50], [63].

✚ **Les BMPs** : Ils favorisent la formation osseuse en induisant l'ossification endochondral mais également la formation du cartilage *in vivo* : BMP-2, BMP-4 et BMP-7 sont les plus étudiés

- BMP-2 : le traitement avec BMP-2 mène à une augmentation de la production de la MEC cartilagineuse et les agrégats obtenus sont plus robustes par rapport aux autres. Il diminue également l'expression du gène du collagène de type I [50], [63].
- BMP-4 : le traitement avec BMP-4 induit une différenciation chondrogénique des CSMs vers une lignée chondroprogénitrice puis vers les chondrocytes matures et supprime la différenciation vers les chondrocytes hypertrophiés. Il améliore donc la production de matrice cartilagineuse en stimulant la synthèse de collagène de type II et d'aggrécanes et en diminuant l'expression du collagène de type I et X [63], [68].

- BMP-7 (aussi appelée protéine ostéogénique-1 (OP-1)) : le traitement de BMP-7 sur les CSMs diminue leur activité de prolifération, mais stimule l'expression des gènes de la MEC du cartilage [50], [63].

✚ Les GDFs : il y a au moins 15 membres de cette sous-famille, mais seul GDF-5 est impliqué dans la chondrogénèse : il augmente l'expression du facteur de transcription SOX-9 [63].

Cas particulier de TGF- $\beta$  : les TGF- $\beta$  sont présents sous leur forme latente dans le LS [69] et nécessitent une activation pour s'accrocher aux récepteurs et déclencher une réponse cellulaire [65]. Les études ont montré que le TGF- $\beta$  latent est activé par les forces mécaniques exercées sur le cartilage. Il peut également être activé par la Stromélysine-1 (MMP-3) et la collagénase-3 (MMP-13) lors de l'ossification endochondrale et par la transglutaminase lors du vieillissement. Cependant une dose trop importante de TGF- $\beta$  actif *in vivo* induit des effets pathologiques associés à l'arthrose, tels que l'inflammation, la fibrose et la formation d'ostéophytes. Les doses optimales de TGF- $\beta$  sont de 1 à 10 ng / ml [69].

### **FGF (Fibroblast Growth Factor)**

Les FGFs jouent aussi un rôle très important pendant l'embryogenèse, l'angiogenèse et la cicatrisation sur la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie et la motilité des cellules. 23 membres de la famille des FGFs ont été identifiés dont 2 dans la chondrogénèse : FGF-2 appelé aussi bFGF (facteur de croissance fibroblastique basique) et FGF-18 [64], [66], [67], [70].

FGF-2 conduit à une prolifération plus rapide des CSMs et une synthèse plus rapide des protéoglycanes (agrégats plus gros par rapport aux témoins). De plus, sous sollicitations mécaniques, FGF-2 (avec FGF-4 et FGF-8) joue un rôle dans le processus d'activation des voies anaboliques en diminuant l'effet des agréganases [63], [67], [70].

FGF-18, moins étudié, est impliqué dans une variété de processus biologiques, y compris le développement embryonnaire, la croissance cellulaire, la morphogenèse, la réparation tissulaire et la

### 1.3 L'ingénierie tissulaire (IT) du cartilage

croissance tumorale. Son rôle est de bloquer la prolifération cellulaire pour initier la différenciation cellulaire [63].

#### **IGF-1 (Insulin Growth Factor-1)**

L'IGF-1 est une hormone de structure similaire à l'insuline. Au sein du cartilage articulaire, IGF-1 est le principal facteur de croissance anabolique, nécessaire à l'homéostasie du cartilage, pour la synthèse des protéoglycanes et du collagène de type II [50]. L'IGF-1 stimule la chondrogenèse des CSMs par la prolifération, la régulation de l'apoptose cellulaire et en induisant l'expression du phénotype chondrocytaire [63], [64], [66], [67].

#### **La famille SOX**

Cette famille de protéines tire son nom de SRY (*Sex determining Region on Y*) à cause du domaine HMG (*High Mobility Group*) qu'elle possède et qui est très semblable à celui de SRY, le gène codant la différenciation des gonades en testicules. On en dénombre 17 dont 3 sont impliqués dans la différenciation chondrogénique : SOX-5, SOX-6 et SOX-9. Ce sont des facteurs de différenciation, des régulateurs transcriptionnels qui ont un rôle de médiateur dans la transition de l'immature au chondrocyte mature et plus tard au chondrocyte hypertrophié [70].

#### **Interleukine anabolique IL-6**

L'interleukine 6 (IL-6) s'oppose à l'IL-1 (interleukine catabolique) et a des effets protecteurs. C'est un médiateur anti-inflammatoire agissant sur les facteurs de croissance anaboliques classiques pour induire un anabolisme sans bloquer directement les médiateurs cataboliques [70].

#### **Combinaison des facteurs de croissance et de différenciation**

L'environnement *in vivo* contient une combinaison de divers facteurs de croissance et non l'action que d'un seul. Les études ont montré que l'utilisation de plusieurs facteurs simultanément ou de manière cyclique améliore les résultats sur la chondrogenèse : Mackay *et al* et Johnstone *et al*,

montrent que l'utilisation du Dexaméthasone (corticostéroïde qui bloque la prolifération en faveur de la différenciation) est indispensable au TGF- $\beta$  *in vitro* pour agir correctement [71], [72]. Des études ont également montré l'effet significatif de BMP-7 en combinaison avec TGF- $\beta$ 1 et IGF-1 sur la chondrogénèse [63]. Indrawattana *et al* montrent que les facteurs de croissance combinés de manière cyclique TGF- $\beta$ 3 et BMP-6 ou TGF- $\beta$ 3 et IGF-1 étaient plus efficaces sur la régulation des gènes SOX-9, Collagène de type II et aggrécane [73]. De même, le traitement des biomatériaux avec TGF- $\beta$ 1 et FGF-2 (bFGF) suivi par le traitement avec IGF-1 a donné des greffons avec de meilleures propriétés biochimiques et mécaniques [39].

#### En résumé :

Facteurs de croissance ou de différenciation	Effet sur les CSMs
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	Augmente la prolifération Régulation positive des gènes du collagène de type II et des aggrécane. Diminue l'expression du gène pour le collagène de type I Opposant du médiateur inflammatoire IL-1 Dexaméthasone améliore la chondrogénèse <i>in vitro</i> BMP-7, IGF-1 agit ensemble de manière significative sur la chondrogénèse FGF-2 (bFGF) et IGF-1 améliore les propriétés des greffons obtenus
<b>TGF-<math>\beta</math>2</b>	Améliore la chondrogénèse Induit l'expression des gènes de la MEC du cartilage
<b>TGF-<math>\beta</math>3</b>	Augmente la production de MEC en particulier des GAGs Effets améliorés par l'ajout de BMP-2 Avec BMP-6 et IGF-1 de manière cyclique: Améliore la synthèse de SOX9, collagène de type II et aggrécane
<b>BMP-2</b>	Augmente la prolifération Augmente la production de la MEC Diminue l'expression du gène pour le collagène de type I
<b>BMP-4</b>	Accélère la maturation des CSMs jusqu'aux chondrocytes matures Régule à la hausse les gènes pour le collagène de type II et GAGs Régule à la baisse les gènes pour le collagène de type I et X
<b>BMP-7</b>	Inhibe la prolifération Induit la différenciation chondrogénique Effet additionnel sur la chondrogénèse en présence de TGF- $\beta$ 1 et IGF-1
<b>GDF-5</b>	Augmente l'expression de SOX-9
<b>IGF</b>	Augmente la prolifération Augmente la production de la MEC (PGs et collagène de type II) Effet additionnel sur la chondrogénèse en présence de TGF- $\beta$ 1 et BMP-7
<b>FGF-2 ou bFGF</b>	Augmente la prolifération Augmente la production des protéoglycane Inhibe l'action des aggrécaneases sous l'action d'une charge

### 1.3 L'ingénierie tissulaire (IT) du cartilage

<b>FGF-18</b>	Inhibe la prolifération Induit la différenciation chondrogénique
<b>SOX-9</b>	Méiateur dans l'évolution des cellules au sein du cartilage : CSMs-préchondrocytes / préchondrocytes-chondrocytes / chondrocytes matures-chondrocytes hypertrophiés

Tableau 2 : Liste des facteurs de croissance et de différenciation les plus utilisés dans l'ingénierie tissulaire et leurs effets sur les CSMs. Tableau complété à partir de Danišovič et al (2012) [63] et Seo et al (2014) [67].

En résumé, les CSMs ont des caractéristiques biologiques uniques qui peuvent être influencées et orientées par de nombreux facteurs, y compris des facteurs de croissance et de différenciation spécifiques dans les conditions *in vivo* et *in vitro*. Le facteur indispensable à la différenciation chondrogénique semble être la superfamille TGF- $\beta$  dont les capacités sont augmentées en présence d'autres facteurs comme la famille FGF ou IGF. Cependant, les cellules ne sont pas seulement influencées par les facteurs chimiques, des facteurs physiques et mécaniques influent également sur le comportement et notamment l'environnement 3D dans lequel elles se situent.

### 3.3. Choix du biomatériau

Il est reconnu que les CSMs ont besoin d'un environnement 3D lors de la différenciation chondrogénique mais également que les chondrocytes ont besoin de cet environnement pour maintenir leur phénotype [50]. Pendant plusieurs années la recherche c'est principalement réalisée en culture sur micro-masse aussi appelée en pellet qui consiste à centrifuger les cellules afin de créer un culot cellulaire (environnement 3D). Depuis plusieurs années, la recherche montre que de meilleurs résultats sont obtenus lorsque les cellules sontensemencées dans des biomatériaux ou des matrices. A l'heure actuelle, il existe une grande diversité de biomatériaux. Parmi ces biomatériaux se trouvent les biomatériaux naturels (le collagène, la soie, la fibrine, l'agarose, l'alginate, le chitosane et l'acide hyaluronique) et les biomatériaux synthétiques (PLA, PGA, PLGA, polycaprolactone). Ces matériaux ont été transplantés sur des petits et grands animaux avec succès, visualisé par l'expression des gènes spécifiques à la chondrogénèse ou la synthèse des constituant de la MEC suite à l'implantation de la matrice avec ou sans cellules dans un défaut ostéochondral [57].

### **a. Propriétés du biomatériau**

Les propriétés architecturales, chimiques et mécaniques du biomatériau affectent le nombre, le phénotype, et les propriétés d'adhérence des cellules, ce qui joue sur la réponse cellulaire [29]. Les cellules peuvent être : 1) soit incorporées dans la matrice tel que les hydrogels, puis l'ensemble est injecté directement dans l'articulation ou 2) soitensemencées dans les pores des biomatériaux tel que les éponges ou les mousses, puis l'ensemble est placé par chirurgie dans l'articulation.

Les principales caractéristiques d'un « bon » matériau pour l'IT du cartilage sont [32], [43], [52], [78]–[83] :

- ✚ Biomimétique / porosité et inter-connectivité: les matrices doivent attirer, ancrer et protéger les cellules. Elles doivent également laisser se diffuser les nutriments et les déchets ainsi que l'oxygène.
- ✚ Biodégradable : les matrices doivent pouvoir se dégrader pour laisser la place au tissu néoformé.
- ✚ Biocompatibilité / intégration : les matrices doivent être biocompatibles avec l'hôte afin d'éviter les réactions inflammatoires qui induisent une dégradation plutôt qu'une synthèse de la MEC.
- ✚ Mécano-compatibilité / résistance mécanique : La matrice doit dans un 1<sup>er</sup> temps remplacer le cartilage dans son rôle de résistance à la compression pour permettre aux cellules de construire une MEC correctement.
- ✚ Stérilisable

### **b. Composition du biomatériau**

Deux catégories de biomatériaux sont retrouvés dans l'ingénierie tissulaire : les biomatériaux naturels ou les synthétiques. Au sein des biomatériaux synthétiques il y a deux sous catégories : les résorbables et les non-résorbables [43], [52], [54], [55], [80], [82], [85]–[87]

### 1.3 L'ingénierie tissulaire (IT) du cartilage

#### **Les biomatériaux naturels**

**La Soie** : C'est une protéine fibreuse des vers à soie et des araignées. C'est un biomatériau polymère naturel aux propriétés mécaniques uniques avec une excellente biocompatibilité et biodégradabilité [50].

**Le collagène de type I et III**: C'est une protéine abondante du corps et c'est le biomatériau le plus étudié sous forme de membrane, d'éponge ou de gel [39]. Il contient des ligands qui permettent l'adhésion cellulaire, la migration et la différenciation [78]. Au sein d'animaux, les tests sur gels de collagènes de type I et IIIensemencés avec ses CSMs ont montré la formation de cartilage et d'os sous-chondral. Cependant le néocartilage a des propriétés mécaniques inférieures au cartilage natif et a commencer à se dégénérer après 24 semaines. Les propriétés mécaniques ont été améliorées avec l'utilisation d'une matrice de collagène. Dans une étude clinique, des gels de collagènes avec des CSMs ont montré la formation d'un tissu ressemblant au cartilage hyalin après 7 mois et la récupération de l'activité normale chez les patients après 1 an [50]. L'inconvénient est que le collagène est dérivé de sources xénogéniques (principalement de peau de porc ou de bœuf) et les techniques de purification ne peuvent pas éliminer les télopeptides immunogènes, ce qui peut créer une réponse immunitaire face à ce corps étranger à son implantation [76].

**L'alginate** : C'est un polysaccharide à charge négative dérivé des algues. En présence de calcium, les chaînes d'alginate se réticulent. Les billes sont formées en mélangeant les cellules dans une solution de chlorure de calcium avec de l'alginate formant un réseau de mailles assez grandes laissant diffuser les macromolécules. Elles ont un aspect de gel et sont injectables dans l'articulation [76], [78]. Ces billes posent un problème de biocompatibilité, avec une dégradation lente et une résistance mécanique insuffisante [39].

**L'acide hyaluronique** : les matrices d'hyaluronane sont le produit de l'estérification de l'AH. Elles sont constituées d'un réseau de fibres de 20µm d'épaisseur avec une porosité variable. L'acide hyaluronique a des propriétés physico-chimiques et biologiques uniques [76]. Il est hautement

biocompatible puisque c'est un élément naturel de la matrice du cartilage et entièrement résorbable en 3 mois avec des taux de dégradation contrôlables. Cependant, les produits de dégradation de l'hyaluronane peuvent provoquer une chondrolyse [78].

### **Les biomatériaux synthétiques**

**Les biomatériaux dégradables** les plus utilisés sont le polyesteramide type BAK 1095, le polyesteramide type C (PEA C), le poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL), l'acide poly-lactique (PLA) et l'acide poly-lactique co-glycolique (PLGA).

**Les biomatériaux non dégradables** les plus utilisés sont le poly dimethyl siloxane (PDMS), le polyurethane Texin<sup>®</sup> 950, le polyéthylène glycol (PEG), le PET et le PTFE.

### **En résumé :**

L'avantage des polymères synthétiques est le faible coût, la disponibilité en grande quantité, l'absence de danger lié à la biologie du polymère et leur polyvalence : leurs propriétés physiques, chimiques, mécaniques et de dégradation peuvent être modifiées [39], [50]. Cependant, quelques polymères synthétiques induisent une réponse immuno-inflammatoire après l'implantation ou présentent des sous-produits toxiques lors de leur dégradation entraînant un changement de pH et la mort cellulaire [76], [78].

Les polymères naturels peuvent contenir des ligands pouvant être reconnus par les récepteurs de la membrane cellulaire, ils sont biocompatibles et présentent moins de contraintes réglementaires. Les inconvénients potentiels de ces matériaux comprennent le manque de grandes quantités pour les applications cliniques, préoccupations d'antigénicité et de transfert de maladies pour les allogreffes, et un taux de dégradation qui varie d'un hôte à un autre [39], [77].

#### c. Structure des biomatériaux

De plus en plus, le biomatériau unique n'est plus utilisé mais plutôt un composite de plusieurs polymères synthétiques et naturels afin d'améliorer leurs propriétés biologiques et mécaniques : les interactions cellule-substrat et la libération de molécules bioactives ou la taille des pores et la géométrie respectivement [39].

L'autre aspect des biomatériaux est l'aspect bi-phasique, non spatialement uniforme, afin de répondre aux demandes d'un défaut ostéocondral, c'est-à-dire une structure os-cartilage [82], [84].

Un certain nombre de ces biomatériaux sont d'ailleurs commercialisés prêt à l'emploi comme par exemple Bio-Seed®-C (PGA + PLA + polydioxanone), Chondro-Gide®, Maix® (matrice de col I et col III), BST-CarGel® (chitosan et  $\beta$ -glycerophosphate) ou Hemotèse® et Collapat® II (hydroxyapatite-collagène) [85] qui pour certains sont adaptés à un défaut chondral et pour d'autres à un défaut ostéocondral.

Neuss *et al* lors de leur étude ont testé 19 biomatériaux et 7 souches de CSMs différents *in vitro* [49]. Ces tests démontrent que la viabilité cellulaire sur un seul et même biomatériau diffère en fonction du type de cellule. De même un type cellulaire réagit différemment selon le biomatériau. L'importance des paramètres, comme l'attachement cellulaire, la prolifération ou la différenciation dépend du biomatériau, de sa forme, de sa structure et de sa composition.

Grâce aux tests *in vitro*, on est capable de trouver la bonne combinaison entre cellules – facteurs bioactifs – biomatériau. Cependant ces critères sont valables pour le développement *in vitro* mais ne donnent en rien des informations sur le comportement du greffon néoformé une fois implanté dans l'articulation. Le modèle animal est la technique utilisée pour faire le lien entre le développement *in vitro* et les études cliniques chez l'homme. Une considération importante dans le choix du modèle animal est de choisir un modèle qui soit adapté à fournir une réponse à la question que l'on se pose.

### 3.4. Le modèle animal

Afin de vérifier le bon fonctionnement des cellules sur le biomatériau en présence des facteurs bioactifs plusieurs paramètres doivent être vérifiés : l'intégration avec la surface environnante, la biocompatibilité, les propriétés biomécaniques et la durabilité du tissu néoformé. Les modèles animaux sont un moyen de comprendre et de répondre à ces questions. En effet les études précliniques sont réalisées en générale sur des petits animaux (souris, rat, cochon d'inde, lapin, etc..) avant de passer sur les grands animaux (chien, chèvre, cochon ou cheval). Cependant il est nécessaire d'avoir une bonne connaissance des propriétés intrinsèques de l'articulation de l'animal afin de choisir l'animal le plus approprié pour répondre à la problématique choisie [76], [86].

En plus des propriétés intrinsèques de l'articulation de l'animal, d'autres paramètres sont à prendre en compte comme : l'âge (maturité du squelette et maturité sexuelle), la taille et le poids (qui vont permettre une étude post-opératoire) et le sexe (certaines hormones peuvent influencer la réponse).

Les animaux les plus utilisés dans la réparation du cartilage sont [39], [86]–[90]:

**La souris** : la souris est un animal généralement peu onéreux et facile à manipuler. Sa petite taille est un avantage car on visualise l'articulation complète en une seule image. Cependant la souris n'a pas le même cartilage que l'homme et les autres animaux, la couche de cartilage calcifié adjacent à l'os sous-chondral n'existe pas. La souris a permis d'élucider les pathogènes génétique et moléculaire dans l'os grâce à son séquençage complet et à l'existence de souris knockout (suppression de l'expression d'un gène). Mais ce n'est pas un modèle très bon pour la reconstruction du cartilage car la biomécanique et la charge ne sont pas suffisantes et il est difficile d'induire un défaut qui progresse doucement jusqu'à la maladie.

**Le rat** : Le rat est un animal relativement peu onéreux et facile à manipuler. Son cartilage est composé des différentes couches distinctes et est suffisamment épais pour induire un petit ou un gros défaut. Le rat a permis l'étude des techniques de réparation du cartilage comme la thérapie génique, la transplantation de cellules souches et les traitements par des facteurs de croissance. Il est

### 1.3 L'ingénierie tissulaire (IT) du cartilage

également très utilisé pour caractériser la douleur suite à un traitement ou au développement de l'arthrose. L'utilisation de rat athymique (c'est à dire avec un système immunitaire inhibé en raison d'un nombre très réduit de cellules T) fournit une possibilité unique d'étudier le potentiel de réparation des cellules humaines dans un environnement diarthrodial. Cependant, la présence de plaque de croissance qui reste ouverte tout au long de sa vie, et augmente probablement le potentiel de guérison intrinsèque du cartilage.

**Le cochon d'inde** : Son genou est différent de celui de l'homme car la partie centrale du condyle médial n'est pas couvert par le ménisque, le rendant plus sensible à l'arthrose. C'est un modèle très utilisé pour l'arthrose dégénérative car sa maturité squelettique est rapide et présente une arthrose spontanée.

**Le lapin** : Son haut degré de flexion et sa démarche entraîne une biomécanique différente de celui de l'homme. De plus son cartilage a un auto-renouvellement très efficace. C'est un modèle néanmoins très utilisé dans l'étude de l'arthrose et pour l'étude de différents traitements.

**Le chien** : Le chien souffre de problème au niveau de leur cartilage allant de l'ostéochondrite disséquante aux lésions du cartilage et à l'arthrose. C'est un animal facile à manipuler et des techniques d'évaluation cliniques similaires à ce qui est fait chez l'homme peuvent être utilisées. Cependant le chien est un animal qui coûte cher et la perception vis-à-vis du public est sensible.

**La chèvre et le mouton** : C'est un animal facile à manipuler qui n'est pas agressif et les études post-opératoires sont possibles. Il présente une arthrose spontanée. Cependant, ce sont des ruminants, leur système digestif est très différent (pas d'étude de traitement par voie orale).

**Le cochon 'minipig'** : La taille de l'articulation, l'épaisseur du cartilage et le poids porté par l'articulation des modèles porcins est proche de celui de l'homme. En effet, l'épaisseur du cartilage de porc permet la création de défaut cartilagineux d'épaisseur totale et partielle. Cependant c'est un modèle peu étudié car il a un coût important et l'animal est agressif.

**Le cheval :** Le modèle équin comme les humains souffre de problème au niveau de leur cartilage allant de l'ostéochondrite disséquante aux lésions du cartilage et à l'arthrose. Plusieurs thérapies biochimiques, moléculaires et génétiques ainsi que les dosages immunohistochimiques sont très bien décrits pour divers tissus articulaires et le liquide synovial.

**En résumé :**

Espèces	Epaisseur du cartilage du CMF (mm)	Diamètre des défauts (mm)	Age de la maturité du squelette	Avantages	inconvenients
<b>Murin</b>	0.1 à 0.3	2	Tout au long de sa vie	*Faible coût *Facile à manipuler *Genome séquencé *Visualisation de toute l'articulation	*Cartile trop fin pour la souris *Pas d'étude post-opératoire
<b>lapin</b>	0.3	3 à 4	Entre 4 à 10 mois	*Faible coût *Facile à manipuler	*Biomécanique du genou pas adaptée à l'homme *Auto-regeneration du cartilage *Etude post-opératoire difficile
<b>canin</b>	0.95	4	Entre 1 et 2 ans	*Facile à manipuler *Genou proche de l'homme *Modèle d'arthrose intantané *Etude post-opératoire	*Coût *Perception du public
<b>caprin</b>	1.1	6	Entre 3 et 4 ans	*Facile à manipuler *Etude post-opératoire	*coût
<b>porcin</b>	1.5	6 à 8	Entre 10 et 12 mois	*Genou proche de l'homme anatomiquement et biomécaniquement	*Coût *Aggressif
<b>équin</b>	1.75	/	Entre 5 et 6 ans	*Modèle d'arthrose spontané *Etude post-opératoire *Biomécanique existante	*Coût *Anatomie
<b>humain</b>	2.35	10	Entre 15 et 17 ans	/	/

Tableau 3 : Tableau résumant les différentes informations sur les modèles animaux les plus utilisés : l'épaisseur du cartilage du condyle médial du fémur (CMF), l'âge de maturité du squelette calculé par rapport à l'ouverture de la plaque de croissance, les avantages, les inconvénients et les découvertes apportées par les modèles pour la médecine humaine. Gregory *et al* [86] et Chu *et al* [89].

On s'oriente de plus en plus sur la possibilité des études post-opératoire non invasives avec les IRMs (imagerie à résonance magnétique) afin d'obtenir les informations sur le volume du cartilage, les

### *1.3 L'ingénierie tissulaire (IT) du cartilage*

lésions de l'os sous-chondral et la réparation sans euthanasie. Cette pratique est impossible sur les petits animaux même si récemment des résultats encourageants ont été obtenus sur des rats [91].

Il est important de faire attention aux résultats obtenus sur les animaux et à leurs interprétations. Certaines études ont montré que des traitements comme l'utilisation d'inhibiteur des metalloprotéinases ou du bisphosphonate donne des résultats positifs sur les animaux mais ne fonctionne pas chez l'homme. Le modèle animal ne permet pas de prédire l'efficacité d'un traitement mais de comprendre son mécanisme. Il est important de choisir l'animal en fonction de la problématique choisie. Afin d'étudier les maladies articulaires, il existe des modèles animaux spontanés, chimiques ou chirurgicaux [87], [88].

L'ingénierie tissulaire pour le cartilage est une technique prometteuse. En effet, grâce à cette technique, il est facile de combiner plusieurs facteurs, d'autant qu'il en existe un nombre important, à la fois au niveau de la cellule, du biomatériau et des facteurs bioactifs, afin d'obtenir un greffon dont les propriétés mécaniques et structurales correspondent aux besoins du tissu que l'on cherche à réparer. Pour le moment, la technique « miracle » n'est toujours pas trouvée mais en augmentant nos connaissances sur les interactions au sein du tissu, la réparation du cartilage articulaire, sera peut-être durable dans le temps et augmentera la qualité de vie des personnes atteintes.

## IV. Caractérisation du résultat de l'Ingénierie Tissulaire

Afin d'évaluer la réparation ou le remplacement du cartilage réalisé grâce aux greffons issus de l'ingénierie tissulaire, une caractérisation des propriétés mécaniques et structurales est indispensable. En mettant l'accent sur les propriétés structurales du greffon, il est important de le caractériser avant la chirurgie mais également après la chirurgie au niveau du tissu néoformé. Pour cela les techniques basées sur l'imagerie comme la microscopie confocale multiphoton permettent d'avoir accès à la microstructure des fibres de collagène, des protéines et des cellules de la matrice. Une analyse histologique et immunohistochimique (qui sont les techniques « gold standard ») permet de mettre en évidence la synthèse des protéines de la matrice comme les glycosaminoglycanes ou le collagène de type II mais également l'aspect de la structure os-cartilage. Le métabolisme est un facteur important pour la synthèse d'un nouveau cartilage, ainsi l'étude des gènes exprimés par les cellules donne une information sur la nature de la cellule (cellules souches, chondrocytes, osteocytes, etc...) et son métabolisme. Compte tenu de la nature biomécanique du cartilage, une analyse des propriétés mécaniques du greffon et du tissu voisin est indispensable et peut être réalisée par différents tests mécaniques : test d'indentation-relaxation, test de compression, test de traction, etc.... Pour finir, le tissu osseux doit être sain au niveau de sa structure, qui peut être mesurée par de l'imagerie ou par nanoscanner, et de ses propriétés mécaniques, qui peuvent être mesurées par nanoindentation afin de se focaliser sur des zones particulières.

### 4.1. La microscopie confocale biphotonique

La microscopie confocale biphotonique a été utilisée pour étudier la microstructure du cartilage d'une manière non destructrice. Elle est parfaitement adaptée à l'imagerie du tissu *ex vivo*. Cette technique repose sur le principe physique selon lequel un atome excité par deux photons de même longueur d'onde  $\lambda$ , a une excitation effective équivalente à l'absorption d'un photon de longueur d'onde  $\lambda/2$ . Ainsi, un fluorophore qui absorbe normalement la lumière dans les ultraviolets (environ 350 nm), pourra être excité avec un laser infrarouge à 700 nm. L'utilisation des infrarouges permet

#### 1.4 Caractérisation du résultat de l'ingénierie tissulaire

une meilleure pénétration que la lumière visible et permet donc d'aller plus en profondeur dans l'échantillon. Cependant, ce phénomène suppose que les deux photons arrivent au même point dans un laps de temps très court, de l'ordre de la centaine de femto secondes. On utilise pour cela des lasers infrarouges pulsés très puissants. La rencontre des deux photons se produit uniquement au plan focal de l'objectif. On récupère ensuite les signaux émis par les fluorophores grâce à des filtres ayant une certaine plage de longueurs d'ondes. Ce système permet d'augmenter le rapport signal/bruit.

La visualisation du collagène ne nécessite pas l'utilisation d'un fluorophore. En effet, les molécules de collagène, génèrent de la seconde harmonique (SHG). Cela signifie, que lorsqu'elles sont excitées à une longueur d'onde  $\lambda$ , elles émettent des photons à  $\lambda/2$ . Sur ce principe, *Matcher et al* montrent dans une étude réalisée sur le cartilage hyalin équin [92] que la zone superficielle intacte est apparue lisse et inhomogène, avec les chondrocytes inclus apparaissant comme des vides sombres. Alors que sur le site de la lésion, l'image SHG montre une structure fortement fibrillée, indiquant probablement le remplacement de cartilage hyalin avec du fibrocartilage et les chondrocytes perdent leur noyaux brillants.

Dans notre étude, les piles d'images ont été réalisées au microscope confocal multiphoton A1R MP PLUS® (Nikon), avec une longueur d'onde de 850 nm, doté d'un objectif 25X, à immersion à eau avec une distance de travail de 2mm. Le champ de vision de l'image était de  $1024 \times 1024$  pixels avec une résolution de  $0,5 \mu\text{m}^2$ . Des piles d'images 2D ont été enregistrées pour tous les échantillons avec une vitesse de balayage de 0,125 image / s et une moyenne de 2 balayages par image, tous les  $2 \mu\text{m}$  de 0 à  $100 \mu\text{m}$  de profondeur. Les fibres de collagène ont été observées par SHG et les cellules par autofluorescence.

## 4.2. Histologie et immunohistologie

### **Analyse histologique :**

Les analyses histologiques ont été réalisées sur le greffon issu de l'ingénierie tissulaire, la membrane synoviale, le fémur et le tibia. Les échantillons conservés dans du formol 10% sont dans un premier temps décalcifiés, déshydratés puis inclus dans de la paraffine. Des coupes de 5µm d'épaisseur ont été réalisées : de manière transversale (perpendiculaire à la surface) sur les greffons et les membranes synoviales et dans le plan sagittal pour les fémurs et tibias. Pour nos études, les zones sélectionnées pour les fémurs et tibias sont au niveau de la zone portante. Les coupes sont ensuite déparaffinées, hydratées, colorées et pour finir montées en lame et lamelle afin d'être visualisées avec un microscope optique (DMD 108, Leica, France).

#### Greffon issu de l'Ingénierie Tissulaire :

- Coloration au bleu alcian : évaluer la teneur en glycosaminoglycanes
- Coloration au rouge sirius : évaluer le contenu de collagène

#### Membrane synoviale :

- Coloration hématoxyline-éosine (HES) : évaluer la synovite

#### Tibia et Fémur :

- Coloration hématoxyline-éosine (HES) : évaluer la cellularité et l'aspect morphologique.  
Les noyaux apparaissent bleu foncé, le cytoplasme et fibres élastiques en rose et le collagène en jaune
- Coloration bleu de toluidine (BT) : évaluer la teneur en glycosaminoglycanes
- Coloration rouge sirius (RS) : évaluer le contenu en collagène.

Sur les greffons, le pourcentage volumique de glycosaminoglycanes a été obtenu avec le logiciel de traitement d'image Image J (National Institutes of Health Inc., Bethesda, Maryland, USA).

Pour le fémur et le tibia, un score a été mesuré afin de quantifier la qualité de la réparation pour le fémur et la qualité du tissu pour le tibia. Sur chaque échantillon, la qualité du tissu a été déterminée

#### 1.4 Caractérisation du résultat de l'ingénierie tissulaire

en fonction de 11 paramètres histologiques visant à apprécier l'aspect cellulaire, le contenu de la matrice et la qualité du tissu ainsi que l'interface avec le tissu voisin, tableau 4, [91]. Ce score varie entre 0 et 28, 0 correspondant à l'absence de réparation et 28 à un aspect hyalin du tissu.

Staining	Parameters	Observations	Score*	
HES	Cellular morphology (chondrocyte or fibroblasts)	100% of chondrocytes	4	
		66–100% of chondrocytes	3	
		33–66% of chondrocytes	2	
		0–33% of chondrocytes	1	
		100% of fibroblasts	0	
	Subchondral bone rebuild	Normal	3	
		Limited	2	
		Low	1	
	Percentage of filling	Any	0	
		100%	3	
		50–70%	2	
	Surface regularity	25–50%	1	
		0%	0	
		Smooth or regular	2	
	Interface with the normal cartilage	Slightly irregular	1	
Irregular or fibrillar		0		
Junction with two lateral sides		2		
Junction with one side only		1		
Any junction		0		
Vascularity in repair tissue	Absence	1		
	Presence	0		
TB	Percentage of matrix staining by toluidine blue	100	4	
		66–100%	3	
		33–66%	2	
		0–33%	1	
		No stained	0	
SR	Percentage of matrix staining by Sirius red staining	Normal	3	
		0–33% in addition	2	
		33–66% in addition	1	
		66–100% in addition	0	
		Polarized light microscopy to appreciate the collagen network organization in cartilage layers	Superficial zone	Normal architecture
	Partially disorganized			1
	Totally disorganized			0
	Transitional zone		Normal architecture	2
			Partially disorganized	1
			Totally disorganized	0
	Radial zone	Normal architecture	2	
		Partially disorganized	1	
		Totally disorganized	0	

**Tableau 4 : 11 paramètres histologiques visant à apprécier la morphologie cellulaire, le contenu de la matrice, l'organisation du tissu et l'aspect du tissu avec les structures voisines. HES: coloration Hematoxylin-Eosin, TB: coloration Bleu Toluidine, SR: coloration Rouge Sirius. Watrin-Pinzano *et al* (2004) [91].**

En plus du score, avec les lames colorées au RS, en lumière polarisée, on peut observer la biréfringence du réseau de collagène qui dépend de la profondeur et du nombre de cellules. Ainsi, il est facile de distinguer les différentes couches du cartilage en fonction de l'orientation des fibres de collagène : une 1<sup>ère</sup> couche mince de couleur rouge en superficie, une couche intermédiaire fine noire et une couche épaisse plus profonde de couleur verte accompagnée d'espaces sombres pour les chondrocytes [1].

Pour la membrane synoviale, un score a été mesuré afin de quantifier l'inflammation. Le score utilisé est le score de Rooney basé sur le nombre de cellules dans l'intima, la fibrose et les infiltrations de vaisseaux. Ce score varie de 0 à 24, 0 correspondant à une membrane synoviale saine et 24 une membrane très inflammatoire, tableau n°5,[93], [94].

<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

**Tableau 5 : Score de Rooney – Evaluation de l'inflammation de la membrane synoviale**

### **Analyse immunohistochimie:**

L'analyse immunohistochimique a été réalisée uniquement sur le greffon issu de l'ingénierie tissulaire du chapitre 2. C'est une technique avidine-biotine (Envision + Dual Link, DAKO), avec des anticorps monoclonaux primaires pour le collagène de type II (Labvision). Les coupes de 5µm de tissus inclus en paraffine sont déparaffinées et traitées à la pepsine (0,4% p / v, Sigma) pendant 30 min à température ambiante et incubées avec une solution de peroxydase 5 min pour bloquer la peroxydase endogène. Les coupes sont par la suite contre-colorées avec la coloration à l'hématoxyline de Mayer. Pour finir, les coupes sont montées entre lame et lamelle afin d'être visualisées avec un microscope optique (DMD 108, Leica, France). Le pourcentage volumique de collagène de type II a été obtenu avec le logiciel de traitement d'image Image J (National Institutes of Health Inc., Bethesda, Maryland, USA).

### 4.3. Caractérisation du métabolisme – Etude de l'expression génique par PCR

La différenciation cellulaire peut être mise en évidence par des modifications qualitatives du phénotype cellulaire, c'est à dire l'expression d'un gène.

Une analyse PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a été réalisée afin d'évaluer la différenciation chondrogénique en fonction des gènes exprimés. En fonction de la maturation, la cellule ne va pas exprimer les mêmes gènes (figure n°16). Les marqueurs des chondrocytes sont : collagène IIB isoforme (COL2A1), agrégécan (ACAN), Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP), facteur de transcription SOX-9 (SOX9) et les marqueurs des chondrocytes hypertrophiés ou des marqueurs ostéogéniques sont : le collagène de type X (COL10A1), le collagène de type I (COL1A1), le facteur de transcription Runt-related 2 (RUNX2), le versican (VCAN), l'ostéocalcine (BGLAP) et l'osterix (OSX).

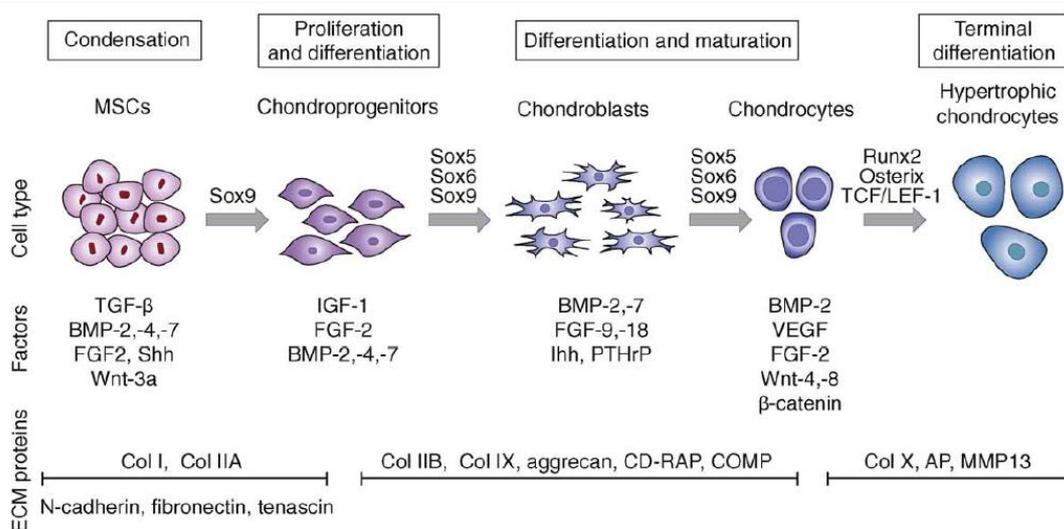


Figure 16: Schéma décrivant les marqueurs importants durant le processus de chondrogénèse et de maturation des chondrocytes. Vinatier *et al* (2009) [66].

### 4.4. La nanoindentation

#### a. Test d'indentation - relaxation

Les techniques de nanoindentation ont été récemment adaptées pour l'étude de matériaux biologiques. Cette technique s'adapte au comportement et besoin de l'échantillon : hydratation, comportement mécanique dépendant du temps, etc... [95]. Elle permet l'étude de petits échantillons

pour des tests mécaniques quantitatifs avec des échelles de force et de déplacement dans la gamme du  $\mu\text{m}$  et du  $\text{mN}$  respectivement.

Les tests de nanoindentation ont été réalisés à température ambiante dans du PBS 1X en utilisant un nanoindenteur commercial (Agilent Nanoindenter G200, ScienTec, Les Ulis, France) avec une pointe saphir sphérique de 0,479 mm de diamètre. La gamme de charge de cet appareil est entre 1  $\mu\text{N}$  et 500  $\text{mN}$  avec une résolution de 50  $\text{nN}$  et la gamme de déplacement jusqu'à 500  $\mu\text{m}$  avec une résolution de 0.01  $\text{nm}$ . Trois paramètres sont enregistrés : la charge, le déplacement et le temps. Ces paramètres sont indispensables pour caractériser le comportement viscoélastique du cartilage.

Le test débute par une charge à une vitesse de  $5\mu\text{m/s}$ , jusqu'à une profondeur définie en fonction de la taille de l'échantillon, puis un maintien de 400s afin d'atteindre l'équilibre et pour finir une décharge à une vitesse de  $0,05\mu\text{m/s}$ . Durant la phase de maintien, l'échantillon et le fluide (dans lequel le test est réalisé) vont se réorganiser pour atteindre un état d'équilibre, comme expliqué dans la figure n°17.

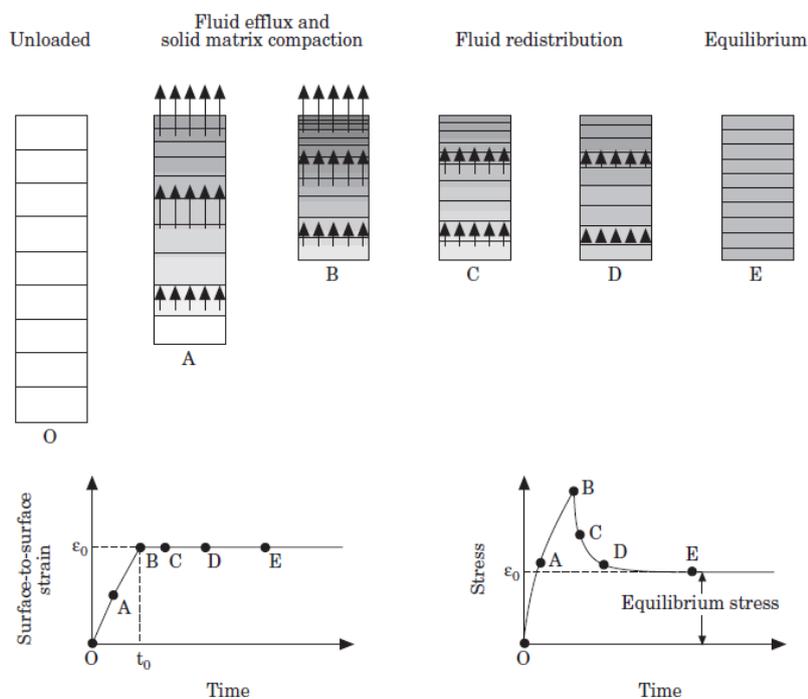


Figure 17 : Schéma représentant le comportement du fluide et le réarrangement du cartilage durant une expérience de contrainte-relaxation. Les phases de compression sont O, A et B et les phases de relaxation durant B, C, D et E. Mow *et al* (1999) [31].

## 1.4 Caractérisation du résultat de l'ingénierie tissulaire

Le cartilage est un tissu viscoélastique, cela signifie que son comportement mécanique dépend du temps. Deux comportements sont observés : 1) la relaxation, c'est-à-dire que lorsque l'on applique une déformation constante, la contrainte sur le matériau diminue au cours du temps et 2) le fluage, c'est-à-dire que lorsque l'on applique une contrainte constante, la déformation du matériau va augmenter au cours du temps.

Le comportement viscoélastique peut être caractérisé par le module instantané ( $E_{ins}$ ) qui représente le comportement dynamique, sans déformation durant la charge (rigidité à de haute vitesse) et le module à l'équilibre ( $E_{eq}$ ) qui représente le comportement statique, en se déformant suivant la charge (rigidité à faible vitesse).

### b. Le cartilage, un tissu viscoélastique - modèle numérique

Il existe plusieurs modèles rhéologiques pour caractériser un matériau viscoélastique qui consiste à représenter le matériau par un ensemble de ressort et d'amortisseurs [96]. Les ressorts représentent l'élasticité du matériau, sa capacité à conserver et restituer l'énergie et les amortisseurs représentent la viscosité du matériau, sa capacité à dissiper l'énergie. Nous avons choisi pour cette étude le modèle de Maxwell généralisé à n branches. Dans ce modèle développé et détaillé dans la thèse d'A. Levillain [15], le matériau viscoélastique est représenté par une succession de ressorts et d'amortisseurs en série, mis en parallèle (figure n°18).

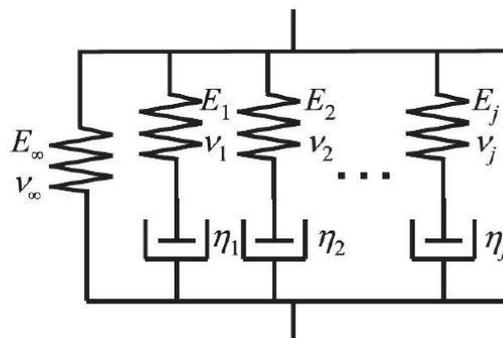


Figure 18 : Schéma représentant le modèle de Maxwell généralisé à n branches. E et  $\nu$  sont respectivement le module d'Young et le coefficient de Poisson de chaque ressort et  $\eta$  est la viscosité de chaque amortisseur. Chen et al (2012) [96].

Le module viscoélastique est décrit dans ce cas avec une somme d'exponentielle, appelée série de Prony (équation 4.1)

$$G(t) = G_0 + \sum_{i=1}^n G_i \exp(-t/\tau_i) \quad (4.1)$$

Dans cette équation,  $G_0$  représente le module de cisaillement,  $G_i$  les paramètres de relaxation,  $\tau_i$  les constantes de temps ( $\tau_i = \eta_i/E_i$ ) et  $n$  le nombre de branche du modèle (ou élément de Maxwell).

Pour rappel, le module de viscosité ne peut être directement mesuré sur une courbe de charge – décharge car cette courbe ne prend pas en compte l'évolution du module jusqu'à son équilibre. Un essai d'indentation – relaxation est donc nécessaire et le module est directement mesuré sur la phase de maintien, où le module diminue avec la force jusqu'à l'équilibre. Le module est obtenu à partir de l'équation 4.2

$$F(t) = \frac{8\sqrt{R}}{3(1-\nu)} \int_0^{t_c} G(t-s) \frac{dh(t)^{3/2}}{ds} ds \quad (4.2)$$

Dans cette équation,  $F$  représente la force décroissante mesurée durant le maintien,  $R$  le rayon de la pointe,  $h$  le déplacement,  $\nu$  le coefficient de Poisson du matériau et  $t_c$  le temps de charge.

Les modules instantané et à l'équilibre sont ensuite calculés avec l'équation 4.3 et 4.4 respectivement :

$$E_{ins} = 2(1 + \nu) (G_0 + \sum_{i=1}^n G_i) \quad (4.3)$$

$$E_{eq} = 2(1 + \nu) G_0 \quad (4.4)$$

La fraction élastique,  $f$ , peut ensuite être calculée comme le rapport du module à l'équilibre sur le module instantané (équation 4.5).  $f = 0$  représente un matériau purement visqueux et  $f = 1$  un matériau purement élastique.

$$f = \frac{E_{eq}}{E_{ins}} \quad (4.5)$$

#### *1.4 Caractérisation du résultat de l'ingénierie tissulaire*

Ces paramètres sont calculés pour chaque test d'indentation (3 indents par échantillons) puis réduit à une valeur par échantillon.

#### **4.5. Tomographie de l'os sous-chondral – nanoscanner à rayons X**

Afin d'évaluer la microarchitecture de l'os sous-chondral dans l'échantillon, des analyses ont été réalisées sur des images obtenues par tomographie par rayons X (Phoenix Nanotom, GE Sensing & Inspection Technologies GmbH, Wunstorf, Allemagne). Chaque échantillon de tibia et de fémur a été immergé dans une solution saline physiologique (NaCl 0,9%) dans un cryotube puis imagé. Les rayons X sont obtenus grâce à une source : un tube ouvert GE Phoenix nano-foyer et une cible de molybdène. Les images de projection sur une caméra CDD, ayant une taille de pixel de  $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ , ont été obtenues à 90 kV et 120  $\mu\text{A}$  avec une résolution de  $4,25\ \mu\text{m}^3$ . Une rotation de  $0,15^\circ$  entre chaque acquisition d'image est réalisée, fournissant une série composée de 2400 images de projection. Le logiciel de reconstruction Phoenix Datos (GE Sensing & Inspection Technologies GmbH, Wunstorf, Allemagne) a été utilisé pour reconstruire une pile de 3 sections (X-Y / X-Z / Y-Z) pour chaque échantillon d'os et stockées sous forme de fichiers TIF. Afin d'obtenir une image 3D de condyles entiers, le logiciel VGStudio (GE Sensing & Inspection Technologies GmbH, Wunstorf, Allemagne) a été utilisé.

Ces techniques de caractérisation présentées ci-dessus, non exhaustives, ont été adaptées et développées dans nos études pour répondre au mieux aux problématiques des lésions et de la réparation du cartilage. Cependant, pour le cartilage articulaire, les propriétés mécaniques des greffons sont mesurées avant l'implantation ou après le sacrifice de l'animal. Une innovation dans le domaine de la caractérisation serait de développer de nouvelles méthodologies qui permettraient d'évaluer les propriétés mécaniques des greffons et des tissus néoformés d'une manière non-invasive ou de manière minimalement invasive afin d'éviter le sacrifice des animaux. Certaines

techniques sont déjà utilisées comme l'utilisation *in vivo* de marqueurs du métabolisme tissulaire, l'arthroscopie, la sonde biomécanique, l'imagerie par résonance magnétique ou l'échographie [29].

### V. Conclusion

L'articulation du genou est une articulation complexe où les tissus qui la compose sont connectés directement ou indirectement entre eux. Le cartilage est le tissu au centre de l'articulation. Son rôle est de protéger l'os en répartissant les contraintes tout en autorisant une mobilité articulaire avec un coefficient de friction extrêmement faible par l'intermédiaire du liquide synovial, lubrifiant naturel de l'articulation. L'homéostasie du cartilage est basée sur le maintien des activités métaboliques des chondrocytes. Malgré une grande résistance, le cartilage finit par s'abîmer suite à des traumatismes extérieurs, ou lors d'ostéochondrite disséquante ou l'arthrose. Avec l'âge, le cartilage sénescence devient également plus sensible. De nos jours, peu de techniques développées sont efficaces pour la réparation d'un cartilage fonctionnel et durablement dans le temps.

Les blessures du cartilage sont retrouvées chez les individus de tout âge confondu, mais elles dépendent du facteur responsable de la blessure. Il a été montré que l'âge du donneur avait une influence négative sur la multiplication et la prolifération cellulaire *in vitro* et en général dans un environnement en 2 dimensions, mais peu ou pas d'études ont été réalisées sur l'influence de l'âge du donneur durant la reconstruction du cartilage après une lésion du cartilage.

L'ingénierie tissulaire est une technique prometteuse dans le traitement des défauts cartilagineux. De base, l'IT est une association de cellules, biomatériau et facteurs bioactifs optimisés afin d'obtenir un tissu néoformé capable par ses propriétés de remplacer le tissu natif dégradé. Dans le cas du cartilage, d'un défaut ostéochondral, les cellules les plus adaptées sont les cellules souches mésenchymateuses, le biomatériau n'est pas encore bien défini mais le plus utilisé est un biomatériau à base de collagène de type I et les facteurs bioactifs ne sont pas encore bien définis non plus avec un rôle indispensable du facteur de croissance TGF- $\beta$ .

Malgré un bon nombre de paramètres étudiés, aucune étude n'a montré à l'heure actuelle une réparation satisfaisante et durable dans le temps, que ce soit chez l'homme ou dans des modèles

animaux. Les contraintes exercées sur le cartilage peuvent être la cause des échecs une fois les greffons soumis aux conditions *in vivo*. Une meilleure compréhension de l'interaction de la biomécanique et de la signalisation cellulaire aiderait à développer des méthodes thérapeutiques, y compris pour les approches d'ingénierie tissulaire. Les études sur l'effet des sollicitations mécaniques au moment de la prolifération et de la différenciation *in vitro* commencent à être bien développées. Les *reviews* réalisées par O'conor *et al*, Elder *et al* et Steward *et al* résument bien les différents tests réalisés sous compression ou pression hydrostatique [30], [33], [97].

