



**HAL**  
open science

# **Nouveau dispositif fluïdique pour la stimulation et la caractérisation biomécanique de microsphères : preuve de concept et application aux micropellets de cartilage**

Noémie Petitjean

## ► To cite this version:

Noémie Petitjean. Nouveau dispositif fluïdique pour la stimulation et la caractérisation biomécanique de microsphères : preuve de concept et application aux micropellets de cartilage. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2020. Français. ⟨NNT : 2020MONTT047⟩. ⟨tel-03164570⟩

**HAL Id: tel-03164570**

**<https://theses.hal.science/tel-03164570v1>**

Submitted on 10 Mar 2021

**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.



HAL Authorization

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie-Santé

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unités de recherche : Institut de Médecine Régénératrice et Biothérapie, Laboratoire de Mécanique et Génie Civil

**Nouveau dispositif fluide pour la stimulation et la caractérisation biomécanique de microsphères : preuve de concept et application aux micropellets de cartilage.**

**Présentée par Noémie Petitjean  
Le 18 décembre 2020**

**Sous la direction de Danièle Noël et Pascale Royer**

**Devant le jury composé de**

Hubert Marotte, PU-PH, Université Jean Monnet  
Frédéric Mallein-Gerin, DR, CNRS  
Martine Pithioux, DR, CNRS  
Jean-Marc Allain, Pr, École Polytechnique  
Claire Vinatier, MCU, Université de Nantes  
Danièle Noël, DR, INSERM  
Pascale Royer, DR, CNRS  
Patrick Cañadas, MCU, Université de Montpellier  
Simon Le Floc'h, MCU, Université de Montpellier

Président du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Co-directeur  
Co-directeur  
Invité  
Invité



**UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER**



Nouveau dispositif fluïdique pour la stimulation et la caractérisation biomécanique de microsphères : preuve de concept et application aux micropellets de cartilage.

---

Les pathologies du cartilage articulaire (CA) constituent aujourd'hui un problème de santé publique. L'ingénierie tissulaire, dont l'objectif est la création de nouveaux tissus contenant des cellules, est une solution thérapeutique prometteuse pour la réparation de lésions du CA mais nécessite encore des recherches pour améliorer les propriétés mécaniques des néo-tissus. Ce travail de thèse avait pour objectif l'analyse de l'impact de stimulations mécaniques sur le développement et le maintien du CA. Le micropellet de cartilage, conçu à partir de l'agrégation de cellules souches mésenchymateuses, a été choisi comme modèle biologique d'étude. Pour ce faire, un dispositif fluïdique capable de stimuler et caractériser mécaniquement les micropellets de cartilage de petite taille et de forme irrégulière a été développé. Il permet de stimuler et caractériser simultanément 6 micropellets de cartilage par leur compression dans 6 puits coniques, grâce à différents signaux de pression. L'association du dispositif fluïdique à un modèle numérique a rendu possible la caractérisation mécanique de diverses microsphères à base d'alginate, de collagène ou de collagène réticulé par comparaison à une méthode de caractérisation conventionnelle par compression entre deux surfaces planes. L'analyse des signaux de pression générés a permis de vérifier la fiabilité du dispositif pour l'application de stimuli mécaniques. La stimulation de micropellets de cartilage de 21 jours par un signal carré avec diverses amplitudes, fréquences et durées a montré que l'expression des gènes chondrocytaires pouvait être modulée par les stimulations mécaniques. Des déformations importantes des micropellets ont été observées sans toutefois les altérer structurellement. La caractérisation mécanique de micropellets de 21 jours a montré des résultats cohérents avec la bibliographie. Cette preuve de concept a montré l'intérêt du dispositif fluïdique permettant la stimulation et la caractérisation de micropellets de cartilage, et a mis en évidence des pistes d'amélioration du système et des méthodes d'analyses numériques associées ainsi que des pistes de travail pour améliorer notre compréhension du développement du micropellet de cartilage lors de stimulations mécaniques.

New fluidic device for the biomechanical stimulation and biomechanical characterization of microspheres: proof of concept and application to cartilage micropellets.

---

Articular cartilage (AC) pathologies have emerged as a public health problem. Tissue engineering, whose objective is to create new tissues with cells, is a promising therapeutic solution for the repair of AC lesions but still requires research to improve the mechanical properties of the new tissues. The objective of this PhD thesis work was to analyze the impact of mechanical stimuli in the development and maintenance of AC, based on the model of cartilage micropellet, derived from the aggregation of mesenchymal stem cells. For this purpose, a fluidic device able to mechanically stimulate and characterize small and irregularly shaped cartilage micropellets was developed. Six cartilage micropellets in six conical wells can be simultaneously stimulated by compression and characterized through different pressure signals. Associated to a numerical model, the fluidic device has been shown to allow the characterization of the mechanical properties of various microspheres made of alginate, collagen or cross-linked collagen as compared to a conventional characterization method by compression between two planar surfaces. The reliability of the device for the application of mechanical stimuli have been confirmed by analyzing the pressure signals generated. Stimulation of 21-day cartilage micropellets with a square-wave signal with various amplitudes, frequencies and durations have shown that chondrocyte gene expression could be modulated by mechanical stimuli. Moderate levels of deformation of the micropellets were observed without any obvious damage. The mechanical characterization of 21-day micropellets have shown results consistent with the literature. This proof of concept shows the interest of the fluidic device allowing the stimulation and characterization of cartilage micropellets and highlighted possibilities to improve the system and associated numerical analysis methods as well as directions to improve our understanding of cartilage micropellet development under mechanical stimulations.

## Remerciements

Par ces quelques mots, je souhaite tout d'abord remercier toutes les personnes qui m'ont accompagnée de près ou de loin tant professionnellement que personnellement durant ces trois années montpelliéraines.

Aux directeurs de recherche **Martine Pithioux** et **Frédéric Mallein-Gerin**, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Merci à tous les deux pour le temps précieux que vous avez consacré à évaluer ce manuscrit, pour votre bienveillance et vos commentaires constructifs. Je remercie aussi très chaleureusement **Claire Vinatier**, **Jean-Marc Allain** pour avoir accepté d'examiner mon travail lors de sa soutenance orale et tout particulièrement **Hubert Marotte** d'avoir accepté d'endosser le rôle de président du jury et d'être présent le jour J étant donné les conditions sanitaires. C'est un immense honneur d'être évaluée et d'échanger avec un jury dont les expertises sont aussi variées qu'avisées.

Un grand merci à **Anne-Sophie Caro** et **Xavier Garric**, membres de mon comité de thèse. Votre expérience m'a été précieuse pour prendre du recul sur mes recherches et avancer sereinement au fil des années.

Mes plus sincères remerciements bien sûr à mon quatuor d'encadrants, **Danièle Noël**, **Pascale Royer**, **Patrick Cañadas** et **Simon Le Floc'h**. Le projet que vous avez conçu a été pour moi une aubaine. Merci infiniment d'avoir cru en moi et de m'avoir choisie. Travailler à la convergence de quatre spécialistes différents est d'une richesse exceptionnelle. Non seulement, j'ai appris mille choses mais vous avez su également m'écouter, me conseiller, m'encourager tant d'un point de vue professionnel que personnel. Vous formez un formidable groupe de recherche à part entière et je n'ai aucun doute sur le caractère fructueux de cette collaboration à l'avenir. Même si j'envisage de rejoindre ma contrée l'été prochain pour débiter ma carrière, j'espère que nous aurons l'opportunité de collaborer tous ensemble à nouveau.

Mes plus vifs remerciements à **Christian Jorgensen** et **Stéphane Pagano**, pour leur accueil dans leur laboratoire de recherche respectif. Travailler au sein de ces deux instituts m'a permis d'observer des travaux d'une grande diversité et d'alimenter sans fin ma curiosité. Je souhaite souligner l'importance des projets ambitieux que Christian Jorgensen met en place pour la recherche orthopédique.

Toute ma gratitude à **Gilles Dusfour** et Simon pour la conception de ce précieux dispositif de stimulation et caractérisation des micropellets ! Je remercie sincèrement mes « techniciens préférés », **Stéphan Devic**, **Gille Camp** et **Gilles Genevois**, toujours réactifs pour la réalisation des pièces du dispositif. Merci à **Patrice Valorge** et **Quentin Chapelier**, pour la mise en place et la maintenance du système électronique. Merci à **Yvan Duhamel**, pour l'impression de mes multiples cuves et supports. Merci à **Jonathan Barés**, pour toutes tes petites astuces qui nous aident bien dans la mise en place de nos expérimentations ! Merci à **Vincent Huon** pour la gestion de la Halle mécatronique. Enfin, je remercie **Emmanuel Belamie** et **Jade Berthelot** pour la préparation des microsphères de collagène qui m'ont permis de valider le dispositif.