## *1.5 Conclusion*

## Partie II : L'âge du donneur dans

# l'ingénierie tissulaire – étude *in vitro*

---

### I. Introduction

Les lésions du cartilage du genou sont très fréquentes chez les personnes saines pratiquant des sports extrêmes mais également chez les personnes plus âgées présentant des affections articulaires comme l'arthrose ou l'arthrite rhumatoïde. Ces lésions provoquent des douleurs associées à un dysfonctionnement de l'articulation pouvant aller jusqu'à l'incapacité de mouvement due à la dégradation du cartilage et des autres tissus articulaires [98], [99]. La réparation des lésions cartilagineuses est un véritable enjeu sociétal. En effet, le cartilage hyalin est un tissu primordial de l'articulation dont le rôle est de protéger celle-ci contre l'érosion des surfaces articulaires [100] mais aussi d'absorber les chocs mécaniques et de distribuer le poids avec un minimum de friction[10].

Cependant, une fois mature, le cartilage hyalin a un potentiel très faible d'auto renouvellement dû à ses propriétés intrinsèques qui sont l'absence de nerfs et de vascularisation, ainsi qu'un faible nombre de cellules chondrocytaires responsables du turn-over de la matrice extracellulaire (MEC). Suite à une lésion du cartilage, une réparation du défaut est observée en général, qui se caractérise par la migration des chondrocytes vers la lésion et la formation d'un fibrocartilage qui a un rôle cicatriciel mais a des propriétés biomécaniques insuffisantes [98],[101].

Plusieurs techniques à l'heure actuelle existent afin de mieux réparer ces lésions cartilagineuses [102],[103]: micro fractures, stimulation de la moelle osseuse, autogreffe / allogreffe / mosaïcoplastie, remplacement de l'articulation par une prothèse et transplantation de cellules (chondrocytes ou cellules souches mésenchymateuses (CSMs)) stimulées par des facteurs de croissance. Malgré de bons résultats cliniques de ces différentes techniques, le nouveau cartilage

## 2.1 Introduction

formé ne reproduit pas fidèlement un cartilage hyalin [101], [102], [103] et d'un point de vue biomécanique, le cartilage reformé est différent du cartilage natif qui l'entoure. Depuis plusieurs années, une nouvelle piste pour palier à la dégradation du cartilage est l'ingénierie tissulaire. L'ingénierie tissulaire est une triade entre biomatériaux, cellules et facteur de croissance.

Les cellules du cartilage, les chondrocytes, étant en nombre insuffisant et difficiles à cultiver, un autre type cellulaire est donc nécessaire. Les CSMs sont impliquées dans le renouvellement de nombreux tissus du système musculosquelettique avec une capacité à devenir des adipocytes, ostéocytes et chondrocytes *in vitro* [55] mais également *in vivo* [67]. Les CSMs ont de nombreux avantages, elles sont accessibles et isolables facilement, modulent le système immunitaire [104], ont un comportement migratoire vers le site infecté [105] et surtout se retrouvent dans de nombreux tissus comme la moelle osseuse, le cordon ombilical, la graisse, le placenta, la pulpe dentaire, etc... Les CSMs sont donc une excellente source pour la thérapie cellulaire.

Afin d'obtenir des chondrocytes durant la culture *in vitro* de CSMs, la maîtrise de la chondrogenèse qui peut être induite par différents facteurs intrinsèque ou extrinsèque est très importante. Les facteurs ayant le plus d'influence sont les facteurs de croissance : parmi eux, le plus employé est celui de la famille des '*Transforming Growth Factor- $\beta$* ' (TGF- $\beta$ ). Plusieurs études montrent l'efficacité de TGF- $\beta$  dans l'induction de la chondrogenèse des CSMs chez différentes espèces animales [72] et chez l'humain [106]. De plus, Danisovic *et al* [63] et Blaney *et al* [65] montrent qu'en présence de TGF- $\beta$ 1, la prolifération des cellules est augmentée ainsi que la production de la MEC du cartilage accompagnée également d'une diminution dans la régulation de l'expression du gène codant pour le collagène de type I, caractéristique du tissu osseux. Elder *et al* [107] et Mauck *et al* [108] [109] montrent également que l'utilisation de facteur de croissance de la famille des TGF- $\beta$  sur des chondrocytes en biomatériaux 3D, améliore les propriétés mécaniques du nouveau cartilage formé.

Le dernier élément du triptyque de l'ingénierie tissulaire est le biomatériau, qui va servir de support à la cellule, il doit respecter certaines règles: biodégradable, bioactif pour la régulation et la

migration des cellules et une architecture avec une porosité suffisante pour la répartition homogène des cellules et la diffusion des nutriments et facteurs [67], [80], [110], [79], [111], [85], [75]. Les approches utilisant des biomatériaux appelés « scaffolds » (matrices) et des CSMs pour traiter le cartilage ont testé une grande variété de biomatériaux [80], [110], [79], [85], [75] tels que le collagène [112], [113], [114], [115], le collagène avec des glycosaminoglycanes [116], [117], [118], l'alginate, l'agarose, le chitosan et l'acide hyaluronique. Un des objectifs de ces biomatériaux est de se rapprocher des propriétés mécaniques du tissu natif ce qui reste très difficile à atteindre [119]. En effet, ce biomatériau joue un rôle sur le comportement cellulaire permettant de fabriquer un tissu néoformé avec un comportement élastique [120] et/ou viscoélastique [121].

L'ingénierie du cartilage est une technique destinée à la reconstruction de défauts cartilagineux suite à certaines maladies ou traumatismes. Les défauts cartilagineux touchent donc toutes les catégories d'âge. Il est maintenant bien connu qu'avec l'âge, certaines molécules sont dérégulées au sein de la MEC affectant l'homéostasie de celle-ci et augmentant ainsi le risque de rupture du cartilage [13], [36]. En effet, avec l'âge la balance de production s'inverse et les chondrocytes commencent à entrer en sénescence ne permettant plus de renouveler correctement la MEC [36]. Certaines études démontrent que l'âge interviendrait également sur les fonctionnalités des CSMs [61]. L'âge serait donc un nouveau critère à prendre en compte pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.

L'influence de l'âge sur la prolifération, la réponse cellulaire ainsi que sur la différenciation des CSMs est controversée dans la littérature. L'une des premières études montre que la différenciation est diminuée avec l'âge [122] chez le rat puis chez l'humain particulièrement sur l'ostéogénèse et l'adipogénèse [106], [123], [124], mais peu montrent une différence sur la chondrogénèse [10], [125], [126]. Cependant les études qui ne montrent pas de changement dans la différenciation chondrogénique montrent que l'âge a de l'influence sur la prolifération, l'attachement, la sénescence et l'autorenouvellement des cellules chez la souris [127], le rat [128] et l'humain [123], [129], [130]. D'autres études ne trouvent cependant aucun impact de l'âge sur la réponse des CSMs : prolifération

## *2.1 Introduction*

et différenciation [106], [60]. Cette différence de résultats observés notamment sur la prolifération peut être liée à la forme de la cellule qui n'avait plus la morphologie fibroblastique [124] souvent observée après de nombreux passages cellulaires [131], [132].

Les études traitant de la réparation du cartilage ne prennent que rarement en compte l'âge du donneur alors qu'une influence directe sur les mécanismes cellulaires est souvent mise en évidence. L'objectif de cette partie est donc d'analyser l'influence de l'âge du donneur sur les propriétés structurales et mécaniques d'un greffon de cartilage obtenu par ingénierie tissulaire à partir d'une éponge de collagène de type I sur laquelle sontensemencées des CSMs humaines (CSMh) en présence du facteur de croissance TGF- $\beta$ 1. Pour cela une étude histologique et immunohistochimique a été menée afin de mettre en évidence la synthèse de collagène de type II et de glycosaminoglycane (GAGs) (caractéristique de la différenciation chondrogénique) couplée à une étude sur les propriétés mécaniques du greffon obtenu par ingénierie tissulaire (IT).

## II. Matériels et méthodes

### 2.1. Human mesenchymal stem cells

In the present study two groups of human bone marrow donors based on their ages were selected (i) Group Young (GY) composed by two donors of five and sixteen years old and (ii) Group Old (GO) composed by two donors over 60 years old. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) were isolated from human bone marrow obtained as discarded tissue during routine bone surgery for young donors (GY) and during hip replacement for old donors (GO) after patient informed consent and in accordance with the procedures approved by the Human Experimentation and Ethic Committees of the Lariboisiere Hospital (Paris) and CHRU Nancy (France).

The aspirated bone marrow was diluted in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM). Nucleated cells were suspended in "expansion medium" composed of DMEM low glucose (DMEM-LG, Gibco) containing 10 % (v/v) foetal calf serum (FCS, Sigma, France), 1ng/mL bFGF (Miltenyi biotec SAS, France), 2 mM L-glutamine (Gibco), 100 µg/mL streptomycin et 100 U/mL penicillin (Gibco). Primary nucleated cells were counted and seeded at the density of  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> of tissue-culture polystyrene surface flasks, and were cultured under standard cell culture conditions (37°C, 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). After three days of culture, non-adherent cells were discarded during supernatant media change. The supernatant cell-culture medium was changed three times a week during cell expansion. When the cells were confluent, the hMSCs were detached using 0.25% trypsin-EDTA and were frozen.

### 2.2. Scaffold and in vitro experiments

Cryopreserved MSCs were thawed and expanded until passage 2. During the last passage before seeding in collagen scaffold (passage 3), MSCs were cultured with the "expansion medium" supplemented with sodium pyruvate (110 µg/ml), proline (40 µg/ml, Sigma), dexamethasone ( $10^{-7}$ M, Sigma), ascorbic acid-2-phosphate (50 µg/ml, Sigma).

## 2.2 Matériels et méthodes

The used scaffold was a collagen sponge mainly composed of collagen type I (95%) and collagen type III (5%) manufactured by “Symatèse biomatériaux” company (Chaponost, France). The sponge size was 5 mm diameter and 2 mm thickness with an open porosity (mean pore size was 100µm). MSCs were seeded into sponges after 3 passages at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells/sponge and incubated at 37°C for 4 hours to allow cell attachment. Collagen sponges were then transferred in a 48 well plate already containing 1 ml of “expansion medium” for the first three days. At D3 collagen sponges were cultured under standard cell-culture conditions with a chondrogenic medium Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) high glucose supplemented with ITS+premix (Insulin-Transferrin-Selenium, BD), sodium pyruvate (110 µg/ml, sigma), proline (40µg/ml, Sigma), dexamethasone ( $10^{-7}$ M, Sigma), ascorbic acid-2-phosphate (50 µg/ml, Sigma) supplemented or no with TGF-β1 (10 ng/ml, Miltenyi biotec SAS, France). The supernatant cell-culture medium was changed two times a week.

For each donor, twelve collagen sponges constructs were cultured during 28 and 56 days i.e; 6 without TGF-β1 and 6 with TGF-β1 at 28 days and 6 without TGF-β1 and 6 with TGF-β1 at 56 days. At both end time of the culture, 2 groups were defined: i) 6 constructs (3 samples without TGF-β1 and 3 samples with TGF-β1) were used for qRT-PCR analysis, ii) 6 constructs (3 samples without TGF-β1 and 3 samples with TGF-β1) were frozen (-20°C) for mechanical characterization and for quality of the tissue-engineered substitute (cells aspects, proteoglycan and collagen type II content) by histology and immunohistochemistry.

### 2.3. RNA Isolation & RT-PCR

Derived-hMSCs, from collagen sponges at 28 and 56 days of culture with or without TGF-β1 (n=3 sponges/culture condition/donor), were collected by collagenase enzymatic digestion. Chondrogenic differentiation was assessed by the expression of the mRNA of cartilage interest gene as type II collagen : collagen IIB isoform (COL2A1), aggrecan (ACAN), Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP), Transcription factor SOX-9 (SOX9) and of hypertrophic or osteogenic markers as type X collagen (COL10A1), type I collagen (COL1A1), Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), versican

(VCAN), osteocalcin (BGLAP) and osterix (OSX) using RT-PCR. For this purpose, total RNA was isolated from the cells using the RNeasy mini kit (Qiagen, France), according to the manufacturer's instructions as previously described [115]. The RNA concentration and purity were determined. Following isolation, 500 ng total RNA was reverse-transcribed into cDNA using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, France) according to the manufacturer's instructions. Each Quantitative RT-PCR was performed (RNA equivalent) QuantiTect™ SYBR® GreenPCR (Qiagen). cDNA of each gene was dosed, then diluted to obtain a standard curve of the  $10^{-3}$  to  $10^{-6}$  µg/ml range, which permits quantification of the expression of the gene of interest. For standardization of gene expression levels, Relative gene expression (fold change) was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method and results were expressed as the ratio of the mRNA level of each gene of interest over the RSP29 (Ribosomal protein S29) mRNA. This gene is a house-keeping gene which has a constant expression level in derived-hMSCs independent of culture conditions. The primers are detailed in Table 6

Gene		Primer sequences
<i>RP29</i>	Fwd	5'-AGATGGGTCACCAGCAGCTGTACTG-3'
	Rev	5'-AGACACGACAAGAGCGAGAA-3'
<i>COL2A1</i> (Type II collagen)	Fwd	5'-ATGACAATCTGGCTCCCAAC-3'
	Rev	5'-GAACCTGCTATTGCCCTCTG-3'
<i>COL10A1</i> (Type X collagen)	Fwd	5'-GCTAAGGGTGAAAGGGGTTTC-3'
	Rev	5'-CTCCAGGATCACCTTTTGA-3'
<i>ACAN</i> (Aggrecan)	Fwd	5'-TCGAGGACAGCGAGGCC-3'
	Rev	5'-TCGAGGGGTAGCGTGTAGAGA-3'
<i>VCAN</i> (Versican)	Fwd	5'-TGTTCTCCCACTACCCTTG-3'
	Rev	5'-CTTCCACAGTGGGTGGTCTT-3'
<i>COMP</i> (Cartilage Oligomeric Matrix Cartilage)	Fwd	5'-ACAATGACGGAGTCCCTGAC-3'
	Rev	5'-TCTGCATCAAAGTCGTCCTG-3'
<i>SOX9</i> (Transcription factor SOX-9)	Fwd	5'-GAGCAGACGCACATCTC-3'
	Rev	5'-CCTGGGATTGCCCCGA-3'
<i>RUNX2</i> (Runt-related transcription factor 2)	Fwd	5'-CCCGTGGCCTTCAAGGT-3'
	Rev	5'-CGTTACCCGCCATGACAGTA-3'
<i>BGLAP</i> (osteocalcin)	Fwd	5'-GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT-3'
	Rev	5'-TCAGCCAACTCGTCACAGTC-3'
<i>OSX</i> (Osterix)	Fwd	5'-TAGTGGTTTGGGGTTTGTATTACCGC-3'
	Rev	5'-AACCAACTCACTCTTATTCCTAAGT-3'
<i>COL1A1</i> (type I collagen)	Fwd	5'-AGGTGCTGATGGCTCTCCT-3'
	Rev	5'-GGACCACTTTCACCCTTGT-3'

Tableau 6: Primers sequences for Rt-PCR

#### 2.4. Histology of in vitro tissue engineered substitute

After mechanical testing, collagen sponges were fixed in 10% formalin during 24 hours at 4°C. Each specimen was dehydrated, embedded in paraffin wax, and cut into 5 µm thick sections.

## 2.2 Matériels et méthodes

After deparaffinization, sections were stained using Alcian Blue for proteoglycan content, Sirius red for collagen content and was visualized on an optical microscope (DMD 108, Leica, France).

The recovery percentage of proteoglycan was obtained with image processing software Image J (National Institutes of Health Inc., Bethesda, Maryland, USA).

### 2.5. Immunohistochemistry of in vitro tissue engineered

Immunohistochemistry was performed according to based on avidin-biotin techniques (Envision + Dual Link, DAKO), with primary monoclonal antibodies for type II collagen (Labvision) to assess the degree of chondrogenic MSC differentiation on sponges (n=3 sponges/culture condition/donor). Paraffin-embedded tissue sections of 5µm of collagen (n=3 sponges/culture condition/donor) were deparaffinized treated with pepsin (0,4% w/v, Sigma) for 30 min at room temperature and incubated with hydrogen peroxidase block solution for 5 min to block endogenous peroxidase, according to the manufacturer's recommendations. Sections were counterstained using Mayer's haematoxylin stain. Control sections without the addition of primary antibodies were processed in parallel to rule out nonspecific labelling. Sections were observed with an optical microscope (DMD108, Leica, France). The recovery percentage of type II collagen was obtained with image processing software Image J (National Institutes of Health Inc., Bethesda, Maryland, USA).

### 2.6. Mechanical testing

Nanoindentation tests were performed at the ambient temperature in PBS 1X using a commercial nanoindenter (Agilent Nanoindenter G200, ScienTec, Les Ulis, France) with spheric saphir tip of 0.479mm diameter. Rubber sample was indented at the beginning and the end of each day to ensure a good reliability of the experiment. The location of each indent (three per graft) was set manually on the top of collagen graft using an optical microscope. A load velocity of 5µm/s, a maximum depth of 200 µm, holding of 300s and unload velocity of 0.5µm/s were imposed.

As grafts were considered as viscoelastic material specific model were used to determine threes parameters: Equilibrium Young's modulus ( $E_{eq}$ ), Instantaneous Young's modulus ( $E_{ins}$ ) and viscosity

(Elastic fraction; f) with a custom made Matlab algorithms (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA) [133].

## **2.7. Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using Rstudio software (RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>) with a threshold of 5% corresponding to the alpha-risk and the analysis unit was a collagen graft. Wilcoxon-Mann-Whitney tests (non-parametric) were performed to evaluate the differences between Young (n=6), Old (n=6), between J28 (n=12) and J56 (n=12), between TGF- $\beta$ 1 (n=12) and ITS (n=12).

### III. Résultats

#### 3.1. Morphologie et contraction des éponges

La première caractérisation est la mesure du diamètre de l'éponge cultivée dans toutes les conditions de culture. L'évolution du diamètre est faible et non significative pour les conditions de croissance sans TGF- $\beta$ 1 par rapport à la taille initiale. Au contraire, en présence de TGF- $\beta$ 1, il y a une diminution très significative ( $p < 0,01$ ) de ce diamètre allant de 5mm à 4,22 (+/- 0,27) mm pour toutes les éponges à J28. De plus, dans ces mêmes conditions de culture, il existe une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les diamètres des éponges avec des cellules issues de donneurs âgés et les éponges issues des cellules de donneurs jeunes 4,37 (+/- 0,23) mm et 4,07 (+/- 0,22) mm respectivement. Résultats en annexe n°1.

#### 3.2. Expression des gènes par Rt-PCR quantitative

Dans cette étude, nous avons comparé l'expression génique des CSMh de donneurs âgés ou jeunes cultivées dans une éponge de collagène de type I avec ou sans TGF- $\beta$ 1.

La figure 19, montre l'expression des différents gènes liés aux composants de la matrice extracellulaire et des marqueurs ostéogéniques: Collagène de type II, Sox9, Aggrécane, COMP, Collagène de type X, Collagène de type I, RunX2, Versican, Osterix et Osteocalcine.

L'effet de l'âge du donneur et de la présence de TGF- $\beta$ 1 ont été déterminés. Il y avait une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les éponges cultivées en présence de TGF- $\beta$ 1 et sans TGF- $\beta$ 1. Comparé aux résultats obtenus avec les contrôles respectifs (éponges cultivées sans TGF- $\beta$ 1), l'expression des gènes liés aux composants de la MEC était multipliée par 36 pour COL2A1, par 3 pour SOX9, par 16 pour ACAN et par 35 pour COMP, l'expression des gènes liés à l'hypertrophie était multipliée par 89 pour col10A1 et l'expression des gènes liés aux marqueurs ostéogéniques était diminuée de 0,6 pour VCAN, 0,3 pour BGLAP et 0,4 pour OSX. Les résultats sont les mêmes à 56 jours (données non présentées).

Il a également été observé que les gènes Col2A1 et COMP étaient surexprimés de manière significative ( $p < 0,05$ ) dans les cellules de donneurs plus âgés comparativement aux cellules de donneurs jeunes à J28 ainsi qu'une sous-expression des marqueurs ostéogéniques OSX et BGLAP. La même analyse réalisée à 56 jours montre une inversion de tendance non significative sur les gènes liés aux composants de la matrice extracellulaire en faveur des donneurs jeunes.

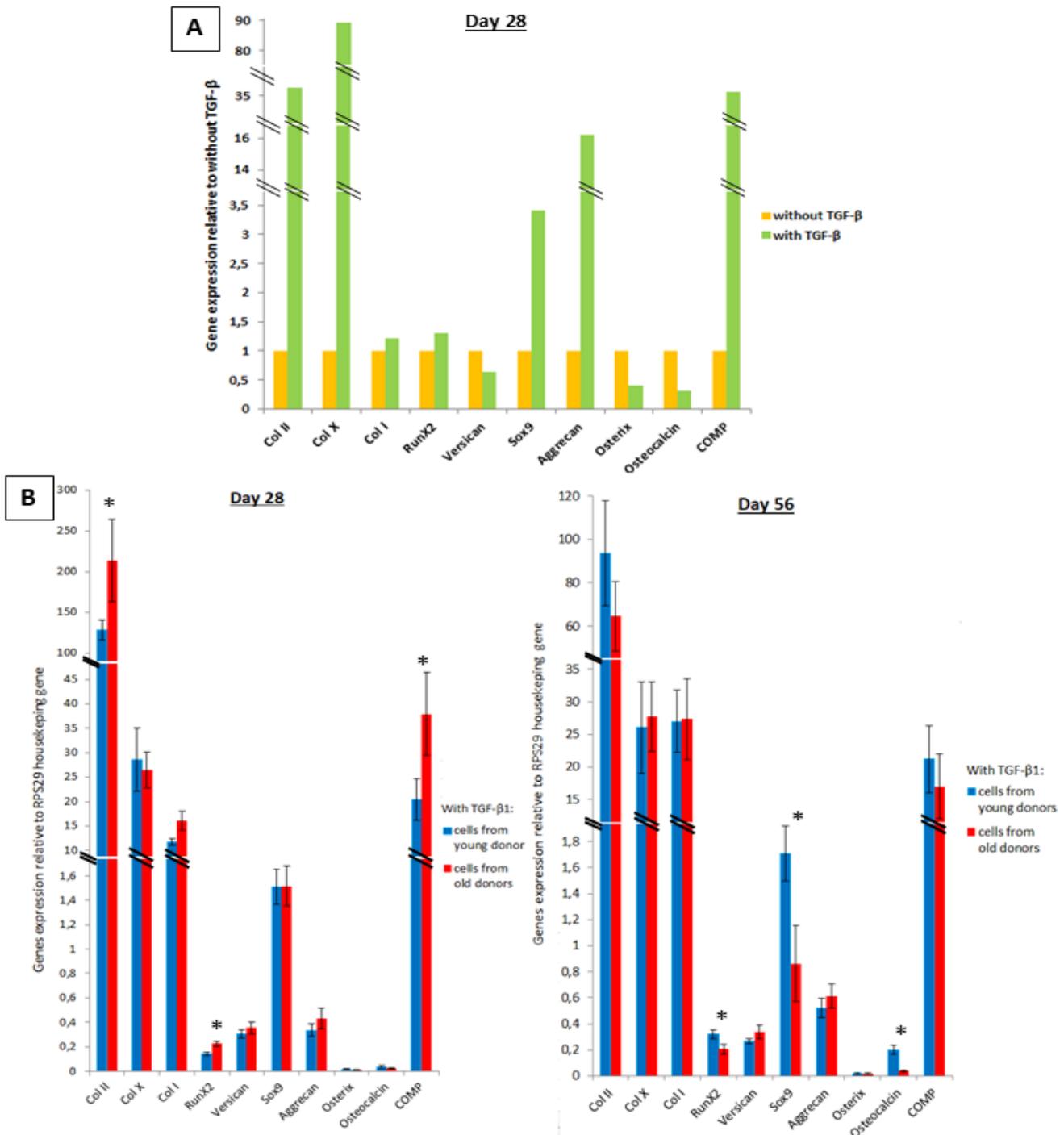


Figure 19 : RT-PCR réalisée sur les éponges avec les CSMh des donneurs jeunes ou âgés, avec ou sans TGF- $\beta$ 1, après 28 jours ou 56 jours de culture. Les gènes pour le Collagène de type II, X et I, RunX2, Versican, SOX-9, Aggrécane, Ostérix, Ostéocalcine et COMP sont mesurés. Les résultats sont représentés tel que le niveau d'expression des CSMh avec TGF- $\beta$ 1 par rapport à sans TGF- $\beta$ 1,  $n=12$  (A), le niveau d'expression des CSMh des donneurs jeunes ou âgés par rapport au gène de référence RPS29,  $n=6$  (B). \* $p < 0.05$  avec un test de Mann Whitney entre les donneurs jeunes (bleu) et les donneurs âgés (rouge).

### 3.3. Synthèse de la matrice extracellulaire (collagène de type II) dans les éponges de collagène avec ou sans TGF- $\beta$ 1

La figure 20 montre la production de collagène de type II obtenue par immunohistochimie de toutes les conditions. Une seule éponge représentative de chaque condition de culture est montrée. Pour toutes les conditions, c'est à dire le temps de culture ou l'âge du donneur, l'absence de TGF- $\beta$ 1 mène à une absence de production de collagène de type II. Au contraire dans le groupe TGF- $\beta$ 1, la production de collagène est visible et dépendante de l'âge du donneur. En particulier, pour chaque temps de culture, la production de collagène de type II est plus importante pour les donneurs âgés que pour les donneurs jeunes significativement. Pour les deux groupes de donneurs, il est aussi observé, que la production de collagène de type II continue d'augmenter au cours du temps.

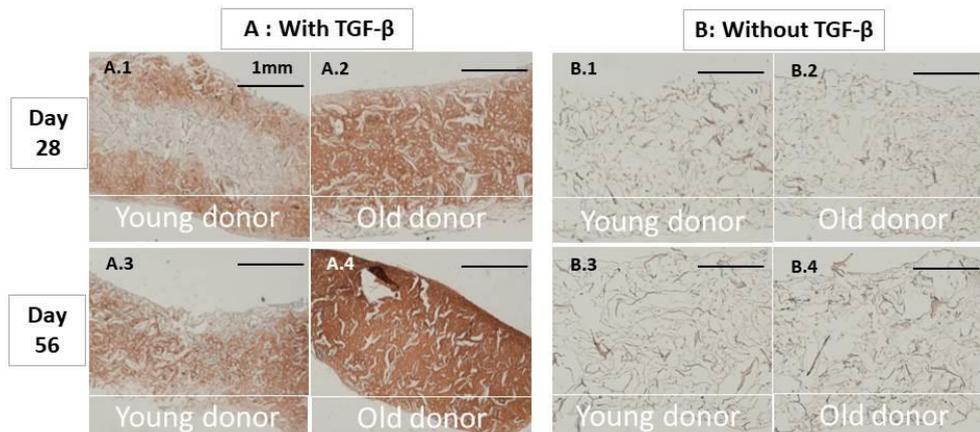


Figure 20 : Immunohistochimie de la production de la MEC du cartilage avec (A) ou sans (B) TGF- $\beta$ 1 : Production du collagène de type II des CSMh des donneurs jeunes (A.1, B.1, A.3, B.3) ou donneurs âgés (A.2, B.2, A.4, B.4) après 28 jours (haut) ou 56 jours (bas) de culture.

### 3.4. Synthèse de la matrice extracellulaire (Glycosaminoglycanes) dans les éponges de collagène avec ou sans TGF- $\beta$ 1

La figure 21 montre la production des glycosaminoglycanes (GAGs), un autre élément important de la MEC du cartilage, obtenue par histologie (coloration au bleu alcian) pour toutes les conditions de culture. Une seule éponge représentative de chaque condition de culture est montrée. Comme pour le collagène de type II, l'absence de TGF- $\beta$ 1 mène à une absence de production des GAGs. Au

contraire, dans le groupe TGF- $\beta$ 1, la production de GAGs est visible et dépendante de l'âge du donneur. En particulier, la production au bout de 28 jours des GAGs est plus importante chez les donneurs âgés que chez les donneurs jeunes de manière significative. Cependant, il a été observé que la production des GAGs continue d'augmenter au cours du temps chez les donneurs jeunes uniquement.

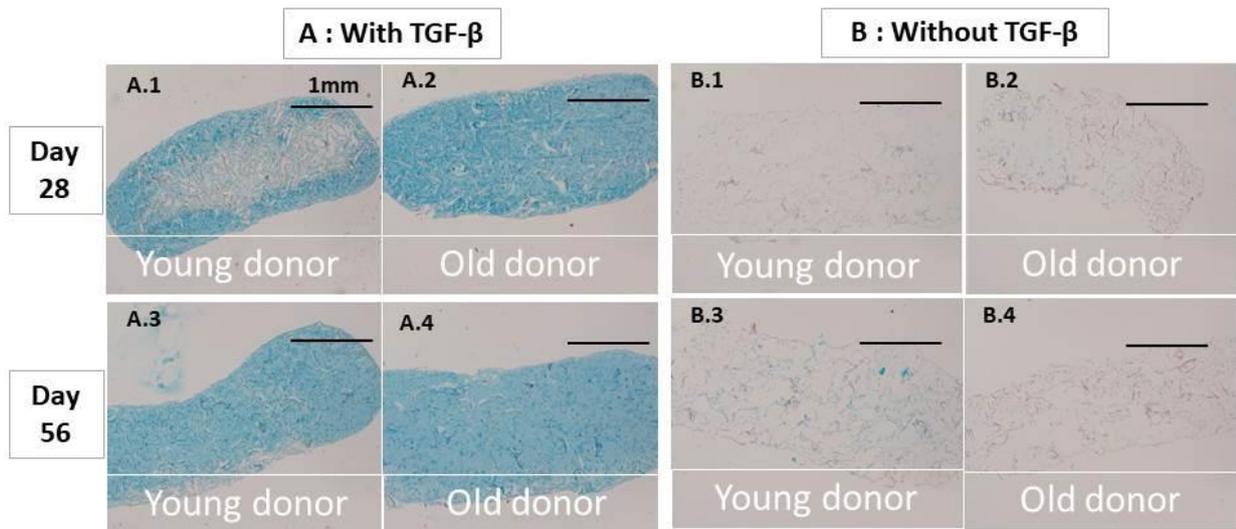


Figure 21 : Histologie de la production de la MEC du cartilage avec (A) ou sans (B) TGF- $\beta$ 1 : Production des GAGs par les CSMh des donneurs jeunes (A.1, B.1, A.3, B.3) ou donneurs âgés (A.2, B.2, A.4, B.4) après 28 jours (haut) ou 56 jours (bas) de culture.

La figure 22 montre la quantité moyenne de GAGs par éponge obtenue à partir de la méthode de Goldberg exprimée en  $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ . Cette mesure quantitative confirme les résultats histologiques. L'absence de TGF- $\beta$ 1 mène à une production presque nulle de GAGs. Au contraire, dans le groupe TGF- $\beta$ 1, la production est plus élevée (multipliée par 12 à J28 et par 12 à J56). De plus, la production de GAGs dépend significativement de l'âge du donneur. En particulier, à J28, la production de GAGs est plus importante chez les donneurs âgés que chez les donneurs jeunes. A J56, le phénomène opposé a été observé, c'est à dire que la production de GAGs est plus importante chez les donneurs jeunes que chez les donneurs âgés.

### 2.3 Résultats

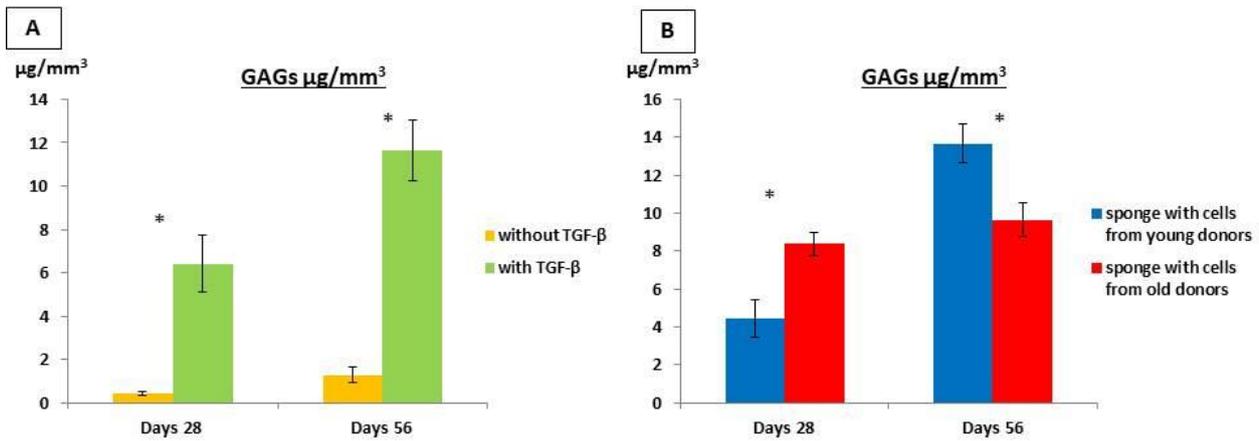


Figure 22 : Les graphiques représentent le volume total de GAGs par éponge avec les CSMh de donneurs jeunes ou de donneurs âgés, avec ou sans TGF-β1 et après 28 ou 56 jours de culture. Les résultats représentent la teneur en GAGs des CSMh avec TGF-β1 et sans TGF-β1, n=12 (A). Les résultats représentent la production de GAGs des CSMh provenant de donneurs jeunes ou de donneurs âgés, n=6 (B). Les données sont présentées par la moyenne +/- SD. \* p < 0,05 test Mann Whitney entre le groupe jeune (bleu) et le groupe âgé (rouge) et entre les conditions sans (orange) ou avec (vert) TGF-β1

### 3.5. Propriétés mécaniques du greffon

Les différents paramètres mécaniques obtenus, c'est à dire module instantané, fraction élastique et contrainte sont représentés sur la figure 23.A.  $E_{ins}$  représente le comportement du matériau en dynamique,  $E_{eq}$  représente le comportement du matériau en statique et la fraction élastique est le rapport de  $E_{eq} / E_{ins}$ . La culture en présence de TGF-β1 mène à des propriétés mécaniques plus élevées qu'en absence de TGF-β1 pour les deux temps de culture à J28 et J56. (données non montrées pour J56). De plus la fraction élastique diminue significativement pour le groupe TGF-β1, ce qui reflète un comportement plus visqueux pour ces types d'éponge. Même si les résultats ne sont pas significatifs, l'influence de l'âge se retrouve ici de nouveau en présence de TGF-β1. La figure 23.B, montre que les éponges issues des donneurs âgés ont des propriétés mécaniques plus élevées que celles issues des donneurs jeunes après 28 ou 56 jours de culture. Ceci se traduit par une plus faible diminution de la fraction élastique chez les donneurs jeunes que chez les donneurs âgés.

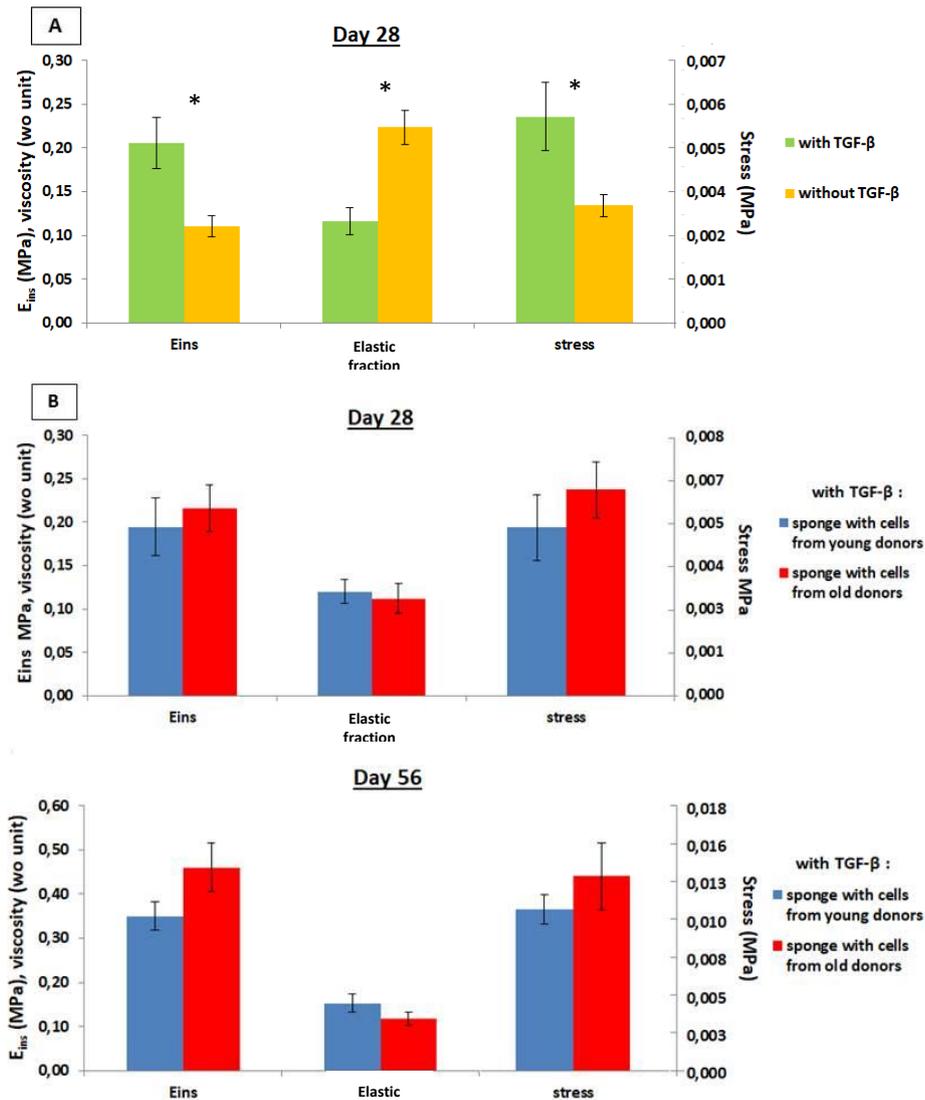


Figure 23 : Module instantané (gauche), facteur élastique (centre) et contrainte (droite) du greffon issu des donneurs jeunes ou âgés, avec (A), n=12, ou sans (B), n=6, TGF-β1 après 28 jours ou 56 jours de culture. Les données sont présentées par la moyenne +/- SD. \*p<0.05 test Mann Whitney entre les conditions avec (vert) et sans (orange) TGF-β1.

### 3.6. Corrélation entre les propriétés mécaniques et la quantité de GAGs et de collagène de type II

Les figures 24.A et 24.B représentent pour chaque éponge, le module instantané en fonction de la quantité de GAGs obtenue par la méthode de Goldberg et du collagène de type II obtenu par immunohistochimie, respectivement. Les points rouges représentent les éponges cultivées sans TGF-β1, les points bleus et verts correspondent aux valeurs obtenues en présence de TGF-β1 pour les donneurs jeunes et âgés respectivement.

### 2.3 Résultats

En ce qui concerne les GAGs, il existe une corrélation linéaire entre la quantité de GAGs et les propriétés mécaniques. Il est clair que les éponges obtenues avec des donneurs âgés sont relativement épargnées par le temps de culture, alors que pour les donneurs jeunes, la quantité de GAGs est plus faible à 28 jours et plus élevée à 56 jours.

En ce qui concerne les niveaux de collagène de type II, une relation polynomiale semble être plus appropriée pour décrire la relation entre les niveaux de collagène de type II et les propriétés mécaniques. Les éponges provenant de donneurs âgés ont des taux plus élevés de collagène de type II et des propriétés mécaniques supérieures à celles obtenues avec les éponges de donneurs jeunes.

A noter que ces corrélations peuvent être trouvées pour les différents paramètres mécaniques (Stress, fraction élastique - données non fournies).

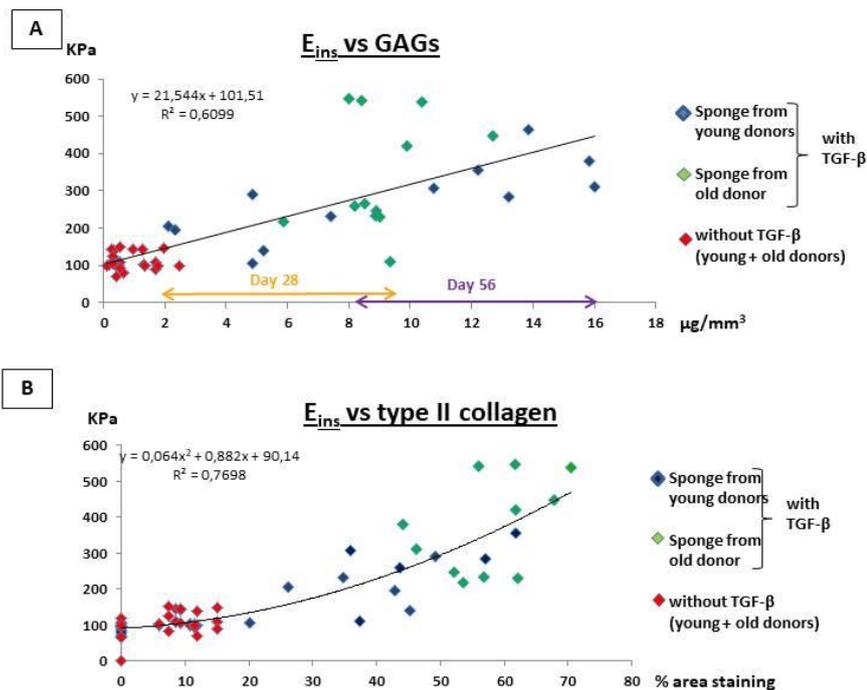


Figure 24 : Corrélation entre le module instantané et la quantité de GAGs (A), Corrélation entre le module instantané et la teneur en collagène de type II (B). Les données sont représentées pour chaque valeur des greffons pour les CSMs de donneurs jeunes et âgés, pour une durée de 28 ou 56 jours de culture, avec ou sans TGF- $\beta$ 1.

## IV. Discussion

Grâce à cette étude, combinant CSMh et un biomatériau à base de collagène de type I, nous avons pu démontrer qu'en présence de facteur de croissance tel que TGF- $\beta$ 1, les propriétés mécaniques du greffon issu de l'IT sont améliorées ainsi que la synthèse des protéines de la matrice du cartilage articulaire : collagène de type II et glycosaminoglycanes (GAGs). L'âge du donneur, facteur primordial pour l'ingénierie tissulaire, influence la prolifération et la multiplication cellulaire en 2D. En trois dimensions, ce qui à notre connaissance est très peu étudiée, on observe une faible modification des propriétés mécaniques mais une variation significative de la morphologie du greffon ainsi que la synthèse des protéines de la matrice du cartilage, notamment le collagène de type II.

L'effet de TGF- $\beta$ 1 sur l'expression des gènes caractéristiques de la chondrogenèse ainsi que la synthèse de collagène de type II et des GAGs est déjà très étudié sur les CSMs humaines dans la littérature principalement en pellet ou micro mass [71], [106] et quelques études en 3D avec l'utilisation d'une matrice d'hydroxyapatite [124] ou de cartilage de porc homogénéisé et lyophilisé [134]. Cependant, à notre connaissance, il y a peu ou pas d'étude sur les propriétés mécaniques combinant une matrice et des hMSCs. Mauck *et al* [108] ont étudié l'effet de TGF- $\beta$ 3 sur la chondrogenèse de CSMs de bœuf sur un gel d'agarose. Ils ont corrélé le module à l'équilibre avec la quantité de GAGs synthétisée et le module dynamique avec celle du collagène de type II. Dans notre étude, comme dans celle de Mauck *et al* [108], l'augmentation des propriétés mécaniques est significativement plus élevées avec TGF- $\beta$ 1 et corrélées avec la quantité de collagène de type II et des GAGs.

La chondrogenèse des CSMs ou le maintien du phénotype chondrocytaire n'est possible que sur un support 3D, la perte du phénotype entraîne la synthèse d'os ou un retour à la forme fibroblastique. Il existe une grande variété de biomatériau 3D, homogène, dans l'ingénierie du cartilage notamment des hydrogels et des « pre-made porous scaffold » (comme polycaprolactone (PCL) , ou les éponges de collagène) [67], [80]. Dans cette étude, nous nous sommes orientés vers les éponges de collagène

## 2.4 Discussion

afin de garantir une reproductibilité entre les différentes matrices, mais aussi afin d'obtenir une certaine rigidité mécanique et une composition biocompatible avec l'organisme. La limitation principale dans le choix de la matrice est la réponse cellulaire qui est souvent liée au type de biomatériaux [75] notamment au niveau de leurs constituants, leurs propriétés mécaniques et leur intégration avec le cartilage natif. Une limitation de notre étude est donc liée au choix de ce biomatériau.

Nous avons observé que l'âge du donneur a un impact sur le comportement des CSMs notamment au niveau de la multiplication cellulaire qui est deux fois plus rapide chez les jeunes en 2D (3/4 jours pour les jeunes et 7/8 jours pour les âgés) dans notre étude. Ce résultat est cohérent avec la majorité de la littérature étudiant la multiplication cellulaire chez l'homme ou l'animal [123], [125], [131]. Cependant certaines études ne montrent pas d'influence de l'âge du donneur sur la prolifération et la multiplication [71], [106] cela est dû en général à un manque de donneur très jeune dans l'étude, la comparaison se fait entre adultes et âgés.

L'âge du donneur ayant un impact sur le comportement cellulaire des CSMs en 2D, Il est normal de s'attendre à un même comportement lors de la différenciation chondrogénique sur une matrice 3D dans un milieu chondrogénique. A ce sujet, plusieurs études montrent un impact de l'âge des donneurs sur la différenciation ostéogénique, adipogénique mais pas sur la différenciation chondrogénique chez le rat [122], la souris [131], le cheval [135] et chez l'humain [71], [106], [123], [124] et [136]. Encore une fois l'influence de l'âge du donneur est controversée, Stolzing *et al* [125] montre l'impact de l'âge avec une meilleure chondrogenèse chez les adultes (19-40 ans) puis les jeunes (7-18 ans) et enfin les personnes âgés (>40 ans). Toutes ces études ont été réalisées soit en culture de pellet ou micro masse qui demande une grande concentration cellulaire et pas de biomatériau. Dans notre étude, nous montrons que les cellules de donneurs âgés synthétisent plus de collagène de type II et de GAGs de manière significative ce qui est contraire aux résultats de la

littérature. Cela peut provenir du fait que l'étude est réalisée sur un biomatériau 3D contrairement à toutes les études précédentes.

La plupart des études sont réalisées avec la culture en pellet, cependant ce n'est pas le meilleur environnement 3D d'étude pour l'ingénierie tissulaire. Une des différences observables de la chondrogenèse est l'augmentation du volume pour une culture en pellet alors qu'il est associé à une rétraction de la matrice [137]. En effet, Kim *et al* [138] ont montré que les chondrocytes ou les CSMs se regroupent et rétractent la matrice lors de la différenciation grâce à une protéine synthétisée par les chondrocytes nommée 'Smooth Muscle Action' (SMA). Dans notre étude, une réduction du diamètre est observée pour les greffons en présence de TGF- $\beta$ 1 chez les donneurs jeunes plus importante. Cette contraction de la matrice est également associée à la réticulation de celui-ci comme montrée lors d'études avec des chondrocytes [137], [118], [139] et [140] ou les CSMs [118], [134]. Pfeiffer *et al* [137] et Rowland *et al* [134], montrent que la contraction de la matrice permet une augmentation de la densité au même endroit favorisant les liens cellules-cellules déclenchant la différenciation cellulaire. Ils montrent également que l'augmentation de la rigidité du greffon est associée avec une perte en GAGs ce qui pourrait expliquer la diminution des GAGs à J56 chez les donneurs âgés et leurs propriétés mécaniques plus élevées.

Notre étude montre que l'âge du donneur joue un rôle très faible sur les propriétés mécaniques même si une tendance se dessine en faveur de propriétés plus fortes avec les matricesensemencées à partir des cellules de donneurs âgés plutôt que jeunes. La matrice du cartilage est composée d'eau, de collagène de type II, de GAGs et d'autres molécules qui interviennent dans sa structure et ses propriétés. Treppo *et al* [141] montre qu'en corrélant les propriétés mécaniques avec la synthèse de GAGs, l'eau et l'hydroxyproline, il augmente le coefficient de Pearson d'un  $R^2=0.4$  à un  $R^2=0.8$ . Dans notre étude, à J28, la synthèse de collagène de type II et de GAGs est plus importante sur les greffons à partir de cellules de donneurs âgés. Cependant, à J56 la synthèse de collagène de type II est plus importante chez les donneurs âgés mais la synthèse de GAGs est plus faible par rapport aux

donneurs jeunes. Ceci montre comme Treppo *et al* qu'il est nécessaire de prendre en compte la synthèse de GAGs et de collagène de type II dans la détermination et l'interprétation des propriétés mécaniques.

## V. Conclusion

Au sein d'un biomatériau de collagène de type I, TGF- $\beta$ 1 est primordial pour la différenciation chondrogénique des CSMh au niveau de la synthèse des protéines de la matrice du cartilage et des propriétés mécaniques du cartilage néoformé. Un autre facteur qui est l'âge du donneur intervient dans la différenciation chondrogénique en faveur des cellules de donneurs âgés avec une synthèse plus importante de collagène de type II et de GAGs ainsi qu'une tendance vers des propriétés mécaniques plus fortes. L'âge du donneur est donc un facteur primordial pour l'ingénierie tissulaire. Dans notre étude, à J56 la synthèse de collagène de type II est plus importante chez les donneurs âgés mais la synthèse de GAGs est plus faible par rapport aux donneurs jeunes. Cela laisse supposer un retard chez les cellules de donneurs jeunes mais pas une absence de réponse aux stimuli.

Afin d'aller plus loin dans cette différence de comportement cellulaire selon l'âge, la partie III présente une étude *in vivo* qui a pour objectif de valider l'influence de l'âge du donneur sur l'ingénierie tissulaire du cartilage.

# Partie III : L'âge du donneur dans l'ingénierie tissulaire – étude *in vivo*

---

## I. Introduction

De nos jours, la réparation du cartilage articulaire est un défi clinique et scientifique dont l'objectif est le soulagement de la douleur et la restauration de la fonction articulaire. En effet, le cartilage présente un faible taux d'autorenouvellement et sa réponse à une lésion ne permet pas de reformer un tissu fonctionnel durable[101], [103]. Quand la lésion du cartilage articulaire s'étend à l'os sous-chondral, les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) de la moelle osseuse de l'os sous-chondral, migrent dans la zone endommagée et réorganisent le tissu cartilagineux qui finira par dégénérer sur le long terme [40].

Dans le cas de défauts purement chondraux, la guérison n'est pas spontanée : les chondrocytes vont répondre en proliférant et en augmentant la synthèse des molécules de la matrice extracellulaire (MEC) près de la lésion mais cette nouvelle matrice ne réparera pas entièrement le défaut. Actuellement, le remplacement de l'articulation par une prothèse est l'approche clinique la plus courante, mais reste encore limitée dans le temps. Certaines des stratégies afin de réparer le cartilage articulaire et de le rendre fonctionnel sur le long terme sont encore en cours d'amélioration comme la transplantation de cellules chondrogéniques ou CSMs, les micro-fractures, la mosaïcoplastie ou l'ingénierie tissulaire.

Toutes ces techniques sont développées et améliorées sur des animaux avant d'être proposées en tant que thérapie à l'homme. Le choix du modèle animal est compliqué car il n'y a pas de « gold standard », ni de modèle animal idéal. Son choix va dépendre de la question posée [4]–[6]. Le modèle animal fournit des informations cliniques cruciales sur l'évolution de la lésion articulaire, de

### 3.1 Introduction

son environnement et des réponses aux traitements. Les petits animaux sont le plus souvent utilisés, car ils sont relativement peu onéreux, faciles à manipuler et à héberger, la perception du public est plus aisée qu'avec les grands animaux mais la gestion post-opératoire est compliquée et l'obtention de prélèvements de taille suffisante est un facteur limitant à leur utilisation. Les gros animaux sont quant à eux très onéreux, plus difficiles à héberger, plus près de l'homme par la taille de leur articulation et une gestion post-opératoire plus simple. Le rat est une espèce souvent utilisée dans le domaine de la réparation du cartilage articulaire qu'il s'agisse de thérapie génique, de transplantation de cellules souches [142] ou encore d'utilisation de facteurs de croissance. De plus, il existe chez les rats et les souris des animaux immunosupprimés permettant l'étude du potentiel de réparation de cellules xénogéniques provenant notamment de sources humaines.

L'ingénierie tissulaire (IT) est une méthode prometteuse. Elle repose sur trois composants : les cellules pour fabriquer la matrice, un biomatériau adapté à la transplantation et des molécules bioactives [143]. Au sujet des cellules, le choix s'est porté sur les CSMs pour leur facilité d'approvisionnement et leur propriétés [54]. Les molécules bioactives commencent à être bien connues et les biomatériaux sont toujours plus nombreux et plus performant au cours des années. L'un des facteurs qui n'est pas ou peu pris en compte est l'âge du donneur chez lequel sont prélevées les cellules.

Novelli *et al* mettent en avant l'effet de l'âge sur les changements morphologique, chimique et mécanique que peut subir le cartilage articulaire [10]. Avec l'âge, l'épaisseur du cartilage diminue, la concentration en protéoglycanes et en eau diminue, la taille des fibres de collagène augmentent, augmentant la rigidité et la fragilité du cartilage [10]. Les chondrocytes de patients âgés ne sont donc pas de très bons candidats. Au sujet des CSMs, nous avons vu lors du chapitre précédent que l'âge du donneur avait également un impact sur l'activité de ces cellules en 2D (multiplication et prolifération) mais également en 3D sur la qualité du greffon obtenue par l'IT. Les cellules de donneurs jeunes sont plus actives au niveau 2D pour la multiplication mais les cellules de donneurs âgés fabriquent plus de

matrice en environnement 3D, augmentant légèrement la qualité des greffons. Ce qui amène à se poser la question du devenir du greffon une fois en place dans le défaut cartilagineux.

L'objectif de cette partie est d'analyser l'influence de l'âge du donneur sur la réparation d'un défaut ostéochondral et sur les propriétés structurales et mécaniques du cartilage autour du défaut. Pour cela un défaut ostéochondral a été réalisé dans un modèle animal de rat Nude (i.e. immunosupprimé), puis comblé par un greffon issu de l'ingénierie tissulaire (partie II) durant 28 jours. Pour cela, différentes techniques ont été utilisées (imagerie, mécanique, histologie) afin de caractériser le défaut et la réparation de celui-ci couplées à une étude sur les propriétés mécaniques et microscopique des zones entourant le défaut.

## II. Materials and methods

### 2.1. Human mesenchymal stem cells

In the present study two groups of human bone marrow donors were selected based on their ages (i) the Young Group (GY) was composed by two donors of five and sixteen years old and (ii) the Old Group (GO) was composed by two donors over 60 years old. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) were isolated from human bone marrow obtained as discarded tissue during routine bone surgery for young donors (GY) and during hip replacement for old donors (GO) after patient informed consent and in accordance with the procedures approved by the Human Experimentation and Ethic Committees of the Lariboisiere Hospital (Paris) and CHRU Nancy (France).

The aspirated bone marrow was diluted in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM). Nucleated cells were suspended in "expansion medium" composed of DMEM low glucose (DMEM-LG, Gibco) containing 10 % (v/v) foetal calf serum (FCS, Sigma, France), 1ng/mL bFGF (Miltenyi biotec SAS, France), 2 mM L-glutamine (Gibco), 100 µg/mL streptomycin et 100 U/mL penicillin (Gibco). Primary nucleated cells were counted and seeded at the density of  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> of tissue-culture polystyrene surface flasks, and were cultured under standard cell culture conditions (37°C, 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). After three days of culture, non-adherent cells were discarded during supernatant media change. The supernatant cell-culture medium was changed three times a week during cell expansion. When the cells were confluent, the hMSCs were detached using 0.25% trypsin-EDTA and were frozen.

### 2.2. Scaffold and *in vitro* experiments

Cryopreserved MSCs were thawed and expanded until passage 2. During the last passage before seeding in collagen scaffold (passage 3), MSCs were cultured with the "expansion medium" supplemented with sodium pyruvate (110 µg/ml), proline (40 µg/ml, Sigma), dexamethasone ( $10^{-7}$ M, Sigma), ascorbic acid-2-phosphate (50 µg/ml, Sigma).

The scaffold used was a collagen sponge mainly composed of collagen type I (95%) and collagen type III (5%) manufactured by “Symatèse biomatériaux” company (Chaponost, France). The sponge size was 5 mm diameter and 2 mm thickness with an open porosity (mean pore size was 100µm). MSCs were seeded into sponges after 3 passages at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells/sponge and incubated at 37°C for 4 hours to allow cell attachment. Collagen sponges were then transferred in a 48-well plate containing 1 ml of “expansion medium” for the first three days. At day 3 collagen sponges were cultured under standard cell-culture conditions with a chondrogenic medium Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) high glucose supplemented with ITS+premix (Insulin-Transferrin-Selenium, BD), sodium pyruvate (110 µg/ml), proline (40 µg/ml, Sigma), dexamethasone ( $10^{-7}$ M, Sigma), ascorbic acid-2-phosphate (50 µg/ml, Sigma) supplemented with TGF-β1 (10 ng/ml, Miltenyi biotec SAS, France). The supernatant cell-culture medium was changed twice a week.

For each donor, nine collagen sponges constructs were cultured during 28 days. At the end time of the culture, 3 groups were defined: i) 3 constructs were used for qRT-PCR analysis, ii) 3 constructs were frozen (-20°C) for mechanical characterization and for studying the quality of the tissue-engineered substitute (cells aspects, proteoglycan and collagen type II content) by histology and immunohistochemistry and iii) 3 constructs were implanted in rats.

### 2.3. Animal experiments

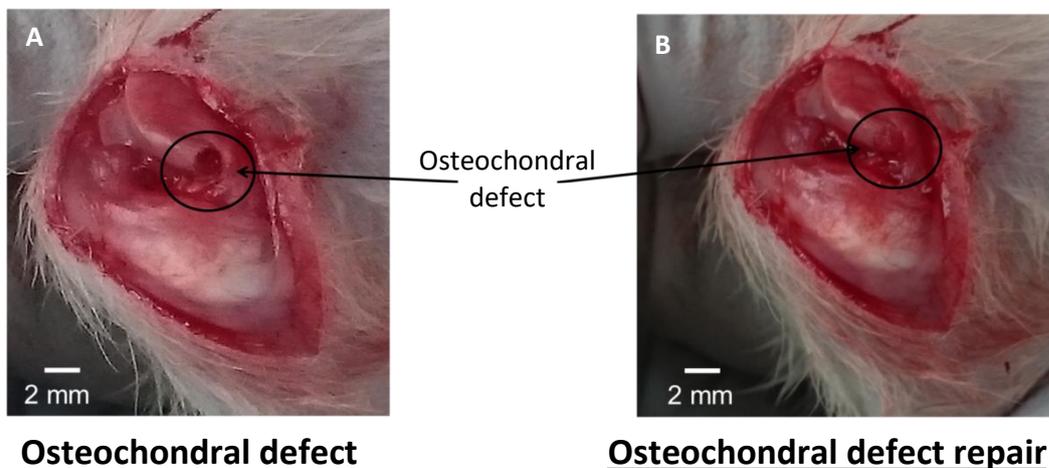


Figure 25 : Pictures of the osteochondral defect on the right femoral condyle in a Nude rat. A: free osteochondral defect, B: Osteochondral defect filled with the cartilage graft (just after implantation).

### *3.2 Matériels et méthodes*

All of the experiments and procedures involving animals were approved by LECAE (Lorrain Ethics Committee on Animal Experimentation) and were performed in full accordance with European legislation. Eighteen healthy adult male Nude rats (aged eight weeks old, weighting about 242 g +/- 14g) free of degenerative joint disease were obtained from a licensed vendor (Charles River Laboratories, Saint Germain Nuelles, France). After two weeks in acclimatization and quarantine, rats were anesthetized by an initial intramuscular injection of ketamine (followed by ventilation with isoflurane if necessary during the experiment with mask). An osteochondral defect was realized, performed by a qualified person in animal surgery, in the right medial femoral condyle called thereafter "MO, Medial Operated" of eighteen rats. A full-thickness defect of 2mm diameter and 2mm depth on articular cartilage of right condyle was made with a hand drill (figure 25). Six Rat had MO defect filled with sponge + GY cells called "Young", six with sponge + old's cells called "Old" and six were not filled called "SR" (Spontaneous Reparation) which is the control operated group. After the surgery, rats were not immobilized and were allowed to ambulate freely in their cages (three rats per cage) immediately after awakening. The stability of the graft was ensured by repeated flexion of the knee. The joint capsule and the skin were closed by resorbable vicryl sutures.

#### **2.4. Sample preparation**

After twenty-eight days, rats from Young, Old and SR groups were euthanized. Both knees were explanted and carefully dissected. Immediately, MO repair tissue scored with binocular magnifying glass (x2) according to five parameters taking into account the quality of filling tissue [91]. The score varied from 0 (absence of repair) to 12 (normal cartilage).

Right and left knee (femurs and tibias) from each groups (Young, old and SR) were stored at -20°C into wet compresses of PBS 1X until their utilization for experimentations. The femoral knee (right and left) were thawed at room temperature for a couple of hours and stayed entire for the measurement (lateral and medial condyle were not separated). All measurements of each sample

were realized within a day in the following order: nanoscanner imaging, nanoindentation, multiphoton imaging. Moreover, both right and left knees of one rat were analyzed the same day.

On the right knee, the medial and lateral condyle were called “MO” (medial operated) and “LO” (lateral operated) respectively. On the left knee, the medial and lateral condyle called “MNO” (medial no-operated) and “LNO” (lateral no-operated) respectively.

## **2.5. High-resolution X-ray computed tomography**

Nanoscanner experiments were performed using an X-ray computed tomography (Phoenix Nanotom, GE Sensing & Inspection Technologies GmbH, Wunstorf, Germany). Each femoral condyle sample was immersed in a physiologic saline solution (NaCl 0.9%) in a cryotube then imaged with the nanoscanner equipped with a highpower nanofocus tube with molybdenum target. Projection images on a CDD camera were obtained at 90kV and 120 $\mu$ A with a resolution of 4.25 $\mu$ m<sup>3</sup>. A rotation of 0.15° was used between each image acquisition, providing a series composed of 2400 projection images. The software Phoenix Datos reconstruction (GE Sensing & Inspection Technologies GmbH, Wunstorf, Germany) was used to reconstruct a stack of 2- sections for each bone sample and stored as TIF files. In order to obtain an 3D image of whole condyles, software VGStudio (GE Sensing & Inspection Technologies GmbH, Wunstorf, Germany) was used.

## **2.6. Nanoindentation test of articular cartilage**

To minimize the bias of topographical variation, knees were cut in order to obtain the bearing zone on the top of cartilage and have an entire contact surface between cartilage and nanoindenter tip (tip and cartilage are perpendicular). Nanoindentation tests were performed at ambient temperature in PBS 1X using a commercial nanoindenter (Agilent Nanoindenter G200, ScienTec, Les Ulis, France) with spheric saphir tip of 0.479mm diameter. Rubber sample was indented at the beginning and the end of each day to ensure a good reliability of the experiment. The location of each indent (three per

### 3.2 Matériels et méthodes

area) was set manually on the top of collagen graft using an optical microscope. A load velocity of  $5\mu\text{m/s}$ , a maximum depth of  $20\mu\text{m}$ , holding of 400s and unload velocity of  $0.05\mu\text{m/s}$  were imposed.

As condyles were considered as viscoelastic material, specific models were used to determine three parameters: Equilibrium Young's modulus ( $E_{eq}$ ), Instantaneous Young's modulus ( $E_{ins}$ ) and viscosity (Elastic fraction;  $f$ ) with a custom made Matlab algorithms (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA) [133].

#### 2.7. Multiphoton imaging

Biphotonic confocal microscopy (BCM) was used to investigate the microstructure of the cartilage in bearing area. Second harmonic generation (SHG) from collagen and autofluorescence from cells were excited by a wavelength of 850 nm. Lights were collected on two channels specific band-pass filters of 400-490 and 500-550 nm, respectively. A 25x, 1.1 numerical apertures, water immersion objective (CFI Apo LWD 25XW, Nikon) was used. The image field of view was  $1024 \times 1024$  pixels with a resolution of  $0.5\mu\text{m}^2$ . Stacks of 2D images were recorded for each condyle (lateral and medial) in both knees (right and left) with a scan speed of 0.125 frame/sec and an average of 2 scans per image, every  $2\mu\text{m}$  from 0 to  $100\mu\text{m}$  in depth.

#### 2.8. Histology of knee

Fixed synovial membrane, femur, tibia and patellae were decalcified 1h (except synovial membrane) with Rapid Decalcifier RDO (Apex engineering products corporation, Canada), then dehydrated and embedded in paraffin. Sections of  $5\mu\text{m}$  were cut in the transversal plane with a microtome, deparaffinized in toluene, and hydrated in a graded serie of ethanol. The sections performed on spontaneous repair tissue and normal cartilage (control group) were stained with hematoxylin-eosin (HES) to evaluate cellularity and morphologic aspect, with toluidine blue (TB) to evaluate proteoglycan content, and picosirius red (SR) to evaluate collagen content. To examine the network organization in both groups, the SR sections were analyzed in polarized light microscopy. For

each time point, the quality of the repair tissue was determined according to 11 histological parameters aimed at appreciating morphological and structural organizations, cellular aspect, and distribution of matrix constituents in the repair tissue [91] [Table 4]. This score varied between 0 and 28, 0 corresponding to the absence of repair and 28 to a hyaline aspect of the repair tissue. Synovial membranes were stained with hematoxylin-eosin (HES) to evaluate the inflammation of the joint with the Rooney score [93], [94] [table 5].

## **2.9. Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using Rstudio software (RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>) with a threshold of 5% corresponding to the alpha-risk and the analysis unit was a collagen graft. Kruskal-wallis (non-parametric) test were used to assess statistical differences between MO (n=6), and others condyles: LO, LNO, MNO (n=6). Wilcoxon-Mann-Whitney tests (non-parametric) were performed to evaluate the differences between Young (n=6), Old (n=6).

### III. Résultats

#### 3.1. Propriétés mécaniques et structurelles de l'éponge avant implantation

Les éponges implantées au niveau du défaut ostéochondral du condyle médial de la patte droite des rats présentent des propriétés mécaniques et structurelles dépendantes de l'âge du donneur. En effet, nous avons montré dans le chapitre précédent qu'à J28, une synthèse de collagène de type II et de GAGs s'effectue en quantité plus importante au sein des éponges issues des donneurs âgés que des d'éponges issues de donneurs jeunes (cf partie II, 3.3 et 3.4), ainsi que des propriétés mécaniques légèrement plus élevées mais non significatives pour les éponges issues de donneurs âgés. Cependant la contraction des éponges est plus importante pour celles issues des donneurs jeunes, indiquant une contraction plus élevée de la matrice et une interaction cellules-cellules plus importante.

#### 3.2. Aspect macroscopique du cartilage articulaire et du défaut ostéochondral 28 jours après l'opération

##### a. Les condyles fémoraux et le défaut ostéochondral médial de la patte droite (patte opérée)

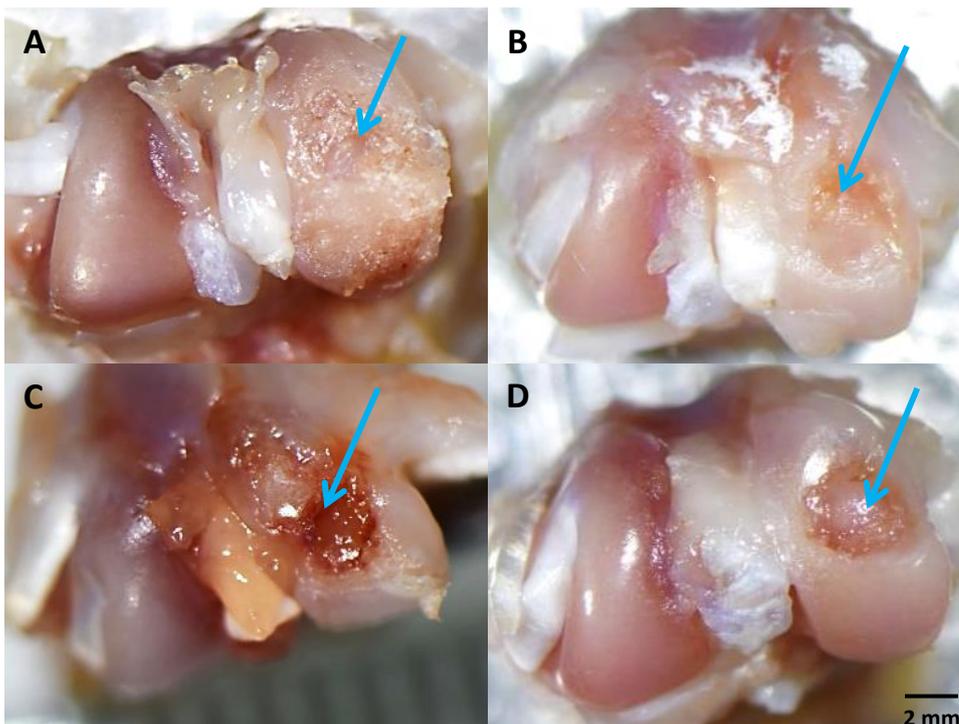


Figure 26 : Photographies des condyles fémoraux (extrémité distale du fémur) de la patte droite (patte opérée). A: réparation avec un cartilage fibreux, B: réparation normale mais incomplète, C: pas de réparation, dégradation de l'articulation, D: pas de réparation, pas de dégradation. Le fémur est positionné de manière à avoir à droite le condyle médial (condyle opéré – flèche bleue) et à gauche le condyle latéral.

Au bout de 28 jours de réparation, on n'observe aucune réparation complète avec un cartilage dit hyalin du défaut ostéochondral. La figure 26 représente des photographies des condyles fémoraux de la patte droite, c'est-à-dire la patte opérée, où on peut observer soit une réparation - figure 26.A et 26.B - soit pas de réparation - figure 26.C et 26.D. Dans cette expérience, 4 cas de figures de réparation : 1- une réparation avec un cartilage fibreux de mauvaise qualité (figure 26.A), 2- une réparation avec un cartilage hyalin mais incomplète (figure 26.B), 3- pas de réparation et une destruction de l'articulation (figure 26.C), 4- aucune réaction, ni de réparation, ni de dégradation (figure 26.D). Les photographies ont été sélectionnées afin de montrer de manière représentative les différents cas de réparation entre celles issues des rats opérés avec les greffons issus de donneurs jeunes et celles issues des greffons de donneurs âgés. Cependant, on retrouve une réparation plus ou moins partielle principalement chez les rats ayant reçu les greffons issus de donneurs âgés mais une dégradation du défaut ou une réparation avec un tissu de mauvaise qualité chez les rats ayant reçu les greffons issus de donneurs jeunes. L'ensemble des photographies sont en annexe 2.

**b. Le plateau tibial de la patte droite (patte opérée)**

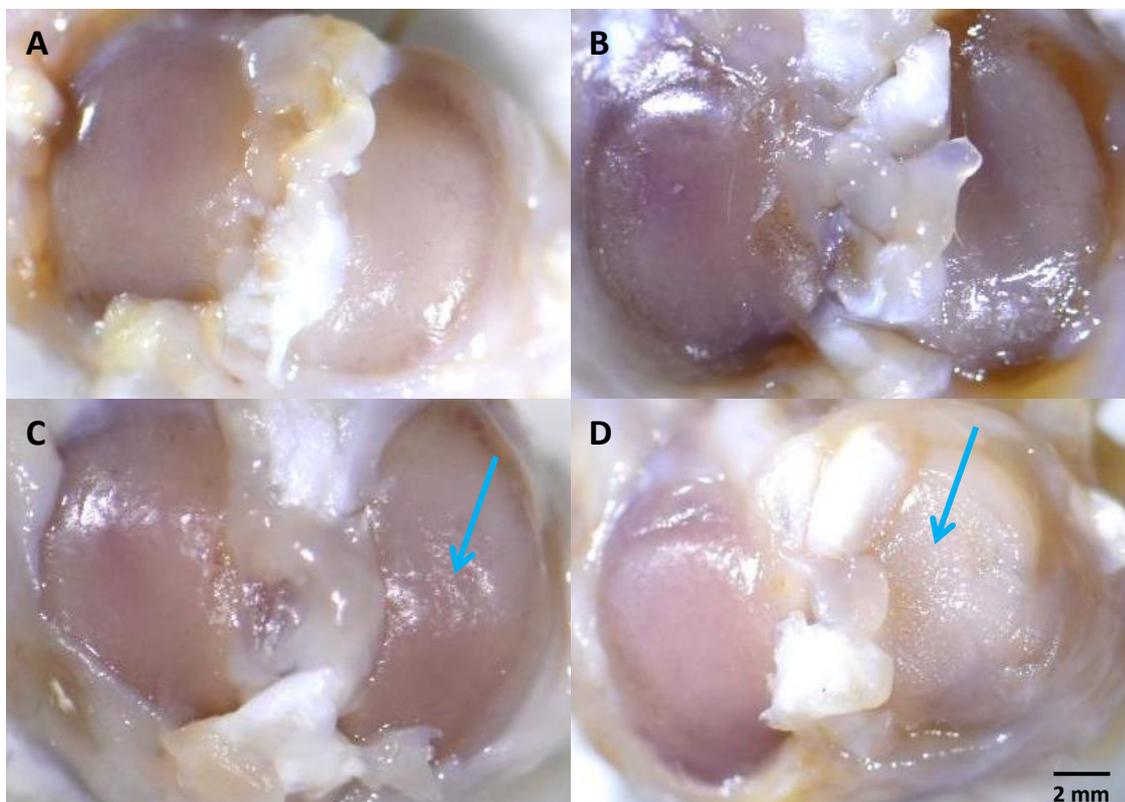


Figure 27 : Photographies du plateau tibial de la patte droite (patte opérée). A et B: pas de lésion en miroir sur le tibia, des rougeurs mais non significative, C: légère dégradation du condyle médial D: dégradation, aspect d'un cartilage fibreux sur le condyle médial. A droite condyle médial mis en évidence par les flèches bleue (face au condyle du fémur opéré) et à gauche condyle latéral.

### 3.3 Résultats

Au bout des 28 jours d'expérience, on observe sur certains rats une lésion en miroir du plateau tibial, plus précisément du condyle médial, celui faisant face au condyle opéré. La figure 27 représente des photographies du plateau tibial de la patte droite, c'est-à-dire la patte opérée, où on peut observer 3 cas de figures de dégradation : 1- Pas de dégradation visible des condyles du plateau tibial (figure 27.A et 27.B), 2- légère dégradation du condyle médial, avec un aspect vallonné du cartilage (figure 27.C), 3- dégradation plus importante du condyle médial, le cartilage a un aspect fibreux (figure 27.D). Les photographies illustrent les rats opérés avec les greffons issus de donneurs jeunes et ceux issus des greffons de donneurs âgés. Cependant, on n'observe pas de différence sur les lésions du plateau tibial selon l'âge des donneurs des CSMs ayant permis de faire les greffons. L'ensemble des photographies sont en annexe 3.

#### c. La rotule de la patte droite (patte opérée)

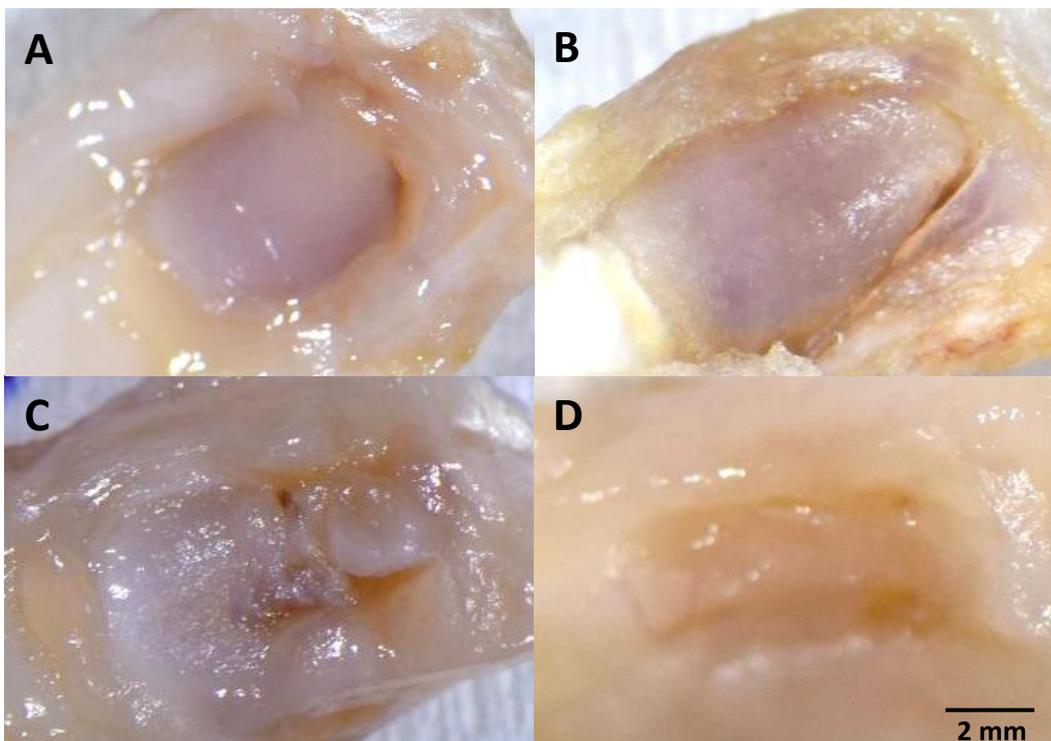


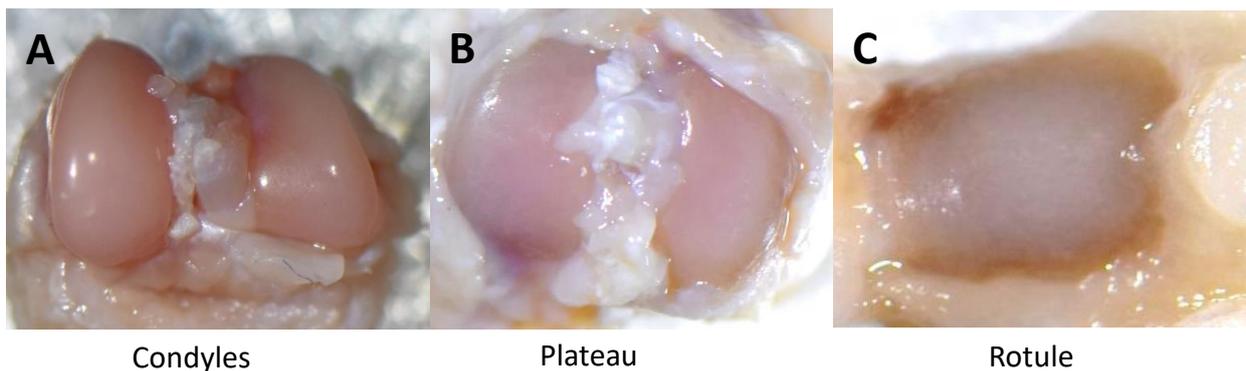
Figure 28 : Photographies de la face dorsale de la rotule de la patte droite (patte opérée) obtenues 28 jours après l'opération. A et B: pas de lésion sur la rotule, C: dégradation importante de la rotule, D: dégradation importante de la rotule jusqu'à disparition de celle-ci.

Au bout de 28 jours d'expérience, on observe sur certains rats une dégradation de la rotule de la patte droite (patte opérée). La figure 28 représente des photographies de la face dorsale de la rotule

de la patte droite, où on peut observer 3 cas de figures de dégradation : 1- Pas de dégradation visible de la rotule (figure 28.A, 28.B), 2- Une dégradation importante de la rotule (figure 28.C). 3- Une dégradation plus importante de la rotule avec quasi disparition de celle-ci (figure 28.D). Les photographies ont été sélectionnées de manière représentatives et à titre illustratif entre celles issues des rats opérés avec les greffons issus de donneurs jeunes et celles issues des greffons de donneurs âgés. Cependant, on retrouve plus de lésions de la face dorsale de la rotule chez les rats ayant reçu les greffons issus de donneurs jeunes (3 sur 6) que chez les rats ayant reçu un greffon issu de donneurs âgés (1 sur 6). L'ensemble des photographies sont en annexe 4.

Pour conclure au niveau macroscopique de la patte opérée, il n'y a pas de réparation complète du défaut ostéochondral et dans certains cas, on retrouve même une dégradation du condyle opéré. Le plateau tibial ainsi que la rotule sont également touchés et subissent une détérioration. Cependant, les dégradations ne sont pas forcément associées, c'est à dire que le condyle fémoral le plus abimé n'est pas associé avec la rotule la plus abimée ou au plateau tibial le plus abimé. Cf annexe 2-3-4.

**d. La patte gauche, la patte non opérée**



**Figure 29 : Photographies de l'articulation de la patte gauche (patte non opérée) chez un rat ayant reçu le greffon issu de donneurs âgés. A : condyles fémoraux, B : le plateau tibial, C : la rotule**

Macroscopiquement, on n'observe pas de dégradation dans l'articulation de la patte non opérée (patte gauche) chez les rats ayant reçus des greffons issus de donneurs jeunes ou âgés dans la patte droite comme illustré par la figure 29. La figure 29 représente, à titre d'exemple, l'articulation non

### 3.3 Résultats

opérée d'un rat ayant reçu le greffon issu d'un donneur âgé. Les photographies de toutes les pattes sont en annexe 5.

#### 3.3. Aspect microscopique de la MEC du cartilage à la surface articulaire 28 jours après l'opération des fémurs et tibias

##### a. Les chondrons ou logettes articulaires du fémur

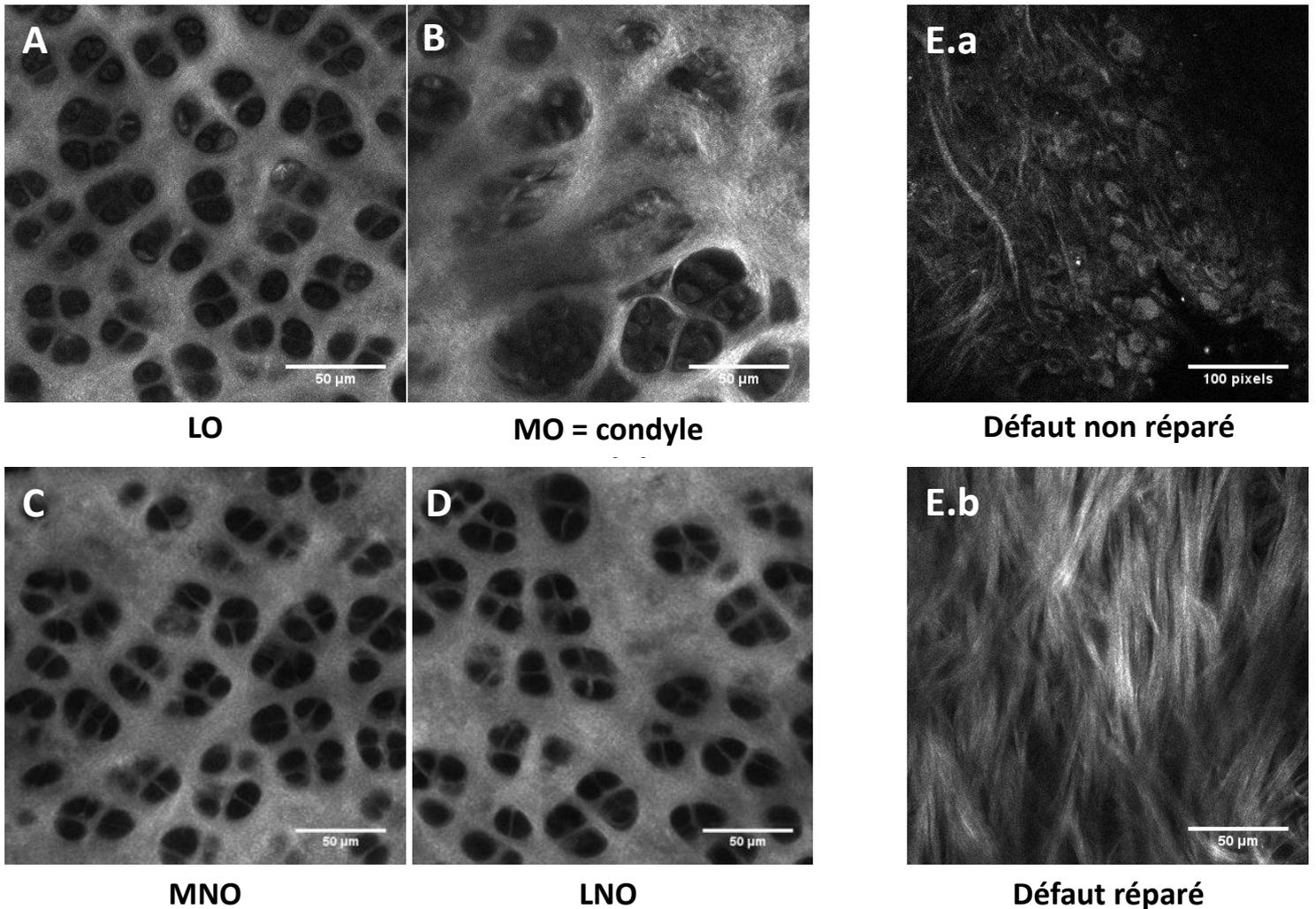


Figure 30 : Images obtenues à partir d'un microscope confocal multiphoton de la surface articulaire du fémur illustrant les différences entre les différents condyles. A : condyle latéral opéré (LO) patte droite, B : condyle médial opéré (MO) patte droite, C : condyle médial non opéré (MNO) patte gauche, D : condyle latéral non opéré (LNO) patte gauche, E.a : défaut mal ou pas réparé, E.b : défaut réparé avec un tissu fibreux.

28 jours après l'opération, la surface fémorale est observée au microscope confocal multiphoton. L'organisation du réseau de collagène est obtenue par microscopie SHG. On observe, figure 30, une organisation identique de la surface articulaire pour le condyle latéral de la patte droite (LO), le

condyle médial et latéral de la patte gauche (MNO et LNO). Alors que pour le condyle fémoral médial opéré (MO), il y a une différence dans l'organisation des logettes chondrocytaires qui visuellement semblent plus grosses (figure 31 et 32) ainsi qu'un aspect moins lisse du réseau de collagène. Au niveau du défaut ostéochondral, la réparation, lorsqu'elle a eu lieu, est uniquement fibreuse. Sur la figure 30.E.b on peut ainsi observer le réseau fibreux organisé par le collagène qui n'a pas l'aspect lisse observé sur MO, LO, MNO ou LNO. Sur la figure 30.E.a, on observe quelques fibres de collagène malgré l'absence de réparation.

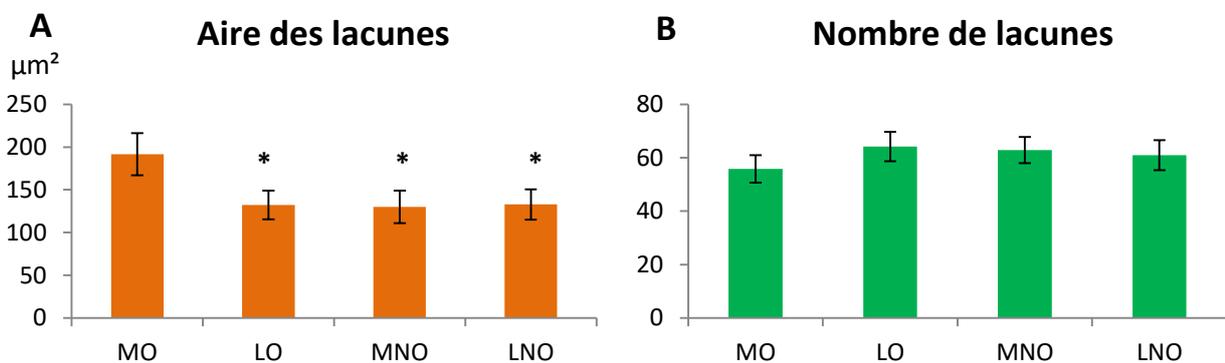


Figure 31: graphiques représentant l'aire moyenne (orange) et le nombre moyen (vert) de lacunes chondrocytaires de la MEC à la surface articulaire du fémur. La barre d'erreur représente l'écart type. A : surface moyenne en  $\mu\text{m}^2$  des lacunes chondrocytaires sur les 4 condyles fémoraux de l'articulation, B : nombre moyen de lacunes chondrocytaires sur les 4 condyles fémoraux de l'articulation. LO : condyle fémoral latéral opéré, MO : condyle fémoral médial opéré, MNO : condyle fémoral médial non opéré, LNO : condyle fémoral latéral non opéré. \* p-value < 0.005 par rapport à MO, test Kruskal Wallis suivi d'un test de Wilcoxon par paire, n=12.

Après analyse par Image J des surfaces articulaires du fémur, on obtient l'aire et le nombre de lacunes sur une surface de  $48730 \mu\text{m}^2$  (zone sélectionnée pour l'analyse). On observe une différence significative de l'aire moyenne des lacunes chondrocytaires sur MO ( $191 \mu\text{m}^2$ ) qui est plus élevée par rapport aux autres condyles de l'articulation (environ  $130 \mu\text{m}^2$ ), p-value < 0.005. De plus, le nombre de lacunes sur la zone sélectionnée est plus petit sur le condyle MO (55 lacunes) par rapport aux autres condyles de l'articulation (environ 62 lacunes) mais de manière non significative.

### 3.3 Résultats

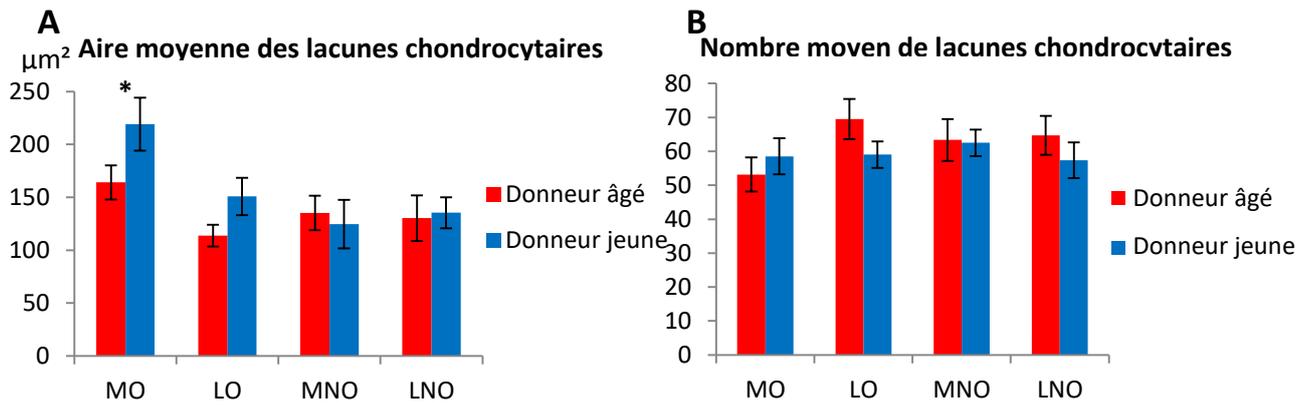


Figure 32 : graphiques représentant l'aire moyenne et le nombre moyen de lacune chondrocytaire de la MEC des cartilages articulaires des condyles fémoraux en fonction de l'âge des donneurs. Les barres d'erreur représentent l'écart type. A : surface moyenne en  $\mu\text{m}^2$  des lacunes chondrocytaires sur les 4 condyles fémoraux de l'articulation, B : nombre moyen de lacunes chondrocytaires sur les 4 condyles fémoraux de l'articulation. LO : condyle latéral opéré, MO : condyle médial opéré, MNO : condyle médial non opéré, LNO : condyle latéral non opéré. \* p-value<0.05 entre le groupe âgé et le groupe jeune, test de Wilcoxon, n=6.

Si on s'intéresse à l'effet de l'âge du donneur sur l'organisation des logettes chondrocytaires, une différence significative entre les groupes sur l'aire moyenne des lacunes chondrocytaires est obtenue sur le condyle MO,  $164 \mu\text{m}^2$  pour le groupe âgé contre  $219 \mu\text{m}^2$  pour le groupe jeune, p-value<0.05 et non significative sur le condyle LO,  $113 \mu\text{m}^2$  pour le groupe âgé contre  $150 \mu\text{m}^2$  pour le groupe jeune. Il n'y a pas de différence significative sur le nombre de lacunes.

#### b. Les chondrons ou logettes articulaires du tibia

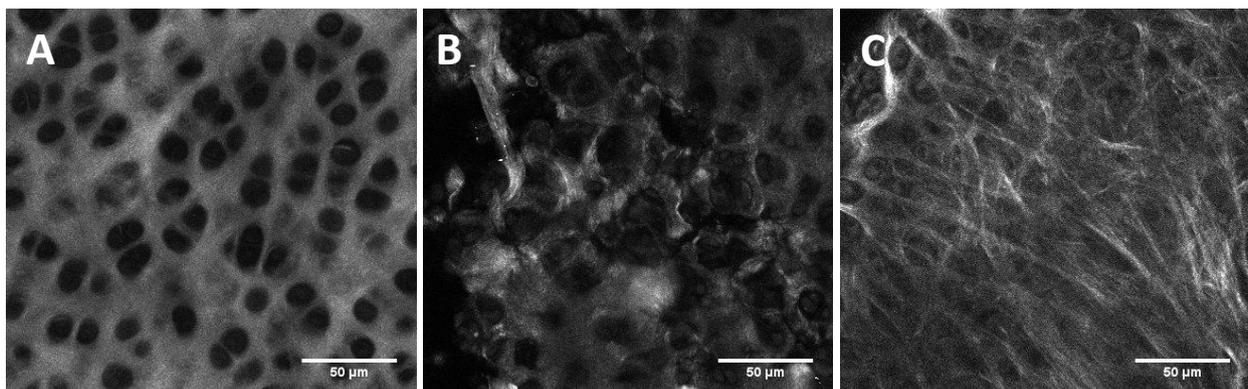


Figure 33 : Images obtenues à partir d'un microscope confocal multiphoton de la surface articulaire du tibia illustrant les différents cas de figure de dégradation observée. A: aucune dégradation, B: fibrillation ou de fissuration du cartilage, C: pas de dégradation mais une synthèse de cartilage fibreux.

La figure 33, représente l'aspect de la surface du cartilage du plateau tibial du condyle médial de la patte droite. On observe la même chose que sur le condyle médial du fémur : 1) aucune lésion (A), 2) un aspect moins lisse de la surface articulaire témoin du début d'une fibrillation (B) et 3) un cartilage

d'aspect fibreux. Cependant on ne retrouve ces dégradations miroirs du plateau tibial que sur trois rats (B : un rat du groupe jeune et un rat du groupe âgé, C : un rat du groupe âgé). Malgré un aspect différent, il n'y a pas de changement au niveau de la taille ou du nombre de chondrons.

### 3.4. Aspect macroscopique de la structure osseuse 28 jours après l'opération

#### a. Vue générale de la trochlée du fémur et du plateau tibial

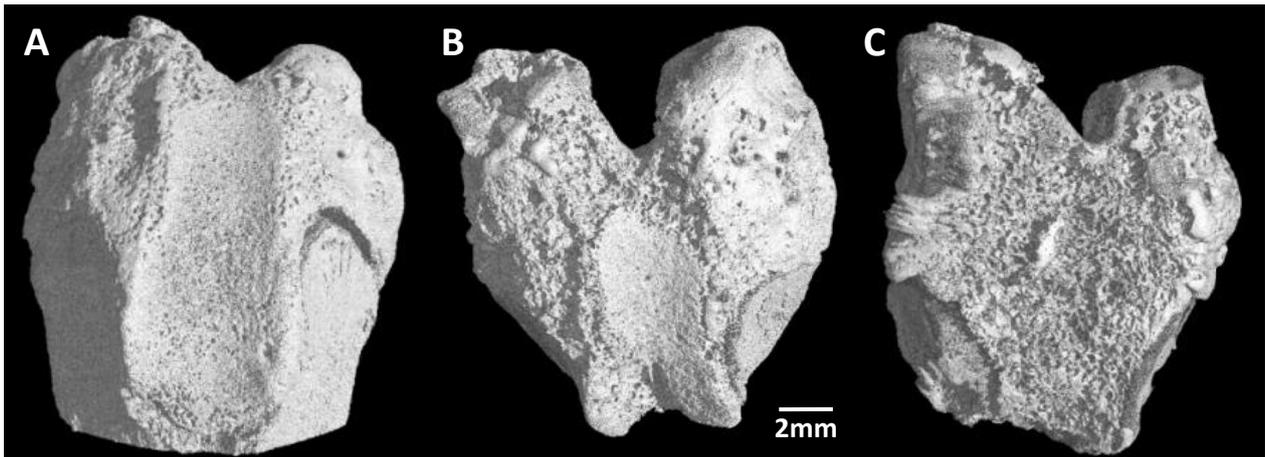


Figure 34 : Reconstruction 3D de l'extrémité distale (fémur) de la patte droite obtenue par rayon X. Cette image représente les différents cas de figures de l'impact de l'opération sur la trochlée fémorale; A : pas d'impact sur la trochlée, B : légère dégradation de la trochlée, C: dégradation de la trochlée jusqu'à sa disparition.

Au bout de 28 jours de réparation, chez certains rats, on observe une dégradation de la trochlée fémorale de la patte droite. La figure 34 représente les reconstructions 3D de l'extrémité distale du fémur de la patte droite, où on peut observer cette dégradation. Dans cette expérience, 3 cas de figures de dégradation : 1- pas de dégradation de la trochlée (figure 34.A), 2- une dégradation légère de la trochlée (figure 34.B), 3- dégradation plus sévère de la trochlée jusqu'à sa disparition (figure 34.C). Chez la totalité des rats on peut remarquer l'absence d'ostéophytes. Les photographies ont été sélectionnées de manière à représenter les différents cas de figures entre celles issues des rats opérés avec les greffons issus de donneurs jeunes et celles issues des greffons de donneurs âgés. Cependant, on retrouve un plus grand nombre de rat dont la trochlée est atteinte chez les rats ayant reçu les greffons issus de donneurs jeunes (6/6) que chez les rats ayant reçu un greffon issu de donneurs âgés (2/6). Les photographies sont en annexe 6.

### 3.3 Résultats

Au niveau des tibias des pattes opérées ou des fémurs et des tibias des pattes non opérées, aucune dégradation osseuse n'est observée. Les photographies sont en annexe 7.

#### **b. Epaisseur de la plaque sous-chondrale des condyles fémoraux**

A partir d'une image prise au milieu du condyle (plan sagittal), 3 localisations ont été définies sur chaque rat afin de mesurer l'épaisseur de la plaque sous-chondrale 28 jours après l'opération. Deux zones ont été conservées et étudiées : 1) zone portante, proche du défaut (trait rouge), 2) au niveau de la trochlée fémorale (1/3 distal) (trait bleu). Ces localisations sont représentées sur la figure 35.

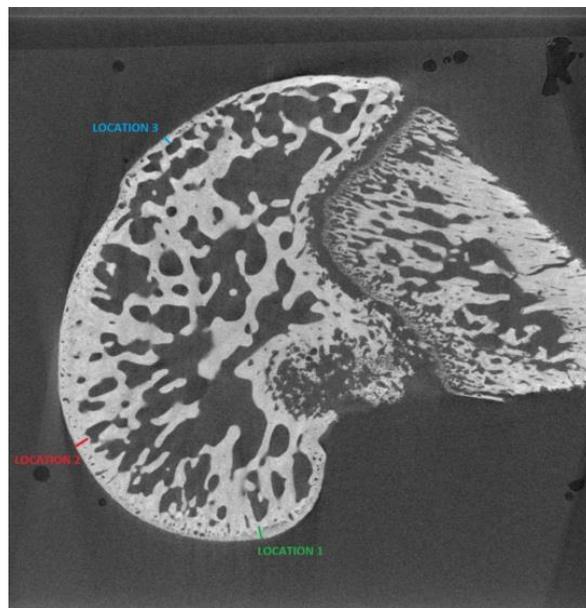


Figure 35 : Image obtenue par rayon X d'un condyle fémoral de rat. Location1 : partie caudale du condyle, location2 : zone portante, à côté du défaut, location 3 : trochlée fémorale

La figure 36 présente les ratios de l'épaisseur osseuse entre la localisation 2 divisée par la localisation 3 mesurée par le logiciel CTan. Une différence significative ( $p$ -value < 0.05) sur le condyle MO entre les rats ayant reçu le greffon issu de donneurs jeunes et les rats ayant reçu le greffon issu de donneurs âgés est observée. Le ratio entre les deux localisations est en moyenne de 2 pour les condyles LO, MNO et LNO. Ce ratio de 2 est également retrouvé sur le condyle MO du groupe âgé contrairement au groupe jeune (les rats ayant reçu le greffon issu de donneurs jeunes) ou le ratio est de 1,19.

Epaisseur osseuse de la localisation 2 rapportée à celle de la localisation 3

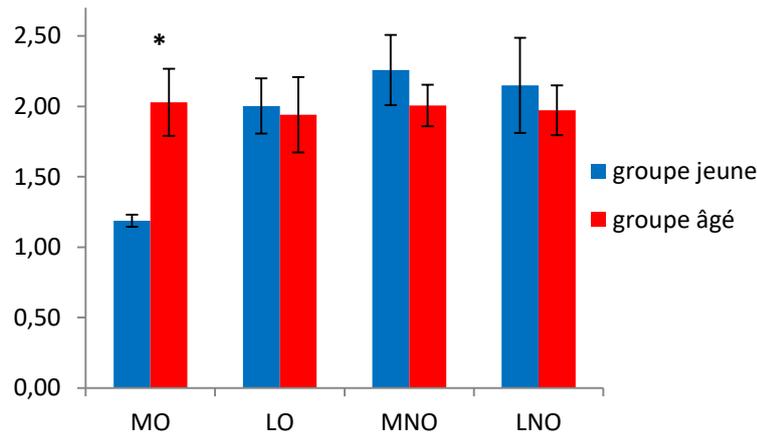


Figure 36: Graphique représentant la différence d'épaisseur entre la localisation 2 et la localisation 3 en fonction de l'âge du donneur. LO : condyle fémoral latéral opéré, MO : condyle fémoral médial opéré, MNO : condyle fémoral médial non opéré, LNO : condyle fémoral latéral non opéré. \* p-value<0.005 entre le groupe âgé et le groupe jeune, test Wilcoxon, n=6.