**Claire Bony** et **Marie Maumus**, je vous remercie infiniment pour m'avoir formée avec rigueur et accompagnée dans mes expérimentations avec mes chers micropellets. Merci beaucoup pour votre aide au moindre de mes doutes ! Merci à **Chantal Ripoll** et **Karine Toupet** de m'avoir formée à la découpe des tissus biologiques à l'aide d'un cryostat et à la préparation des micropellets pour les coupes histologiques. Je remercie sincèrement **Csilla Gergely**, **Marta Martin Fernandez** et **Bela Varga** de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire pour découvrir l'AFM comme technique de caractérisation mécanique et d'avoir mis en place le protocole de mesure pour les micropellets. J'espère que nous pourrons enfin poursuivre ces mesures au cours de l'année qui vient.

Je remercie l'ensemble des enseignants et enseignants-chercheurs qui m'ont initiée à la pratique de l'enseignement. Je remercie chaleureusement **Loïc Daridon, Hervé Louche** et **Bruno Touraine** de m'avoir permis de partager mes missions complémentaires d'enseignement entre biologie et mécanique. Je remercie **Christiane Wagner-Kocher, Sandrine Bardet, Pierre Alart, Franck Jourdan, Julien Laget, Sylvain Le Cam, Nelly Godefroy, Anne-sophie Gosselin-grenet, Sophie Laffray, Simon Descamps** et **Jehan-Hervé Lignot** pour m'avoir formée à leurs enseignements et tout particulièrement, Patrick pour m'avoir aussi guidée dans mes choix.

Plus généralement, merci à l'ensemble des membres de l'IRMB et du LMGC qui en font des lieux d'un haut niveau de recherche. Merci à **Dominique Ambard, Olivier Arnould, Émilien Azéma, Lionel Bichet, Fabien Cherblanc, Frédéric Dubois, François Gibier, Delphine Jullien, Yann Monerie, Mathieu Renouf, Cédric Reynaud, Laurent Waltz, Bertrand Watrisse** pour les échanges que nous avons eus et les moments que nous avons passés au LMGC. **Florence Apparilly, Audrey Bartheleix, Philippe Briolotti, Jean-Marc Brondello, François Carol, Carole Crozet, Gabriel Courties, John De Vos, Farida Djouad, Isabelle Duroux-Richard, Jean-Marc Lemaitre, Gautier Tejedor** et **Élodie Vidal**, je vous remercie pour votre amabilité, votre aide et les conseils que j'ai pu recevoir de vous. Merci également aux personnels administratifs et techniques leur indispensable soutien de nos travaux de recherche.

Merci à **Adrien, Andrei, Capucine, Chenghe, David, Fabien, Fédérica, Félix, Julien, Joffrey L, Jonaz, Lo, Luisa, Mohamed, Pankaj, Théo, Thierry, Vincent, Xavier**. Je n'oublierai pas nos soirées « plage », nos repas internationaux et nos barbecues à la Halle ! Merci à **Alexandre, Benoît, Béryl, Candice, Claire L, Dora, Jérémy B, Jérémy S, Joffrey M, Lilian, Pauline, Sarah**. J'espère que l'année qui vient m'offrira ces occasions avec vous que j'ai rencontrés plus tardivement mais que j'apprécie tout autant ! Enfin, merci aux nombreux autres doctorants et post-doctorants que j'ai pu croiser au cours de ces trois années.

Je conclurai ici en remerciant les personnes les plus chères à mon cœur.  
A **mes parents, à ma famille**, je vous dois la curiosité, la persévérance et un soutien qui m'ont permis de mener à bien l'ensemble de mes études.  
A **ma belle-famille**, merci pour votre accueil depuis tant d'années maintenant et pour vos encouragements.  
J'ai une pensée particulière pour ma marraine, **Nicole**, et son mari, **Jean-Pierre** que j'ai pu rencontrer à nouveau grâce à ce doctorat. C'est un immense plaisir d'échanger avec vous et je vous remercie pour votre aide linguistique lors de la correction finale de ce manuscrit.  
Merci à mes filleules, **Théa** et **Kaëlys**, des petites merveilles qui illuminent la vie.  
Aux ami(e)s qui m'entourent et sur qui je peux compter. J'ai hâte de pouvoir enfin marier ma chère **Blandine**, suivre la fulgurante ascension de mon auxiliaire vétérinaire préférée **Justine**, découvrir les beaux projets de ma belle **Charlotte**, et retrouver après tant d'années mon amie d'enfance **Coralie**.  
Enfin, je tiens à remercier **mes amis à quatre pattes**, les petits comme les grands, tous aussi importants à mes yeux ! Merci **Yves** et **Noëlle** pour la bulle d'air que vous m'offrez.  
Merci **Guillemette** et **Sylvie** pour l'enseignement de cet art qui me colle à la peau, la danse classique.