### 3.5. Propriétés mécaniques du cartilage articulaire à 28 jours

Les différents paramètres mécaniques, à savoir le module instantané ( $E_{ins}$ ), le module à l'équilibre ( $E_{eq}$ ) et la fraction élastique, sont obtenus par un modèle viscoélastique développé sur Matlab [133].  $E_{ins}$  représente le comportement du matériau en dynamique,  $E_{eq}$  représente le comportement du matériau en statique et la fraction élastique est le rapport de  $E_{eq} / E_{ins}$ .

#### a. Propriétés mécaniques selon le condyle, la patte (opérée ou non) et l'âge du donneur

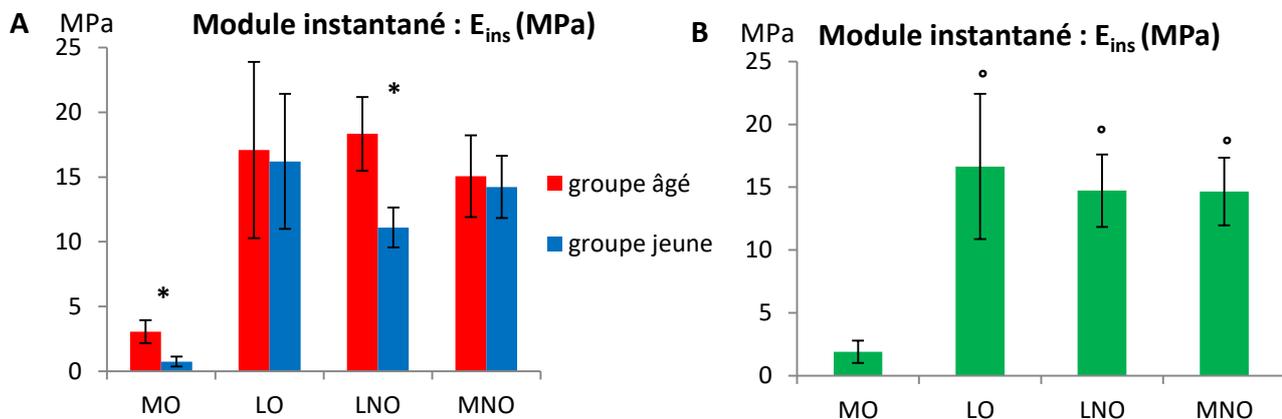


Figure 37 : Graphiques représentant le module instantané ( $E_{ins}$ ) en MPa du fémur ; A :  $E_{ins}$  selon le condyle, la patte (opérée ou non) et l'âge du donneur, B :  $E_{ins}$  des 4 condyles chez les rats ayant reçu un greffon de donneurs jeunes et de donneurs âgés. MO : condyle médial opéré, LO : condyle latéral opéré, MNO : condyle médial non opéré, LNO : condyle latéral non opéré ; \* p-value<0.05 entre le groupe âgé et le groupe jeune, test Wilcoxon, n=6. ° p-value<0.001 par rapport à MO, test Kruskal Wallis suivi d'un test de Wilcoxon par paire, n=12.

### 3.3 Résultats

Les propriétés mécaniques des différents condyles du fémur ne présentent pas de différences significatives entre les rats ayant reçu un greffon issu de donneurs jeunes ou âgés pour les condyles de la patte gauche LNO et MNO (figure n°37). Cependant les condyles de la patte droite, MO et LO présentent des propriétés mécaniques plus faibles de manière significative ( $p$ -value  $< 0.01$  et  $p$ -value  $< 0.05$  respectivement) pour les greffons issus de donneurs jeunes par rapport aux donneurs âgés. Dans chaque groupe d'âge, on observe une différence significative ( $p$ -value  $< 0.001$ ) des propriétés mécaniques entre le condyle MO (1.9 MPa) et LO (16.6 MPa) ou MNO (14.7 MPa) ou LNO (14.7 MPa) représenté sur la figure 37 par la valeur de  $E_{ins}$ . Les autres paramètres viscoélastiques : module à l'équilibre et viscosité, sont en annexe 8.

#### b. Propriétés mécaniques du plateau tibial

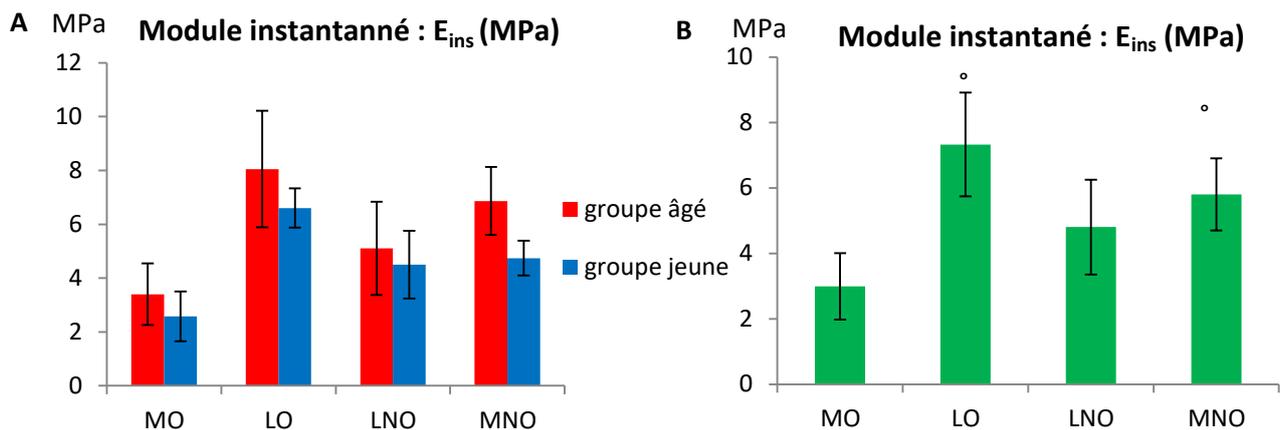


Figure 38: Graphiques représentant le module instantané ( $E_{ins}$ ) en MPa du tibia ; A :  $E_{ins}$  selon le condyle, la patte (opérée ou non) et l'âge du donneur,  $n=6$ , B :  $E_{ins}$  des 4 condyles chez les rats ayant reçu un greffon de donneurs âgés et de donneurs jeunes,  $n=12$ . MO : condyle médial opéré, LO : condyle latéral opéré, MNO : condyle médial non opéré, LNO : condyle latéral non opéré ; °  $p$ -value  $< 0.001$  par rapport à MO, test Kruskal Wallis suivi d'un test de Wilcoxon par paire.

Les propriétés mécaniques des différents condyles du tibia semblent être plus faibles pour le groupe 'jeune' que pour le groupe 'âgé' mais pas de manière significative. Pour chaque groupe d'âge, on observe une différence significative des propriétés mécaniques entre le condyle MO (2.99 MPa) et LO (7.33 MPa) ou MNO (5.8 MPa) représenté sur la figure 38 par la valeur de  $E_{ins}$ . Les autres paramètres viscoélastiques : module à l'équilibre et viscosité, sont en annexe 9.

### 3.6. Histologie de l'articulation après 28 jours

#### a. Histologie des fémurs

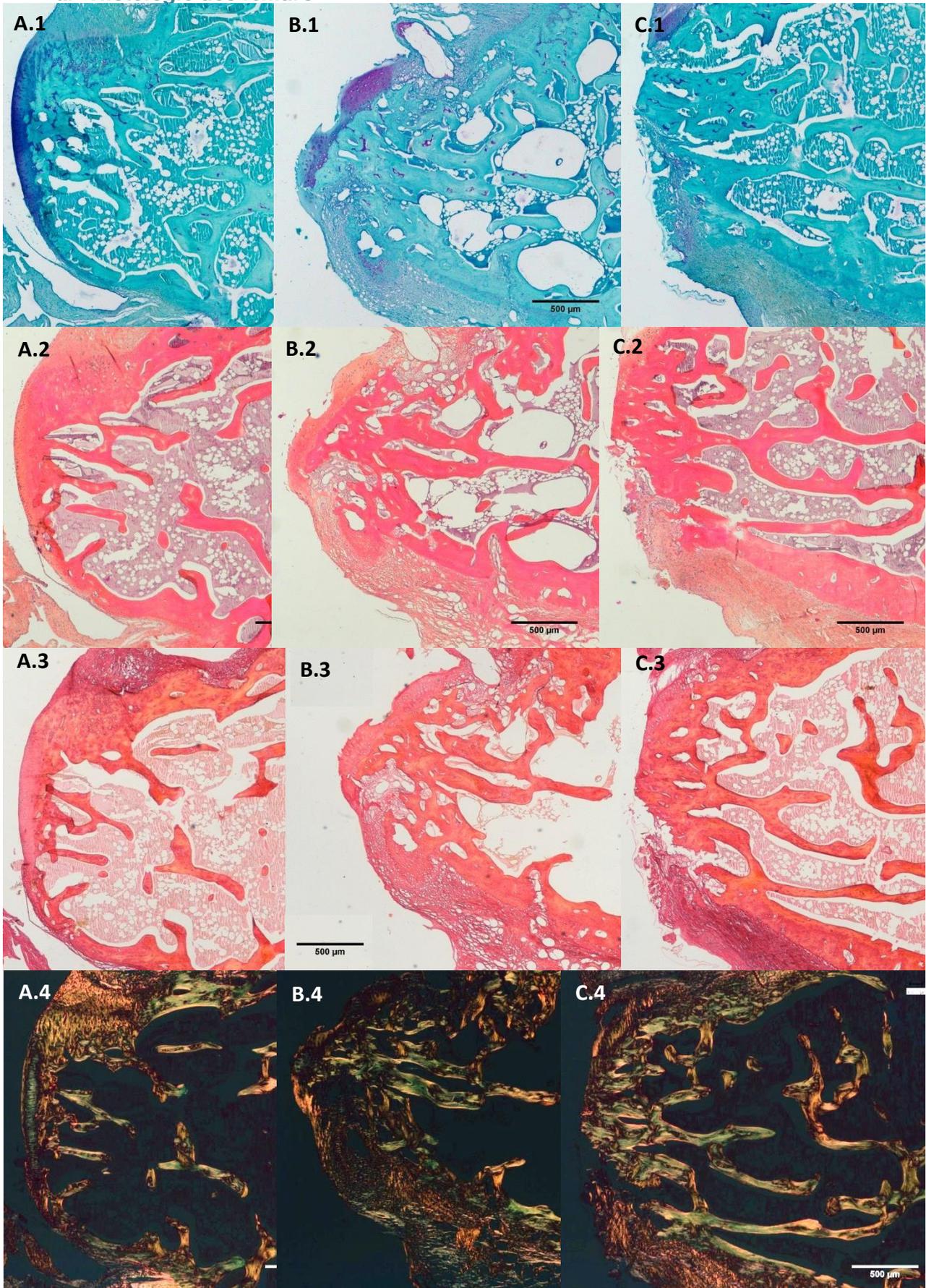


Figure 39 : Coupes histologiques des condyles fémoraux représentant les 3 cas rencontrés: 1- Pas de dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral, 2- Cartilage dégradé, 3- cartilage absent, début de la dégradation de l'os sous-chondral. BT : coloration bleu de Toluidine, HES : hematoxylin-eosin, RS : rouge Sirius, LP : lumière polarisée.

### 3.3 Résultats

Tel qu'illustré figure 39, grâce aux 3 colorations, bleu de Toluidine (BT), hématoxylin-eosin (HES) et rouge sirius (RS), il est possible de scorer la qualité de la réparation du tissu en se basant sur l'intensité de la couleur au sein du cartilage, pour la quantité de GAGs avec la coloration BT et la qualité du collagène avec la coloration RS. A partir de la coloration HES, il est possible d'observer la qualité des cellules, de l'os sous-chondral et de la réparation du défaut (tableau 4) [91]. Les scores vont de 28 pour une articulation saine à 0 pour une articulation détruite.

La lumière polarisée à partir de la coloration RS permet de visualiser l'organisation en profondeur du collagène dans le cartilage. Le cartilage hyalin normal est structuré en trois couches: une 1<sup>ère</sup> couche mince de couleur rouge en superficie, une couche intermédiaire fine noire et une couche épaisse plus profonde de couleur verte accompagnée d'espaces sombres pour les chondrocytes.

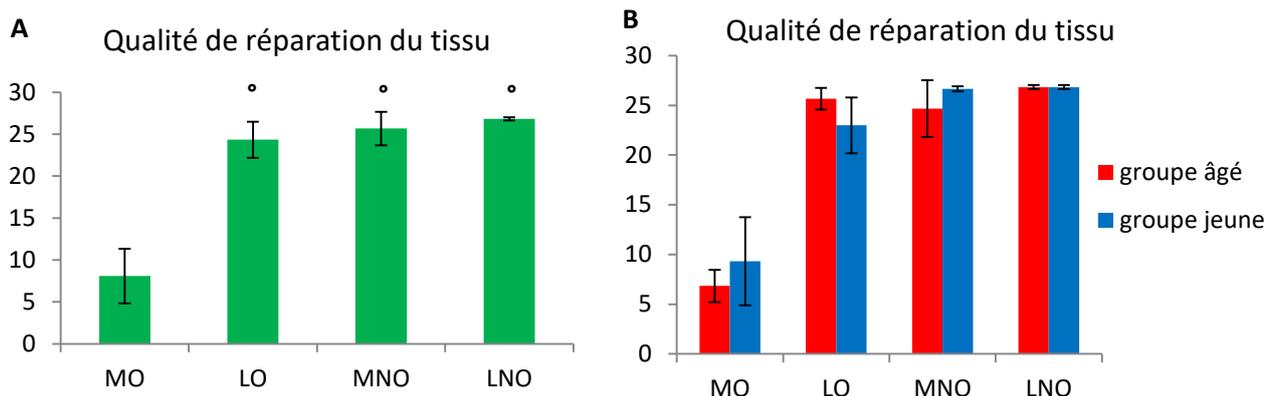


Figure 40: Graphiques représentant la qualité de réparation du tissu fémoral selon 11 paramètres histologiques. Le score de 28 correspondant à une articulation saine et 0 à une articulation présentant le cartilage et l'os sous-chondral détruit. Les barres d'erreur représentent l'écart type. A : score selon les condyles chez tous les rats ayant reçu un greffon de donneurs jeunes et de donneurs âgés, n=12, B : score des 4 condyles en fonction de l'âge du donneur, n=6. ° p-value<0.05 par rapport à MO, test de Kruskal Wallis.

Comme pour les résultats précédents, la qualité du tissu articulaire du condyle MO présente un score significativement plus faible avec les autres condyles LO, MNO et LNO ( $p < 0.001$ ). Cependant on ne trouve pas de différence significative entre le groupe âgé et le groupe jeune quel que soit le condyle (figure 40).

**b. Histologie des tibias**

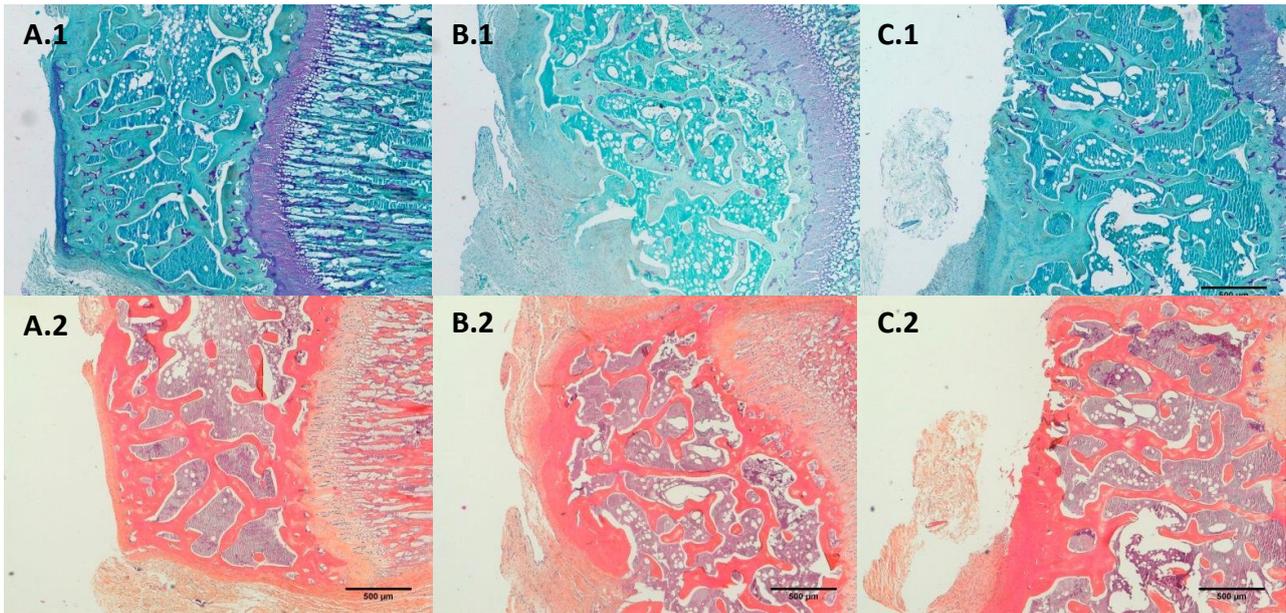


Figure 41 : Coupes histologiques du plateau tibial représentant les 3 cas rencontrés: 1- pas de dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral, 2- cartilage fibreux, 3- cartilage absent, début de la dégradation de l'os sous-chondral. BT : coloration bleu de Toluidine, HES : coloration hematoxylin-eosin.

Sur le même principe que les condyles fémoraux, les 3 colorations (bleu de Toluidine (BT), hematoxylin-eosin (HES) et rouge sirius (RS)) permettent de quantifier la qualité de l'articulation, plus précisément la dégradation possible du plateau tibial (figure 41) histologiquement. On retrouve 3 cas : 1 – plateau tibial sain, pas de dégradation du cartilage ou de l'os sous-chondral, 2- os sous-chondral sain mais le cartilage hyalin a été remplacé par un cartilage fibreux, 3- dégradation complète du cartilage, atteinte de l'os sous-chondral.

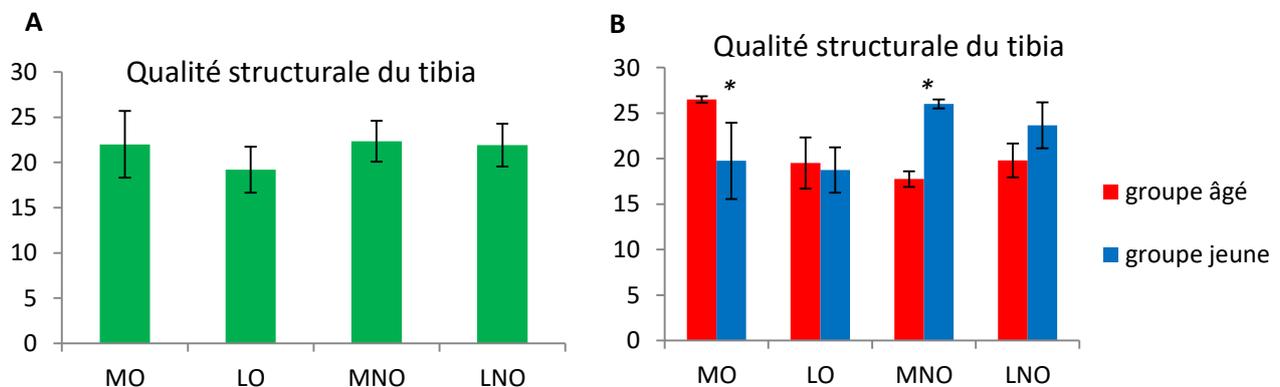


Figure 42 : Graphiques représentant la qualité du tissu tibial selon 11 paramètres histologiques. Le score de 28 correspondant à une articulation saine et 0 à une articulation présentant le cartilage et l'os sous-chondral détruit. Les barres d'erreur représentent l'écart type. A : score selon les condyles chez tous les rats ayant reçu un greffon de donneurs jeunes et de donneurs âgés, n=12, B : score des 4 condyles en fonction de l'âge du donneur, n=6. \* p-value<0.05 entre le groupe de donneurs âgés et le groupe de donneurs jeunes, test Wilcoxon.

### 3.3 Résultats

Contrairement à la tête fémorale, aucun condyle du plateau tibial ne présente une dégradation plus importante par rapport aux autres condyles comme observé sur la figure 42. On observe également que la qualité du condyle MO du groupe âgé est significativement supérieure à celle du groupe jeune et que la qualité du condyle LO du groupe jeune est significativement supérieure à celle du groupe âgé ( $p < 0.05$ ).

#### c. *Histologie des membranes synoviales*

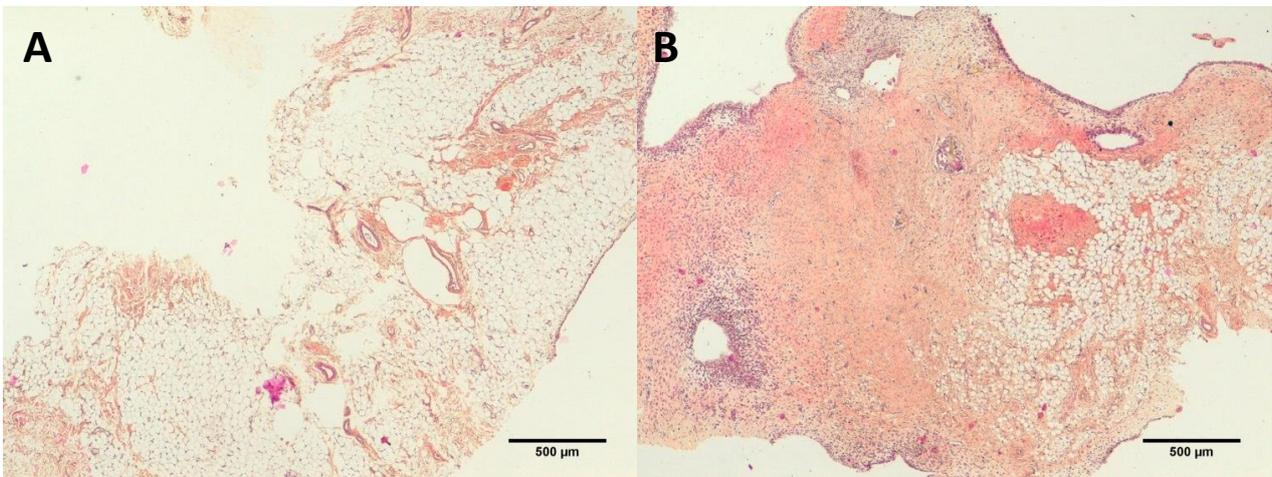


Figure 43 : Photographies des membranes synoviales colorées avec l'HES afin de mesurer l'inflammation au sein de l'articulation. A : inflammation absente, articulation saine, B : articulation très inflammatoire.

Le score de Rooney [93], [94] permet de calculer l'inflammation de la membrane synoviale (synovite) à travers plusieurs paramètres dont l'infiltration de vaisseaux sanguins, la fibrose et l'aspect de l'assise cellulaire (tableau 5). Sur la figure 43, deux images de membranes synoviales typiques, l'une saine et la seconde présentant un état très inflammatoire sont présentées. Un score de 0 représente une articulation saine et un score de 24 très inflammatoire.

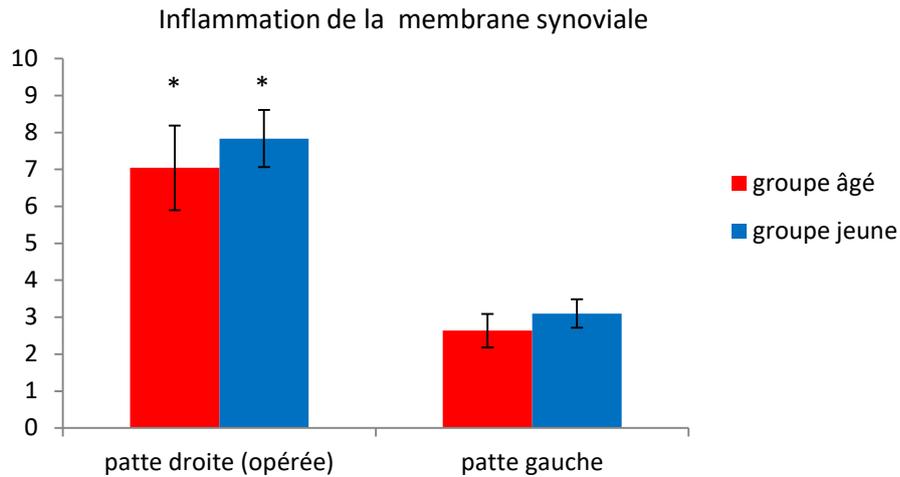


Figure 44 : Graphique représentant l'inflammation de la membrane synoviale entre le groupe âgé et le groupe jeune sur la patte droite et la patte gauche. Le score de 24 correspond à inflammation totale et 0 à une articulation saine. Barres d'erreur représentent l'écart type. \*p-value < 0,05 par rapport à la patte gauche, test Mann Whitney, n=6.

L'inflammation de la patte droite (score de 7.48 +/- 2.83) est significativement plus élevée que la patte gauche (score de 2.90 +/- 1.29) représentant une inflammation de 31% pour la patte droite contre 12% pour la patte gauche. Malgré l'absence de différence significative entre le groupe âgé et le groupe jeune, l'inflammation est plus importante chez le groupe jeune (33% d'inflammation) que chez le groupe âgé (29% d'inflammation) pour la patte droite (figure 44).

## IV. Discussion

L'ingénierie tissulaire (IT) est une technique prometteuse dans le traitement des maladies du cartilage articulaire, notamment pour le remplacement de défaut de cartilage. Trois paramètres sont primordiaux : le biomatériau, les facteurs de croissance et les cellules qui sont très étudiés depuis plusieurs années [143]. Cependant, l'impact du facteur âge du donneur est peu étudié dans l'IT. Pourtant, il a été montré *in vitro* que l'âge du donneur a une influence en 2D sur la multiplication et la prolifération cellulaire et en 3D sur la qualité du greffon au niveau de la production des protéines de la MEC du cartilage (le collagène de type II et les GAGs) ainsi que ses propriétés mécaniques (chapitre 2). Les résultats de ce chapitre montrent qu'*in vivo*, l'âge du donneur ne semble pas intervenir sur la réparation du défaut ostéochondral mais plus sur la réaction inflammatoire associée à la dégradation de l'articulation : La structure osseuse et la structure du cartilage, la qualité et l'organisation de la MEC et les propriétés mécaniques du condyle opéré.

Dans notre étude, 28 jours après l'opération, l'analyse macroscopique de la réparation du défaut ostéochondral dans le modèle animal de rat NUDE, montre 3 cas de réaction à l'opération : 1- une réparation complète du défaut mais de mauvaise qualité avec la présence de cartilage fibreux, 2- une réparation incomplète du défaut avec un cartilage de meilleure qualité au niveau de son aspect et de la composition de sa MEC ou 3- une réparation absente associée à une dégradation du défaut et de son environnement. L'absence de bonne réparation entraîne une dégradation sur l'ensemble de l'articulation provoquant des lésions sur le cartilage au niveau du condyle médial du tibia (en miroir du défaut). La destruction de la rotule et de la trochlée de la patte opérée dans certains cas laisse supposer que l'articulation dans son ensemble est touchée (cartilage + os).

L'analyse de l'os sous-chondral obtenue par microtomographie, confirme l'atteinte osseuse avec une épaisseur de la plaque sous-chondrale et de la trochlée du condyle opéré (MO) significativement très faible par rapport au condyle LO de la même patte et des condyles de la patte opposée MNO et LNO.

L'étude histologique sur le fémur et le tibia confirme le manque de réparation et la dégradation de la structure environnant le défaut. Cette dégradation de l'articulation est associée à une réaction inflammatoire confirmée par l'analyse histologique des membranes synoviales grâce au score de Rooney [93]. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette inflammation : les cellules, le biomatériau, le défaut réalisé ou le modèle animal.

Le choix des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) pour la reconstruction d'un greffon de cartilage est considéré à l'heure actuelle comme le choix le plus judicieux car 1) elles sont faciles à obtenir de par leur présence dans un grand nombre de tissus et 2) elles sont multipotentes donc capable de subir la chondrogénèse afin de se transformer en chondrocytes [55]. Shapiro *et al*, Buckwalter *et al* ont également montré que lors d'un défaut au sein de l'articulation les CSMs étaient les cellules recrutées pour la reconstruction du tissu [40], [103]. Autre critère important, le pouvoir immunosuppresseur des CSMs sur l'immunité innée et adaptative a été démontré *in vitro* et *in vivo* [54], [104]. Par exemple, Zhou *et al* ont utilisé des CSMs chez le rat avec succès afin d'induire la tolérance de l'animal à un organe allotransplanté [144]. Cependant dans certaines études *in vivo* récentes, il a été démontré que les CSMs allogéniques implantées par voie sous-cutanée ont été rejetées par les souris receveuses non immunosupprimées [58], [145]. De plus, Grinnemo *et al* montre la xénoréactivité des CSMs lors d'une étude réalisée sur un modèle animal de rat où les CSMs humaines injectées dans le myocarde de l'animal immunocompétent ont été rejetées mais persistaient chez l'animal immunosuppresseur [146]. Ces études appuient la notion que les CSMs xénogéniques peuvent être greffées chez des hôtes immunodéprimés ou sur des sites immunodéprimés, mais déclenchent une réponse immunitaire chez les hôtes avec un système immunitaire intact.

Le biomatériau a un rôle important dans la réponse cellulaire et inflammatoire. Celui utilisé pour cette expérience est une éponge de collagène de type I. Ce biomatériau donne des bons résultats sur la chondrogénèse des CSMs [67] et *in vitro* encore plus lorsqu'il est associé à d'autres composants de

### 3.4 Discussion

la matrice extracellulaire du cartilage comme des GAGs ou du collagène de type II [147]. Dans notre étude, le greffon obtenu *in vitro*, avant implantation dans le défaut ostéochondral contient une quantité importante de collagène de type II et de GAGs dont de la chondroïtine sulfate (cf partie II). De plus, Ronca *et al* ont démontré l'activité anti-inflammatoire de la chondroïtine sulfate (CS) [148]. Cette activité anti-inflammatoire a été établie chez le rat par injection sous cutanée d'un biomatériau de collagène de type I et d'un biomatériau de collagène de type I associé à la CS [149]. La CS agit sur l'expression de facteur pro-inflammatoire comme IL-1  $\beta$ , iNOS ou TNF- $\alpha$  en la diminuant. Le greffon implanté, de par sa composition, peut donc être considéré comme de bonne qualité.

Le choix du défaut est important dans l'analyse de la réparation. Il existe plusieurs sortes de défaut : 1- peu profond à la surface du cartilage, 2- légèrement profond, englobant tout le cartilage jusqu'à l'os sous chondral sans l'atteindre, 3- défaut ostéochondral, plus profond avec l'intégration d'une partie de l'os sous-chondral. Dans cette étude nous avons choisi d'étudier le défaut ostéochondral. Des études du même défaut chez d'autres animaux notamment le lapin [150], [151] ont donné des résultats de réparation satisfaisants après un temps minimum de 8 à 12 semaines. De même chez le rat [7], [27]–[29], le défaut ostéochondral comblé par des CSMs ou des chondrocytes accompagnées ou non d'un biomatériau présente après 4 semaines, 12 semaines et 40 jours, une bonne réparation. Dans ces études, le défaut est rempli complètement et remplacé par du cartilage sans réaction inflammatoire (CSMs ou chondrocytes). Cependant dans ces études le défaut a été réalisé au niveau de la trochlée c'est-à-dire au niveau de la zone non portante de l'articulation. Une autre étude réalisée par Ko *et al* utilisent des rats immunosupprimés pour réaliser son expérience sur deux types de cellules souches humaines (cellule souche pluripotente induite et cellule souche mésenchymateuse de la moelle osseuse) enrobées dans un gel d'alginate. Il trouve une reconstruction totale au bout de 12 semaines sans réaction inflammatoire [152]. Dans toutes ces études, le temps de réparation est très supérieur à notre expérience de 4 semaines.

Le dernier critère est le choix du modèle animal pour la réparation du défaut ostéochondral. Pour notre étude, le choix du rat est le meilleur parmi les petits animaux car l'articulation est plus grande que celle de la souris (permet l'étude des propriétés mécaniques) et le cartilage ne se régénère pas tout seul contrairement à celui du lapin. De plus, le cartilage du rat est suffisamment épais pour induire un petit défaut ou un gros défaut tandis que la taille réduite de son articulation permet d'avoir une vision d'ensemble de celle-ci en une image. Le rat est souvent utilisé pour l'étude des techniques de la régénération du cartilage comme la thérapie génique, la transplantation de cellules souches et le traitement avec des facteurs de croissance. Les souris et les rats athymiques sont également utiles pour évaluer la réparation du cartilage, des lésions chondrales et ostéochondrales de tailles variables. De plus, les rats et les souris ont des modèles d'animaux immunosupprimés, permettant l'étude de cellules xénogéniques et ainsi étudier le potentiel de réparation des cellules humaines. Le cartilage est certes plus mince et probablement plus facile à réparer que le cartilage articulaire humain mais ne devrait pas modifier l'influence de l'âge du donneur à la réparation d'un défaut ostéochondral.

Dans une autre étude, réalisée par Dausse *et al* [74], une autre hypothèse de l'inflammation peut être expliquée. En effet, ils montrent que l'acide hyaluronique (AH) du liquide synovial est augmenté dans le groupe reconstruction spontanée (défaut laissé libre), qui est en concordance avec le processus inflammatoire, largement signalé pour se produire pendant la réparation spontanée. Ce processus commence la première semaine de la réparation et pourrait être responsable de la faible stabilité du tissu néosynthétisé. Cette explication pourrait expliquer la réaction inflammatoire pour les rats ayant potentiellement perdu le greffon dans l'articulation durant les 28 jours de l'expérience mais n'explique pas la réaction chez les autres rats. Un moyen serait de mesurer la quantité de AH dans le liquide synoviale (LS) lors de l'euthanasie des animaux ou au cours du temps si la quantité de LS de l'articulation le permet.

### 3.4 Discussion

La structure du collagène du cartilage articulaire au microscope confocal multiphoton des condyles LO, MNO et LNO ressemble à ceux du cartilage sain trouvé dans la littérature [154]. Ils ont généralement un réseau de collagène lisse dans lequel des lacunes se forment souvent associées par 4 contenant chacune une cellule. Cependant, un remodelage de la structure avec des chondrons plus gros et contenant plus de cellules est visible pour le condyle ayant subi l'opération (MO). On retrouve ce type de structure à la surface articulaire atteinte d'arthrose. Cela se caractérise par des microfissures et un aspect du collagène moins lisse qui devient fibreux [92], [155]. Ce changement dans la structure du cartilage est associé à un changement dans les propriétés mécaniques du condyle opéré MO qui sont significativement plus faibles que celles des autres condyles LO, MNO et LNO. L'interaction du collagène et des protéoglycanes (aggrécane) donne les propriétés de résistance au cartilage [156], une dégradation du réseau entraîne donc une diminution des propriétés mécaniques. Si on s'intéresse au condyle LO, on peut observer une compensation vis-à-vis des propriétés mécaniques qui augmentent légèrement mais qui ne sont pas corrélées à une réorganisation de la matrice visible au microscope confocal.

L'âge a également un impact sur cette réorganisation. Le groupe de rats, ayant reçu les greffons issus de donneurs jeunes, présente des propriétés mécaniques plus faibles et une réorganisation de la matrice plus importante sur le condyle médial du fémur opéré.

Les propriétés mécaniques du greffon étant faibles et le défaut se trouvant dans la zone portante, le défaut est peut-être responsable de la non réparation et de la dégradation de l'articulation. Les contraintes mécaniques ont un rôle important dans l'homéostasie de la matrice du cartilage. Si les greffons ne jouent pas bien leur rôle, il est possible que les rats n'utilisent pas la patte opérée empêchant le bon déroulement de la réparation. Il n'y a donc plus de remodelage osseux et survient la dégradation de l'os entraînant la réaction inflammatoire de l'articulation. De plus, les animaux laissés sans mouvement montrent une diminution de l'épaisseur du cartilage altérant la synthèse des protéoglycanes [157]. Les propriétés mécaniques du greffon, étant très inférieures à celles du

cartilage natif, Il est nécessaire d'améliorer ces propriétés soit en changeant le biomatériau soit en optimisant les conditions de culture durant la chondrogenèse avec l'environnement mécanique ou chimique.

## V. Conclusion

Au sein d'un biomatériau de collagène de type I, l'âge du donneur a un impact *in vitro* dans le comportement cellulaire des CSMs dans un environnement 2D. L'âge a également un impact, *in vitro*, sur la fabrication d'une matrice cartilagineuse fonctionnelle par les CSMs dans un environnement 3D. Dans notre étude *in vivo*, l'absence de réparation du défaut ostéochondral ne nous donne pas la réponse sur l'influence de l'âge sur la réparation. Cependant, ce manque de réparation a posé un autre problème qui est la dégradation de cette articulation. Nous avons pu observer que l'absence de réparation avait un impact sur toute l'articulation aussi bien au niveau du tissu cartilagineux qu'au niveau du tissu osseux. En particulier, nous avons montré que la destruction de la trochlée et la désorganisation de la matrice de la surface articulaire du condyle opéré est plus forte pour les greffons issus du groupe de donneurs jeunes. Cette désorganisation est accompagnée de faibles propriétés mécaniques du cartilage entourant le défaut de nouveau plus faibles pour le groupe de donneurs jeunes.

Est-ce qu'un tissu fonctionnel est un tissu ressemblant au tissu natif ou un tissu avec les caractéristiques biomécaniques et biochimiques du tissu natif? Nous abordons ainsi la problématique de «l'ingénierie tissulaire fonctionnelle» c'est à dire que nous nous intéressons aux propriétés fonctionnelles du greffon afin d'avoir un tissu reconstruit possédant des caractéristiques mécaniques et biochimiques proches du cartilage articulaire. Pour cela plusieurs facteurs seront étudiés dans le chapitre suivant et notamment l'impact de l'environnement mécanique et l'impact de l'environnement chimique à travers la compression ou la pression hydrostatique et la présence de liquide synovial respectivement.

### **3.5 Conclusion**

# Partie IV : Influence des facteurs environnementaux chimiques et mécaniques sur l'ingénierie tissulaire du cartilage – une étude *in vitro*

---

## I. Introduction

Le cartilage articulaire (CA) est sous sollicitation mécanique complexe et dynamique *in vivo*, avec des contraintes de compression et de cisaillement multiaxiales cycliques et des contraintes de pression hydrostatique et osmotique sur son ensemble [16]. De plus, sa matrice extracellulaire hétérogène et anisotrope lui confère des propriétés biomécaniques complexes pour s'adapter à ce chargement dynamique. Concernant le CA, des expériences ont montré que les contraintes ressenties par le CA lors du mouvement, *in vivo*, sont de l'ordre de 1 à 4 MPa et le CA subit une déformation d'environ 5 à 20% sous compression physiologique normale [158].

La qualité de la matrice extracellulaire du cartilage, les contraintes mécaniques dues aux activités quotidiennes ainsi que le liquide synovial forment le microenvironnement qui influence le comportement des chondrocytes : à savoir, la biosynthèse des éléments du CA, le remodelage, le maintien de l'architecture structurelle de la matrice et leur maturation en chondrocytes hypertrophiés [159].

Malgré son potentiel, l'ingénierie tissulaire a du mal à réparer le CA dont la fonction principalement est biomécanique. Une discipline en évolution appelée « l'ingénierie tissulaire fonctionnelle » (ITF) cherche à relever ce défi dans la réparation des tissus des structures portantes. Les propriétés

#### 4.1 Introduction

fonctionnelles du greffon font ainsi l'objet des études actuelles visant à obtenir un tissu reconstruit possédant les fonctions mécaniques et biochimiques les plus proches du cartilage articulaire natif. Plusieurs questions génériques se posent alors [29]: 1) Quelles sont les contraintes et les déformations *in vivo* auxquelles devra résister le tissu néoformé après la chirurgie ?, 2) Quels sont les seuils de rupture afin de concevoir des implants tissulaires efficaces ?, 3) Connaitre les effets des facteurs physiques et chimiques sur l'activité cellulaire du tissu artificiel durant sa synthèse, et enfin, 4) Avoir des normes chirurgicales pour l'évaluation des réparations car certaines caractéristiques sont plus importantes que d'autres.

Concernant l'environnement chimique, il existe une grande variété de facteurs (de croissance et de différenciation) qui agissent sur l'activité cellulaire, entre autres : la *Bone Morphogenic Protein* (BMP), l'*Insulin Growth Factor-1* (IGF- 1), et le *Transformant Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) qui promeuvent les effets chondrogéniques *in vitro* ou *in vivo* [63], [73]. En particulier, comme Danisovic *et al* [63], nous avons montré au chapitre 2 que le TGF- $\beta$ 1 favorise de manière significative la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh) vers le phénotype chondrogénique mis en évidence par la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire du cartilage (MEC) et une régulation des gènes non caractéristiques de la chondrogénèse.

Au sein de l'articulation synoviale, le CA est en contact avec le liquide synovial (LS) qui assure la lubrification et la nutrition du CA [16]. Le constituant le plus remarquable du LS est l'acide hyaluronique (HA), présent à la concentration élevée de 3 g/l. Le LS est pauvre en protéines (13 à 28 g/l), dont le poids moléculaire est faible (environ 67 kDa) et présente une viscosité liée à la présence d'un complexe HA / protéines. Les caractéristiques de ce liquide évoluent en fonction des conditions systémiques et locales ; il est notamment modifié chez le sujet âgé, lors d'arthrose ou d'arthrite. Pour résumer, le LS a un rôle chimique et mécanique car il a pour fonction de réduire la friction en lubrifiant l'articulation, d'absorber les chocs tout en fournissant de l'oxygène, des

nutriments et des facteurs de croissance aux chondrocytes du cartilage articulaire et en éliminant le dioxyde de carbone et les déchets métaboliques.

L'effet du LS ou de ses constituants sur la chondrogénèse a déjà été étudié. Ogueta *et al* [160] ont montré que l'hormone prolactine (PRL), provoque une augmentation significative de la prolifération cellulaire des CSMh et induit l'expression du collagène de type II (analyse PCR) et la synthèse de protéoglycanes (analyse histologique) caractéristiques de la chondrogénèse. Bian *et al* [161] montrent que dans un environnement à la fois *in vitro* et *in vivo* (implantation chez des souris Nude), les Hydrogels de HA combinés à des microsphères d'alginate chargées de TGF- $\beta$ 3 forment un support composite qui aide à conserver la bioactivité du TGF- $\beta$ 3. Hegewald *et al* [162] a montré que dans un milieu contenant du TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml), du HA (0.1mg/ml) et du LS à différentes concentrations (5, 10 et 50%) la différenciation chondrogénique des CSMs équines se produisait. La culture stimulée par le LS et le HA a démontré une synthèse des protéoglycanes prononcée, mais inférieure à celle avec TGF- $\beta$ 1 et la synthèse du collagène de type II était élevée de manière égale dans toutes les cultures stimulées.

Le LS semble donc pouvoir agir comme un réservoir de facteurs de différenciation et mérite donc des recherches plus approfondies sur ses composants et leurs potentiels d'induction de la chondrogenèse. Cependant, dans le domaine de l'IT fonctionnelle, à notre connaissance, il n'y a actuellement pas d'études sur la chondrogénèse des CSMh et des propriétés mécaniques du greffon obtenu combinant l'utilisation du LS et des contraintes mécaniques. Plus généralement, les contraintes mécaniques sont le plus souvent étudiées seules ou associées à d'autres facteurs de différenciation notamment ceux de la famille des TGF- $\beta$ .

L'effet des contraintes mécaniques sur le maintien du phénotype des chondrocytes et sur la chondrogénèse des CSMs d'animaux ou d'humain (CSMh) est très étudié. Les études regroupent différentes contraintes mécaniques (compression, pression hydrostatique, cisaillement) associées ou non à des facteurs de différenciation, principalement ceux de la famille TGF- $\beta$ . Certaines études

#### 4.1 Introduction

couplent plusieurs contraintes (généralement la compression et le cisaillement) tandis que d'autres travaillent sur la fréquence, la force et la durée d'application de ces contraintes aux cellules. Les revues bibliographiques de Steward *et al* [97] et O'Conor *et al* [33] montrent la disparité des conclusions pour des conditions assez similaires.

Par exemple, les effets de la stimulation par compression *in vitro* sur le CA ou directement sur les chondrocytes dépendent fortement du caractère statique ou dynamique de la compression [163], [164]. En effet, alors que la compression statique d'explants de cartilage mis en culture conduit à la diminution du métabolisme des chondrocytes se traduisant par une réduction de la biosynthèse des GAGs et du collagène de type II [165], la compression dynamique (c'est-à-dire oscillatoire) a un effet anabolique sur la MEC [166] : la compression dynamique améliore l'activité synthétique des CSMs dans le CA [167], [168]. Sawatjui *et al* [77] ont exercé une compression (à 5% / 10% / 50% de déformation) sur les CSMh et les chondrocytes humains dans une matrice de fibrine de soie avec comme facteur de croissance de la chondroïtine sulfate pendant différents temps (1h / 3h / 6h par jours) durant 2 semaines. Ils observent que la compression à 50 % comme à 10% de déformation avec un temps long améliore la différenciation des CSMh et le maintien du phénotype des chondrocytes, observés par la synthèse de collagène de type II et de GAGs.

Les effets de la pression hydrostatique (intermittente ou continue) sont eux aussi bien étudiés : Miyanishi *et al* [169], par exemple, exercent une pression hydrostatique (0,1, 1 et 10MPa) avec comme facteur de différenciation du TGF $\beta$ -3, 4h par jour sur des CSMh en pellet durant 3, 7 et 14 jours. Ils observent une production plus importante de matrice (GAGs et collagène de type II) à 14 jours pour les 2 pressions hydrostatiques les plus élevées (1 et 10 MPa).

Malgré des décennies de recherche, des questions demeurent concernant la meilleure source de cellules, la composition du biomatériau et les conditions mécaniques pour générer des constructions cartilagineuses fonctionnelles, et il est probable que différentes conditions optimales existent pour un choix donné de type cellulaire ou de biomatériau. Ainsi, l'objectif de cette partie est d'optimiser le

greffon par ingénierie tissulaire fonctionnelle (ITF) à partir des mêmes cellules et de la même matrice que dans les chapitres précédents. Dans ce but, nous avons analysé l'influence de l'environnement chimique en choisissant deux facteurs de différenciation : TGF- $\beta$ 1 et le liquide synovial et l'influence de l'environnement mécanique en choisissant deux contraintes très représentatives et étudiées de l'articulation : la pression hydrostatique et la compression. Pour cela, une analyse des propriétés structurales et mécaniques a été réalisée du greffon de cartilage obtenu par l'ITF à partir d'une éponge de collagène de type I (même biomatériau que nos études précédentes) sur laquelle sontensemencées des CSMs humaines (CSMh). Une étude histologique et d'imagerie a été menée afin de mettre en évidence la synthèse de collagène de type II et de glycosaminoglycanes (GAGs) (caractéristique de la différenciation chondrogénique) couplée à une étude sur les propriétés mécaniques du greffon obtenu par ITF.

## II. Matériels et méthodes

### 2.1. Human mesenchymal stem cells

In the present study two groups of human bone marrow donors were selected based on their ages (i) group “Young” (GY) composed of two donors aged five and sixteen years old and (ii) group “old” (GO) composed of two donors aged fifty one and eighty one years old. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) were isolated from human bone marrow obtained as discarded tissue during routine bone surgery for young donors (GY) and during hip replacement for old donors (GO) after patient informed consent and in accordance with the procedures approved by the Human Experimentation and Ethic Committees of the Lariboisiere Hospital (Paris).

The aspirated bone marrow was diluted in  $\alpha$ -Minimal Essential Medium ( $\alpha$ MEM) media. Nucleated cells were suspended in  $\alpha$ -MEM containing 2 mM L-glutamine (Sigma), 50 U/mL penicillin (Sigma), 50  $\mu$ g/mL streptomycin (Sigma), and 10 % (v/v) foetal calf serum (FCS, Biowest, France). Primary nucleated cells were counted and seeded at the density of  $10^5$  cells/cm<sup>2</sup> of tissue-culture polystyrene surface area, and were cultured under standard cell culture conditions (i.e., 5% CO<sub>2</sub>/balance air, humidified, 37°C environment). After four days of culture, non-adherent cells were discarded during supernatant media change. The supernatant cell-culture medium was changed three times a week during cell expansion. When the cells were confluent, the hMSCs were detached using 0.25% trypsin-EDTA and were frozen.

### 2.2. Scaffold and *in vitro* experiments

Cryopreserved MSCs were thawed and expanded until passage 2 in “expansion medium” composed of DMEM low glucose (DMEM-LG, Gibco) containing 10 % (v/v) foetal calf serum (FCS, Sigma, France), 1 ng/mL bFGF (Miltenyi biotec SAS, France), 2 mM L-glutamine (Gibco), 100  $\mu$ g/mL streptomycin et 100 U/mL penicillin (Gibco). During the last passage before seeding in collagen scaffold (passage 3), MSCs were cultured with the “expansion medium” supplemented with sodium pyruvate (110  $\mu$ g/ml),

proline (40 µg/ml, Sigma), dexamethasone ( $10^{-7}$ M, Sigma) and ascorbic acid-2-phosphate (50 µg/ml, Sigma).

The scaffold used was a collagen sponge mainly composed of collagen type I (95%) and collagen type III (5%) manufactured by "Symatèse biomatériaux" company (Chaponost, France). The sponge size was 5 mm diameter and 2 mm thickness with an open porosity (mean pore size was 100µm). MSCs were seeded into sponges after 3 passages at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells/sponge and incubated at 37°C for 4 hours to allow cell attachment. Collagen sponges were then transferred in a 48 well plate already containing 1 ml of "expansion medium" for the first three days. At D3 collagen sponges were cultured under standard cell-culture conditions with a chondrogenic medium Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose supplemented with ITS + premix (Insulin-Transferrin-Selenium, BD), sodium pyruvate (110µg/ml) proline (40 µg/ml, Sigma), dexamethasone ( $10^{-7}$ M, Sigma), ascorbic acid-2-phosphate (50 µg/ml, Sigma) supplemented with TGF-β1 – 10ng/ml - (Miltenyi biotec SAS, France) or with synovial fluid (SF) – 5%. The supernatant cell-culture medium was changed twice a week.

The synovial fluid was obtained from arthroscopy (performed under general anesthesia) of horses. We have taken a pool of synovial fluid of 3 horses (healthy or with osteochondritis dissecans (OCD)) for a total volume of 20 ml, frozen until use.

For each hMSCs donor, twelve collagen sponges constructs were cultured during 28 days *i.e* 3 with TGF-β1 and 3 with synovial fluid (SF) mechanical free and 3 with TGF-β1 and 3 with SF under mechanical stresses. At the end time of the culture, all constructs were frozen (-20°C) for mechanical characterization and for quality of the tissue-engineered substitute (cells aspects, proteoglycans content) by histology.