Enfin et par-dessus tout, un tendre merci à **Aurélien**, Mon chéri aux oreilles de tous, qui partage ma vie depuis plus de dix ans maintenant. Mes choix ont conduit notre couple à franchir de nombreux obstacles : donc il est temps de t'en remercier infiniment.  
Merci pour ton soutien indéfectible de tous les instants.  
Merci pour ta capacité à croire en moi.  
Merci pour tout ce chemin parcouru ensemble.  
Je suis très heureuse et enthousiaste de partager avec toi nos futurs projets.  
Je t'aime.

## I. Table des matières

|  |    |
|--|----|
| I. Table des matières .....  | 6  |
| II. Liste des Figures et Tableaux .....  | 8  |
| III. Liste des abréviations .....  | 10 |
| IV. Introduction générale.....   | 12 |
| V. Le cartilage articulaire : structure, comportements, croissance et réparation .....                         | 14 |
| V.1. Les types de cartilage.....   | 14 |
| V.2. La biologie du cartilage articulaire .....  | 15 |
| V.2.1. La composition du tissu .....   | 15 |
| V.2.2. L'organisation du tissu .....   | 20 |
| V.3. La conception de néo-tissus cartilagineux.....  | 22 |
| V.3.1. Les techniques chirurgicales de réparation du cartilage articulaire .....                               | 23 |
| V.3.2. Les substituts sans cellules : recrutement de cellules in vivo.....                                     | 25 |
| V.3.3. Les substituts avec des chondrocytes ou chondrons : maintien du phénotype chondrocytaire .....          | 26 |
| V.3.4. Les substituts avec des cellules souches : différenciation chondrocytaire.....                          | 27 |
| V.3.5. Le micropellet : un modèle de croissance embryonnaire .....   | 30 |
| V.4. Les stades de maturation du cartilage natif.....  | 35 |
| V.4.1. Le développement embryonnaire .....   | 35 |
| V.4.2. La croissance post-natale .....   | 38 |
| V.4.3. L'homéostasie du tissu adulte.....  | 40 |
| V.4.4. Le vieillissement du tissu .....  | 42 |
| V.5. La biomécanique et les outils de caractérisation du cartilage natif et des néo-tissus cartilagineux ..... | 44 |

|  |     |
|--|-----|
| V.6. Les stimulations biomécaniques comme facteur de croissance mécanique des néo-tissus cartilagineux .....   | 45  |
| V.6.1. Maintien du phénotype chondrocytaire par stimulation mécanique.....   | 45  |
| V.6.2. Chondrogenèse des cellules souches mésenchymateuses par stimulation mécanique .....   | 50  |
| V.6.3. Réponse des cellules aux stimuli mécaniques par les voies de mécanotransduction .....   | 54  |
| .....  |     |
| V.7. Objectif des travaux .....  | 65  |
| VI. Contribution à l'évaluation de l'impact de stimulations mécaniques sur la croissance de micropellets de cartilage via le développement d'un dispositif adapté..... | 66  |
| VI.1. Nouveau dispositif fluide de stimulation et caractérisation mécanique pour des micropellets de cartilage .....   | 66  |
| VI.1.1. Mise au point d'un dispositif.....   | 66  |
| VI.1.2. Validation des capacités du dispositif à stimuler et caractériser mécaniquement des microsphères .....   | 73  |
| VI.2. L'évaluation de la réponse à court terme des micropellets de cartilage à des stimulations mécaniques.....  | 75  |
| VI.2.1. Culture des cellules souches mésenchymateuses .....  | 75  |
| VI.2.2. Mise en place du protocole de stimulation.....   | 75  |
| VI.2.3. Analyse de l'impact de divers paramètres de stimulation mécanique sur le développement des micropellets à court terme .....                                    | 79  |
| VII. Conclusions et perspectives.....  | 81  |
| VIII. Bibliographie.....   | 86  |
| IX. Curriculum Vitae .....   | 105 |

## II. Liste des Figures et Tableaux

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 – Composition et structure du cartilage articulaire décrites selon trois zones et trois régions.....  | 16 |
| Figure 2 – Composition et structure des collagènes de types II, IX et XI au sein du cartilage articulaire – d'après Lane and Weiss, 1975 et Kadler, 2004.....  | 18 |
| Figure 3 – Les chirurgies actuellement proposées afin de réparer des lésions du cartilage articulaire – modifié d'après Liu et al., 2019.....  | 24 |
| Figure 4 – Exemples d'hydrogels et de scaffolds utilisés pour constituer des néo-tissus cartilagineux – d'après Xing et al., 2019 et Tanaka et al., 2010. ....   | 26 |
| Figure 5 – Liste non exhaustive de matériaux utilisés pour la conception de néo-tissus pour l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire.....  | 29 |
| Figure 6 – Observation macroscopique de micropellets de cartilage et localisation des principaux composants de leur matrice extracellulaire – d'après Sekiya et al., 2005.....   | 32 |
| Figure 7 – Microscopie électronique à transmission de micropellets de cartilage issus de CSMs humaines montrant la forme des cellules dans la zone marginale (1), périphérique (2) et profonde (3) du micropellet de cartilage – d'après Eslaminejad et al., 2006..... | 33 |
| Figure 8 – Coupe longitudinale de l'extrémité d'un membre antérieur de la souris lors du développement embryonnaire montrant la genèse des articulations via l'expression du gène <i>GDF5</i> – d'après Koyama et al., 2008.....                                       | 36 |
| Figure 9 – Le développement du CA se fait en deux étapes ; une différenciation lors du développement embryonnaire puis une croissance du tissu lors du développement post-natal – d'après Decker et al., 2017. ....  | 38 |
| Figure 10 – Schéma non exhaustif des voies de mécanotransduction mises en évidence lors de la stimulation mécanique de chondrocytes ou CSMs en cours de différenciation – d'après (Choi et al., 2018).....   | 55 |
| Figure 11 – Cil primaire des chondrocytes du sternum d'embryon de poulet observé au microscope électronique – d'après Jensen et al., 2004. Schéma de la structure du cil primaire – d'après Ke and Yang, 2014.....   | 57 |

Figure 12 – Concepts de stimulation mécanique envisagé pour la stimulation de micropellets de cartilage. (A) compression uniaxiale, (B) méthode magnétique, (C) centrifugation et (D) le nouveau concept fluïdique..... 67

Figure 13 – Modélisations d'une microsphère de 1 mm de diamètre, déposée dans un cône dont l'angle d'ouverture varie de 30 à 80°, et qui possède un tube terminal de 200 µm de diamètre. .... 70

Figure 14 – Influence de l'angle d'ouverture du cône sur l'enfoncement des microsphères en fonction de leur coefficient de frottement. .... 72

Figure 15 – Expression des gènes chondrocytaires par des micropellets de cartilages lors de l'évaluation des paramètres expérimentaux nécessaire à la mise en place d'un protocole de stimulation des micropellets de cartilage avec le dispositif fluïdique..... 78

Tableau 1 – Trois types de cartilages ont été décrit chez les vertébrés : cartilage élastique, cartilage fibreux, cartilage hyalin. .... 14

Tableau 2 – Organisation du cartilage articulaire selon 4 zones : superficielle, intermédiaire, profonde et calcifiée – d'après Guilak et al., 1995; Sophia Fox et al., 2009 et Wachsmuth et al., 2006. .... 21

Tableau 3 – Stimulations mécaniques ayant conduit à la régulation positive de l'expression des gènes de la chondrogenèse ou à l'accumulation de matrice extracellulaire pour des biopsies, ou des néo-tissus, comportant des chondrocytes ou des cellules souches mésenchymateuses (CSMs)..... 63

Tableau 4 – Cahier des charges du dispositif de stimulation et caractérisation mécaniques des micropellets de cartilage..... 68