## 2.3. Mechanical stresses

### a. Cyclic hydrostatic pressure system

A custom-made cyclic computer-operated pressure system inspired by published models [170] was designed, built and calibrated to study the mechanobiological effects of cyclic pressure on cartilage tissue engineering. This pressure system exposed the cells to mechanical stimulation by increasing the pressure of the gaseous phase above the supernatant media under which the cells were cultured. Briefly, a Labview program (National Instruments, Nanterre, France) controlled and maintained a cyclic sinusoidal pressure in the range of 0 to 100,000 Pa and a frequency in the range of 0 to 2Hz, in a sealed stainless steel pressure chamber. This chamber was designed to contain six round tissue-culture polystyrene dishes (each 6 cm in diameter). The desired pressure level was achieved by using a pressure regulator and by continuously monitoring the pressure of the gas phase inside the pressure chamber by opening and closing (as, and when, needed) the inlet (high pressure) and outlet (low pressure) solenoid valve relays that controlled the flow of a humidified air mixture (containing 78% N<sub>2</sub>, 20.9% O<sub>2</sub>, 0.9% Ar, 0.03% CO<sub>2</sub>, 0.17% other gases) into and out of the pressure chamber. For the purpose of the present study, chambers were kept and operated in a humidified, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/balance air environment. The pressure (P<sub>1</sub>) values in the chambers were monitored in real time using pressure transducers (figure n°45).

For the cyclic hydrostatic pressure experiments, six tissue culture polystyrene dishes were placed inside the pressure chamber. The hMSCs were then exposed to cyclic hydrostatic pressure of 75,000Pa at 0.3Hz for 30min, three times per days, 5 days per weeks during 28 days. Controls for these experiments were hMSCs maintained in parallel under similar cell culture conditions but not exposed to cyclic hydrostatic pressure. Medium exchange was performed every 3 days.

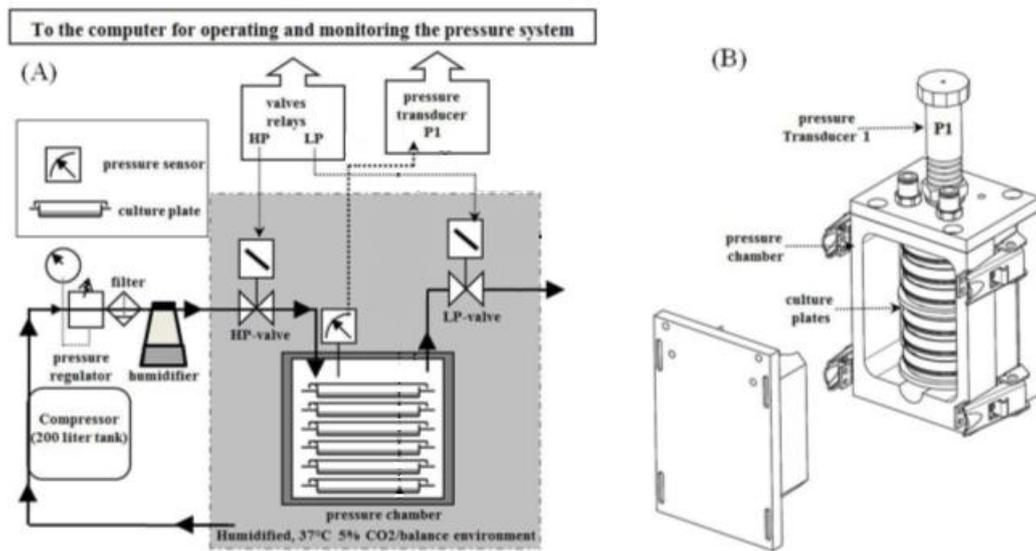


Figure 45 : Schematic (not to scale) illustration of the laboratory system used to expose cells to cyclic hydrostatic pressure (CHP). This pressure system was used to expose the cells to mechanical stimulation by increasing the pressure of the gaseous phase above the supernatant media under which the cells were cultured. Briefly, a Labview program controlled and maintained cyclic and sinusoidal above atmospheric pressure and frequency in a sealed, stainless steel, pressure chamber. This chamber was designed to accommodate a stack of six, round (each 6 cm in diameter) cell-culture, tissue-culture polystyrene dishes. The chosen pressure level of the gas phase inside the pressure chamber was maintained under continuous monitoring using a pressure regulator and by opening and closing as, and when, needed the inlet (high pressure, HP) and outlet (low pressure, LP) solenoid valve relays that controlled the flow of a humidified air mixture into and out of the pressure chamber. Chambers were kept, and operated, in a humidified, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>/balance air environment. The pressures inside the two chambers were monitored in real time using respective pressure and temperature transducers. (A) View of the laboratory pressure system used to expose cells to CHP. (B) Magnified view of the pressure chamber.

### b. Dynamic Compression system

Dynamic compression was carried out in sterile bioreactor (BOSE) with the construct immersed in a custom compression loading system (figure n°46) where a piston in Plexiglas was pressed onto the scaffold (the piston was perforated in order to let the culture medium circulated). The dynamic compression protocol consisted of 50% strain amplitude at a sinusoidal frequency of 1 Hz. The loading regime was employed for a period of 30 minutes twice a day, 5 days per week during 28 days. Medium exchange was performed every 3 days.

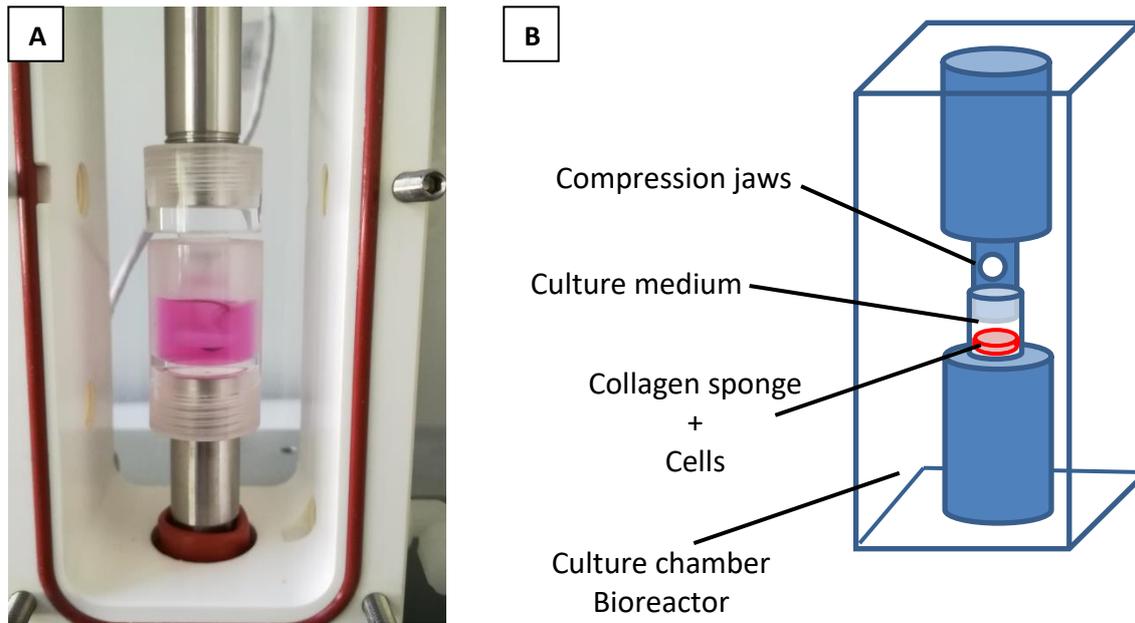


Figure 46 : (A) photography of sterile bioreactor (BOSE), with construct immersed in custom compression loading system. (B) Schematic (not to scale) illustration compression. Chambers were kept, and operated, in a humidified, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>/balance air environment.

#### 2.4. Mechanical testing of constructs

At day 28, nanoindentation tests were performed at the ambient temperature in PBS 1X using a commercial nanoindenter (Agilent Nanoindenter G200, ScienTec, Les Ulis, France) with saphir spheric tip of 0.506mm diameter. Rubber sample was indented at the beginning and the end of each day to ensure a good reliability of the experiment. The location of each indent (three per graft) was set manually on the top of collagen graft using an optical microscope. A load velocity of 5 $\mu$ m/s, a maximum depth of 200  $\mu$ m, holding of 300s and unload velocity of 0.5 $\mu$ m/s were imposed.

As grafts were considered as viscoelastic material specific model were used to determine three parameters: Equilibrium Young's modulus ( $E_{eq}$ ), Instantaneous Young's modulus ( $E_{ins}$ ) and viscosity (Elastic fraction;  $f$ ) with a custom made Matlab algorithms (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA) [133].

#### 2.5. Histology of *in vitro* tissue engineered substitutes

After mechanical testing, collagen sponges were fixed in 10% formalin during 24 hours at 4°C. Each specimen was dehydrated, embedded in paraffin wax, and cut into 5  $\mu$ m thick sections.

After deparaffinization, sections were stained using Hematoxylin-Erythrosin-Saffron (HES) for morphology, Alcian Blue (AB) for proteoglycan content, Sirius red (SR) for collagen content and was visualized on an optical microscope (DMD 108, Leica, France).

The recovery percentage of proteoglycan was obtained with image processing software Image J (National Institutes of Health Inc., Bethesda, Maryland, USA).

## **2.6. Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using Rstudio software (RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>) with a threshold of 5% corresponding to the alpha-risk and the analysis unit was a collagen graft. Wilcoxon-Mann-Whitney tests (non-parametric) were performed to evaluate the differences between Young (n=6), Old (n=6), between TGF- $\beta$ 1 (n=6) and synovial fluid (n=6), between mechanical free (n=6) and under mechanical stress (n=6), between compression stress (n=6) and hydrostatic pressure stress (n=6).

### III. Résultats

#### 3.5. Morphologie du greffon issu de l'ITF

##### a. Aspect général

Les photographies de la figure 47 représentent les éponges prises à J1 et J28 (fin de la culture *in vitro*). On peut observer une répartition non homogène de la matrice formée. A J28, trois situations sont retrouvées : à gauche la matrice se localise dans un cadran de l'éponge, au centre la matrice se répartit sur le pourtour de l'éponge (formation d'un anneau) et à droite sa répartition est uniforme sur toute l'éponge. Les photos des éponges à J28 de la figure 47 ont été sélectionnées parmi toutes les conditions afin de mettre en évidence les différentes répartitions de la matrice.

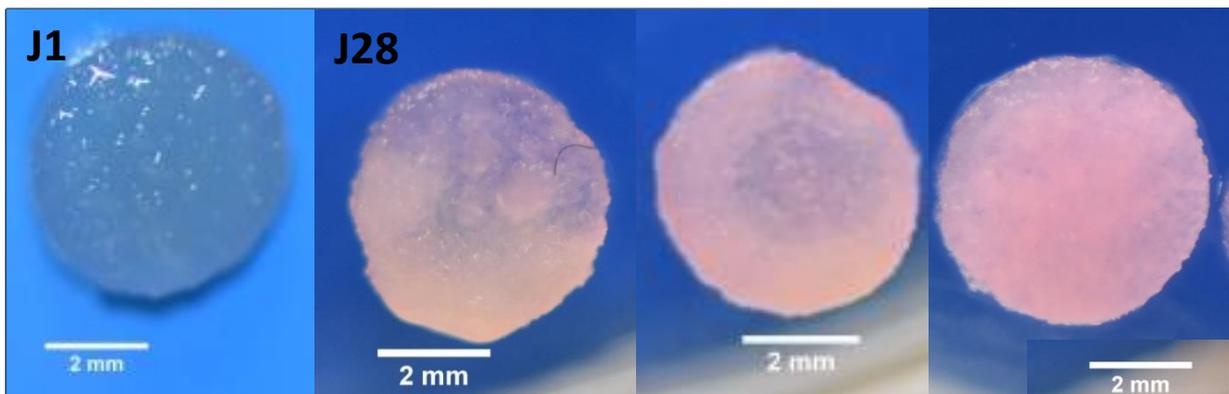


Figure 47 : Photos des éponges à J1 et à J28. A gauche, l'éponge à J1 et à droite les différentes organisations de la matrice formée au bout de 28 jours. Echelle 2mm.

D'une manière générale, au bout de 28 jours de culture les éponges s'épaississent et se rétractent de manière significative entre le 1<sup>er</sup> jour (J1) et le dernier jour de culture (J28) comme le montre la figure 48. Une diminution visible du diamètre (rétraction) de 5.36 mm  $\pm$  0.1 à 4.92 mm  $\pm$  0.14 et une légère augmentation de l'épaisseur de 1.09 mm  $\pm$  0.09 à 1.23 mm  $\pm$  0.07 sont observées entre J1 et J28 respectivement.

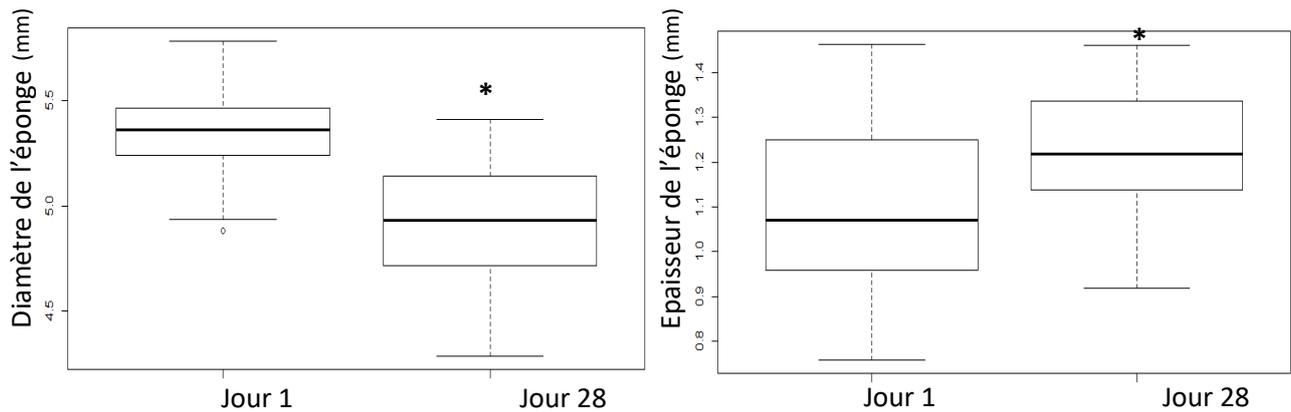


Figure 48 : Représentation en box-plot de l'évolution du diamètre et de l'épaisseur des éponges au bout de 28 jours de culture toutes conditions confondues. A gauche représentation du diamètre en mm et à droite l'épaisseur en mm. \*Mann-Whitney  $p < 0.05$  entre J1 et J28.

### b. Influence de l'environnement chimique

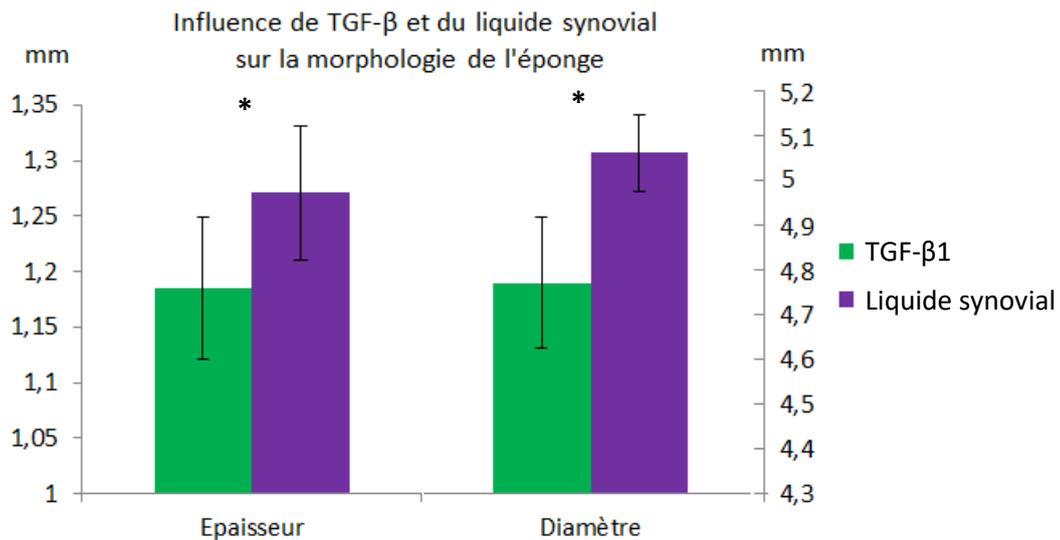


Figure 49 : Graphique représentant l'influence de l'environnement chimique : TGF-β (vert) et liquide synovial (violet) sur la morphologie des éponges au bout de 28 jours de culture : épaisseur (à gauche) et diamètre (à droite). \*Mann-Whitney  $p < 0.05$  entre TGF-β1 et le liquide synovial,  $n=12$ .

L'environnement chimique apporté par le milieu de culture modifie ainsi la morphologie des éponges. En effet, sur la figure 49, on observe que les cellules cultivées en présence de liquide synovial ont une épaisseur d'éponge plus élevée de manière significative par rapport à celles cultivées en présence de TGF-β1 de  $1.27 \text{ mm} \pm 0.06$  à  $1.19 \text{ mm} \pm 0.06$  respectivement. Cependant si on observe la rétractation de l'éponge, les cellules cultivées en présence de TGF-β1 ont un

#### 4.3 Résultats

diamètre de l'éponge plus faible (4.77 mm +/- 0.15) de manière significative par rapport à celles cultivées en présence de liquide synovial (5.06 mm +/- 0.09).

Lorsque l'on distingue les éponges en fonction des classes d'âge des donneurs, (figure 50), les conclusions sont les mêmes, cependant la différence entre les résultats obtenus avec TGF- $\beta$ 1 et avec le liquide synovial ne sont plus significatif pour certains groupes.

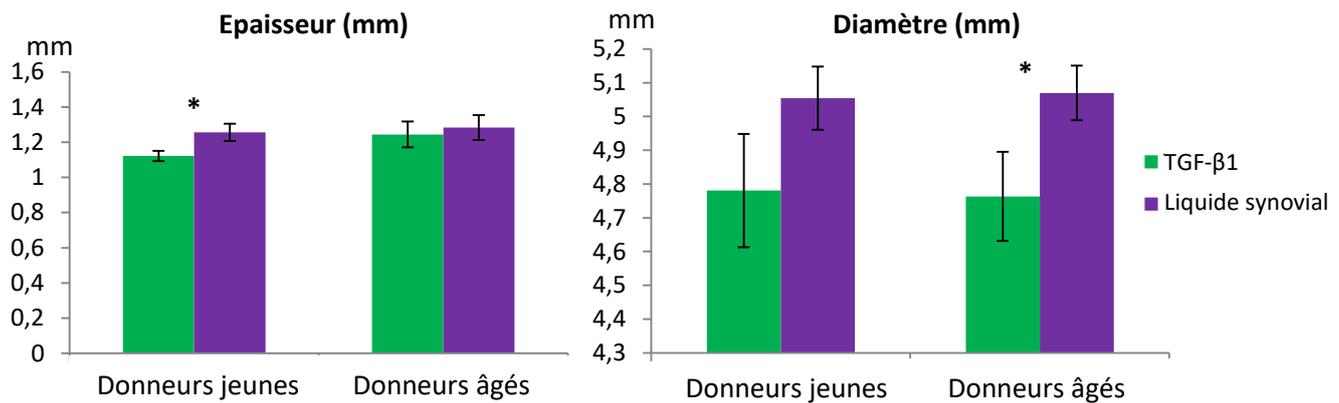


Figure 50 : Graphiques représentant l'influence de l'environnement chimique : TGF- $\beta$ 1 (vert) et liquide synovial (violet) sur le diamètre des éponges au bout de 28 jours de culture pour un groupe d'âge. L'épaisseur est à gauche et le diamètre est à droite. \*Mann-Whitney  $p < 0.05$  entre TGF- $\beta$ 1 et le liquide synovial,  $n=6$ .

#### c. Influence de l'environnement mécanique

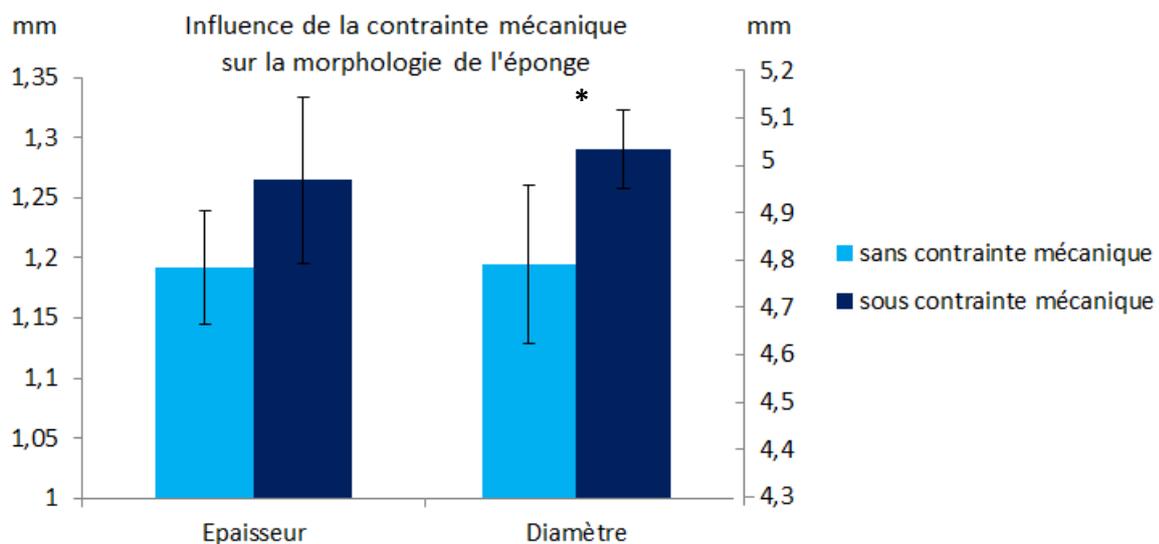


Figure 51: Graphique représentant l'influence de l'environnement mécanique : sans (bleu clair) et avec sollicitations mécaniques (bleu foncé) sur la morphologie des éponges au bout de 28 jours de culture : épaisseur (à gauche) et diamètre (à droite). \*Mann-Whitney  $p < 0.05$  entre les conditions avec ou sans contraintes mécaniques,  $n=24$ .

Lorsque l'on mélange toutes les conditions, l'environnement mécanique modifie la morphologie des éponges. En effet, sur la figure 51, on observe que les éponges sous contraintes mécaniques ont une épaisseur plus élevée de manière significative par rapport aux éponges dans un environnement sans contraintes - 1.26 mm +/- 0.06 à 1.19 mm +/- 0.06. Cependant si on observe la rétractation, ce sont les éponges dans un environnement sans contrainte mécanique qui ont un diamètre plus faible (4.8 mm +/- 0.12) de manière significative que les éponges sous contraintes mécaniques (5.04 mm +/- 0.13).

Lorsque que l'on sépare les donneurs jeunes des donneurs âgés (figure 52), les conclusions sont les mêmes cependant la différence entre le diamètre des éponges sous ou sans contrainte est significative, uniquement chez les donneurs jeunes.

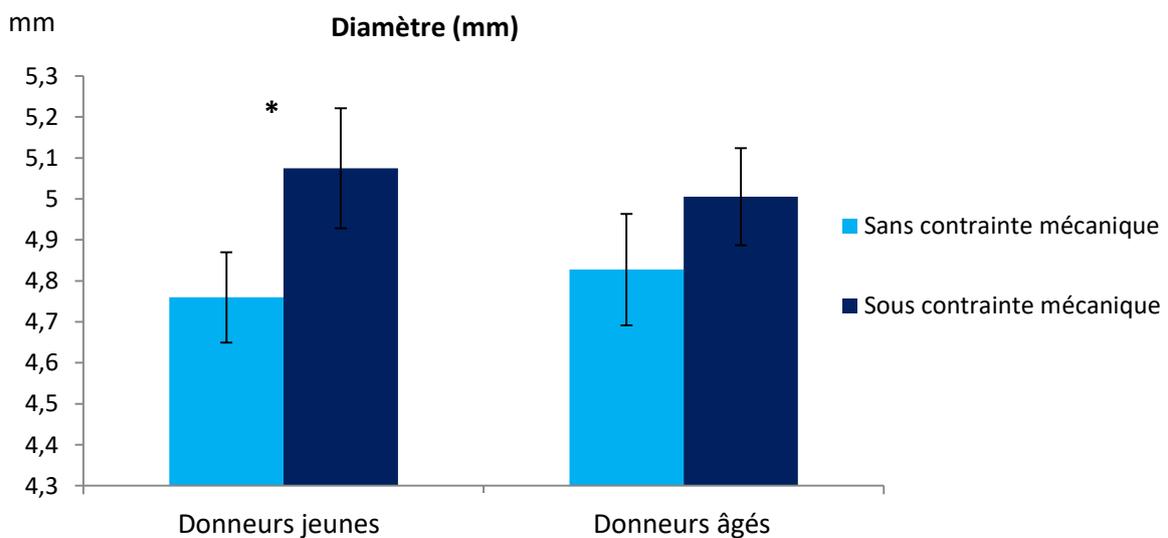


Figure 52: Graphique représentant l'influence de l'environnement mécanique : sans (bleu clair) et avec sollicitations mécaniques (bleu foncé) sur le diamètre des éponges en fonction de l'âge du donneur, au bout de 28 jours de culture. Les donneurs jeunes sont à gauche et les donneurs âgés sont à droite. \*Mann-Whitney  $p < 0.05$  entre les conditions avec ou sans contraintes mécaniques,  $n=24$ .

#### d. Influence du type de contrainte mécanique

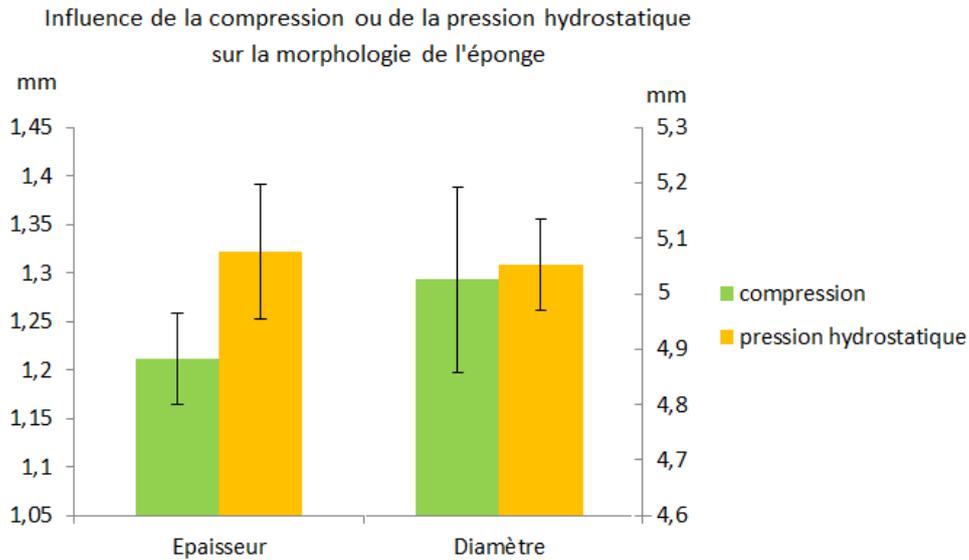


Figure 53 : Graphique représentant l'influence de la contrainte mécanique : compression (vert) et pression hydrostatique (orange) sur la morphologie des éponges au bout de 28 jours de culture : épaisseur (à gauche) et diamètre (à droite). \*Mann-Whitney  $p < 0.05$  entre la compression et la pression hydrostatique,  $n=12$ .

Pour toutes conditions confondues, la contrainte mécanique a une influence sur la morphologie des éponges. En effet, la figure 53 montre que les éponges sous pression hydrostatique ont tendance à avoir une épaisseur plus élevée par rapport à celles sous compression (1.21 mm +/- 0.07 à 1.32 mm +/- 0.05 respectivement). Cependant si on observe le diamètre des éponges soumise aux deux types de contraintes, il n'y a pas de différence notable (5.05 mm +/- 0.08 à 5.03 mm +/- 0.17 pour la pression hydrostatique et la compression respectivement).

Lorsque que l'on distingue les donneurs jeunes des donneurs âgés (figure 54), on observe que la contrainte mécanique n'a aucun effet sur le diamètre des éponges issues des donneurs jeunes contrairement à celles issues des donneurs âgés chez lesquels les éponges tendent à se rétracter sous compression. En ce qui concerne l'épaisseur, il n'y a pas de différence entre les deux groupes d'âge en condition de compression ou de pression hydrostatique.

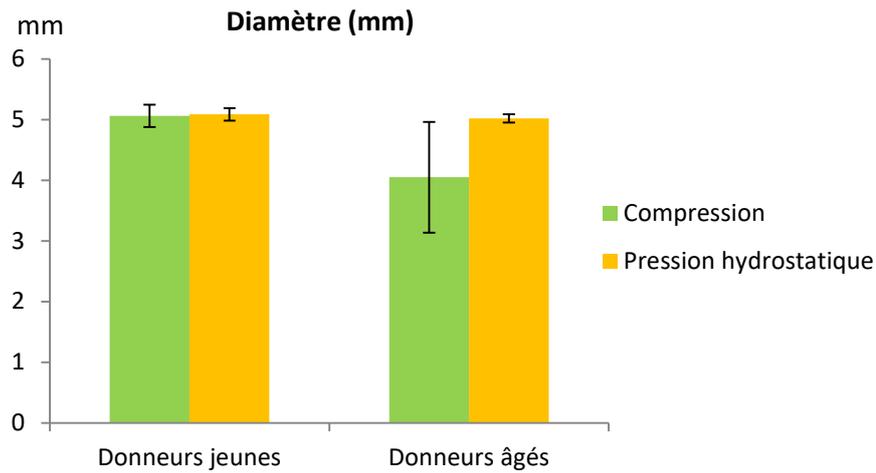


Figure 54 : Graphique représentant l'influence de la contrainte mécanique : compression (vert) et pression hydrostatique (orange) sur le diamètre des éponges au bout de 28 jours de culture selon l'âge du donneur, n=6.

#### e. Combinaison de l'environnement mécanique et chimique

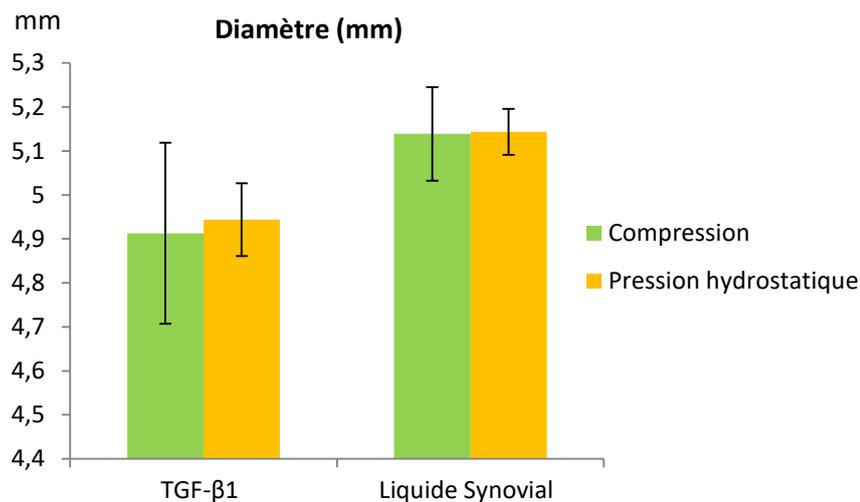


Figure 55 : Graphique représentant l'influence de la combinaison des contraintes mécaniques et chimiques sur le diamètre des éponges au bout de 28 jours de culture: compression (vert) et pression hydrostatique (orange), n=6.

D'un point de vue global (i.e. si on s'affranchit de l'âge du donneur), la combinaison de l'environnement mécanique et chimique montre un effet de l'environnement chimique beaucoup plus prépondérant que l'effet mécanique sur la morphologie de l'éponge (figure 55). 4.791 mm +/- 0.2 et 4.94 mm +/- 0.08 pour la compression et la pression hydrostatique sous présence de TGF-β1 respectivement et 5.14 mm +/- 0.11 et 5.14 mm +/- 0.05 pour la compression et la pression hydrostatique sous présence de LS respectivement.

### 4.3 Résultats

Cependant, lorsque l'on distingue les donneurs jeunes des donneurs âgés (figure 56), on observe une tendance inverse entre les donneurs jeunes et âgés que cela soit pour l'environnement chimique : TGF- $\beta$ 1 ou LS ou mécanique : compression et pression hydrostatique.

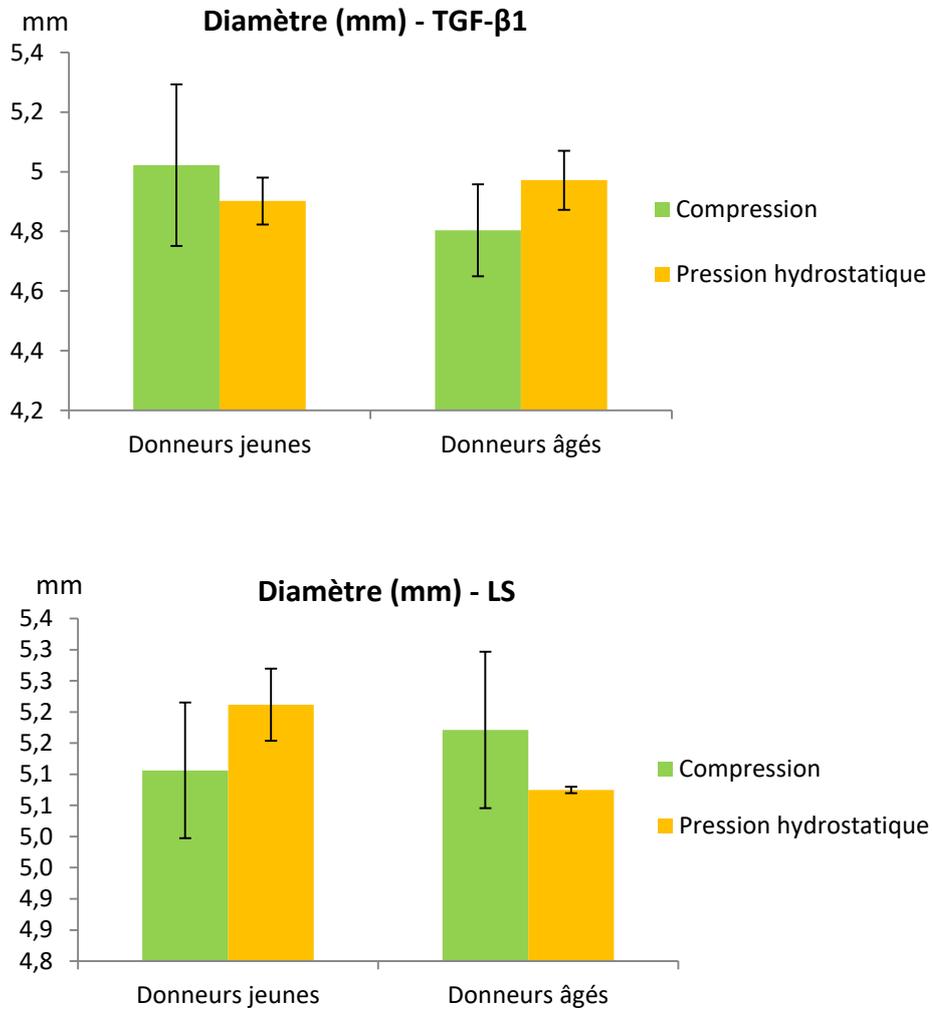


Figure 56 : Graphiques représentant l'influence de la combinaison des sollicitations mécanique et chimique sur le diamètre des éponges au bout de 28 jours de culture selon l'âge du donneur : compression (vert) et pression hydrostatique (orange) ; A : En présence de TGF- $\beta$ 1, B : en présence de liquide synovial, n=6.

3.6. Aspect microscopique des fibres de collagène des greffons issus de l'ITF

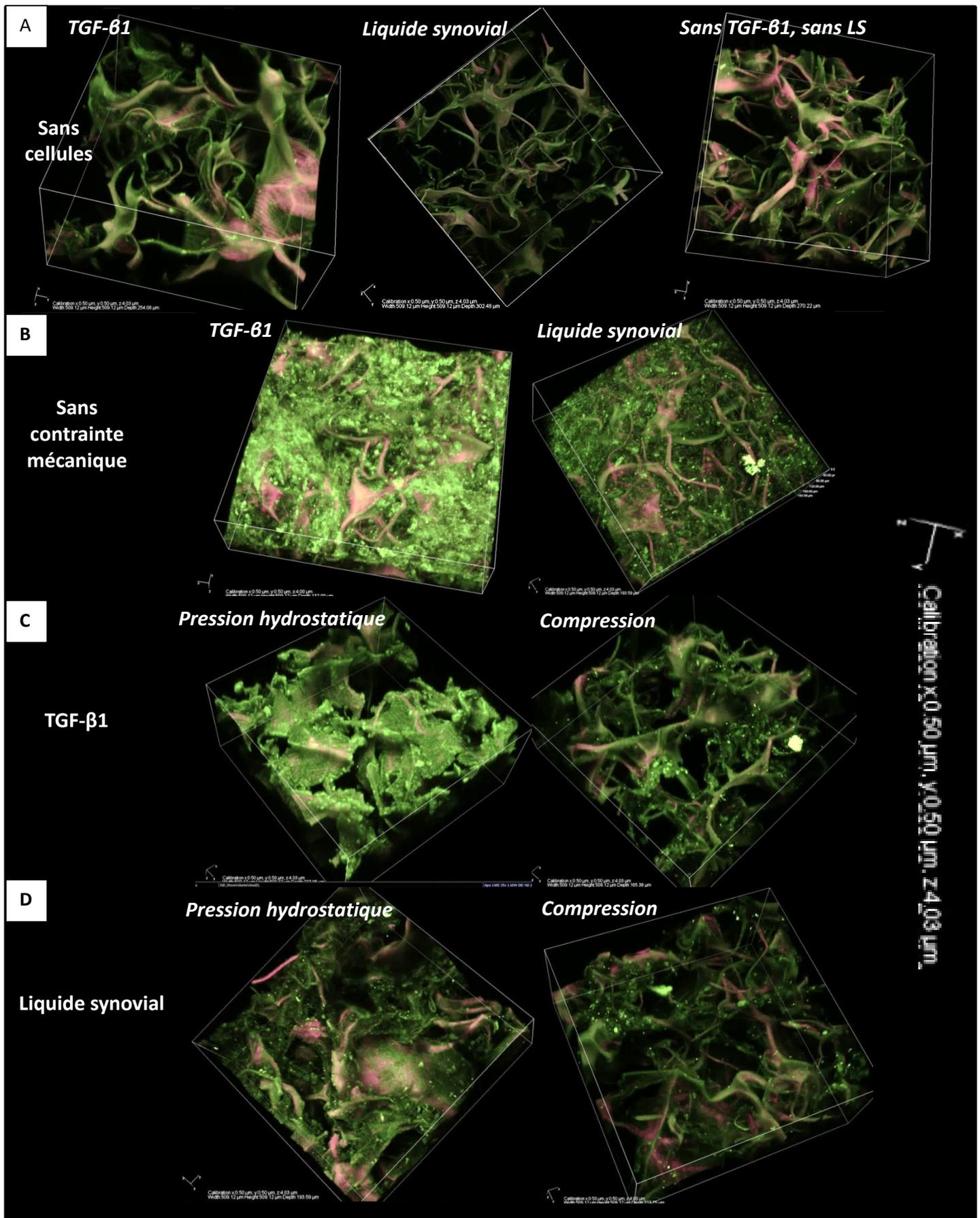


Figure 57 : reconstruction 3D de la matrice de collagène de l'éponge (de couleur rose et verte) et de la MEC (uniquement de couleur verte) après 28 jours de culture. Les images ont été réalisées au microscope confocal multiphoton. Echelle : x:50μm, y:50μm et z:4.03μm

### 4.3 Résultats

A : Eponges sans cellules et sans contrainte mécanique. A gauche en présence de TGF- $\beta$ 1, au centre en présence de liquide synovial et à droite sans TGF- $\beta$ 1 et sans LS. B : Eponges avec cellules sans contrainte mécanique. A gauche, en présence de TGF- $\beta$ 1, à droite en présence de liquide synovial.

C : Eponges avec cellules en présence de TGF- $\beta$ 1. A gauche, sous pression hydrostatique, à droite sous compression. D : Eponges avec cellules en présence de liquide synovial. A gauche, sous pression hydrostatique, à droite sous compression.

Les reconstructions 3D d'images prises au microscope confocal multiphoton, représentées sur la figure 57, permettent d'observer la MEC néoformée.

Lorsqu'il n'y a pas de cellules, on n'observe pas de MEC. On constate également que le liquide synovial modifie la structure de l'éponge pour se rapprocher d'une structure en poutres plutôt qu'en plaques

Sans contrainte mécanique, indépendamment de l'âge du donneur, la matrice formée semble plus dense en présence de TGF- $\beta$ 1 qu'en présence de liquide synovial. Cependant la matrice reste beaucoup plus dense dans les 2 cas que sous contrainte mécanique.

En présence de TGF- $\beta$ 1, l'aspect de la matrice diffère en fonction du type de contrainte mécanique exercée, indépendamment de l'âge du donneur. Sous pression hydrostatique, la matrice formée semble être sous forme de plaques contrairement à la matrice formée sous compression qui est plus homogène et semble moins dense.

En présence de liquide synovial, la matrice semble avoir un aspect identique peu importe la contrainte mécanique exercée, indépendamment de l'âge du donneur. Cependant, sous pression hydrostatique, la matrice formée semble être plus dense contrairement à la matrice formée sous compression.

## 3.7. Comportement mécanique des greffons issus de l'ITF

### a. Influence de l'environnement chimique sur le biomatériau

Afin de comprendre l'influence de l'environnement chimique sur le comportement mécanique de l'éponge, nous l'avons étudié sur des éponges sans cellules cultivées dans les milieux durant 28 jours.

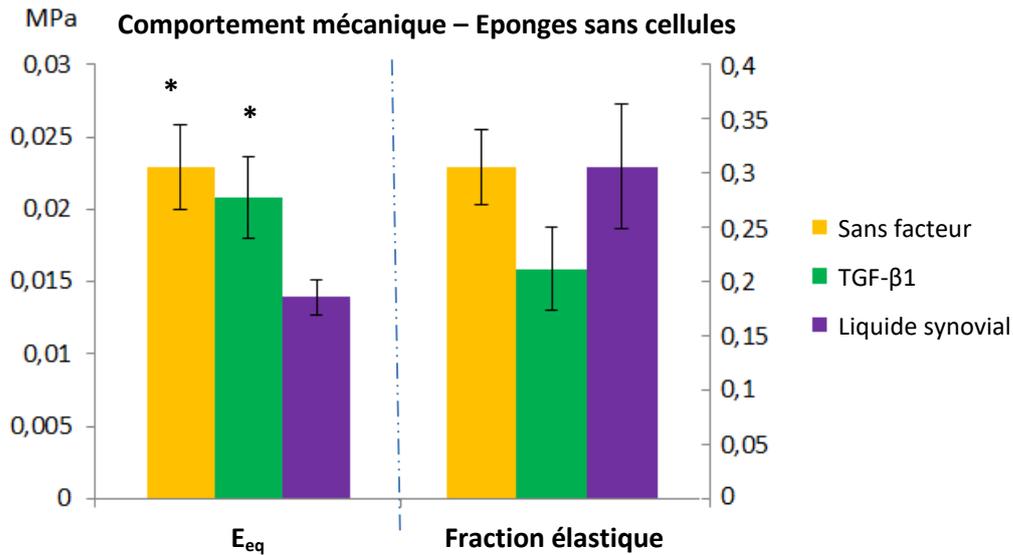


Figure 58 : Comportement mécanique (module à l'équilibre  $E_{eq}$  et fraction élastique) des éponges sans cellules selon le milieu de culture. \* Mann-Whitney  $p < 0.05$  par rapport au liquide synovial,  $n=12$ .

Les facteurs de croissance du milieu de culture ont clairement des effets sur le comportement mécanique des éponges sans cellules après 28 jours de culture (figure 58). Les éponges cultivées en présence du liquide synovial ont un module à l'équilibre significativement plus faible que les éponges cultivées avec du TGF- $\beta$ 1 ou sans aucun de ces 2 facteurs ( $E_{eq}$  : 0.025 MPa +/- 0.003, 0.023 MPa +/- 0.003 et 0.015 MPa +/- 0.001 pour sans facteur, TGF- $\beta$ 1 et LS respectivement). Pour la fraction élastique, une augmentation notable est observée pour les éponges cultivées en présence de TGF- $\beta$ 1 : 0.33 +/- 0.04, 0.23 +/- 0.04 et 0.33 +/- 0.06 pour sans facteur, TGF- $\beta$ 1 et LS respectivement), ce qui signifie une diminution de la viscosité.

### b. Influence de l'environnement chimique sur les greffons obtenus

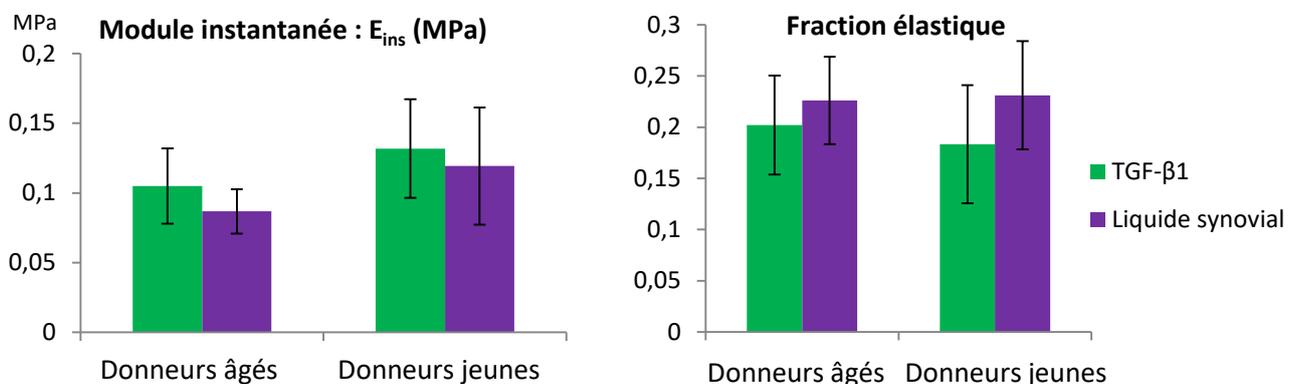


Figure 59 : Comportement mécanique de l'éponge : le module instantané  $E_{ins}$  (à gauche) et la fraction élastique (à droite) en fonction de l'environnement chimique : TGF- $\beta$ 1 (en vert) et le liquide synovial (en violet) de l'âge du donneur,  $n=6$ .

### 4.3 Résultats

La figure 59 illustre l'influence de l'environnement chimique (TGF- $\beta$ 1 et LS) sur le comportement mécanique de l'éponge au bout de 28 jours de culture.

Que les donneurs soient jeunes ou âgés, en présence de liquide synovial, les éponges ont tendance à avoir le module instantané plus faible et la fraction élastique plus élevée, signifiant une viscosité plus faible également, qu'en présence de TGF- $\beta$ 1 ( $E_{ins}$  : 0.11 MPa +/- 0.030 et 0.09 MPa +/- 0.016 chez les donneurs âgés / 0.13 MPa +/- 0.058 et 0.12 MPa +/- 0.039 chez les donneurs jeunes pour TGF- $\beta$ 1 et LS respectivement).

#### c. Influence de la sollicitation mécanique sur les greffons obtenus

##### Comportement mécanique – Influence de la sollicitation

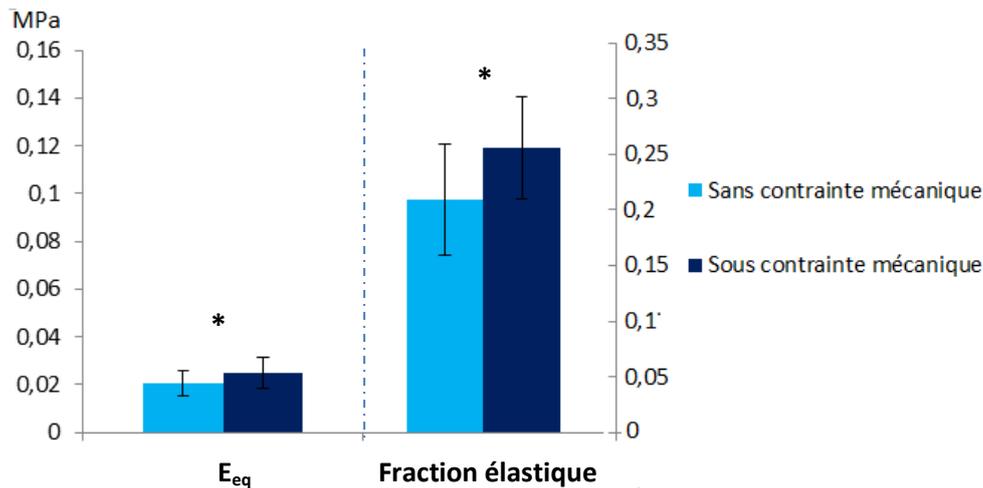


Figure 60 : Comportement mécanique (module à l'équilibre  $E_{eq}$  et fraction élastique) pour les éponges sans (bleu clair) ou avec sollicitations mécaniques (bleu foncé). \* Mann-Whitney  $p < 0.05$  entre sans et avec contrainte mécanique,  $n=24$ .

Quel que soit le type de sollicitation mécanique et le type d'environnement chimique, le module à l'équilibre des éponges obtenues après sollicitation mécanique est plus élevé de manière significative que sans sollicitation : 0.025 MPa +/- 0.007 et 0.021 MPa +/- 0.005 respectivement, tandis que la fraction élastique est significativement plus élevée (i.e. une viscosité plus faible) : 0.256 +/- 0.091 et 0.209 MPa +/- 0.05 respectivement (figure n°60).

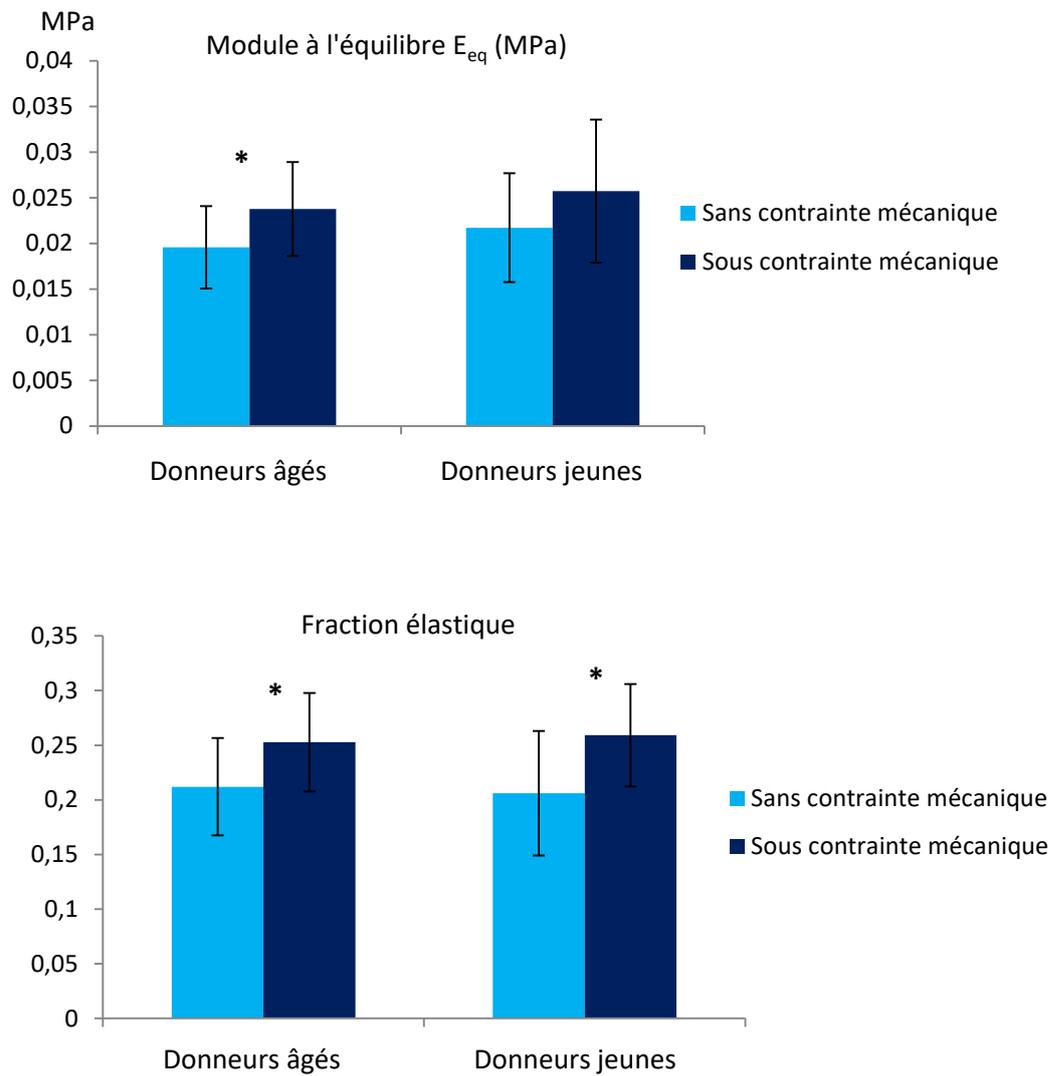


Figure 61 : Comportement mécanique de l'éponge : module à l'équilibre  $E_{eq}$  (en haut) et fraction élastique (en bas). Sans (bleu clair) ou avec (bleu foncé) sollicitations mécaniques selon l'âge du donneur. \* Mann-Whitney  $p < 0.05$  entre sans et avec contrainte mécanique,  $n=12$ .

Lorsque que l'on distingue les greffons obtenus à partir des cellules de donneurs jeunes ou âgés (figure 61), on observe la même conclusion que pour l'analyse globale ( $E_{eq}$  des éponges plus élevé avec sollicitation et une fraction élastique plus élevée (i.e. une viscosité plus faible) avec sollicitation) mais, même si la tendance est identique, la significativité n'est plus retrouvée chez les donneurs jeunes pour le  $E_{eq}$ .

**d. Influence du type de sollicitation mécanique**

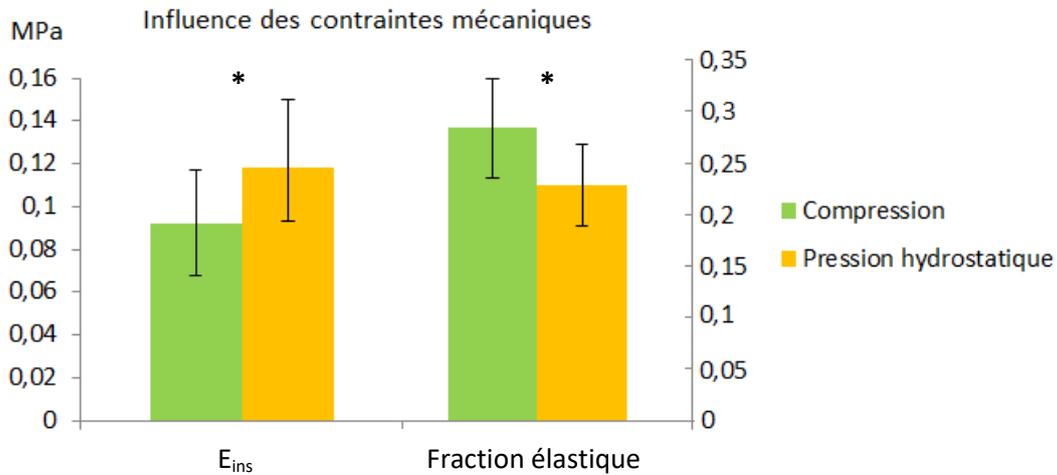


Figure 62 : Comportement mécanique de l'éponge (module instantané  $E_{ins}$  et fraction élastique), en fonction de la contrainte appliquée. \* Mann-Whitney  $p < 0.05$  entre pression hydrostatique et compression,  $n = 12$ .

Les éponges obtenues avec des sollicitations mécaniques sous pression hydrostatique, tout âge de donneur confondu, ont un module instantané plus élevé et une fraction élastique plus faible (i.e. une viscosité plus grande) significativement que les éponges obtenues en compression ;  $E_{ins}$  : 0,092 MPa +/- 0,02 et 0,118 MPa +/- 0,03 / viscosité : 0,284 +/- 0,05 et 0,228 +/- 0,04 pour la compression et la pression hydrostatique respectivement (figure n°62). Le résultat est identique lorsque que l'on distingue les donneurs jeunes des donneurs âgés (figure 63).

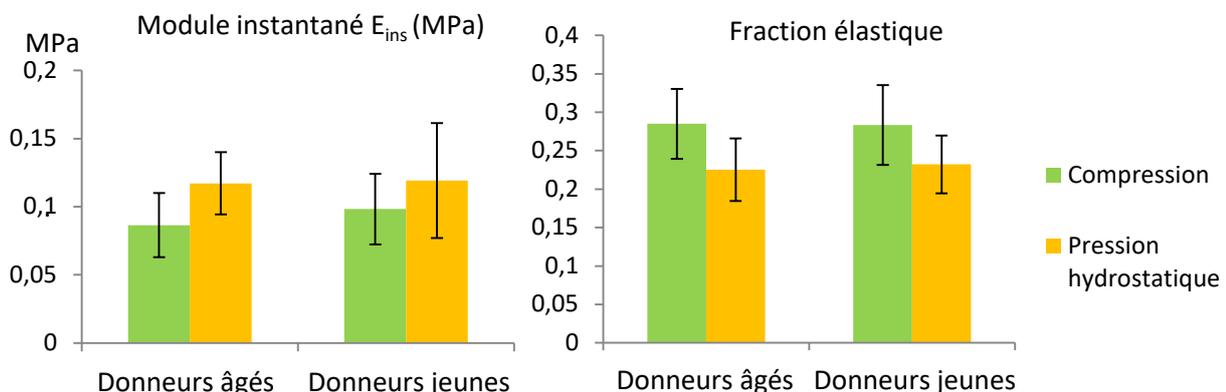


Figure 63 : Comportement mécanique de l'éponge : module instantané  $E_{ins}$  (à gauche) et fraction élastique (à droite), en fonction de la contrainte appliquée et de l'âge du donneur. \* Mann-Whitney  $p < 0.05$  entre pression hydrostatique et compression,  $n = 6$ .

### e. Combinaison de l'environnement mécanique et chimique

Lorsque l'on combine, environnement chimique et mécanique, le comportement mécanique du greffon n'est pas le même selon l'âge. Si on compare par rapport aux conditions sous compression : le module instantané augmente pour les conditions sous pression hydrostatique pour TGF- $\beta$ 1 (0.072 MPa +/- 0.018 à 0.107 MPa +/- 0.019 respectivement) ou LS (0.101 MPa +/- 0.027 à 0.125 MPa +/- 0.025 respectivement) pour les greffons issus des donneurs âgés; alors que sous pression hydrostatique  $E_{ins}$  augmente en présence de LS (0.074 MPa +/- 0.019 à 0.139 MPa +/- 0.051 respectivement) mais diminue en présence de TGF- $\beta$ 1 (0.123 MPa +/- 0.027 à 0.086 MPa +/- 0.009 respectivement) pour les greffons issus des donneurs jeunes (figure 64).

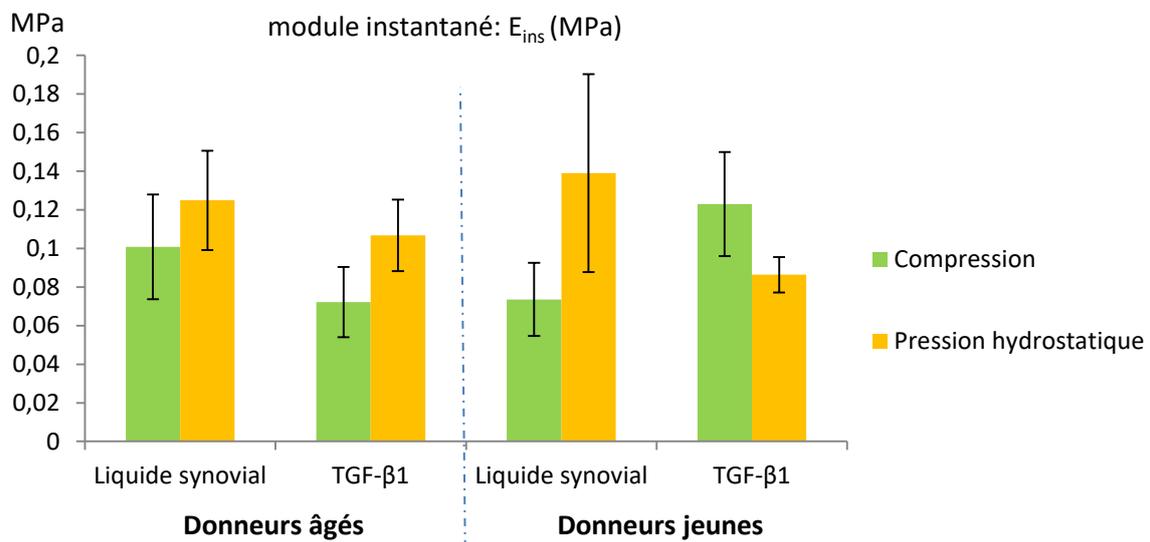


Figure 64 : Graphique représentant le module instantané  $E_{ins}$  en MPa, de l'éponge, en fonction de la contrainte appliquée et de l'âge du donneur. \* Mann-Whitney  $p < 0.05$  entre pression hydrostatique (orange) et compression (vert),  $n=3$ .

## 3.8. Comportement de la cellule

### a. Influence de l'environnement chimique sans sollicitation mécanique

La figure 65 illustre l'influence de l'âge des donneurs en fonction du type de facteur de croissance du milieu de culture (TGF- $\beta$ 1 ou de liquide synovial) en l'absence de contrainte mécanique.

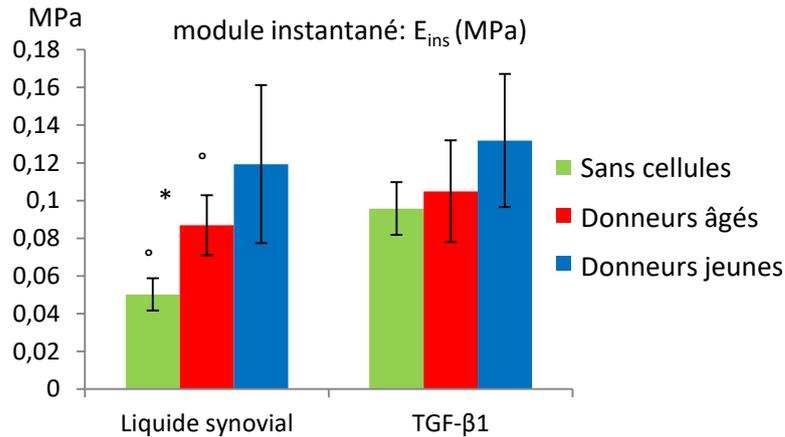


Figure 65 : Graphique représentant l'impact de l'âge sur les propriétés mécaniques de l'éponge en présence TGF-β1 ou de liquide synovial. \*Mann-Whitney  $p < 0.05$  entre les donneurs jeunes et les donneurs âgés. ° Mann-Whitney  $p < 0.05$  par rapport à la condition sans cellules,  $n=6$ .

En présence de liquide synovial, quel que soit l'âge du donneur, les éponges présentent des propriétés mécaniques plus élevées significativement que sans cellules :  $E_{ins}$  : 0.050 MPa +/- 0.009, 0.085 MPa +/- 0.016 et 0.115 MPa +/- 0.039 en culture avec du LS ;  $E_{ins}$  : 0.105 MPa +/- 0.015, 0.106 MPa +/- 0.026 et 0.134 MPa +/- 0.039 en culture avec du TGF-β1, pour les éponges sans cellules, avec les cellules des donneurs âgés et avec les cellules des donneurs jeunes respectivement.

En présence de TGF-β1, cette fois les propriétés mécaniques des greffons obtenus à partir de cellules de donneurs jeunes sont significativement plus élevées que chez les donneurs âgés (comparativement au chapitre 2).

#### ***b. Combinaison de l'environnement mécanique et chimique***

La pression hydrostatique (figure 66) en présence de liquide synovial, a un très fort effet d'augmentation du comportement mécanique des éponges obtenues quel que soit le donneur alors que l'effet est beaucoup moins important en présence de TGF-β1 pour les éponges avec cellules par rapport aux éponges sans cellules. La même tendance est observée dans le cas de la compression mais dans une mesure beaucoup plus faible.

Au niveau de la rétractation, selon l'âge du donneur la réponse cellulaire n'est pas la même. Les cellules de donneurs âgés retractent plus la matrice dans les conditions de compression et TGF-β1

alors que les cellules de donneurs jeunes rétractent plus la matrice dans le cas de la pression hydrostatique et de TGF- $\beta$ 1.

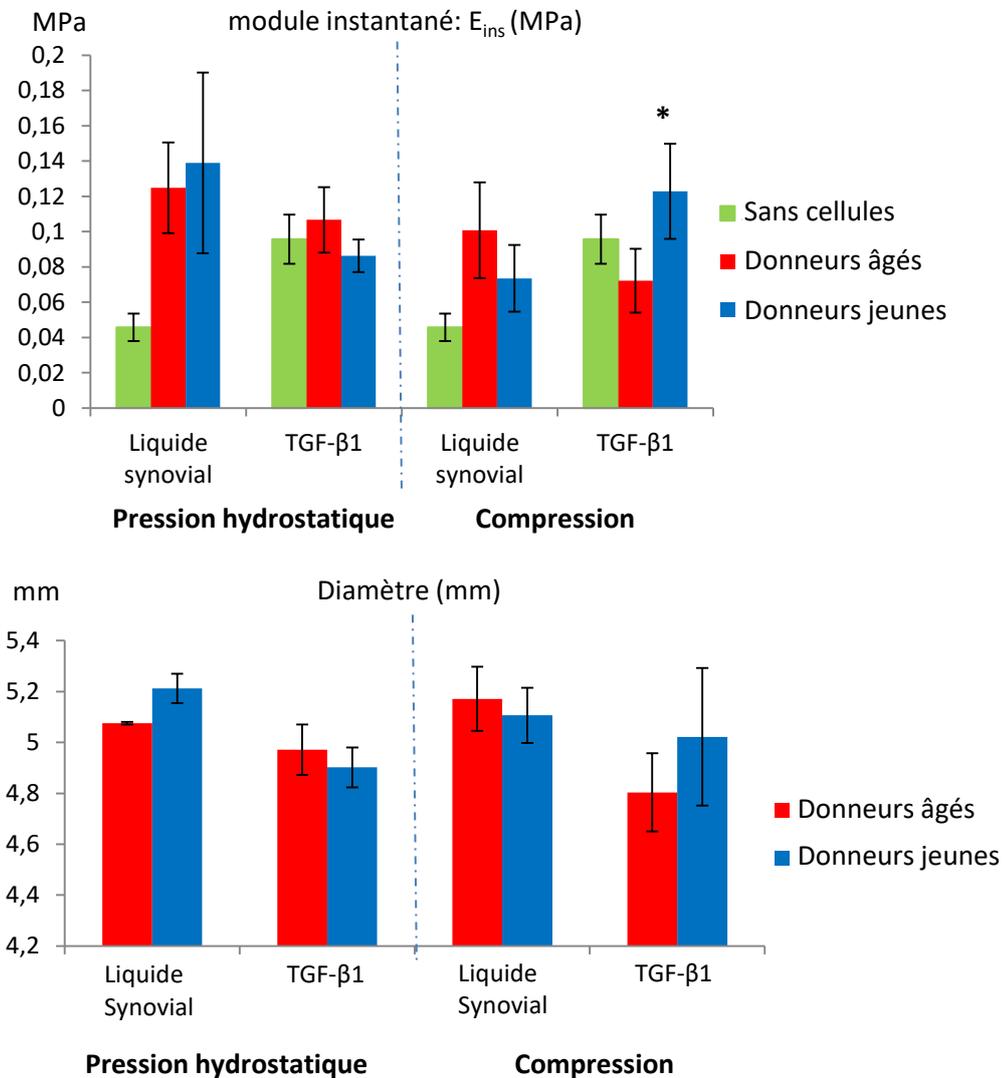


Figure 66 : Graphiques représentant l'impact de l'âge sur les propriétés mécaniques de l'éponge (en haut) et sur le diamètre (en bas) lorsque l'on combine contraintes mécaniques et chimiques. \*Mann-Whitney  $p < 0.05$  entre les donneurs jeunes et les donneurs âgés,  $n=3$ .

## IV. Discussion

L'ingénierie tissulaire fonctionnelle (ITF) est une nouvelle stratégie qui, en se développant, va permettre de mieux comprendre *in vitro* l'interaction entre différents paramètres du vivant. Dans notre étude, combinant les CSMh et un biomatériau à base de collagène de type I, nous avons pu discriminer plusieurs paramètres déterminant les propriétés mécaniques et structurales du greffon, au bout de 28 jours de culture : 1) L'environnement chimique, démontrant que le liquide synovial et le TGF- $\beta$ 1, agit sur les CSMh en les orientant vers la voie de la chondrogénèse. 2) La sollicitation mécanique, en démontrant que l'application d'une contrainte agit sur les CSMh en les orientant vers la voie de la chondrogénèse, mais étonnamment, les résultats restent inférieurs à ceux obtenus sans contraintes. 3) La contrainte mécanique, en démontrant que la pression hydrostatique produit des greffons avec des propriétés mécaniques supérieures à ceux ayant subi la compression malgré une synthèse matricielle qui semble identique. 4) La combinaison d'une contrainte mécanique et d'un stimulus chimique, en démontrant que contrairement à lorsque l'on prend chaque facteur indépendamment, la combinaison de plusieurs facteurs induit une réponse cellulaire en fonction de l'âge du donneur des CSMh.

D'une manière générale, au bout de 28 jours de culture, les éponges se sont rétractées, avec une diminution du diamètre (de 5.36 mm à J1 à 4.92 mm à J28). Cette étude macroscopique est caractéristique de la chondrogénèse [137] et est due à une protéine synthétisée par les chondrocytes, la *Smooth Muscle Action* (SMA) [138]. Cette contraction du biomatériau permet une augmentation de la densité au même endroit favorisant les liens cellules-cellules déclenchant la différenciation cellulaire [134], [137] et est associée à la réticulation en modifiant la porosité [118], [137]. Il y a donc une réorganisation de l'éponge qui se produit en même temps que la synthèse de la MEC d'où probablement l'absence de corrélation entre la contraction de l'éponge et l'épaississement de l'éponge.

Encore actuellement, le choix du biomatériau dans l'ingénierie tissulaire reste un challenge. La plus grande innovation a été sur l'inter-connectivité du biomatériau poreux, encore à améliorer, afin de faciliter la pénétration et la distribution des cellules au sein de celui-ci. Le problème rencontré est que les cellulesensemencées ne restent pas seulement dans le biomatériau, elles le traversent et sortent par les périphéries qui sont ouvertes, entraînant une perte de cellules, une mauvaise distribution de celles qui restent et ainsi une mauvaise qualité du tissu néoformé. Cela peut expliquer nos observations, à l'œil nu, d'une répartition non homogène de la MEC. En effet, une fuite des cellules au sein de l'éponge a pu arriver durant les premières heures suivant l'ensemencement ou lors des contraintes mécaniques à un moment où elles n'étaient plus ancrées dans le biomatériau (pour la division cellulaire par exemple). Pour pallier à cela, une première solution serait d'ensemencer avec une plus grande concentration cellulaire pour compenser la perte mais cette option pourrait entraîner une agrégation cellulaire et avoir un effet négatif sur la distribution et la réponse de ces cellules au sein du biomatériau. Un travail sur le biomatériau semble donc plus approprié. Chen *et al* [171] ont créé un nouveau biomatériau formé d'une éponge de collagène de type I recouverte d'une membrane (le fond et les côtés en laissant une ouverture par le dessus) ayant des pores plus petits que les cellules (11 $\mu$ m) afin d'empêcher leur fuite. Ce dispositif fonctionne, ils ont obtenu après 4 semaines de culture, la synthèse des composants de la MEC (collagène de type II et GAGs) par les CSMh sur tout le biomatériau.

Concernant l'environnement chimique, afin d'améliorer la chondrogénèse, de nombreux facteurs de différenciation sont utilisés dont l'un des principaux est le TGF- $\beta$ . Au sein de l'articulation, le cartilage baigne dans le liquide synovial de composition complexe. Nous avons donc étudié les deux facteurs et montré qu'en présence de liquide synovial, quel que soit l'âge du donneur et sans sollicitation mécanique, les CSMh ont synthétisé la matrice au bout de 28 jours de culture comme observé sur les images obtenues à partir du microscope confocal multiphoton. Cependant, en présence de TGF- $\beta$ 1, la réponse des CSMh paraît meilleure, c'est-à-dire caractérisée par un diamètre des éponges significativement plus petit et des propriétés mécaniques plus élevées (non-significatif). L'utilisation

#### 4.4 Discussion

de LS arthrosique pourrait expliquer cette différence dans les résultats. L'effet du LS sur la chondrogénèse est très controversé dans la littérature. Fahy *et al* [172] montrent que la chondrogenèse des CSMs est inhibée par le LS arthrosique, en diminuant fortement l'expression des gènes Col2A1 et ACAN codant pour la protéine du collagène de type II et des protéoglycanes. Cette inhibition est due à la présence des macrophages M1 qui sont sécrétés par la membrane synoviale et sont associés avec une production élevée de médiateurs pro-inflammatoires tels que *Tumoral Necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) ou les interleukines IL-6 et IL-12 (TNF- $\alpha$ ) [173]. Kruger *et al* [174] ont quant à eux réalisé une culture de cellules progénitrices sous-chondrales (CSP) en pellet en présence de liquide synoviale issu de donneurs sains, atteints d'arthrose ou d'arthrite rhumatoïde (AR) sans la présence TGF- $\beta$ 1 dans le milieu. Ils montrent que l'environnement très inflammatoire de l'AR affecte négativement la chondrogenèse, alors que celui de l'arthrose ne l'altère pas, retardant toutefois l'expression des gènes par les cellules progénitrices sous-chondrales comparé à un environnement sain. Peut-être que la culture en présence de LS arthrosique nécessiterait plus de temps pour arriver aux mêmes résultats que TGF- $\beta$ 1 seul.

Dans notre étude, si on analyse les éponges sans cellules, on observe que les propriétés mécaniques dans le milieu LS arthrosique des éponges ont diminué tandis qu'au microscope, on observe une éponge composée de fibres plus petites que celles sans facteur (ni LS, ni TGF- $\beta$ 1) ou avec TGF- $\beta$ 1. L'éponge a donc été dégradée par le liquide synovial. En effet il contient de nombreuses enzymes comme des métalloprotéases ou collagénases, responsables de la dégradation des protéines matricielles et des protéoglycanes. Ainsi, de base, en présence de LS, l'éponge aura des propriétés mécaniques plus faibles. On conclut donc que les cellules cultivées en présence de LS ont augmentés les propriétés mécaniques de l'éponge de 28 % pour le  $E_{eq}$  et de 102% pour le  $E_{ins}$  contre 5% et 24% respectivement en présence de TGF- $\beta$ 1. Pour pallier à la dégradation, les cellules ont ainsi fabriqué plus de matrice, ce qui pourrait expliquer les épaisseurs plus élevées par rapport à TGF- $\beta$ 1.

Le liquide synovial de l'articulation normale ne contient pas de protéoglycanes sulfatés [17], cela suppose qu'un composant de la couche superficielle du cartilage qui est imprégnée d'acide hyaluronique (HA) constitue une barrière efficace contre la diffusion ou l'écoulement. Pour contrecarrer les effets du LS arthrosique, un biomatériau moins sensible, composé de produit tel que l'AH, pourrait servir de barrière pour inhiber l'effet destructeur du LS arthrosique ou l'inhibition des effets des macrophages M1 et des enzymes au sein du LS même afin de maximiser le potentiel des CSMh.

La stimulation mécanique présente au sein de l'articulation (compression, pression hydrostatique et cisaillement) joue un rôle important dans l'homéostasie des chondrocytes *in vivo* et modifie également le comportement de biosynthèse des chondrocytes *in vitro*, tel que démontré pour les explants et les tissus modifiés [97]. Dans notre étude, sous sollicitations mécaniques (compression et pression hydrostatique), indépendamment de l'âge du donneur et des facteurs de différenciation, au bout de 28 jours, les éponges se sont moins rétractées de manière significative par rapport aux éponges sans sollicitations mécaniques et présentent un module instantané et une viscosité plus faible mais un module à l'équilibre plus élevé non significatif. Cette différence est corrélée à une absence ou une quantité plus faible de MEC (images prises au microscope confocal). Cette différence est surtout visible pour les éponges cultivées en présence de TGF- $\beta$ 1. Pourtant la littérature montre que la pression hydrostatique cyclique [11]–[15] et la compression dynamique [179]–[182] stimulent la différenciation chondrogénique des CSMh.

Dans notre étude, deux types de contraintes mécaniques ont été testées : la compression et la pression hydrostatique. Les résultats montrent que le diamètre n'est pas modifié en fonction de la contrainte mais les éponges sous pression hydrostatique présentent une épaisseur plus élevée que celle ayant subi la compression qui peut être due à une matrice plus diffuse (photo microscope confocal). Au niveau des propriétés mécaniques, les éponges ayant subi la compression présentent des propriétés mécaniques plus faibles que les éponges ayant subi la pression hydrostatique,

#### 4.4 Discussion

indépendamment du facteur chimique (i.e. LS et TGF- $\beta$ 1 confondus). Il est impossible de dire visuellement à partir des images du microscope confocal multiphoton, dû à la difficulté de discriminer le collagène de l'éponge de celui synthétisé par les éponges, si la matrice est plus présente quantitativement pour les éponges ayant subi l'une ou l'autre des contraintes.

Lorsque l'on analyse individuellement chaque paramètre, notre étude, montre qu'en fonction du facteur choisi, la réponse cellulaire des CSMh va dépendre des autres paramètres. Par exemple :

- ✚ si on applique une contrainte mécanique sous forme de pression hydrostatique, les résultats obtenus sont meilleurs en présence du liquide synovial (viscosité,  $E_{ins}$  et  $E_{eq}$  plus élevé) qu'avec TGF- $\beta$ 1.
- ✚ Si on applique une stimulation de compression, les propriétés mécaniques sont plus élevées en présence de TGF- $\beta$ 1 pour les donneurs jeunes alors que pour les donneurs âgés, les propriétés mécaniques sont plus élevées en présence de LS.
- ✚ Si on utilise TGF- $\beta$ 1 comme facteur de différenciation, l'âge doit être pris en compte : pour les donneurs jeunes, les propriétés mécaniques sont plus élevées sous compression que sous pression hydrostatique ; pour les donneurs âgés, les propriétés mécaniques sont plus élevées sous pression hydrostatique que sous compression.
- ✚ Si le milieu est composé de LS, les propriétés mécaniques sont plus élevées sous pression hydrostatique que sous compression.

Le milieu contenant du liquide synovial a une particularité dans son comportement face aux sollicitations mécaniques contrairement au milieu contenant juste TGF- $\beta$ 1 : Albro *et al* [69] montre que le TGF- $\beta$ 1 latent présent dans le liquide synovial sain peut être rendu actif grâce à l'application d'un cisaillement et la concentration de TGF- $\beta$ 1 activé reste stable pendant 8 heures minimum. L'activation du TGF- $\beta$ 1 latent du LS par le cisaillement peut expliquer que dans notre étude, les propriétés mécaniques sont plus élevées ( $E_{ins}$ ,  $E_{eq}$  et la viscosité) sous pression hydrostatique contrairement à la compression. Mais aussi le peu de différence dans la synthèse de matrice

observée au microscope confocal en présence de LS dans des conditions avec ou sans sollicitations mécaniques contrairement à ce qu'on observe en présence de TGF- $\beta$ 1. Cependant la différence n'est pas significative entre les deux conditions. Albro *et al* [69] utilise un taux de cisaillement inférieur au cisaillement ressenti par le LS dans l'articulation, cela veut dire que le mouvement de l'articulation peut augmenter la concentration de TGF- $\beta$ 1 actif *in vivo*. La pression hydrostatique appliquée pour notre expérience est de 75 KPa avec une fréquence de 0.3Hz n'est peut-être pas assez forte par rapport au niveau physiologique qui est compris entre 3 et 10 MPa avec une fréquence de 1Hz [30] contrairement à la contrainte appliquée par la compression. Une 2<sup>ème</sup> hypothèse serait une quantité de TGF- $\beta$ 1 latent (donc de liquide synovial) pas suffisant. Une étude réalisée en interne à l'école vétérinaire de Lyon par Elodie Dubois [183] montre que le LS devient létal pour les CSMh à partir de 20% et dès 10 % pour le LS arthrosique *in vitro*.

Une autre explication aux meilleures propriétés mécaniques obtenues sous contraintes en présence du LS par rapport à TGF- $\beta$ 1 peut aussi être la dégradation de l'éponge de collagène de type I vu précédemment. En effet, Ng *et al* [184] montrent que la dégradation du biomatériau stimule la production de collagène de type II et ainsi augmente le module dynamique ( $E_{ins}$ ), car la dégradation entraîne une augmentation de la place pour le transport de nutriment et de l'espace pour le développement des fibres de collagène néosynthétisées.

Contrairement aux études retrouvées dans la littérature, dans notre étude, la compression n'induit pas une stimulation importante de la chondrogénèse des CSMh. Une première hypothèse, pourrait être l'utilisation d'une contrainte trop forte par rapport à ce qui est ressenti dans l'articulation. Sawatjui *et al* [77] comparent la réponse des CSMh issues de la moelle osseuse et des chondrocytes humain sous une compression allant de 5%, 10% et 50% de déformation durant une stimulation à court (1h) et à long terme (1h par jour durant 7 jours). Ils montrent que la réponse des chondrocytes et des CSMh sur une stimulation sur le long terme était similaire entre les deux types cellulaires et augmente en fonction de la déformation appliquée. La différence avec notre expérience est qu'ils ont

#### 4.4 Discussion

réalisé une pré-culture durant une semaine en condition sans sollicitations mécaniques. Lima *et al* [185] ont montré que les chondrocytes ensemencés dans des hydrogels d'agarose avec 10 ng / ml de TGF- $\beta$ 3 sous compression dynamique présentent une inhibition de la synthèse des GAGs mais l'application de la même contrainte après une culture de 2 semaines en présence de TGF- $\beta$ 3 donne des constructions plus rigides que le contrôle, mesurée par compression non confinée. Il est peut être nécessaire qu'une pré-culture des CSMs soit effectuée avant d'appliquer une contrainte de compression pour obtenir de meilleurs greffons. Mouw *et al* [186] ont observé que la réponse des CSMs de veau issues de la moelle osseuse au sein d'un gel d'agarose sous compression dynamique varie durant le processus de la chondrogenèse. Ils ont en effet observé une amélioration de la chondrogenèse par les contraintes après 16 jours de pré-culture en présence de TGF- $\beta$ 1. En fait, le développement de la matrice régulerait mécaniquement la stimulation des CSMs au fur et à mesure de la chondrogenèse. Dans le cas de la compression, une pré-culture sans contrainte serait donc nécessaire.

Une autre hypothèse pour expliquer la faible réponse sous compression pourrait être la concentration en TGF- $\beta$ 1. Li *et al* [182] montrent que lorsqu'on utilise la concentration standard *in vitro* en TGF- $\beta$ 1 soit de 10ng/ml, la réponse à une compression couplé avec un cisaillement dynamique est réduite contrairement à une concentration plus faible de 1ng/ml qui augmente fortement l'expression des marqueurs chondrogénique (collagène de type II et aggrecanes). En effet, la concentration dite standard de TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) est non physiologique. Elle est beaucoup plus élevée qu'*in vivo* ce qui masque certainement les effets de la contrainte sur la chondrogenèse des CSMh. Miyanishi *et al* [177] ont également montré que l'exposition à une pression hydrostatique, en l'absence de TGF- $\beta$ 3, des CSMh cultivées en pellet, augmente l'expression des gènes pour SOX9, col2A1 et ACAN de manière significative que les contrôles sans contraintes et qu'en présence de 10ng/ml de TGF- $\beta$ 3. Cependant le retrait complet de TGF- $\beta$  peut faire débat. Mouw *et al* [186] ont réalisé des études sans dexaméthasone et sans TGF- $\beta$ 1. Dans leur étude, la contrainte mécanique n'a pas entraîné une augmentation importante du collagène de type II ou de l'expression du gène ACAN.

La combinaison de dexaméthasone et TGF- $\beta$ 1 est cruciale pour la chondrogenèse des CSMh sous contrainte.

On peut ainsi déduire que l'utilisation du liquide synovial couplé à une fréquence, une durée et une amplitude de la contrainte adaptée solutionne le problème lié à la concentration en TGF- $\beta$  et permet de se rapprocher de l'environnement biomécanique et biochimique physiologique de l'articulation.

En résumé, malgré des résultats encourageants, le protocole que nous avons développé nécessite encore d'être amélioré car nous sommes encore loin des propriétés physiologiques du cartilage natif de l'adulte. Lors du mouvement, les sollicitations mécaniques subies par l'articulation sont très complexes et variables, une seule sollicitation mécanique pourrait en réalité ne pas être suffisante pour la production d'une matrice comparable à la matrice *in vivo* par les CSMhs *in vitro*. Li *et al* [182], schatti *et al* [180], Li *et al* [179] et Hosseini *et al* [187] montrent en effet que la réponse est supérieure lors de l'application de deux types de sollicitations, c'est-à-dire compression ou pression hydrostatique accompagnée de cisaillement.

Pour finir, si on s'intéresse à l'âge du donneur et à la réponse cellulaire face aux facteurs extérieurs, on observe une nouvelle fois que l'âge a son importance en fonction de la combinaison des facteurs stimulants. Notre étude a montré que les greffons issus des CSMh de donneurs jeunes se démarquent (i.e. Le comportement mécanique) de manière significative pour la combinaison TGF- $\beta$ 1 et compression et les donneurs âgés pour la combinaison LS et compression de manière visible mais non significative. Les combinaisons de facteurs chimiques associés à la pression hydrostatique ne privilégient pas une catégorie d'âge par rapport à une autre. Il est donc important d'adapter les conditions lorsque plusieurs facteurs entrent en jeu dont l'âge du donneur.

Une autre différence notable concernant l'âge est qu'en présence de TGF- $\beta$ 1 ou de LS dans le milieu de culture sans sollicitations mécaniques, même si l'âge ne joue pas un rôle sur la contraction du biomatériau, les propriétés mécaniques sont affectées. Après la culture sans sollicitation, les

#### 4.4 Discussion

propriétés mécaniques des greffons issus des donneurs jeunes sont plus élevées que pour les greffons issus des donneurs âgés à la fois pour les cultures en TGF- $\beta$ 1 et en LS. Or, le chapitre 2 a démontré que les greffons ensemencés avec les cellules de donneurs âgés sur un biomatériau de collagène de type I, au bout de 28 jours de culture, présentent des propriétés mécaniques plus élevées que ceux issus de donneurs jeunes. Les seules différences entre les deux expériences sont les donneurs âgés et leur âge (52 et 65 ans pour l'expérience du chapitre 2 et 51 et 81 ans pour cette expérience). Cela démontre qu'en plus de l'âge, le donneur lui-même joue un rôle.

## V. Conclusion

Au sein d'un biomatériau de collagène de type I, l'environnement mécanique et chimique rencontré au sein de l'articulation influence la chondrogénèse *in vitro* des CSMh, parfois en fonction de l'âge du donneur. Au bout de 28 jours, nous avons observé que : 1) le liquide synovial oriente les CSMh dans la voie de la chondrogénèse même si les résultats restent inférieurs à ceux obtenus en présence de TGF- $\beta$ 1 (fabrication de la matrice et comportement mécanique) ; 2) l'application d'une sollicitation mécanique (compression ou pression hydrostatique) induit la chondrogénèse mais avec des résultats sur la qualité de la matrice inférieurs à ceux obtenus sans sollicitations (fabrication de matrice et propriétés mécaniques) ; 3) la pression hydrostatique produit des greffons avec des propriétés mécaniques supérieures à ceux sous compression de manière significative mais une synthèse matricielle qui semble équivalente.

Une nouvelle fois, on a pu observer que l'âge du donneur influence la réponse cellulaire et la fabrication de la matrice cartilagineuse lorsque l'environnement, et plus particulièrement une combinaison de facteurs, est pris en compte. Selon le groupe d'âge, on n'obtient pas les mêmes résultats sur la matrice synthétisée et le comportement mécanique du greffon. Cela est marquant, dans le cas de la compression où les greffons sont de meilleure qualité, significativement, dans le cas des donneurs jeunes avec le TGF- $\beta$ 1 et dans le cas des donneurs âgés avec le LS.

L'Ingénierie Tissulaire Fonctionnelle du cartilage offre de nouvelle piste d'optimisation des greffons pour obtenir en présence du microenvironnement articulaire (liquide synovial vs TGF- $\beta$ 1, contraintes vs sans contraintes) des résultats supérieurs à ceux de l'environnement *in vitro* standard. Une meilleure compréhension de la mécanotransduction de la réponse cellulaire lors de l'embryogénèse de l'articulation synoviale pourrait aider à optimiser le protocole. De plus, lorsque que l'on combine plusieurs paramètres, la question de l'âge du donneur pour la réparation du cartilage articulaire endommagé à partir de l'IT est un facteur à ne pas négliger car chaque groupe d'âge réagit de façon différente aux stimuli. Il convient donc d'adapter ces facteurs de façon optimale en fonction de la classe d'âge du donneur.



# Conclusion générale et perspectives

---

Le cartilage est un tissu biologique, dont le rôle principal est la protection des segments osseux des contraintes mécaniques de l'environnement tout en permettant un mouvement fluide de l'articulation avec l'aide du liquide synovial, lubrifiant naturel des diarthroses. Le liquide synovial fournit également les éléments nécessaires au métabolisme des chondrocytes et aux autres cellules du cartilage, pour entretenir la matrice extra-cellulaire (MEC). Le couple cartilage/liquide synovial est un système biotribologique extrêmement performant, mais avec le temps la régulation du métabolisme de la MEC est moins bien contrôlée et la résistance du cartilage aux contraintes mécaniques est moins efficace. Cependant les lésions du cartilage ne sont pas uniquement liées à l'âge et des personnes jeunes peuvent présenter un défaut chondral ou osteochondral notamment suite à un traumatisme.

La partie bibliographie, nous a permis de mettre en avant le rôle central du cartilage dans l'articulation mais aussi ses caractéristiques physiologiques comme le manque de vascularisation provoquant une autoréparation très faible. De plus, on ne connaît pas encore très bien l'action de certains facteurs de croissance et de différenciation sur la réparation du cartilage *in vivo*. Depuis plusieurs années, afin de traiter les lésions du cartilage, diverses techniques ont été développées mais les tissus néoformés ne répondent pas encore aux critères mécaniques ou structuraux complexes du cartilage natif. La technique qui semble être la plus prometteuse est l'ingénierie tissulaire. Cependant, certains aspects comme l'âge du donneur pour les cellules souches utilisées ne sont généralement pas pris en compte dans les études.

Notre première étude *in vitro*, nous a permis de mettre en évidence l'influence de l'âge du donneur sur la synthèse de la MEC cartilagineuse. En effet, au bout de 28 jours, les greffons issus de donneurs âgés montrent des propriétés mécaniques plus élevées que chez les donneurs jeunes ainsi qu'une

### *Conclusion générale et perspectives*

production de collagène de type II et de glycosaminoglycanes (GAGs) plus élevée. Cette différence entre les donneurs jeunes et âgés sur la synthèse de la MEC diminue au bout de 56 jours. Les cellules issues de donneurs jeunes rattrapent leur retard dans la synthèse des GAGs, mais 56 jours représentent un temps trop long pour une application clinique.

Notre deuxième étude, *in vivo* cette fois, nous a permis de nouveau de mettre en évidence l'influence de l'âge des donneurs. Les greffons, obtenus dans les mêmes conditions que la première étude, ont été placés dans un défaut ostéochondral créé chirurgicalement chez des rats NUDE. Dans les 2 cas, c'est-à-dire avec des greffons issus des donneurs jeunes ou des greffons issus des donneurs âgés, les greffons ne permettent pas une réparation satisfaisante du défaut au bout de 28 jours. Cependant les rats ayant reçus les greffons issus de donneurs jeunes présentent une dégradation supplémentaire de l'environnement du défaut dont nous avons étudié les propriétés mécaniques, les caractéristiques histologiques et la microstructure de l'os sous-jacent. La première étude *in vitro* nous a montré que les cellules issues de donneurs jeunes présentaient un retard dans la synthèse des protéines de la MEC du cartilage. *In vivo*, une réaction inflammatoire dégradant des tissus articulaires notamment lors de l'implantation des greffons issus de donneurs jeunes est observée. Cette inflammation peut être due à l'activité cellulaire de prolifération des cellules plus importante ou tout simplement au fait que les CSMs ne se soient pas encore différenciées chez les donneurs jeunes.

Dans notre troisième étude, *in vitro* à nouveau, nous avons combiné plusieurs paramètres du microenvironnement articulaire. Nous avons ainsi étudié l'influence du liquide synovial par rapport au facteur de croissance TGF- $\beta$ 1 et l'influence de la nature des contraintes mécaniques (compression ou pression hydrostatique). Dans toutes les conditions étudiées, les cellules ont synthétisé de la MEC. Plus précisément, les greffons présentent de meilleures propriétés mécaniques et structurelles avec TGF- $\beta$ 1 qu'en présence de LS. En appliquant une pression hydrostatique de façon intermittente, les greffons présentent de meilleures propriétés mécaniques et structurelles que sous compression. De plus, on remarque que sous pression hydrostatique, la différence entre contrainte et sans contrainte

n'est pas significative au niveau de la synthèse de la MEC contrairement à la compression. Enfin, les greffons ne répondent pas de manière identique selon l'âge.

On remarque également une interaction entre les paramètres. En effet, l'association du LS avec la compression donne les meilleurs résultats pour les cellules issues de donneurs âgés alors que l'association TGF- $\beta$ 1 avec la compression donne les meilleurs résultats pour les cellules issues de donneurs jeunes. Toutefois, malgré l'utilisation de paramètres micro-environnementaux biomimétiques, nous n'avons pas réussi à augmenter les propriétés mécaniques des greffons. Le procédé d'ingénierie tissulaire fonctionnelle demande donc encore d'être amélioré.

L'abondance des données disponibles dans la littérature issues des tests biomécaniques ne répond cependant toujours pas à la question principale de l'IT : quels sont les paramètres à utiliser pour la conception d'un greffon dont l'implantation résulte en un néocartilage fonctionnel, ni aux caractéristiques des greffons à rechercher : doit-il imiter le comportement viscoélastique du tissu natif ou posséder sa géométrie, son organisation et sa microstructure ? Très peu d'études ce sont focalisées sur les propriétés mécaniques du greffon, à savoir ses propriétés de résistance face à la compression, à la pression hydrostatique ou aux frottements. Pourtant ces propriétés semblent le point de départ logique à une bonne intégration du greffon et une bonne réparation du défaut.

Dans nos études, nous nous sommes orientés sur l'optimisation des propriétés du greffon de manière à ce qu'il se rapproche le plus possible du cartilage hyalin. De nouvelles pistes thérapeutiques s'intéressent à l'unité ostéochondrale au complet c'est-à-dire à une structure os-cartilage. En effet, les lésions du cartilage sont souvent des lésions ostéochondrales. Aussi de nouvelles études utilisent des matrices biphasiques, si les résultats obtenus sont encourageants, le cartilage néoformé n'est toujours pas mécaniquement viable dans l'articulation.

Une nouvelle technique d'impression 3D se développe. Cette technique permet l'incorporation des cellules et des signaux biologiques pendant le processus de fabrication, pour générer des implants biologiquement actifs mais aussi sa forme. L'utilisation de plusieurs bio-encre, permet de générer des

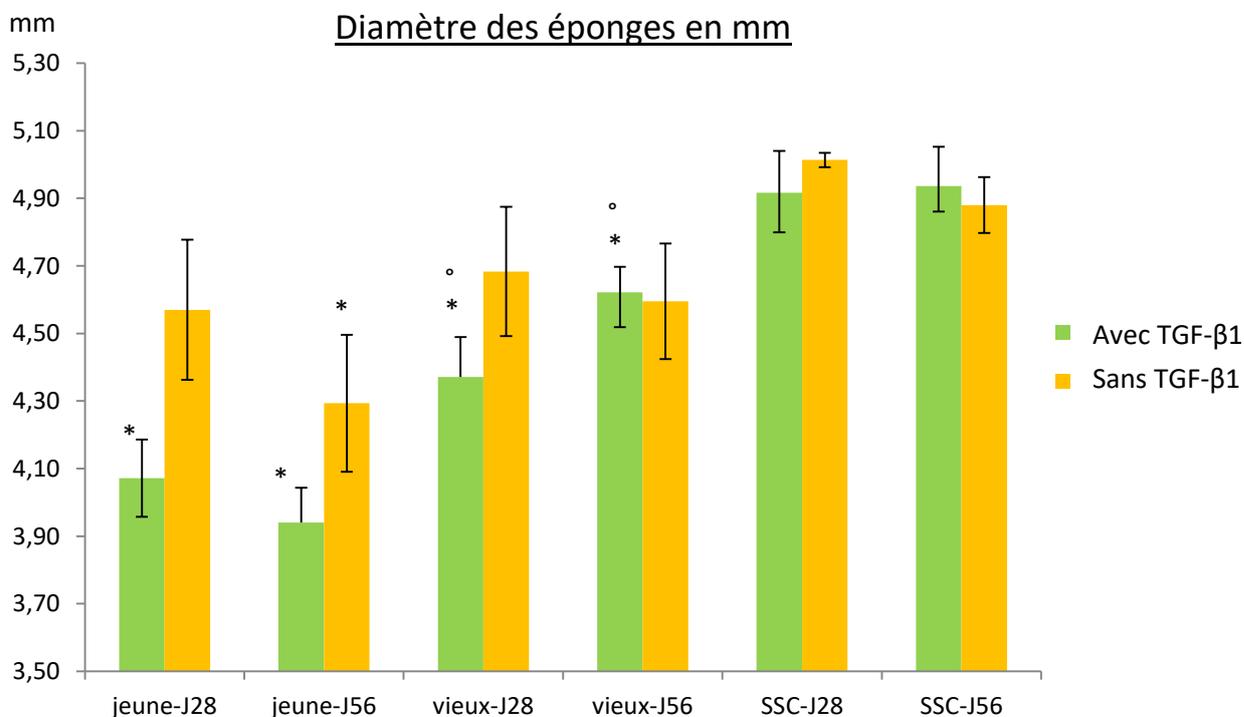
### *Conclusion générale et perspectives*

zones dans l'implant afin de différencier l'os du cartilage. Les propriétés mécaniques de l'implant obtenu par hybridation avec des polymères thermoplastiques ou hydrogels sont pertinentes. Cependant les bio-encre et les processus d'impression doivent encore être optimisés afin de répondre aux exigences de la clinique (reproductibilité, stérilité de l'implant) [188].

Une autre approche intéressante est une manière de caractériser le greffon avant implantation de manière non invasive serait un plus pour l'utilisation clinique. En effet un manque de biomarqueur non invasif en ingénierie tissulaire est un point bloquant. Un tel biomarqueur pourrait donner une idée des propriétés mécaniques et structurelles de l'implant pré-implantatoire permettant ainsi de modifier les conditions de culture au fur et à mesure et au final permettrait un traitement patient spécifique.

# Annexe n°1 : diamètre des éponges de

## la partie II



### Légende :

Jeune-J28 = éponges cultivées avec les CSMh de donneurs jeune durant 28 jours

Jeune-J56 = éponges cultivées avec les CSMh de donneurs jeune durant 56 jours

vieux-J28 = éponges cultivées avec les CSMh de donneurs âgés durant 28 jours

vieux-J56 = éponges cultivées avec les CSMh de donneurs âgés durant 56 jours

SSC-J28 = éponges cultivées sans CSMh durant 28 jours

SSC-J56 = éponges cultivées sans CSMh durant 56 jours

\*P-value < 0.05 par rapport aux éponges sans cellules à un temps t, n=6.

°p-value < 0.05 par rapport aux éponges ensemencées avec les cellules des donneurs jeunes à un temps t, n=6.