### III. Liste des abréviations

|               |  |
|---------------|--|
| <b>ACI</b>    | Implantation de chondrocytes autologues  |
| <b>ADAMTS</b> | Métalloprotéinase contenant un domaine désintégrine et des motifs thrombospondines de type I |
| <b>ADN</b>    | acide désoxyribonucléique  |
| <b>AGG</b>    | Aggrécane  |
| <b>AH</b>     | Acide hyaluronique   |
| <b>AP</b>     | Alcaline phosphatase   |
| <b>ARN</b>    | acide ribonucléique  |
| <b>BMP</b>    | Protéine morphogénétique osseuse   |
| <b>CA</b>     | Cartilage articulaire  |
| <b>CD</b>     | Cluster de différenciation   |
| <b>CDC42</b>  | Protéine de contrôle du cycle cellulaire   |
| <b>COL</b>    | Collagène  |
| <b>COMP</b>   | Protéine oligomérique de la matrice cartilagineuse   |
| <b>CSM</b>    | Cellule souche mésenchymateuse   |
| <b>CTGF</b>   | Facteur de croissance des tissus conjonctifs   |
| <b>DCX</b>    | Doublecortine  |
| <b>DMEM</b>   | Milieu minimum essentiel de Eagle  |
| <b>ELISA</b>  | Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée  |
| <b>ERG</b>    | Facteurs de transcription spécifique à la transformation des érythroblastes                  |
| <b>ERK</b>    | Kinases régulées par des signaux extracellulaires  |
| <b>FAK</b>    | Kinase de l'adhésion focale  |
| <b>FGF</b>    | Facteur de croissance des fibroblastes   |
| <b>GAG</b>    | Glycosaminoglycane   |
| <b>GDF5</b>   | Facteur de croissance et de différenciation 5  |
| <b>GTP</b>    | Guanosine triphosphate   |
| <b>IGF</b>    | Facteur de croissance de type insuline   |
| <b>Ihh</b>    | Protéine de signalisation de la voie Indian Hedgehog   |
| <b>IL</b>     | interleukine   |
| <b>ITS</b>    | Insuline-Transferrine-Sélénium   |
| <b>Link</b>   | Protéine de liaison  |
| <b>LOXL4</b>  | Homologue 4 de la Lysyl-oxydase  |
| <b>MACI</b>   | Implantation de chondrocytes autologues associés à un support matriciel                      |
| <b>MAPK</b>   | Protéines kinases activées par les mitogènes   |
| <b>MEC</b>    | Matrice extracellulaire  |
| <b>MMP</b>    | Métalloprotéinase  |
| <b>MO</b>     | Moelle osseuse   |

|               |  |
|---------------|--|
| <b>MPC</b>    | Matrice péricellulaire   |
| <b>NS</b>     | Non stimulé  |
| <b>ORL</b>    | Otho-Rhino-Laryngologie  |
| <b>PG</b>     | Protéoglycane  |
| <b>PGE2</b>   | Prostaglandine E2  |
| <b>PTHrP</b>  | Protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne                             |
| <b>RGD</b>    | Arginine glutamine asparate  |
| <b>RhoA</b>   | Homologue A de RAS   |
| <b>ROCK</b>   | Protéine kinase associée à Rho   |
| <b>RT-PCR</b> | Réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse                |
| <b>RUNX2</b>  | Facteur de transcription 2 apparenté à Runt                                  |
| <b>SMAD</b>   | <i>Sma Mother Against Decapentaplegic</i>                                    |
| <b>SOX</b>    | Facteur de transcription issu d'un gène du chromosome Y                      |
| <b>SPZ</b>    | Protéine de la zone superficielle  |
| <b>TA</b>     | Tissu adipeux  |
| <b>TGFβ</b>   | Facteur de différenciation transformant β                                    |
| <b>TGFβR</b>  | Récepteur au facteur de différenciation transformant β                       |
| <b>TNFα</b>   | Facteur de nécrose tumorale α  |
| <b>TRVP4</b>  | Récepteur ionotrope 4 activé par des molécules de la famille des vanilloïdes |
| <b>WNT</b>    | <i>Wingless-related integration site</i>                                     |
| <b>SPARC</b>  | protéine sécrétée, acide et riche en cystéine                                |
| <b>RSP9</b>   | Petite protéine ribosomique 9  |

## IV. Introduction générale

Ce projet de doctorat est né de la collaboration entre deux laboratoires de recherche, l'Institut de Médecine Régénératrice et Biothérapies (IRMB) et le Laboratoire de Mécanique et Génie Civil (LMGC). L'IRMB est un institut dont les problématiques touchent majoritairement l'étude des cellules souches, leur biologie et leurs applications thérapeutiques. Les recherches ont pour but de combler des objectifs fondamentaux et applicatifs dans le cadre de maladies chroniques ou liées au vieillissement. Le cartilage articulaire est un tissu largement étudié au sein du groupe "Biologie des cellules souches mésenchymateuses et thérapies du cartilage" dirigé par Danièle Noël. Le LMGc est un laboratoire de Mécanique, notamment des systèmes solides, dont les activités de recherche couvrent un large spectre de thématiques (biomécanique humaine et végétale, milieux granulaires, thermomécanique des matériaux et imagerie, mécanique théorique et numérique, génie civil, assemblages soudés ...). L'activité de l'équipe BIOTIC « Biomécanique des Interactions et de l'Organisation des Tissus et des Cellules », dont font partie Pascale Royer, Patrick Cañadas et Simon le Floc'h, a pour objectif la modélisation et la caractérisation mécanique des cellules et des tissus mous humains, la compréhension de leur organisation et de leur croissance ainsi que l'étude et le développement de dispositifs implantables.

Les domaines de compétence de ces deux laboratoires se rencontrent autour du cartilage articulaire (CA). Ce tissu qui recouvre les os longs au niveau des articulations a un rôle mécanique majeur dans le système musculosquelettique. Il permet des mouvements souples et indolores des membres ainsi que la transmission et l'amortissement des forces exercées au niveau des articulations grâce à ses caractéristiques biochimiques et biomécaniques. Cependant, ce tissu montre de faibles capacités de réparation ou régénération lors de lésions traumatiques et se trouve ainsi particulièrement vulnérable avec le vieillissement. D'autre part, les traitements proposés en clinique sont généralement symptomatiques et palliatifs mais non curatifs. Les recherches actuelles portent entre autres sur l'ingénierie tissulaire basée sur la formation de néo-tissus cartilagineux créés à partir de cellules souches/stromales mésenchymateuses adultes (CSMs). Cependant, l'obtention de tissus fonctionnels à long terme est difficile en raison de l'instabilité du phénotype des chondrocytes qui sont responsables de la sécrétion de la matrice extracellulaire spécifique. Une meilleure compréhension des processus de différenciation des CSMs en chondrocytes en interaction continue avec leur environnement biochimique et biomécanique semble donc nécessaire pour limiter la dédifférenciation ou l'hypertrophie des chondrocytes et améliorer ces néo-tissus.

Dans ce contexte, les deux laboratoires ont souhaité étudier un modèle biologique de croissance du CA : le « micropellet de CA ». Ce modèle *in vitro*, décrit comme reprenant les étapes de condensation, prolifération et différenciation des CSMs embryonnaires est un modèle de référence de la différenciation chondrocytaire. Cependant, très peu d'études ont évalué les propriétés mécaniques de ce néo-tissu ou l'impact de stimulations mécaniques au cours de son développement. Une première étude des propriétés biochimiques et biomécaniques du micropellet de CA au cours de son développement a été faite de manière conjointe par les deux laboratoires (Dusfour et al., 2020). L'étude

a montré une croissance du micropellet pendant 29 jours, associée à une augmentation de l'expression des gènes chondrocytaires et des propriétés mécaniques. Après 29 jours de culture, une diminution de l'expression des gènes du chondrocyte mature au profit de l'expression des gènes du chondrocyte hypertrophique a été observée ainsi qu'une stabilité des propriétés mécaniques. Connaissant la fonction du CA natif et son processus de développement *in vivo*, l'application de stimuli mécaniques sur les micropellets pourrait contribuer à une meilleure différenciation des CSMs en apportant un paramètre déterminant. Les micropellets de CA ont une petite taille (0,8 mm après 21 jours de culture) et ne sont pas parfaitement sphériques. Les dispositifs de stimulation mécanique classiques ne sont donc pas adaptés. Un dispositif de stimulation des micropellets a ainsi été conçu et fabriqué au LMGC, en particulier par Gilles Dusfour et Simon Le Floc'h.

Mon projet de thèse s'est articulé autour de la mise au point du dispositif de stimulation mécanique des micropellets de CA et l'observation de l'impact de divers stimuli mécaniques sur le phénotype chondrocytaire. Il sera présenté en trois parties. La première partie introductive consistera en une revue de la littérature sur le CA et sa croissance d'un point de vue biochimique et biomécanique, les stratégies utilisées en ingénierie tissulaire pour le réparer ou le remplacer ainsi que l'impact de stimulations mécaniques sur ces néo-tissus. La seconde partie présentera les résultats expérimentaux obtenus au cours de ma thèse sous la forme de deux articles originaux. Enfin, une troisième partie clôturera ce manuscrit par une discussion reprenant les principales avancées et les perspectives de ces travaux.