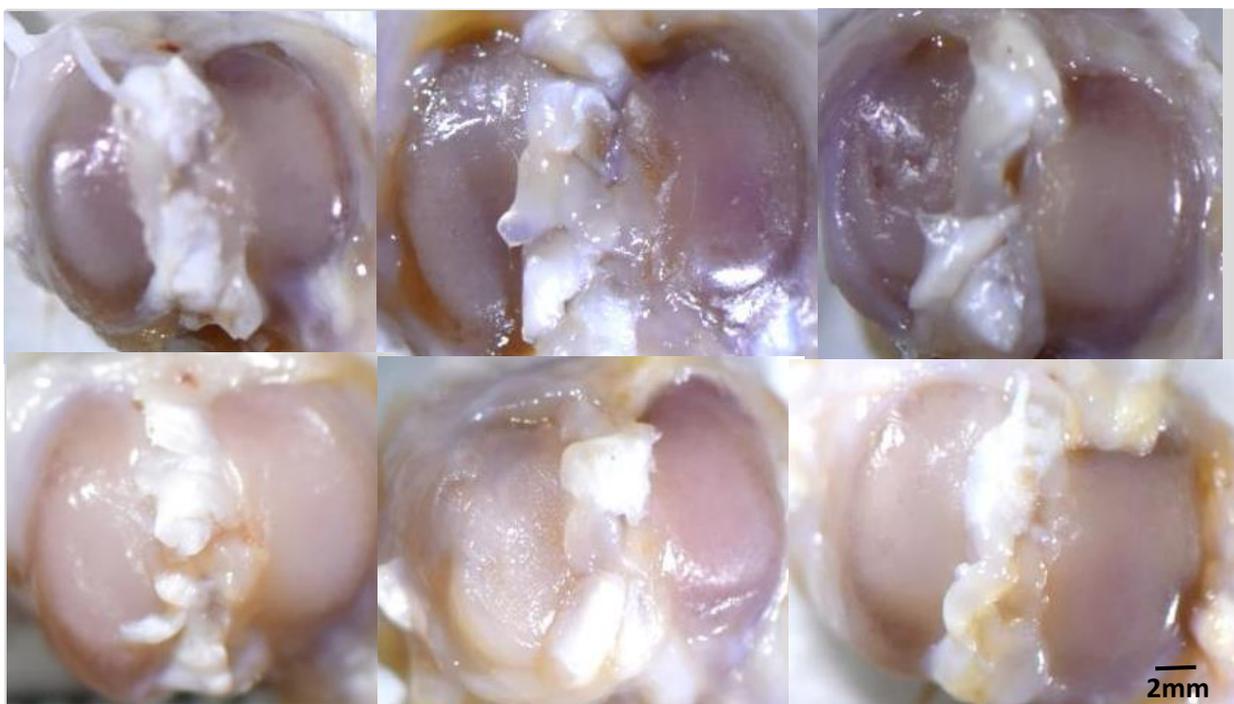
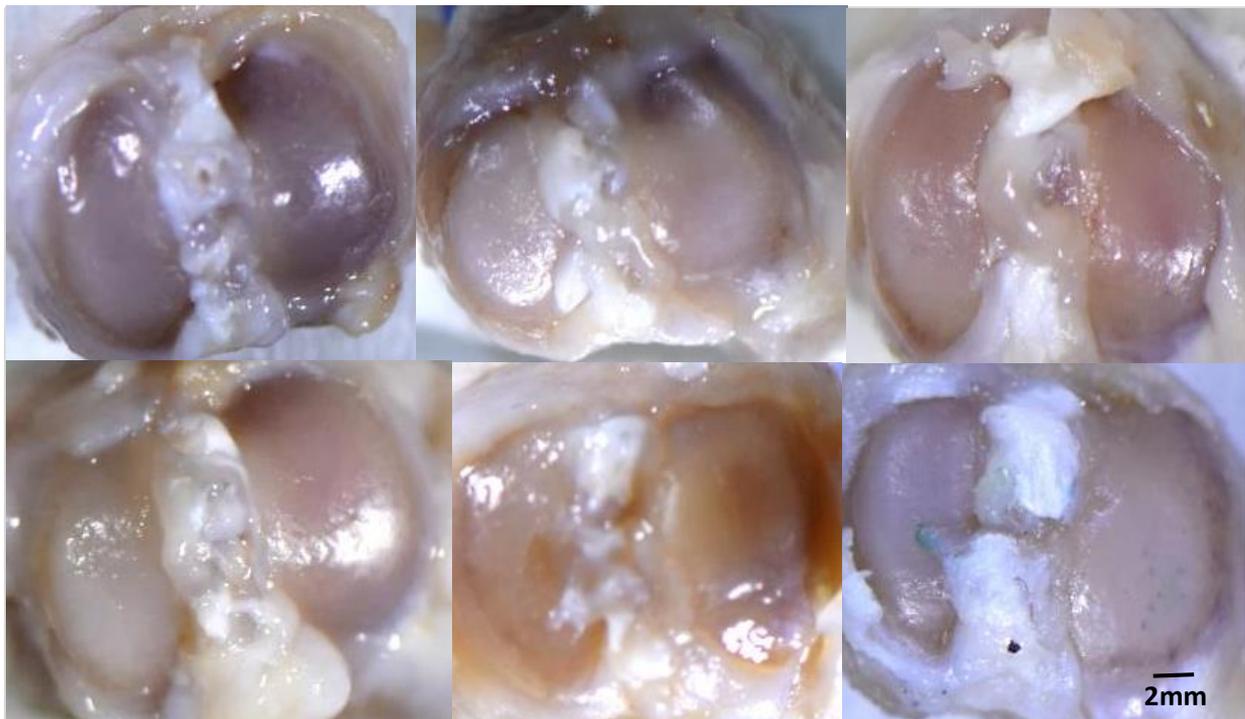
## Annexe n° 2 : photographies macroscopiques des fémurs de la patte droite

Ces photographies montrent les condyles fémoraux de la patte droite, patte opérée, pour les 6 rats ayant reçu les greffons issus des donneurs jeunes (haut) et les 6 rats ayant reçu les greffons issus de donneurs âgés (bas). Echelle 2mm.



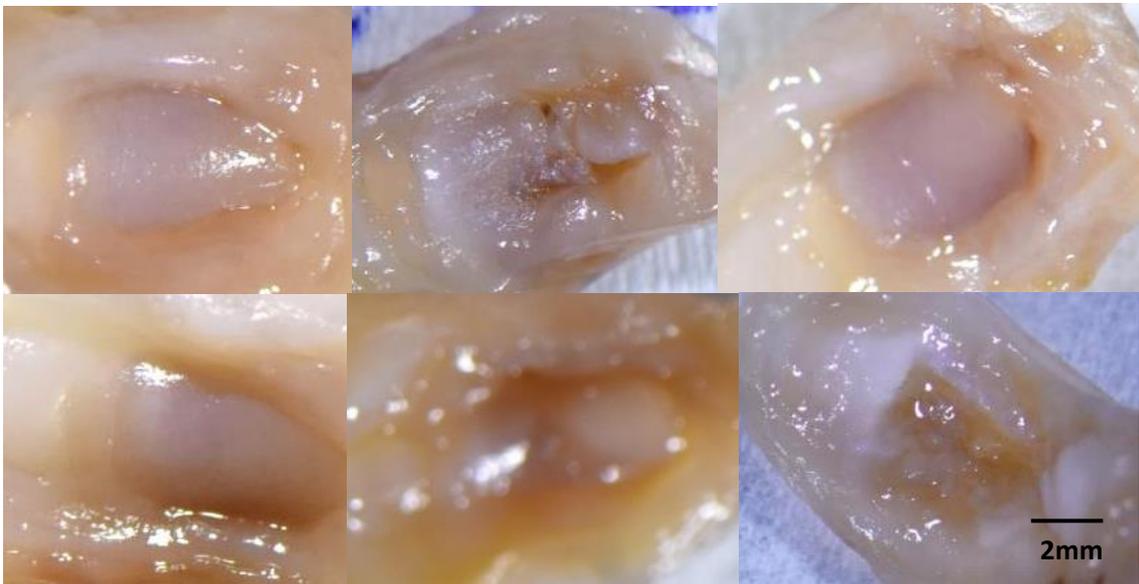
# Annexe n°3 : photographies macroscopiques des tibias de la patte droite

Ces photographies montrent le plateau tibial de la patte droite, patte opérée, pour les 6 rats ayant reçus les greffons issus des donneurs jeunes (haut) et les 6 rats ayant reçu les greffons issus de donneurs âgés (bas). Echelle 2 mm.



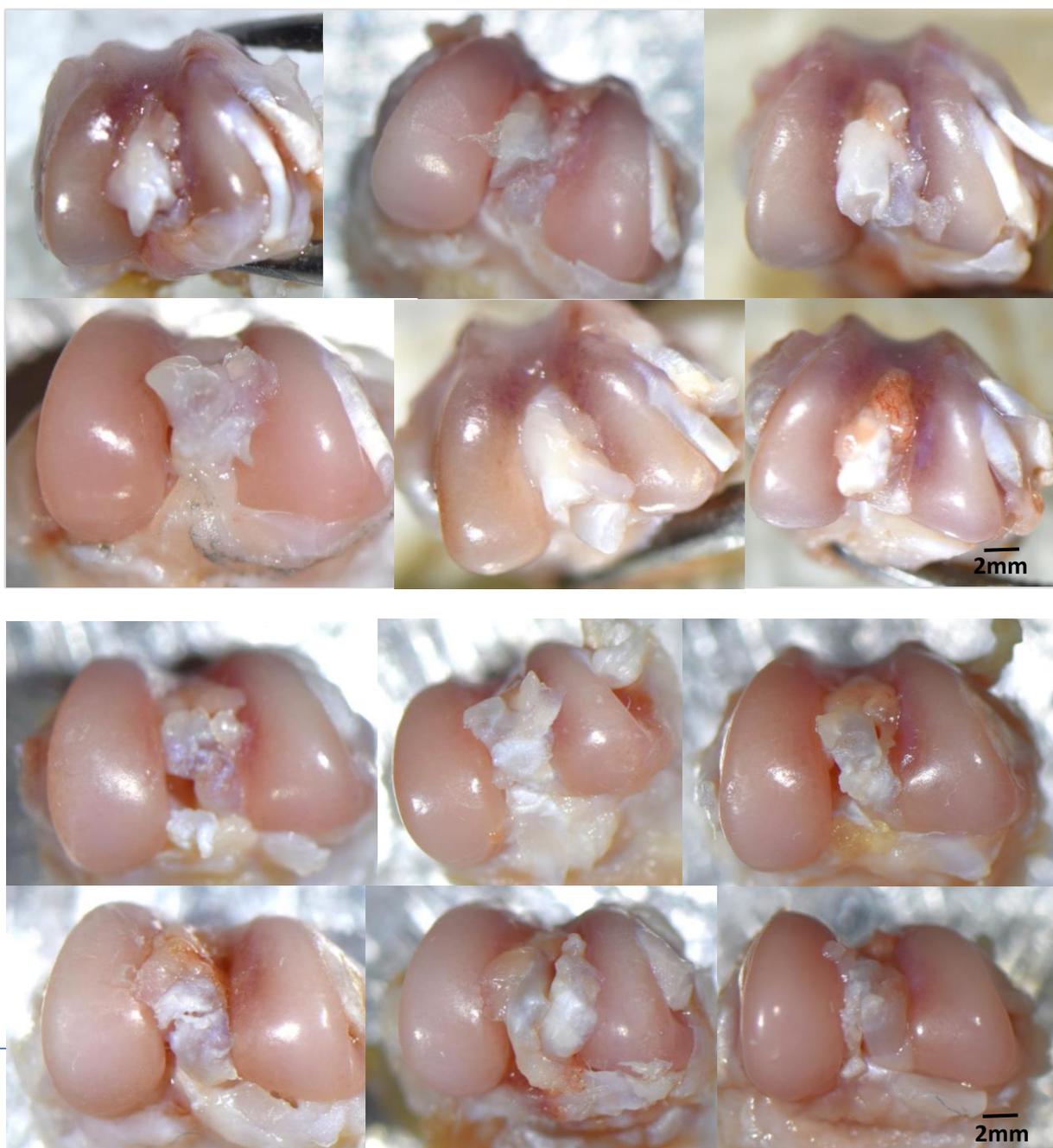
# Annexe n°4 : photographies macroscopiques des rotules de la patte droite

Ces photographies montrent la face dorsale de la rotule de la patte droite, patte opérée, pour les 6 rats ayant reçus les greffons issus des donneurs jeunes (haut) et les 6 rats ayant reçu les greffons issus de donneurs âgés (bas). Echelle 2 mm.



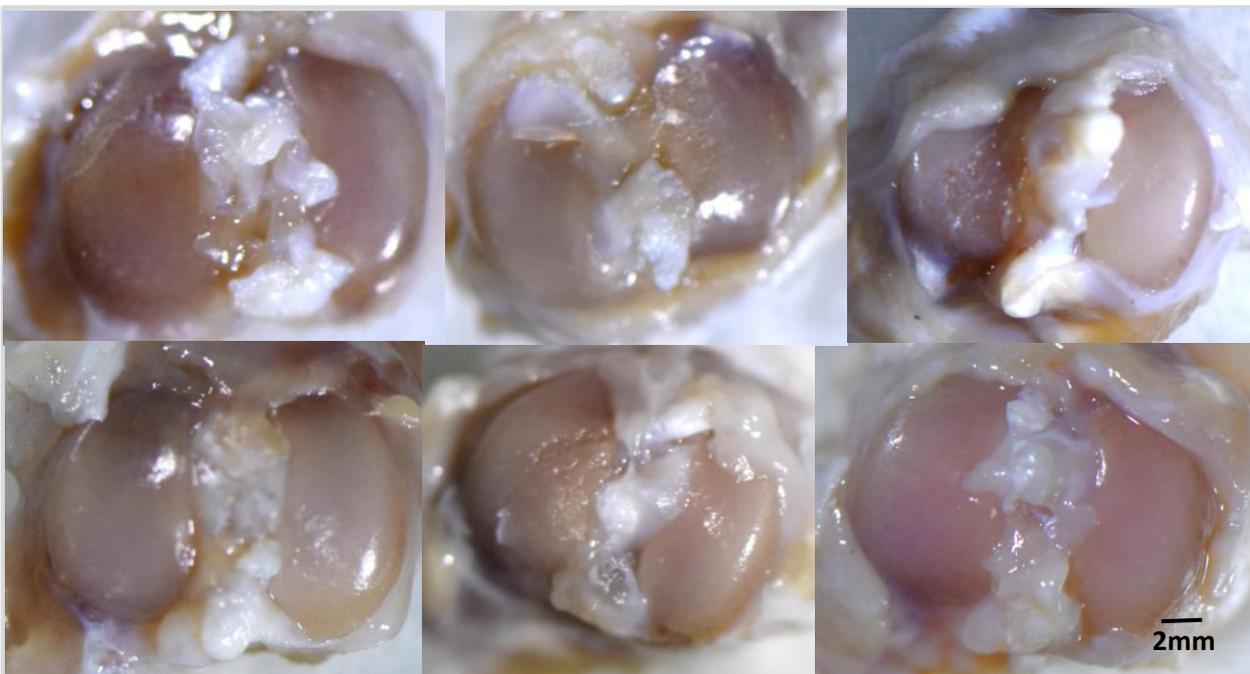
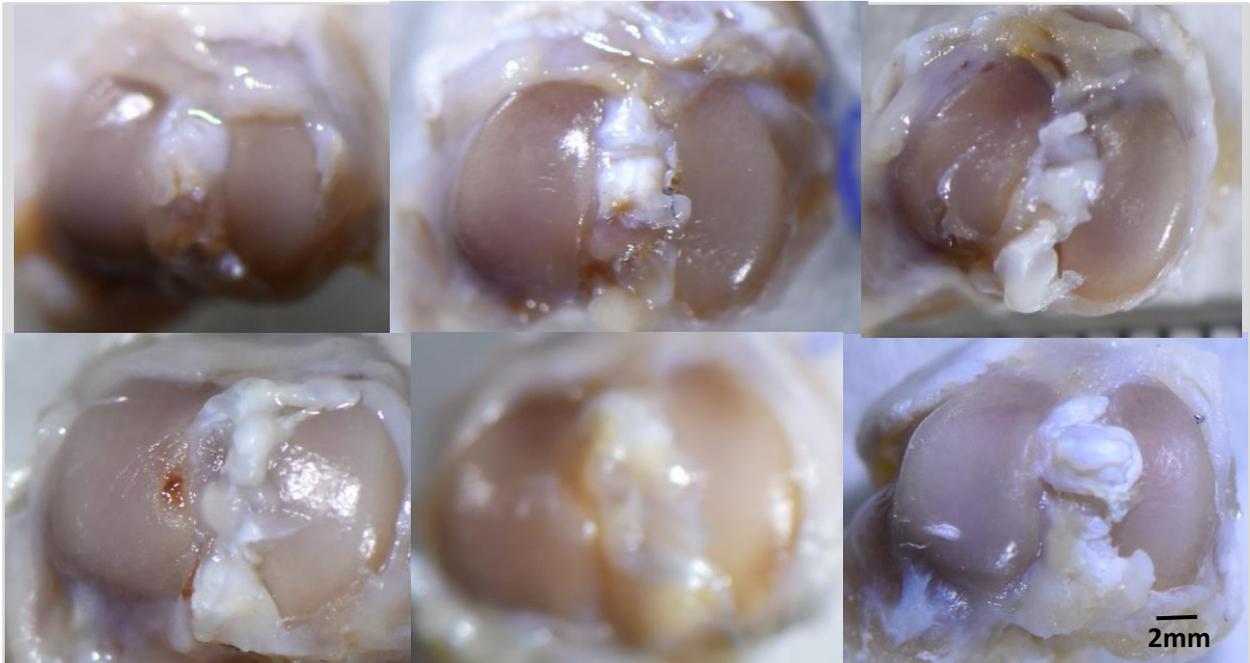
## Annexe n°5 : photographies macroscopiques des fémurs, tibias et rotules de la patte gauche

Ces photographies montrent les condyles fémoraux de la patte gauche, patte non opérée, pour les 6 rats ayant reçu les greffons issus des donneurs jeunes (haut) et les 6 rats ayant reçu les greffons issus de donneurs âgés (bas). Echelle 2 mm.

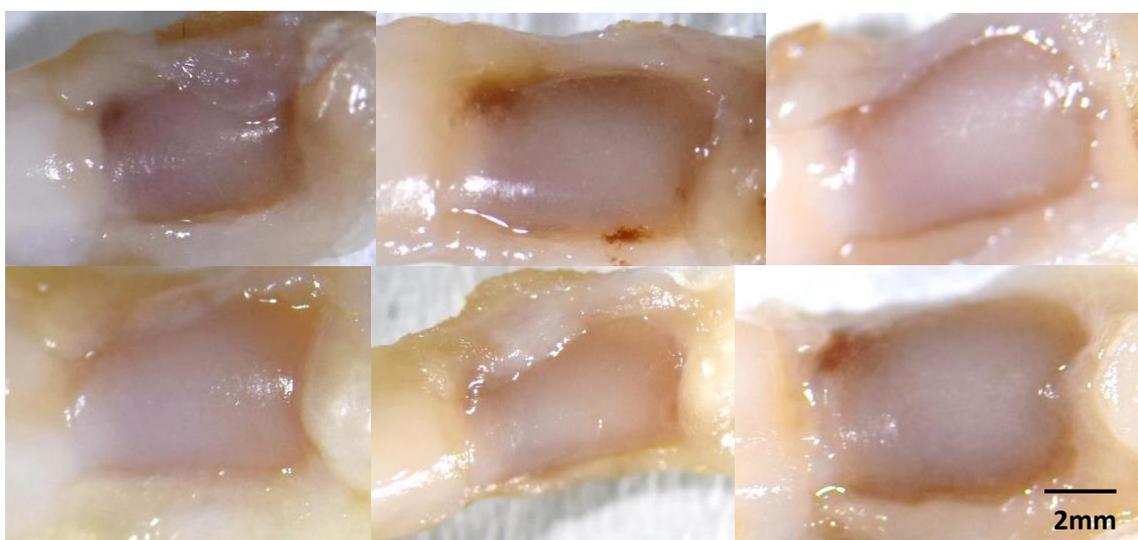
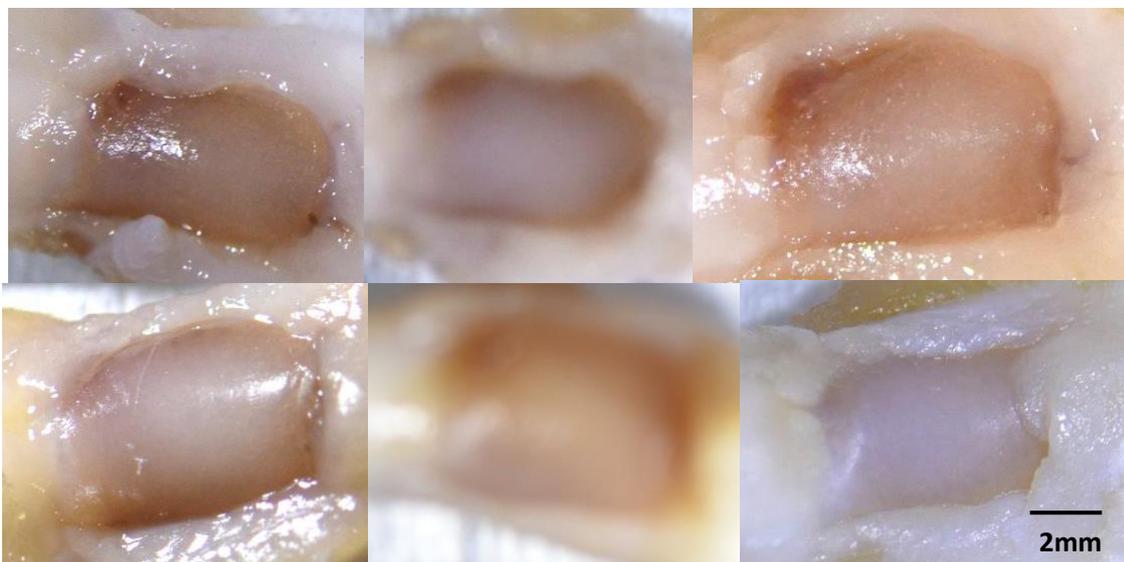


*Annexe n°5*

Ces photographies montrent le plateau tibial de la patte gauche, patte non opérée, pour les 6 rats ayant reçus les greffons issus des donneurs jeunes (haut) et les 6 rats ayant reçu les greffons issus de donneurs âgés (bas). Echelle 2 mm.



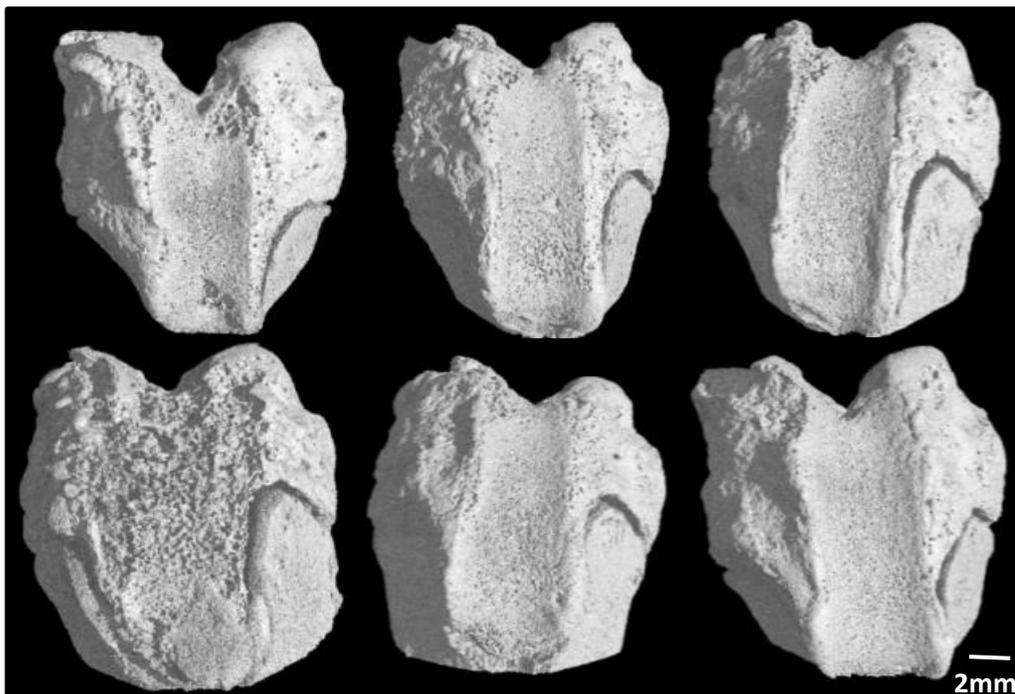
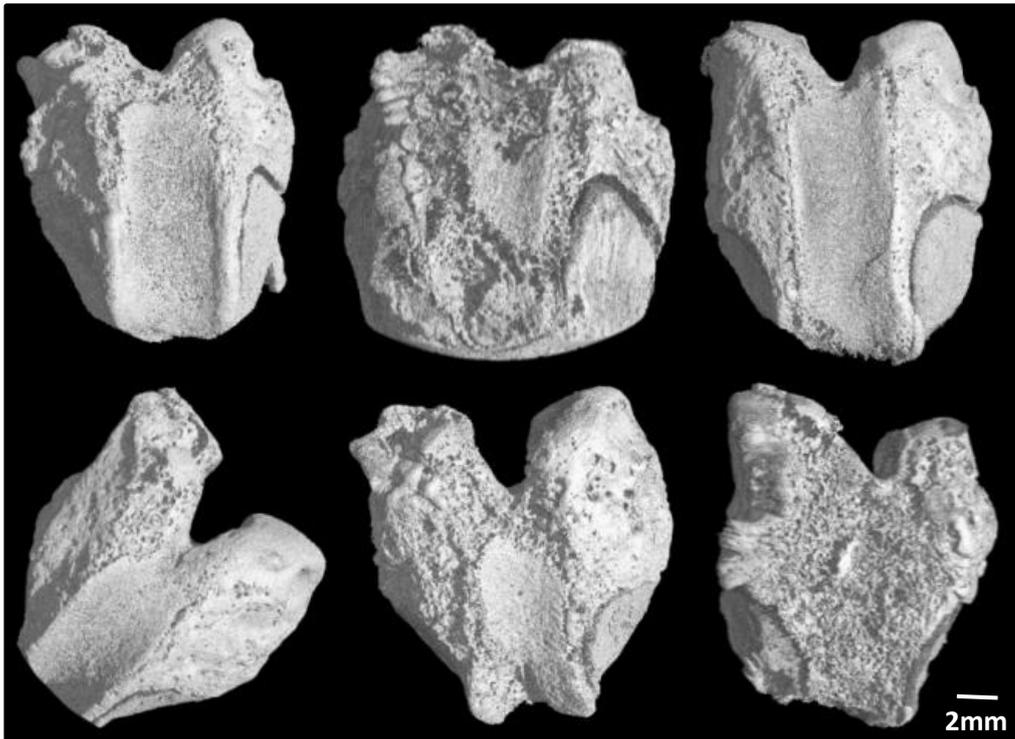
Ces photographies montrent la face dorsale de la rotule de la patte gauche, patte non opérée, pour les 6 rats ayant reçus les greffons issus des donneurs jeunes (haut) et les 6 rats ayant reçu les greffons issus de donneurs âgés (bas). Echelle 2 mm.



## Annexe n°6 : reconstruction 3D de la trochlée fémorale de la patte droite

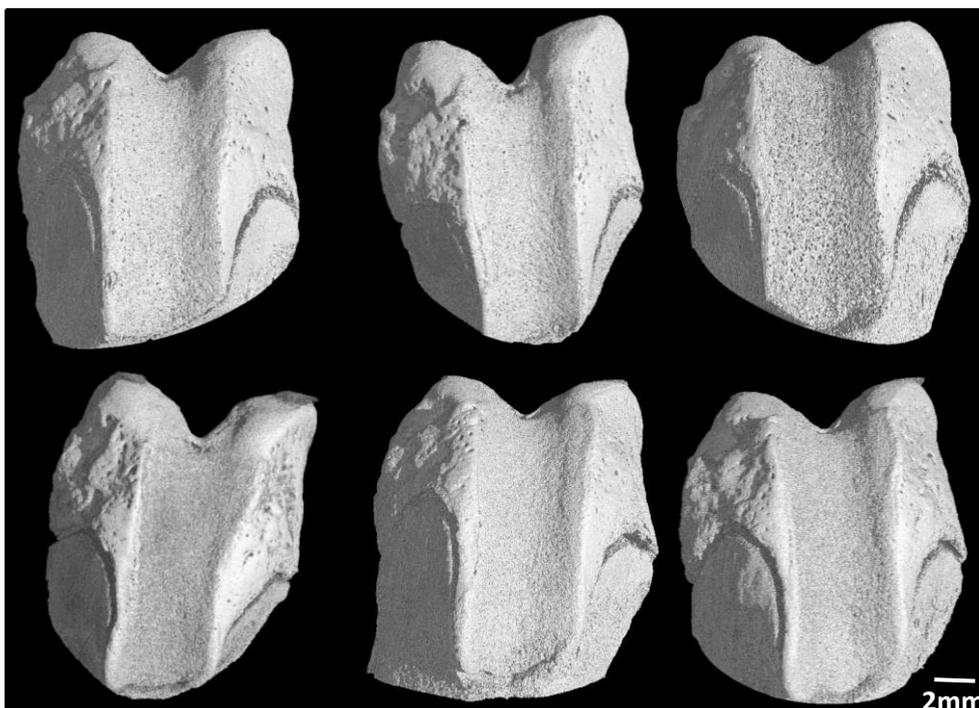
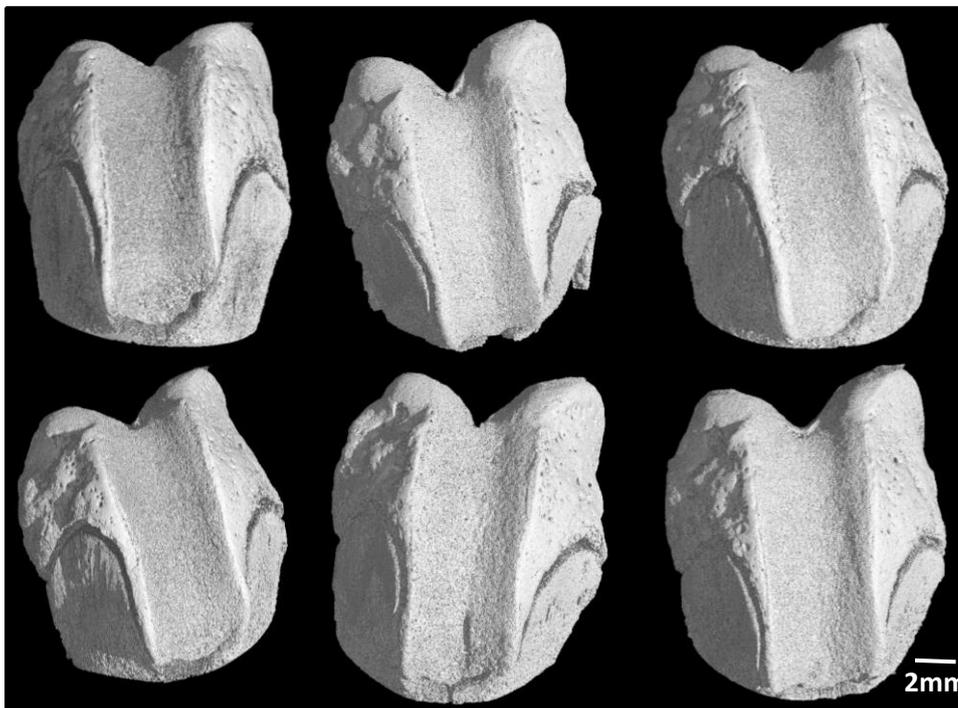
---

Ces reconstructions 3D, obtenues par rayon X, montrent la trochlée de la patte droite, patte opérée, les 6 rats ayant reçus les greffons issus des donneurs jeunes (haut) et les 6 rats ayant reçu les greffons issus de donneurs âgés (bas). Echelle 2 mm.



## Annexe n°7 : reconstruction 3D de la trochlée fémorale de la patte gauche

Ces reconstructions 3D, obtenues par rayon X, montrent la trochlée de la patte gauche, patte non opérée, les 6 rats ayant reçus les greffons issus des donneurs jeunes (haut) et les 6 rats ayant reçu les greffons issus de donneurs âgés (bas). Echelle 2 mm.



# Reconstruction 3D du plateau tibial des deux pattes

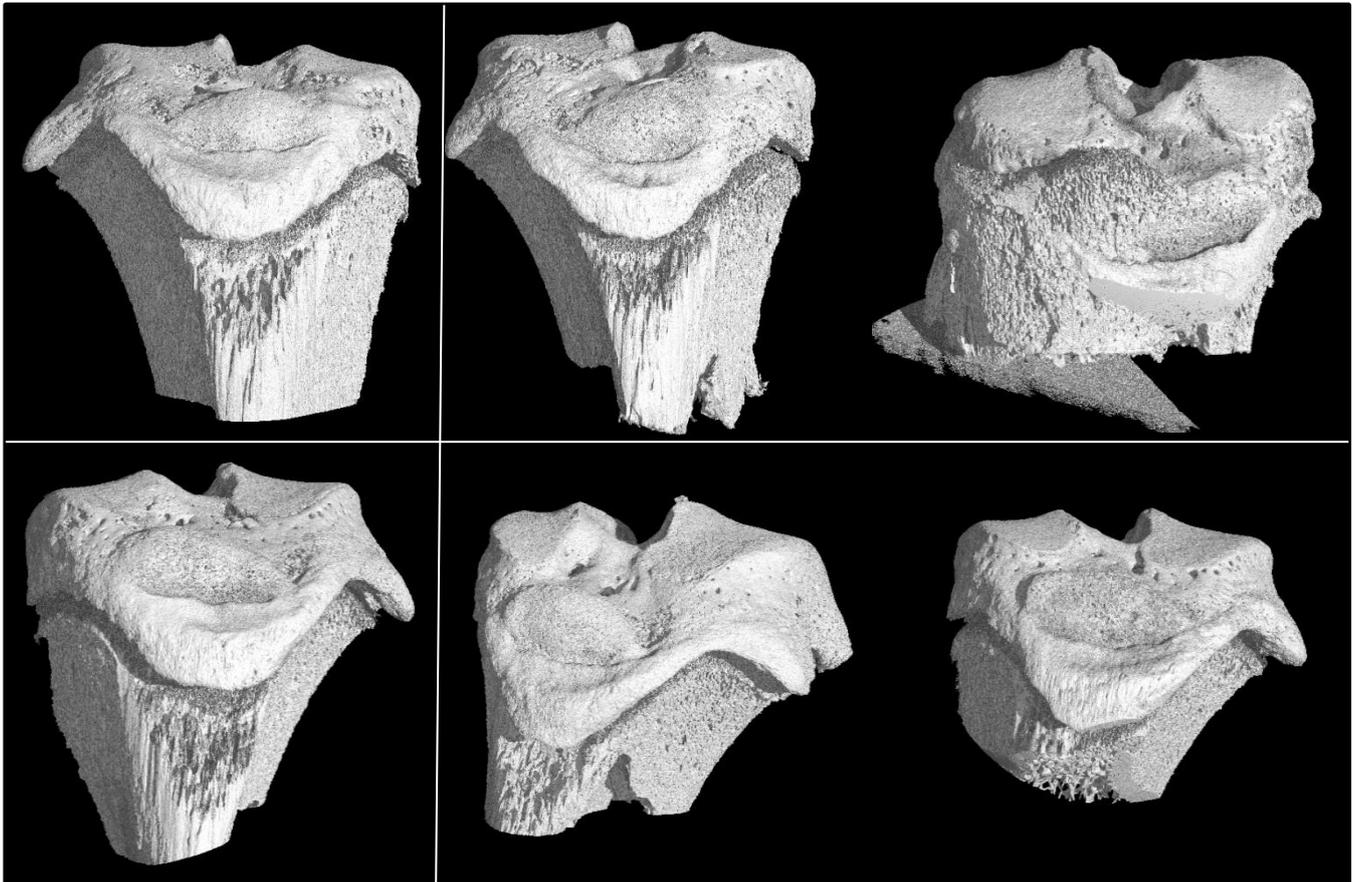
---

Ces reconstructions 3D, obtenues par rayon X, montrent le plateau tibial de la patte droite et gauche, de 2 rats ayant reçus les greffons issus des donneurs jeunes (droite) et d'un rat ayant reçu les greffons issus de donneurs âgés (gauche)

Rat ayant reçu le greffon issu de  
donneurs âgé

Rat ayant reçu le greffon issu de  
donneurs jeune

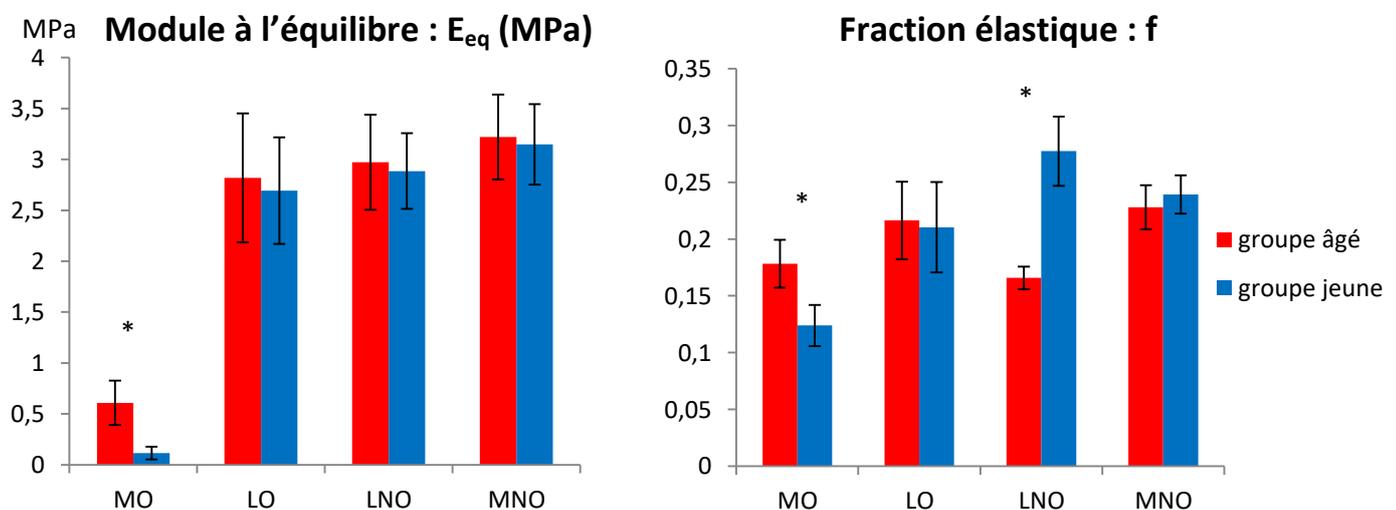
Patte droite



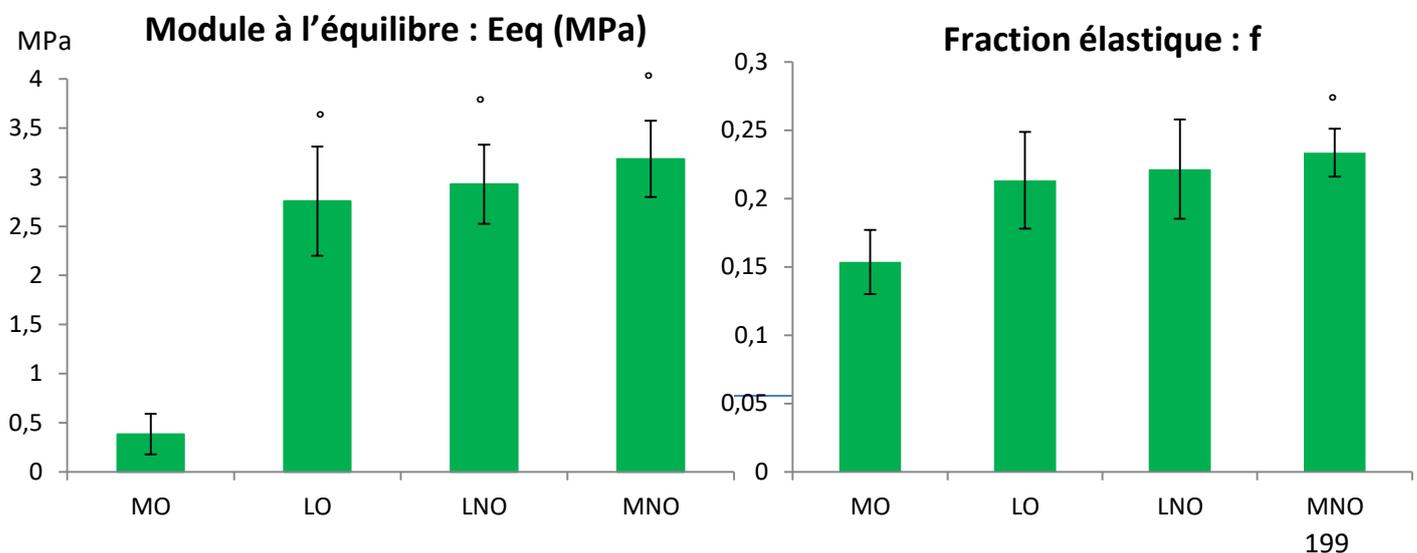
Patte gauche

## Annexe n°8 : fraction élastique (f) et module à l'équilibre ( $E_{eq}$ ) des condyles fémoraux

Graphiques représentant le module à l'équilibre ( $E_{eq}$ ) en MPa et la fraction élastique (f) selon le condyle de la patte opérée ou non et l'âge du donneur. \* p-value<0.05 entre le groupe de donneurs âgés et le groupe de donneurs jeunes, test Wilcoxon. N=6.

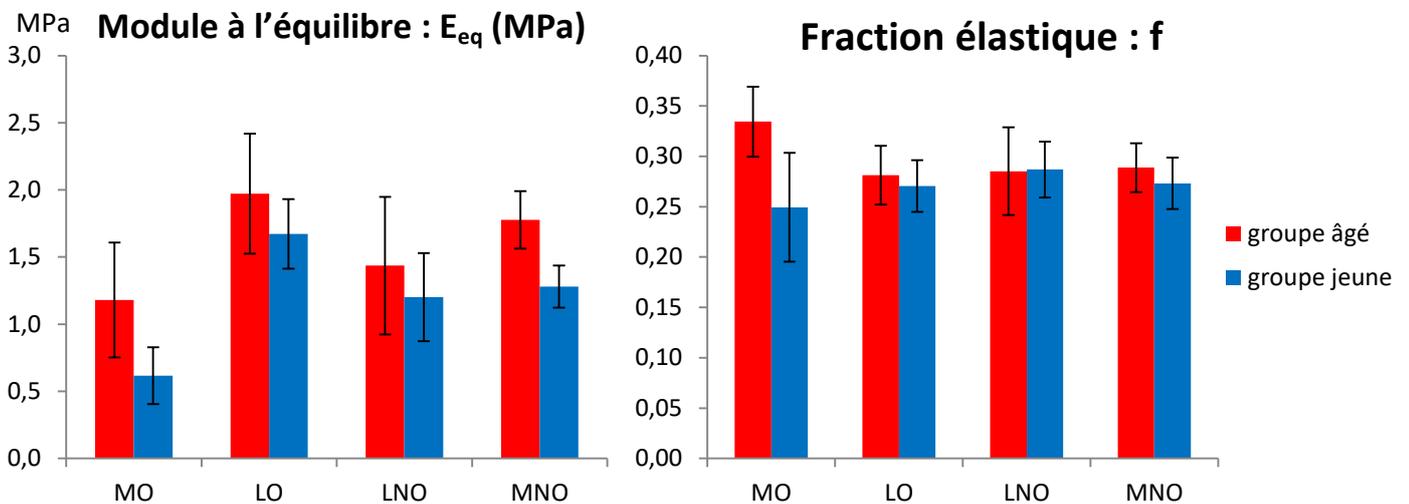


Graphiques représentant le module à l'équilibre ( $E_{eq}$ ) en MPa et la fraction élastique (f) des 4 condyles chez les rats ayant reçu un greffon de donneurs jeunes et de donneurs âgés. ° p-value<0.05 par rapport à MO, test Kruskal Wallis suivi d'un test de Wilcoxon par paire. N=12.

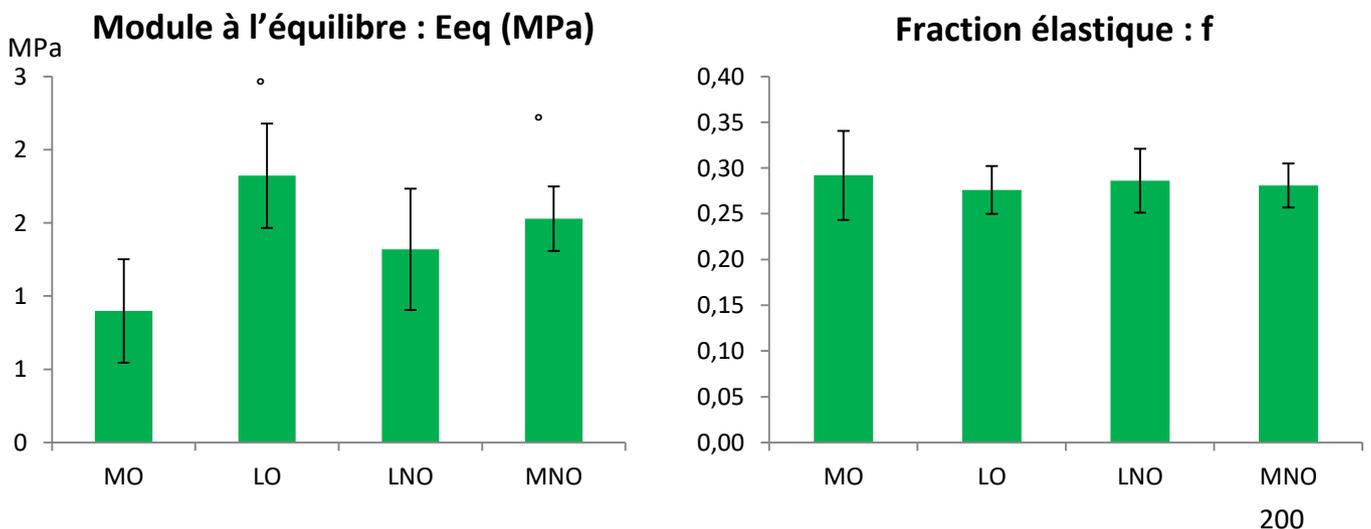


# Annexe n°9 : Fraction élastique (f) et module à l'équilibre ( $E_{eq}$ ) du plateau tibial

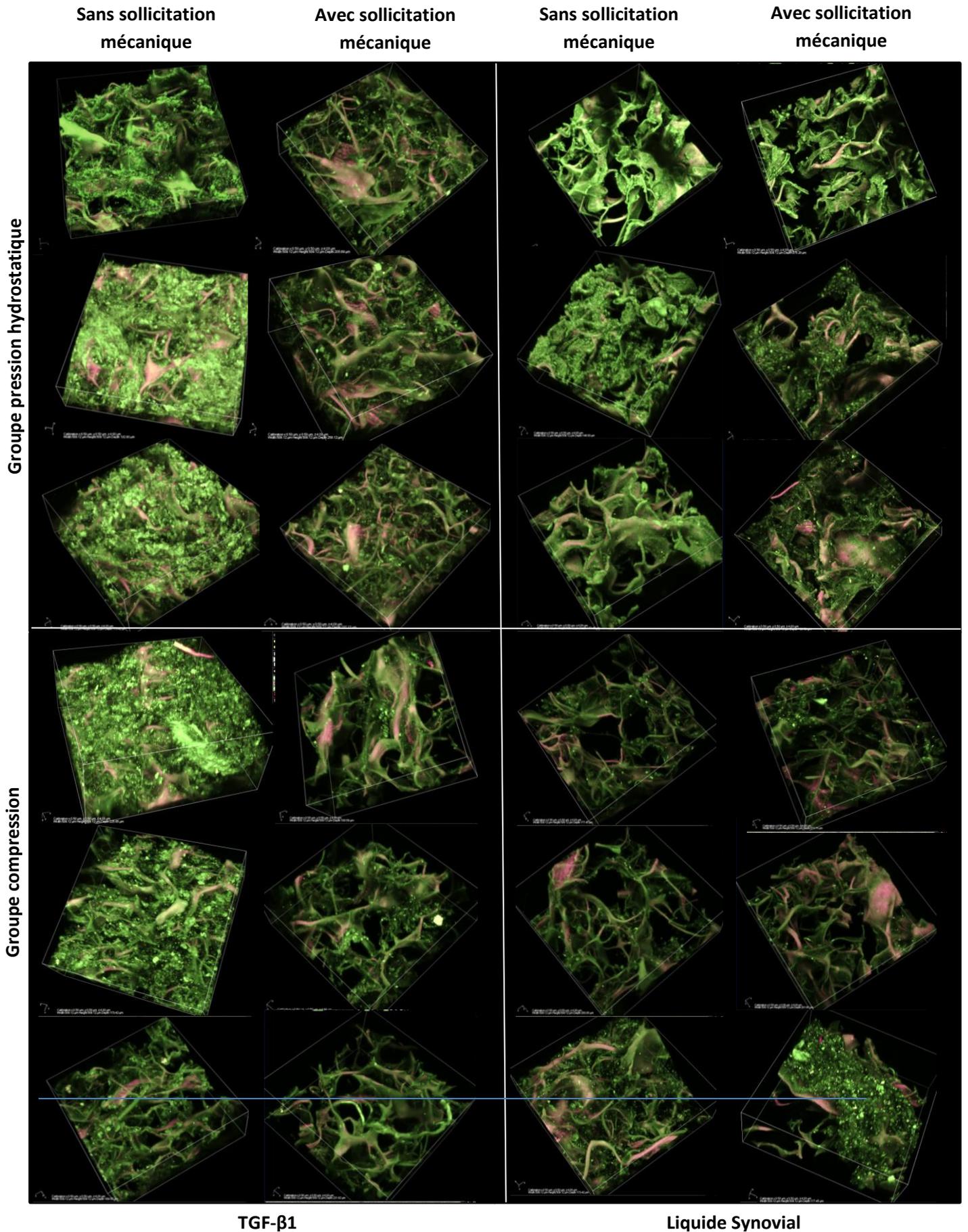
Graphiques représentant le module à l'équilibre ( $E_{eq}$ ) en MPa et la fraction élastique (f) selon le condyle de la patte opérée ou non et l'âge du donneur. MO : condyle médial opéré, LO : condyle latéral opéré, MNO : condyle médial non opéré, LNO : condyle latéral non opéré. N=6.



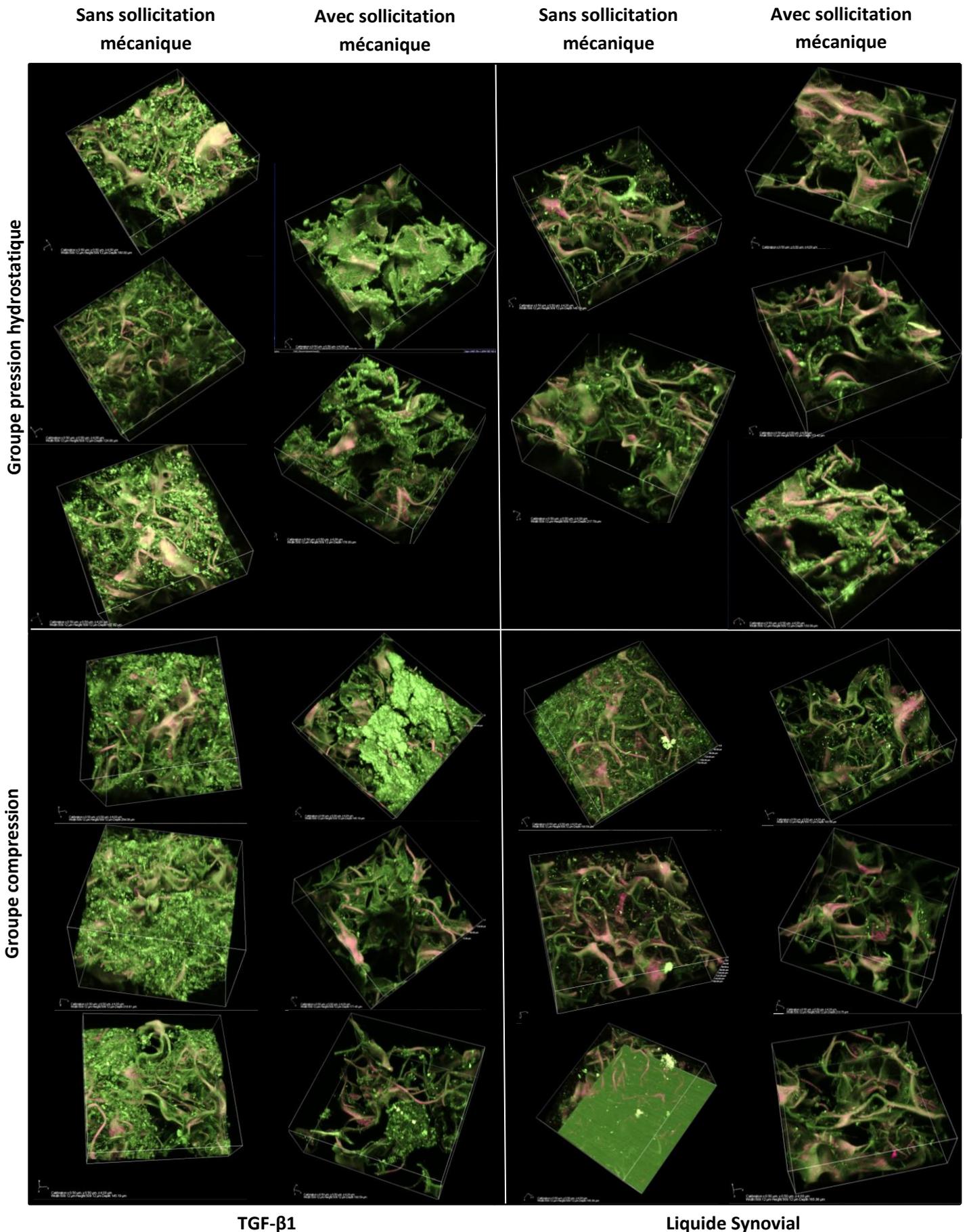
Graphiques représentant le module à l'équilibre ( $E_{eq}$ ) en MPa et la fraction élastique (f) des 4 condyles chez les rats ayant reçu un greffon de donneurs âgés et de donneurs jeunes. MO : condyle médial opéré, LO : condyle latéral opéré, MNO : condyle médial non opéré, LNO : condyle latéral non opéré. ° p-value<0.001 par rapport à MO, test Kruskal Wallis suivi d'un test de Wilcoxon par paire. N=12.



# Annexe n°10 : images multiphoton de la MEC des éponges cultivées avec les donneurs âgés



# Images multiphoton de la MEC des éponges cultivées avec les donneurs jeunes



# Références bibliographique

---

- [1] X. Chevalier and P. Richette, "Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement," *EMC - Rhumatol.-Orthopédie*, vol. 2, no. 1, pp. 41–58, Jan. 2005.
- [2] A. J. Sophia Fox, A. Bedi, and S. A. Rodeo, "The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function," *Sports Health Multidiscip. Approach*, vol. 1, no. 6, pp. 461–468, Nov. 2009.
- [3] A. M. Bhosale and J. B. Richardson, "Articular cartilage: structure, injuries and review of management," *Br. Med. Bull.*, vol. 87, no. 1, pp. 77–95, Aug. 2008.
- [4] Z. Deng, J. Jin, J. Zhao, and H. Xu, "Cartilage Defect Treatments: With or without Cells? Mesenchymal Stem Cells or Chondrocytes? Traditional or Matrix-Assisted? A Systematic Review and Meta-Analyses," *Stem Cells International*, 2016.
- [5] S. Pragnère, C. Boulocher, O. Pollet, A. Levillain, M. Cruel and T. Hoc, "Mechanical alterations of the bone-cartilage unit in a rabbit model of early osteoarthritis," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 83, pp. 1–8, Jul. 2018.
- [6] N. Hamann, F. Zaucke, M. Dayakli, G.-P. Brüggemann, and A. Niehoff, "Growth-related structural, biochemical, and mechanical properties of the functional bone–cartilage unit," *J. Anat.*, vol. 222, no. 2, pp. 248–259.
- [7] M. Huber, S. Trattinig, and F. Lintner, "Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage," *Invest. Radiol.*, vol. 35, no. 10, pp. 573–580, 2000.
- [8] A. R. Poole, T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi, and S. Laverty, "Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 391, pp. S26–S33, 2001.
- [9] P. Noble, B. Collin, J. Lecomte-Beckers, A. Magnee, J.-M. Denoix, and D. Serteyn, "L'articulation synoviale : un système tribologique parfait," *Ann. Med. Veterinaire*, no. 154, pp. 83–93, 2010.
- [10] C. Novelli, J. B. V. Costa, and R. R. Souza, "Effects of aging and physical activity on articular cartilage: a literature review," *Morphology*, vol. 29, no. 1, pp. 1–7, 2012.
- [11] B. J. Ahern, J. Parvizi, R. Boston, and T. P. Schaer, "Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 17, no. 6, pp. 705–713, Jun. 2009.
- [12] A. P. Newman, "Articular Cartilage Repair," *Am. J. Sports Med.*, vol. 26, no. 2, p. 16, 1998.
- [13] M. Lotz and R. F. Loeser, "Effects of aging on articular cartilage homeostasis," *Bone*, vol. 51, no. 2, pp. 241–248, Aug. 2012.
- [14] E. A. Makris, P. Hadidi, and K. A. Athanasiou, "The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration," *Biomaterials*, vol. 32, no. 30, pp. 7411–7431, Oct. 2011.
- [15] A. Levillain, "Caractérisation multi-échelle des ménisques du genou : effet de l'arthrose," N° d'ordre NNT : 2016LYSEC27, 2016.
- [16] J. Katta, Z. Jin, E. Ingham, and J. Fisher, "Biotribology of articular cartilage—A review of the recent advances," *Med. Eng. Phys.*, vol. 30, no. 10, pp. 1349–1363, Dec. 2008.
- [17] E. Balazs, "The physical properties of synovial fluid and the special role of hyaluronic acid," *Disord. Knee*, pp. 63–75, 1974.
- [18] J. Damiano and T. Bardin, "Liquide synovial normal et pathologique Synovial fluid," *EMC-Rhumatol. Orthop.*, no. 1, pp. 2–16, 2014.
- [19] G. D. Jay, J. R. Torres, M. L. Warman, M. C. Laderer, and K. S. Breuer, "The role of lubricin in the mechanical behavior of synovial fluid," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 15, pp. 6194–6199, Apr. 2007.

- [20] H.-K. Ea, C. Bazille, and F. Lioté, "Histologie et physiologie de la membrane synoviale," *EMC - Appar. Locomoteur*, vol. 3, no. 3, pp. 1–6, Jan. 2008.
- [21] M. D. Smith, "The Normal Synovium," *Open Rheumatol. J.*, vol. 5, pp. 100–106, Dec. 2011.
- [22] J. R. Levick and J. N. McDonald, "Fluid movement across synovium in healthy joints: role of synovial fluid macromolecules," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 54, pp. 471–423, 1995.
- [23] N. Tiwari, S. Chabra, S. Mehdi, P. Sweet, T.B. Krasieva, "Imaging of normal and pathologic joint synovium using nonlinear optical microscopy as a potential diagnostic tool," *J. Biomed. Opt.*, vol. 15, no. 5, 2010.
- [24] C. R. Scanzello and S. R. Goldring, "The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis," *Bone*, vol. 51, no. 2, pp. 249–257, Aug. 2012.
- [25] M. J. Zuscik, M. J. Hilton, X. Zhang, D. Chen, and R. J. O’Keefe, "Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress," *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 2, pp. 429–438, Feb. 2008.
- [26] M. B. Goldring, "Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis," *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.*, vol. 4, no. 4, pp. 269–285, Aug. 2012.
- [27] H. Muir, "The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules," *BioEssays*, vol. 17, no. 12, pp. 1039–1048, 1995.
- [28] J. C. Mansfield, J. S. Bell, and C. P. Winlove, "The micromechanics of the superficial zone of articular cartilage," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 23, no. 10, pp. 1806–1816, Oct. 2015.
- [29] D. L. Butler, S. A. Goldstein, and F. Guilak, "Functional Tissue Engineering: The Role of Biomechanics," *J. Biomech. Eng.*, vol. 122, no. 6, p. 570, 2000.
- [30] B. D. Elder and K. A. Athanasiou, "Hydrostatic Pressure in Articular Cartilage Tissue Engineering: From Chondrocytes to Tissue Regeneration," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 15, no. 1, pp. 43–53, Mar. 2009.
- [31] V.C. Mow, C.C. Wang, and C.T. Hung, "The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 7, no. 1, pp. 41–58, 1999.
- [32] J. P. G. Urban, "THE CHONDROCYTE: A CELL UNDER PRESSURE," *Rheumatology*, vol. 33, no. 10, pp. 901–908, 1994.
- [33] C. J. O’Conor, N. Case, and F. Guilak, "Mechanical regulation of chondrogenesis," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 4, no. 4, p. 61, 2013.
- [34] H. B. Sun, "Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1211, no. 1, pp. 37–50, 2010.
- [35] T. Ikenoue, M.C.D. Trindade, M.S. Lee, E.Y. Lin, D.J. Schurman, S.B. Goodman, R. Lane Smith, "Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro," *J. Orthop. Res.*, vol. 21, no. 1, pp. 110–116, Jan. 2003.
- [36] M. Rahmati, G. Nalesso, A. Mobasheri, and M. Mozafari, "Aging and osteoarthritis: Central role of the extracellular matrix," *Ageing Res. Rev.*, vol. 40, pp. 20–30, Nov. 2017.
- [37] K. Yamada, R. Healey, D. Amiel, M. Lotz, and R. Coutts, "Subchondral bone of the human knee joint in aging and osteoarthritis," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 10, no. 5, pp. 360–369, May 2002.
- [38] M. Piñeiro-Ramil, R. Castro-Viñuelas, C. Sanjurjo- Rodríguez, T. Hermida-Gómez, I. Fuentes-Boquete, F. J. de Toro-Santos, F.J. Blanco-García and S.M. Díaz-Prado, "Cell Therapy and Tissue Engineering for Cartilage Repair," in *Cartilage Repair and Regeneration*, A. R. Zorzi and J. B. de Miranda, Eds. InTech, 2018.
- [39] G. G. Reinholz, L. Lu, D. B. F. Saris, M. J. Yaszemski, and S. W. O’Driscoll, "Animal models for cartilage reconstruction," *Biomaterials*, vol. 25, no. 9, pp. 1511–1521, Apr. 2004.

- [40] F. Shapiro, S. Koide, and M. J. Glimcher, "Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage," *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 75, no. 4, pp. 532–553, Apr. 1993.
- [41] A. Getgood, T. P. S. Bhullar, and N. Rushton, "Current concepts in articular cartilage repair," *Orthop. TRAUMA*, p. 12, 2009.
- [42] M. Corvelli, B. Che, C. Saeui, A. Singh, and J. Elisseeff, "Biodynamic performance of hyaluronic acid versus synovial fluid of the knee in osteoarthritis," *Methods*, vol. 84, pp. 90–98, Aug. 2015.
- [43] G. Versier and O. Barbier, "Techniques de reconstruction cartilagineuse," *EMC-Tech. Chirurgicale-Othopédie-Traumatol.*, vol. 0, no. 0, pp. 1-16 [Article 44-035], 2014.
- [44] H. Robert, "Chondral repair of the knee joint using mosaicplasty," *Orthop. Traumatol. Surg. Res.*, vol. 97, no. 4, pp. 418–429, Jun. 2011.
- [45] L. Hangody and P. Füles, "Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience," *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 85-A Suppl 2, pp. 25–32, 2003.
- [46] J. A. Buckwalter, "Articular Cartilage: Injuries and Potential for Healing," *J. Orthop. Sports Phys. Ther.*, vol. 28, no. 4, pp. 192–202, Oct. 1998.
- [47] S. M. D. Prado, I. F. Boquete, and F. J. Blanco, "Cell Therapy and Tissue Engineering to Regenerate Articular Cartilage," *Biomed. Eng.*, pp. 193–216, Jan. 2011.
- [48] A. I. Caplan, M. Elyaderani, Y. Mochizuki, S. Wakitani, and V. M. Goldberg, "Principles of cartilage repair and regeneration," *Clin. Orthop.*, no. 342, pp. 254–269, Sep. 1997.
- [49] S. Neuss, C. Apel, P. Buttler, B. Denecke, A. Dhanasingh, X. Ding, D. Grafarend, A. Groger and K. Hemmrich, A. Herr, W. Jahnen-Dechent, S. Mastitskaya, A. Perez-Bouza, S. Rosewick, J. Salber, M. Wöltje, M. Zenke, "Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 29, no. 3, pp. 302–313, Jan. 2008.
- [50] N. Bhardwaj, D. Devi, and B. B. Mandal, "Tissue-Engineered Cartilage: The Crossroads of Biomaterials, Cells and Stimulating Factors: Tissue Engineered Cartilage ...," *Macromol. Biosci.*, vol. 15, no. 2, pp. 153–182, Feb. 2015.
- [51] C. Vinatier, L. Bordenave, J. Guicheux, and J. Amédée, "Les cellules souches en ingénierie des tissus ostéoarticulaires et vasculaires," *médecine/sciences*, vol. 27, no. 3, pp. 289–296, Mar. 2011.
- [52] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C. Marini, D.S Krause, R.J Deans, A. Keating, D.J. Prockop and E.M. Horwitz, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement," *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–317, 2006.
- [53] K. Le Blanc and L. C. Davies, "MSCs—cells with many sides," *Cytotherapy*, vol. 20, no. 3, pp. 273–278, Mar. 2018.
- [54] S. Roux, J. Leotot, N. Chevallier, P. Bierling, and H. Rouard, "Cellules stromales mésenchymateuses : propriétés biologiques et perspectives thérapeutiques," *Transfus. Clin. Biol.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–12, Feb. 2011.
- [55] M. F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman and D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, "Multilineage Potential of adult human mesenchymal stem cells," *Science*, vol. 284, no. 5411, pp. 143–146, 1999.
- [56] V. D. Roobrouck, F. Ulloa-Montoya, and C. M. Verfaillie, "Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells," *Exp. Cell Res.*, vol. 314, no. 9, pp. 1937–1944, May 2008.
- [57] T. D. Bornes, A. B. Adesida, and N. M. Jomha, "Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 16, 2014.
- [58] A. J. Nauta, G. Westerhuis, A. B. Kruisselbrink, E. G. A. Lurvink, R. Willemze, and W. E. Fibbe, "Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting," *Blood*, vol. 108, no. 6, pp. 2114–2120, Sep. 2006.

- [59] G. Moll, J.J. Alm, L.C. Davies, L. von Bahr, N. Heldring, L. Stenbeck-Funke, O.A. Hamad, R. Hinsch, L. Ignatowicz, M. Locke, H. Lönniesa, J.D. Lambris, Y. Teramura, K. Nilsson-Ekdahl, B. Nilsson, and K. Le Blanc, "Do Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Display Impaired Immunomodulatory and Therapeutic Properties?," *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 32, no. 9, pp. 2430–2442, Sep. 2014.
- [60] Y. Naaldijk, A. A. Johnson, S. Ishak, H. J. Meisel, C. Hohaus, and A. Stolzing, "Migrational changes of mesenchymal stem cells in response to cytokines, growth factors, hypoxia, and aging," *Exp. Cell Res.*, vol. 338, no. 1, pp. 97–104, Oct. 2015.
- [61] D. Duscher, R.C. Rennert, M. Januszyk, E. Anghel, Z.N. Maan, A.J. Whittam, M.G. Perez, R. Kosaraju, M.S. Hu, G.G. Walmsley, D. Atashroo, S. Khong, A.J. Butte and G.C. Gurtner, "Aging disrupts cell subpopulation dynamics and diminishes the function of mesenchymal stem cells," *Sci. Rep.*, vol. 4, no. 1, May 2015.
- [62] M. Zscharnack, P. Hepp, R. Richter, T. Aigner, R. Schulz, J. Somerson, C. Josten, A. Bader and B. Marquass, "Repair of Chronic Osteochondral Defects Using Predifferentiated Mesenchymal Stem Cells in an Ovine Model," *Am. J. Sports Med.*, vol. 38, no. 9, pp. 1857–1869, Sep. 2010.
- [63] I. Danišovič, I. Varga, and Š. Polák, "Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells," *Tissue Cell*, vol. 44, no. 2, pp. 69–73, Apr. 2012.
- [64] M. Demoor, D. Ollitrault, T. Gomez-Leduc, M. Bouyoucef, M. Hervieu, H. Fabre, J. Lafont, J.M. Denoix, F. Audigié, F. Mallein-Gerin, F. Legendre, P. Galera, "Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1840, no. 8, pp. 2414–2440, Aug. 2014.
- [65] E. N. Blaney Davidson, P. M. van der Kraan, and W. B. van den Berg, "TGF- $\beta$  and osteoarthritis," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 15, no. 6, pp. 597–604, Jun. 2007.
- [66] C. Vinatier, D. Mrugala, C. Jorgensen, J. Guicheux, and D. Noël, "Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors," *Trends Biotechnol.*, vol. 27, no. 5, pp. 307–314, May 2009.
- [67] S.-J. Seo, C. Mahapatra, R. K. Singh, J. C. Knowles, and H.-W. Kim, "Strategies for osteochondral repair: focus on scaffolds," *J. Tissue Eng.*, vol. 5, p. 2041731414541850, 2014.
- [68] N. D. Miljkovic, G. M. Cooper, and K. G. Marra, "Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 16, no. 10, pp. 1121–1130, Oct. 2008.
- [69] M. B. Albro, A.D. Cigan, R.J. Nims, K.J. Yeroushalmi, S.R. Oungoulian, C.T. Hung, and G.A. Ateshian, "Shearing of Synovial Fluid Activates Latent TGF- $\beta$ ," *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.*, vol. 20, no. 11, pp. 1374–1382, Nov. 2012.
- [70] C. Gaissmaier, J. L. Koh, and K. Weise, "Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair," *Injury*, vol. 39, no. 1, pp. 88–96, Apr. 2008.
- [71] A. M. Mackay, S. C. Beck, J. M. Murphy, F. P. Barry, C. O. Chichester, and M. F. Pittenger, "Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow," *Tissue Eng.*, vol. 4, no. 4, pp. 415–428, 1998.
- [72] B. Johnstone, T. M. Hering, A. I. Caplan, V. M. Goldberg, and J. U. Yoo, "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells," *Exp. Cell Res.*, vol. 238, no. 1, pp. 265–272, 1998.
- [73] N. Indrawattana, G. Chen, M. Tadokoro, L.H. Shann, H. Ohgushi, T. Tateishi, J. Tanaka and A. Bunyaratvej, "Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 320, no. 3, pp. 914–919, Jul. 2004.
- [74] Y. Dausse, L. Grossin, G. Miralles, S. Pelletier, D. Mainard, P. Hubert, D. Baptiste, P. Gillet, E. Dellacherie, P. Netter and E. Payan, "Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 11, no. 1, pp. 16–28, Jan. 2003.
- [75] A. R. Armiento, M. J. Stoddart, M. Alini, and D. Eglin, "Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology," *Acta Biomater.*, vol. 65, pp. 1–20, Jan. 2018.

- [76] R. Cancedda, B. Dozin, P. Giannoni, and R. Quarto, "Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone," *Matrix Biol.*, vol. 22, no. 1, pp. 81–91, Mar. 2003.
- [77] N. Sawatjui, T. Limpiboon, K. Schrobback, and T. Klein, "Biomimetic scaffolds and dynamic compression enhance the properties of chondrocyte- and MSC-based tissue-engineered cartilage," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 12, no. 5, pp. 1220–1229, May 2018.
- [78] A. M. Haleem and C. R. Chu, "Advances in Tissue Engineering Techniques for Articular Cartilage Repair," *Oper. Tech. Orthop.*, vol. 20, no. 2, pp. 76–89, Jun. 2010.
- [79] Z. Ge, C. Li, B. C. Heng, G. Cao, and Z. Yang, "Functional biomaterials for cartilage regeneration," *J. Biomed. Mater. Res. Part. A*, vol. 100A, pp. 2526–2536, sept. 2012.
- [80] B. P. Chan and K. W. Leong, "Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations," *Eur. Spine J.*, vol. 17, no. S4, pp. 467–479, Dec. 2008.
- [81] J. S. Temenoff and A. G. Mikos, "Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage," *Biomaterials*, vol. 21, no. 5, pp. 431–440, Mar. 2000.
- [82] H. Chajra, C.F. Rousseau, D. Cortial, M.C. Ronzière, D. Herbage, F. Mallein-Gerin, A.M. Freyria, "Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects," *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 18, no. s1, pp. 33–45, Jan. 2008.
- [83] H.-Y. Cheung, K.-T. Lau, T.-P. Lu, and D. Hui, "A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development," *Compos. Part B Eng.*, vol. 38, no. 3, pp. 291–300, Apr. 2007.
- [84] R. Tuli, W.-J. Li, and R. S. Tuan, "Current state of cartilage tissue engineering," *Arthritis Res.*, vol. 5, no. 5, p. 4, 2003.
- [85] C. Vinatier and J. Guicheux, "Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments," *Ann. Phys. Rehabil. Med.*, vol. 59, no. 3, pp. 139–144, Jun. 2016.
- [86] M. H. Gregory, N. Capito, K. Kuroki, A. M. Stoker, J. L. Cook, and S. L. Sherman, "A Review of Translational Animal Models for Knee Osteoarthritis," *Arthritis*, vol. 2012, pp. 1–14, 2012.
- [87] K. Lampropoulou-Adamidou, P. Lelovas, E.V. Karadimas, C. Liakou, I.K. Triantafillopoulos, I. Dontas and N.A. Papaioannou, "Useful animal models for the research of osteoarthritis," *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.*, vol. 24, no. 3, pp. 263–271, Apr. 2014.
- [88] A. M. Bendele, "Animal models of osteoarthritis," *J. Musculoskeletal Neuronal Interact.*, vol. 1, no. 4, pp. 363–376, 2001.
- [89] C. R. Chu, M. Szczodry, and S. Bruno, "Animal Models for Cartilage Regeneration and Repair," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 16, no. 1, pp. 105–115, Feb. 2010.
- [90] P. Mainil-Varlet, F. Rieser, S. Grogan, W. Mueller, C. Saager, and R. P. Jakob, "Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 9, pp. S6–S15, Aug. 2001.
- [91] A. Watrin-Pinzano, J.-P. Ruaud, Y. Cheli, P. Gonord, L. Grossin, P. Gillet, A. Blum, E. Payan, P. Olivier, G. Guillo, P. Netter and D. Loeuille, "T2 mapping: an efficient MR quantitative technique to evaluate spontaneous cartilage repair in rat patella," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 12, no. 3, pp. 191–200, Mar. 2004.
- [92] S. J. Matcher, "What can biophotonics tell us about the 3D microstructure of articular cartilage?," *Quant. Imaging Med. Surg.*, vol. 5, no. 1, p. 16, 2015.
- [93] M. Rooney, D. Condell, W. Quinlan, L. Daly, A. Whelan. C. Feighery and B. Bresnihan, "Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 31, no. 8, pp. 956–963, Aug. 1988.
- [94] V. Krenn, L. Morawietz, G.R. Burmester, R.W. Kinne, U. Mueller-Ladner, B. Muller and T. Haupl, "Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis," *Histopathology*, vol. 49, no. 4, pp. 358–364, Oct. 2006.
- [95] M. L. Oyen, "Nanoindentation of Biological and Biomimetic Materials," *Exp. Tech.*, vol. 37, no. 1, pp. 73–87, 2010.
- [96] D.-L. Chen, P.-F. Yang, and Y.-S. Lai, "A review of three-dimensional viscoelastic models with an application to viscoelasticity characterization using nanoindentation," *Microelectron. Reliab.*, vol. 52, no. 3, pp. 541–558, Mar. 2012.

- [97] A. J. Steward and D. J. Kelly, "Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation," *J. Anat.*, vol. 227, no. 6, pp. 717–731, Dec. 2015.
- [98] J. A. Buckwalter, J. A. Martin, and T. D. Brown, "Perspectives on chondrocyte mechanobiology and osteoarthritis," *Biorheology*, vol. 43, no. 3, 4, pp. 603–609, 2006.
- [99] W. W. Curl, J. Krome, E. S. Gordon, J. Rushing, B. P. Smith, and G. G. Poehling, "Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies," *Arthroscopy*, vol. 13, no. 4, pp. 456–460, 1997.
- [100] L. J. Sandell and T. Aigner, "Articular cartilage and changes in arthritis: cell biology of osteoarthritis," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 3, no. 2, p. 107, 2001.
- [101] C. J. Campbell, "The Healing of Cartilage Defects," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, no. 64, pp. 45–63, 1963.
- [102] G. D. Smith, G. Knutsen, and J. B. Richardson, "A clinical review of cartilage repair techniques," *Bone Jt. J.*, vol. 87, no. 4, pp. 445–449, 2005.
- [103] J. A. Buckwalter, "Articular cartilage injuries," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 402, pp. 21–37, 2002.
- [104] A. J. Nauta and W. E. Fibbe, "Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells," *Blood*, vol. 110, no. 10, pp. 3499–3506, Nov. 2007.
- [105] Z.-J. Liu, Y. Zhuge, and O. C. Velazquez, "Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells," *J. Cell. Biochem.*, vol. 106, no. 6, pp. 984–991, Apr. 2009.
- [106] A. Scharstuhl, B. Schewe, K. Benz, C. Gaissmaier, H.-J. Bühring, and R. Stoop, "Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology," *Stem Cells*, vol. 25, no. 12, pp. 3244–3251, 2007.
- [107] B. D. Elder and K. A. Athanasiou, "Synergistic and Additive Effects of Hydrostatic Pressure and Growth Factors on Tissue Formation," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 6, p. e2341, Jun. 2008.
- [108] R. L. Mauck, X. Yuan, and R. S. Tuan, "Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 14, no. 2, pp. 179–189, Feb. 2006.
- [109] R. L. Mauck, S. B. Nicoll, S. L. Seyhan, G. A. Ateshian, and C. T. Hung, "Synergistic action of growth factors and dynamic loading for articular cartilage tissue engineering," *Tissue Eng.*, vol. 9, no. 4, pp. 597–611, 2003.
- [110] D. W. Hutmacher, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage," in *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*, Elsevier, pp. 175–189, 2006.
- [111] D. Correa and S. A. Lietman, "Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 62, pp. 67–77, Feb. 2017.
- [112] Y. Stark, K. Suck, C. Kasper, M. Wieland, M. van Griensven, and T. Scheper, "Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering," *Exp. Toxicol. Pathol.*, vol. 57, no. 4, pp. 305–311, Mar. 2006.
- [113] S. Mizuno, F. Allemann, and J. Glowacki, "Effects of medium perfusion on matrix production by bovine chondrocytes in three-dimensional collagen sponges," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 56, no. 3, pp. 368–375, 2001.
- [114] G. S. Offeddu, J. C. Ashworth, R. E. Cameron, and M. L. Oyen, "Multi-scale mechanical response of freeze-dried collagen scaffolds for tissue engineering applications," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 42, pp. 19–25, Feb. 2015.
- [115] C. Henrionnet, E. Roeder, R. Gillet, L. Galois, D. Bensoussan, D. Mainard, P. Netter, P. Gillet and A. Pinzano, "Expression of chondrogenic genes by undifferentiated vs. differentiated human mesenchymal stem cells using array technology," *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 20, no. 3–4, pp. 175–181, 2010.
- [116] E. Farrell, F.J. O'Brein, P. Doyle, J. Fischer, I. Yannas, B.A. Harlez, B. O'Connell, P.J. Prendergast and V.A. Campbell, "A collagen-glycosaminoglycan scaffold supports adult rat mesenchymal stem cell differentiation along osteogenic and chondrogenic routes," *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 3, pp. 459–468, 2006.

- [117] G. Ragetyl, D. J. Griffon, and Y. S. Chung, "The effect of type II collagen coating of chitosan fibrous scaffolds on mesenchymal stem cell adhesion and chondrogenesis," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 10, pp. 3988–3997, Oct. 2010.
- [118] S. M. Vickers, L. S. Squitieri, and M. Spector, "Effects of cross-linking type II collagen-GAG scaffolds on chondrogenesis in vitro: dynamic pore reduction promotes cartilage formation," *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 5, pp. 1345–1355, 2006.
- [119] J. M. Shapiro and M. L. Oyen, "Hydrogel Composite Materials for Tissue Engineering Scaffolds," *JOM*, vol. 65, no. 4, pp. 505–516, Apr. 2013.
- [120] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 677–689, Aug. 2006.
- [121] A. R. Cameron, J. E. Frith, and J. J. Cooper-White, "The influence of substrate creep on mesenchymal stem cell behaviour and phenotype," *Biomaterials*, vol. 32, no. 26, pp. 5979–5993, Sep. 2011.
- [122] H. Zheng, J. A. Martin, Y. Duwayri, G. Falcon, and J. A. Buckwalter, "Impact of aging on rat bone marrow-derived stem cell chondrogenesis," *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 62, no. 2, pp. 136–148, 2007.
- [123] M. Zaim, S. Karaman, G. Cetin, and S. Isik, "Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells," *Ann. Hematol.*, vol. 91, no. 8, pp. 1175–1186, Aug. 2012.
- [124] S. C. Mendes, J.M. TIBBE, M. VEENHOF, K. BAKKER, S. BOTH, B.Sc.,1 P.P. PLATENBURG, F.C. ONER, J.D. DE BRUIJN, and C.A. VAN BLITTERSWIJK, "Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age," *Tissue Eng.*, vol. 8, no. 6, pp. 911–920, 2002.
- [125] A. Stolzing, E. Jones, D. McGonagle, and A. Scutt, "Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 129, no. 3, pp. 163–173, Mar. 2008.
- [126] M. N. Starodubtseva, "Mechanical properties of cells and ageing," *Ageing Res. Rev.*, vol. 10, no. 1, pp. 16–25, Jan. 2011.
- [127] R. J. Bergman, D. Gazit, A. J. Kahn, H. Gruber, S. McDougall, and T. J. Hahn, "Age-related changes in osteogenic stem cells in mice," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 11, no. 5, pp. 568–577, 1996.
- [128] S. V. Tokalov, S. Grüner, S. Schindler, G. Wolf, M. Baumann, and N. Abolmaali, "Age-Related Changes in the Frequency of Mesenchymal Stem Cells in the Bone Marrow of Rats," *Stem Cells Dev.*, vol. 16, no. 3, pp. 439–446, Jun. 2007.
- [129] K. Mareschi, I. Ferrero, D. Rustichelli, S. Aschero, L. Gammaitoni, M. Aglietta, E. Madon and F. Fagioli, "Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow," *J. Cell. Biochem.*, vol. 97, no. 4, pp. 744–754, Mar. 2006.
- [130] K. Stenderup, "Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells," *Bone*, vol. 33, no. 6, pp. 919–926, Dec. 2003.
- [131] J. D. Kretlow, Y.Q. Jin, W. Liu, W.J. Zhang, T.H. Hong, G. Zhou, L.S Baggett, A.G Miko and Y. Cao, "Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells," *BMC Cell Biol.*, vol. 9, no. 1, p. 60, 2008.
- [132] S. Sethe, A. Scutt, and A. Stolzing, "Aging of mesenchymal stem cells," *Ageing Res. Rev.*, vol. 5, no. 1, pp. 91–116, Feb. 2006.
- [133] A. Levillain, H. Magoaric, C. Boulocher, A. Decambon, V. Viateau, and T. Hoc, "Viscoelastic properties of rabbit osteoarthritic menisci: A correlation with matrix alterations," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 65, pp. 1–10, Jan. 2017.
- [134] C. R. Rowland, D. P. Lennon, A. I. Caplan, and F. Guilak, "The effects of crosslinking of scaffolds engineered from cartilage ECM on the chondrogenic differentiation of MSCs," *Biomaterials*, vol. 34, no. 23, pp. 5802–5812, Jul. 2013.
- [135] J. L. Carter-Arnold, N. L. Neilsen, L. L. Amelse, A. Odoi, and M. S. Dhar, "In vitro analysis of equine, bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates differences within age-

- and gender-matched horses: Equine mesenchymal stem cells from middle-aged horses," *Equine Vet. J.*, vol. 46, no. 5, pp. 589–595, Sep. 2014.
- [136] H. Alves, J. van Ginkel, N. Groen, M. Hulsman, A. Mentink, M.I Reinders, C. van Blitterswijk and J. de Boer, "A Mesenchymal Stromal Cell Gene Signature for Donor Age," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 8, p. e42908, Aug. 2012.
- [137] E. Pfeiffer, S. M. Vickers, E. Frank, A. J. Grodzinsky, and M. Spector, "The effects of glycosaminoglycan content on the compressive modulus of cartilage engineered in type II collagen scaffolds," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 16, no. 10, pp. 1237–1244, Oct. 2008.
- [138] A. C. Kim and M. Spector, "Distribution of chondrocytes containing  $\alpha$ -smooth muscle actin in human articular cartilage," *J. Orthop. Res.*, vol. 18, no. 5, pp. 749–755, 2000.
- [139] C. R. Lee, H. A. Breinan, S. Nehrer, and M. Spector, "Articular cartilage chondrocytes in type I and type II collagen-GAG matrices exhibit contractile behavior in vitro," *Tissue Eng.*, vol. 6, no. 5, pp. 555–565, 2000.
- [140] C. R. Lee, A. J. Grodzinsky, and M. Spector, "The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis," *Biomaterials*, vol. 22, no. 23, pp. 3145–3154, 2001.
- [141] S. Treppo, H. Koepp, E. C. Quan, A. A. Cole, K. E. Kuettner, and A. J. Grodzinsky, "Comparison of biomechanical and biochemical properties of cartilage from human knee and ankle pairs," *J. Orthop. Res.*, vol. 18, no. 5, pp. 739–748, 2000.
- [142] Y. Anraku, H. Mizuta, A. Sei, Kudo, E. Nakamura, K. Senba, K. Takagi and Y. Hiraki, "The chondrogenic repair response of undifferentiated mesenchymal cells in rat full-thickness articular cartilage defects," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 16, no. 8, pp. 961–964, Aug. 2008.
- [143] N. de Isla, C. Huseltein, N. Jessel, A. Pinzano, V. Decot, J. Magdalou, D. Bensoussan and J.-F. Stoltz, "Introduction to tissue engineering and application for cartilage engineering," *Biomed. Mater. Eng.*, no. 3–4, pp. 127–133, 2010.
- [144] H. P. Zhou, D.H.Yi, S.Q.Yu, G.C.Sun, Q.Cui, H.L.Zhu, J.C.Liu, J.Z.Zhang and T.J.Wu, "Administration of donor-derived mesenchymal stem cells can prolong the survival of rat cardiac allograft," *Transplant. Proc.*, vol. 38, no. 9, pp. 3046–3051, Nov. 2006.
- [145] N. Eliopoulos, "Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice," *Blood*, vol. 106, no. 13, pp. 4057–4065, Dec. 2005.
- [146] K.H. Grinnemo, A. Månsson, G. Dellgren, D. Klingberg, E. Wardell, V. Drvota, C. Tammik, J. Holgersson, O. Ringde´n, C. Sylve´n and K. Le Blanc, "Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 127, no. 5, pp. 1293–1300, May 2004.
- [147] C. Sanjurjo-Rodríguez, A. H. Martínez-Sánchez, T. Hermida-Gómez, I. Fuentes-Boquete, S. Díaz-Prado, and F. J. Blanco, "Differentiation of human mesenchymal stromal cells cultured on collagen sponges for cartilage repair," *Histol. Histopathol.*, vol. 31, no. 11, pp. 1221–1239, Nov. 2016.
- [148] F. Ronca, L. Palmieri, P. Panicucci, and G. Ronca, "Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 6 Suppl A, pp. 14–21, May 1998.
- [149] F. Taraballi, B. Corradetti, S. Minardi, S. Powel, F. Cabrera, J.L. Van Eps, B.K Weiner and E. Tasciotti, "Biomimetic collagenous scaffold to tune inflammation by targeting macrophages," *J. Tissue Eng.*, vol. 7, p. 204173141562466, Jan. 2016.
- [150] S. Wakitani, T. Goto, S.J. Pineda, R.G. Young, J.M. Mansour, A.I. Caplan and V.M. Goldberg, "Mesenchymal Cell-based Repair of Large, Full-thickness Defects of Articular Cartilage.," *J. Bone Jt. Surg.-Am. Vol.*, vol. 76, no. 4, pp. 579–592, Apr. 1994.
- [151] H. Mizuta, S. Kudo, E. Nakamura, Y. Otsuka, K. Takagi, and Y. Hiraki, "Active proliferation of mesenchymal cells prior to the chondrogenic repair response in rabbit full-thickness defects of articular cartilage," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 12, no. 7, pp. 586–596, Jul. 2004.
- [152] J.Y. Ko, K.-I. Kim, S. Park, and G.-I. Im, "In vitro chondrogenesis and in vivo repair of osteochondral defect with human induced pluripotent stem cells," *Biomaterials*, vol. 35, no. 11, pp. 3571–3581, Apr. 2014.

- [153] R. L. Dahlin, L.A. Kinard, J. Lam, C.J. Needham, S. Lu, F. Kurtis Kasper and A.G. Mikos, "Articular chondrocytes and mesenchymal stem cells seeded on biodegradable scaffolds for the repair of cartilage in a rat osteochondral defect model," *Biomaterials*, vol. 35, no. 26, pp. 7460–7469, Aug. 2014.
- [154] K. D. Novakofski, R. M. Williams, L. A. Fortier, H. O. Mohammed, W. R. Zipfel, and L. J. Bonassar, "Identification of cartilage injury using quantitative multiphoton microscopy," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 22, no. 2, pp. 355–362, Feb. 2014.
- [155] J. Mansfield, J. Yu, D. Attenburrow, J. Moger, U. Tirlapur, J. Urban, Z. Cui and P. Winlove, "The elastin network: its relationship with collagen and cells in articular cartilage as visualized by multiphoton microscopy," *J. Anat.*, vol. 215, no. 6, pp. 682–691, Dec. 2009.
- [156] M. Huber, S. Trattinig, and F. Lintner, "Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage," *Invest. Radiol.*, vol. 35, no. 10, pp. 573–580, Oct. 2000.
- [157] B. Vanwanseele, E. Lucchinetti, and E. Stüssi, "The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 10, no. 5, pp. 408–419, May 2002.
- [158] M. S. Kuster, G. A. Wood, G. W. Stachowiak, and A. Gächter, "Joint Load Considerations In Total Knee Replacement," *J. Bone Jt. Surg.*, vol. 79, no. 1, pp. 109–113, Jan. 1997.
- [159] D. E. Anderson and B. Johnstone, "Dynamic Mechanical Compression of Chondrocytes for Tissue Engineering: A Critical Review," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 5, Dec. 2017.
- [160] S. Ogueta, J. Muñoz, E. Obregon, E. Delgado-Baeza, and J. P. García-Ruiz, "Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 190, no. 1, pp. 51–63, 2002.
- [161] L. Bian, D. Y. Zhai, E. Tous, R. Rai, R. L. Mauck, and J. A. Burdick, "Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF- $\beta$ 3 from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels in vitro and in vivo," *Biomaterials*, vol. 32, no. 27, pp. 6425–6434, Sep. 2011.
- [162] A. A. Hegewald, J. Ringe, J. Bartel, I. Krüger, M. Notter, D. Barnewitz, C. Kaps, M. Sittinger, "Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study," *Tissue Cell*, vol. 36, no. 6, pp. 431–438, Dec. 2004.
- [163] K. W. Li, A. K. Williamson, A. S. Wang, and R. L. Sah, "Growth Responses of Cartilage to Static and Dynamic Compression," *Clin. Orthop.*, vol. 391, pp. S34–S48, Oct. 2001.
- [164] T. Davissou, S. Kunig, A. Chen, R. Sah, and A. Ratcliffe, "Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage," *J. Orthop. Res.*, vol. 20, no. 4, pp. 842–848, Jul. 2002.
- [165] M. D. Buschmann, E. B. Hunziker, Y.-J. Kim, and A. J. Grodzinsky, "Altered aggrecan synthesis correlates with cell and nucleus structure in statically compressed cartilage," p. 10.
- [166] T. M. Griffin and F. Guilak, "The Role of Mechanical Loading in the Onset and Progression of Osteoarthritis," *Exerc. Sport Sci. Rev.*, vol. 33, no. 4, pp. 195–200, Oct. 2005.
- [167] S. D. Thorpe, C. T. Buckley, T. Vinardell, F. J. O'Brien, V. A. Campbell, and D. J. Kelly, "The Response of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to Dynamic Compression Following TGF- $\beta$ 3 Induced Chondrogenic Differentiation," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 38, no. 9, pp. 2896–2909, Sep. 2010.
- [168] J. J. Campbell, D. A. Lee, and D. L. Bader, "Dynamic compressive strain influences chondrogenic gene expression in human mesenchymal stem cells," *Biorheology*, vol. 43, no. 3,4, pp. 455–470, 2006.
- [169] K. Miyayoshi, M.C.D Trindade, D.P. Lindsey, G.S. Beaupre, D.R. Carter, S.B. Goodman, D.J. Schurman and R. Lane Smith, "Dose-and time-dependent effects of cyclic hydrostatic pressure on transforming growth factor- $\beta$ 3-induced chondrogenesis by adult human mesenchymal stem cells in vitro," *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 8, pp. 2253–2262, 2006.

- [170] P. Becquart, M. Cruel, T. Hoc, L. Sudre, K. Pernelle, R. Bizios, D. Logeart-Avramoglou, H. Petite and M. Bensidhoum, "Human mesenchymal stem cell responses to hydrostatic pressure and shear stress," *Eur. Cell. Mater.*, vol. 31, pp. 160–173, Feb. 2016.
- [171] G. Chen, D. Akahane, N. Kawazoe, K. Yamamoto, and T. Tateishi, "Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a leakproof collagen sponge," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 28, no. 1, pp. 195–201, Jan. 2008.
- [172] N. Fahy, M.L. de Vries-van, J. Lehmann, W. Wei, N. Grotenhuis, E. Farrell, P.M. van der Kraan, J.M. Murphy, Y.M. Bastiaansen-Jenniskens, G.J.V.M. van Osch, "Human osteoarthritic synovium impacts chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via macrophage polarisation state," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 22, no. 8, pp. 1167–1175, Aug. 2014.
- [173] J. Bondeson, A. B. Blom, S. Wainwright, C. Hughes, B. Caterson, and W. B. van den Berg, "The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 62, no. 3, pp. 647–657, 2010.
- [174] J.P. Krüger, M. Endres, K. Neumann, B. Stuhlmüller, L. Morawietz, T. Häupl and C. Kaps, "Chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells is affected by synovial fluid from donors with osteoarthritis or rheumatoid arthritis," *J. Orthop. Surg.*, vol. 7, no. 1, p. 10, 2012.
- [175] P. Angele, J.U. Yo, C. Smith, J. Mansour, K.J. Jepsen, M. Nerlich, B. Johnstone, "Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro," *J. Orthop. Res.*, vol. 21, no. 3, pp. 451–457, 2003.
- [176] D. R. Wagner, D.P. Lindsey, K. W. Li, P. Tummala, S.E. Chandran, R. Lane Smith, M.T. Longaker, D.R. Carter and G.S. Beaupre, "Hydrostatic Pressure Enhances Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells in Osteochondrogenic Medium," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 36, no. 5, pp. 813–820, May 2008.
- [177] K. Miyanishi, M.C.D. Trindade, D.P. Lindsey, G.S. Beaupre, D.R. Carter, S.B. Goodman, D.J. Schurman and R. Lane Smith, "Effects of hydrostatic pressure and transforming growth factor- $\beta$  3 on adult human mesenchymal stem cell chondrogenesis in vitro," *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 6, pp. 1419–1428, 2006.
- [178] A. R. Finger, C. Y. Sargent, K. O. Dulaney, S. H. Bernacki, and E. G. Loba, "Differential Effects on Messenger Ribonucleic Acid Expression by Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Seeded in Agarose Constructs Due to Ramped and Steady Applications of Cyclic Hydrostatic Pressure," *Tissue Eng.*, vol. 13, no. 6, pp. 1151–1158, Jun. 2007.
- [179] Z. Li, S.-J. Yao, M. Alini, and M. J. Stoddart, "Chondrogenesis of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Fibrin-Polyurethane Composites Is Modulated by Frequency and Amplitude of Dynamic Compression and Shear Stress," *Tissue Eng. Part A*, vol. 16, no. 2, pp. 575–584, Feb. 2010.
- [180] O. Schatti, S. Grad1, J. Goldhahn2, G. Salzmänn3, Z. Li1, M. Alini1 and M.J. Stoddart, "A combination of shear and dynamic compression leads to mechanically induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells," *Eur Cell Mater*, vol. 22, no. 214–225, p. b97, 2011.
- [181] P. Angele, D. Schumann, M. Angele, B. Kinner, C. Englert, R. Hente, B. Führtmeier, M. Nerlich, C. Neumann and R. Kujat, "Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds," *Biorheology*, vol. 41, no. 3–4, pp. 335–346, 2004.
- [182] Z. Li, L. Kupcsik, S.-J. Yao, M. Alini, and M. J. Stoddart, "Mechanical load modulates chondrogenesis of human mesenchymal stem cells through the TGF- $\beta$  pathway," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 14, no. 6a, pp. 1338–1346, Jun. 2010.
- [183] E. Dubois, "Elaboration et essais préliminaires d'un protocole expérimental *in vitro* permettant d'évaluer l'influence de liquides synoviaux issus d'articulations arthrosiques de cheval sur les cellules stromales mésenchymateuses," *VetAgro Sup, campus vétérinaire, thèse d'exercice*, "2015 Lyon, thèse n°30", 2015.

- [184] K. W. Ng, L. E. Kugler, S. B. Doty, G. A. Ateshian, and C. T. Hung, "Scaffold degradation elevates the collagen content and dynamic compressive modulus in engineered articular cartilage," *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.*, vol. 17, no. 2, pp. 220–227, Feb. 2009.
- [185] E. G. Lima, L. Bian, K.W. Ng, R.L. Mauck, B.A. Byers, R.S. Tuan, G.A. Ateshian, and C.T. Hung, "The beneficial effect of delayed compressive loading on tissue-engineered cartilage constructs cultured with TGF- $\beta$ 3," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 15, no. 9, pp. 1025–1033, Sep. 2007.
- [186] J. K. Mouw, J. T. Connelly, C. G. Wilson, K. E. Michael, and M. E. Levenston, "Dynamic Compression Regulates the Expression and Synthesis of Chondrocyte-Specific Matrix Molecules in Bone Marrow Stromal Cells," *Stem Cells*, vol. 25, no. 3, pp. 655–663, 2007.
- [187] M.-S. Hosseini, M. Tafazzoli-Shadpour, N. Haghighipour, N. Aghdami, and A. Goodarzi, "The synergistic effects of shear stress and cyclic hydrostatic pressure modulate chondrogenic induction of human mesenchymal stem cells," *Int. J. Artif. Organs*, vol. 38, no. 10, pp. 557–564, 2015.
- [188] V. H. M. Mouser, R. Levato, L.J. Bonassar, D.D. D’Lima, D.A. Grande, T.J. Klein, D.B.F. Saris, M. Zenobi-Wong, D. Gawlitta, and J. Malda, "Three-Dimensional Bioprinting and Its Potential in the Field of Articular Cartilage Regeneration," *Cartilage*, vol. 8, no. 4, pp. 327–340, Oct. 2017.

# Résumé

---

Le cartilage est un tissu clé des articulations synoviales. Suite à un problème mécanique, traumatique ou inflammatoire, le cartilage est dégradé entraînant des douleurs articulaires et une perte de mobilité. Le cartilage étant un tissu non innervé et non vascularisé, son auto-réparation est très faible. De plus en plus de techniques sont développées pour la réparation des défauts cartilagineux mais aucune n'a encore permis d'obtenir un nouveau cartilage pleinement fonctionnel. En particulier, l'ingénierie tissulaire (IT) est une technique très prometteuse qui consiste à obtenir un greffon de cartilage dont les propriétés mécaniques et structurales soient satisfaisantes une fois implanté dans l'articulation. L'IT est basée sur l'association de cellules, d'un biomatériau et de facteurs de croissance. Le but de cette thèse est d'étudier l'effet de l'âge du donneur des cellules sur la synthèse du greffon par l'IT *in vitro* et sur la qualité du cartilage obtenu lors de l'implantation dans un modèle de rat NUDE. Puis dans une dernière partie, l'impact de l'environnement chimique et mécanique est étudié sur la qualité du greffon. Nos études montrent ainsi que l'âge du donneur aussi bien dans un contexte *in vitro* ou *in vivo* impacte la qualité du greffon et la réparation une fois implanté dans l'animal. En effet, les greffons issus des donneurs âgés ont des propriétés mécaniques légèrement plus élevées et une synthèse des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) du cartilage significativement plus élevée que les greffons issus de donneurs jeunes. De plus, la réponse inflammatoire des greffons implantés dans un défaut cartilagineux chez le rat NUDE est plus faible pour les donneurs âgés. Enfin, nous montrons que le microenvironnement mécanique (compression ou pression hydrostatique) et chimique (liquide synovial (LS) ou TGF- $\beta$ 1 pur) joue un rôle important sur la réponse cellulaire. Par ailleurs, en fonction de l'âge, l'association de ces différents facteurs donnent des résultats différents. Par exemple, pour une sollicitation de type compression, c'est le LS qui est à favoriser pour obtenir les greffons de meilleure qualité dans le cas des donneurs âgés. Au contraire, pour la même sollicitation de type compression, c'est la présence de TGF- $\beta$ 1 qui conduit au greffon de meilleure qualité pour les donneurs jeunes. Ces études mettent en évidence l'importance de l'âge du donneur et montrent de plus qu'un protocole IT patient spécifique est la meilleure solution.

Mots clés: cartilage, défaut ostéochondral, âge, tissu ingénierie, liquide synovial, contrainte mécanique

# Abstract

---

Articular cartilage is an important tissue of synovial joints. Biomechanical, traumatic or inflammatory factors can trigger articular cartilage damages, which ultimately leads to joint pain and loss of mobility. Because cartilage is a non-innervated and non-vascularized tissue, its self-repair is extremely limited. Numerous cartilage repair techniques are being developed but none has resulted in a new, fully functional, cartilage. In particular, tissue engineering (TE) is a very promising technique that consists in obtaining a cartilage graft whose mechanical and structural properties are satisfactory once implanted in the joint. TE is based on the association of a combination of cells, biomaterial and growth factors. The first aim of this thesis was to study the effect of cells donor's age on graft synthesis and quality *in vitro* and on the quality of the cartilage obtained after implantation in a Nude rat model of cartilage defect. The second aim was to study the impact of the chemical and mechanical environment during graft synthesis on mechanical and structural properties of the resulting graft. Our *in vitro* and *in vivo* studies showed that the age of the donor had an impact on graft properties and cartilage repair quality. More precisely, grafts resulting from older donors had slightly higher mechanical properties and a significantly higher synthesis of extracellular matrix proteins (ECM) than grafts resulting from younger donors. The inflammatory response was lower when grafts resulting from older donors' cells were implanted. Finally, the mechanical microenvironment (compression or hydrostatic pressure) and chemical microenvironment (synovial fluid (SF) or TGF- $\beta$ 1) played an important role in the cellular response during the *in vitro* process. Depending on the donor's age, the combination of these environmental factors gave different results. For example, in the case of elderly donors, when compressive solicitations were used, SF gave better quality grafts. On the contrary, TGF- $\beta$ 1 leads to the best quality graft for young donors. These studies highlight the importance of donor age on TE and that a patient specific protocol might be the best solution.

Key words: cartilage, osteochondral defect, age, tissue engineering, synovial fluid, mechanical stress