## V. Le cartilage articulaire : structure, comportements, croissance et réparation

### V.1. Les types de cartilage

Le cartilage est un tissu conjonctif présent dans l'ensemble du corps des vertébrés. Il a un rôle important dans le développement et le maintien de la fonction du système musculo-squelettique. Ce tissu est capable de résister aux forces de compression, tension, cisaillement et torsion qu'il subit. Le cartilage n'est ni innervé, ni vascularisé. Il est composé d'une matrice extracellulaire (MEC) qui est sécrétée puis remodelée par l'unique type de cellules matures du cartilage, les chondrocytes. La concentration en cellules de ce tissu étant relativement faible, c'est de la composition et de l'organisation de la MEC que proviennent majoritairement les fonctions du tissu. Alors que cette MEC est majoritairement composée d'eau, de collagènes et de protéoglycanes (Wachsmuth et al., 2006), l'équilibre entre ces trois composants et le type de collagène peuvent varier d'un tissu cartilagineux à un autre. Ainsi, trois types de cartilage ayant des aspects, propriétés et fonctions différents ont été décrits : le cartilage élastique, le cartilage fibreux et le cartilage hyalin (Tableau 1).

|                     | Localisation   | Aspect                                | Composition   | Fonctions                                |
|---------------------|--|---------------------------------------|---|--|
| Cartilage élastique |  Pavillon de l'oreille, trompe d'Eustache, ailes du nez, épiglotte, larynx                 | Opaque et jaunâtre                    | Protéoglycanes, collagène de type II et élastine    | Maintien de la structure                 |
| Cartilage fibreux   |  Disques inter-vertébraux, ménisques, symphyse pubienne, insertions tendino-ligamentaires | Blanc brillant                        | Collagène de type I dominant par rapport au type II | Résistance à la tension et compression   |
| Cartilage hyalin    |  Articulations, sphère Otho-Rhino-Laryngologie (ORL) et les voies aériennes               | Translucide, blanchâtre voir bleuâtre | Protéoglycanes et collagène de type II              | Transmission et amortissement des forces |

Tableau 1 – Trois types de cartilages ont été décrit chez les vertébrés : cartilage élastique, cartilage fibreux, cartilage hyalin.

Le cartilage élastique, d'apparence opaque et jaunâtre, est le tissu qui subit le moins de contraintes mécaniques. En effet, il a pour rôle le maintien de la forme des structures dans lesquelles il est inclus. On le trouve dans le pavillon de l'oreille, les ailes du nez, la trompe d'Eustache, l'épiglotte ou encore le larynx. C'est le tissu cartilagineux qui contient le plus de cellules. Il est aussi le plus élastique et flexible grâce à la richesse de sa MEC en élastine. Les protéoglycanes et les fibres de collagène de type II, qui n'ont pas d'orientations principales dans ce tissu, permettent de résister aux compressions et tensions.

Le cartilage fibreux ou fibrocartilage, de couleur blanc brillant, est un tissu intermédiaire entre le cartilage hyalin et les tissus conjonctifs fibreux. En effet, il est composé de peu de cellules et de fibres de collagène de type I mais sa MEC est solide et souple. L'organisation anisotrope de ses fibres lui confère une résistance importante aux forces de tension et de cisaillement. Ainsi, on retrouve ce tissu au niveau de la symphyse pubienne, des ménisques, des insertions tendino-ligamentaires et il compose l'*annulus fibrosus*, soit la périphérie, du disque intervertébral (Dusfour, 2018).

Le cartilage hyalin est le tissu cartilagineux le plus abondant. Ce cartilage est translucide, blanchâtre à bleuâtre, lisse et brillant. On parle de cartilage hyalin articulaire lorsqu'il recouvre les os longs au niveau des surfaces articulaires. Les tissus cartilagineux de la sphère Otho-Rhino-Laryngologie (ORL), des voies aériennes et du *nucleus pulposus*, le cœur du disque intervertébral, appartiennent aux cartilages hyalins non-articulaires. Le cartilage hyalin est riche en protéoglycanes et en fibres de collagène de type II. Cependant, le cartilage articulaire est la structure la plus complexe, divisée en zones où l'orientation préférentielle des fibres de collagène varie. Cette organisation permet au cartilage articulaire de résister aux compressions, tensions, cisaillements issus de l'exercice du poids du corps et des mouvements. Le cartilage non articulaire permet, comme le cartilage élastique, le maintien de la forme de la structure mais avec moins de souplesse. Les fibres de ces tissus sont orientées de manière aléatoire. Le *nucleus pulposus* est le seul cartilage hyalin non-articulaire à résister aux forces de pesanteur par un gonflement induit par les protéoglycanes et par son association avec l'*annulus fibrosus*.

## **V.2. La biologie du cartilage articulaire**

Le cartilage articulaire (CA) est un tissu conjonctif hautement spécialisé (Hu and Athanasiou, 2003; Sophia Fox et al., 2009; Wachsmuth et al., 2006) qui favorise les mouvements angulaires d'un os par rapport à un autre grâce à sa surface lisse et lubrifiée, et le transfert des forces au niveau des articulations avec un certain amortissement. La relation structure-fonction de ce tissu est primordiale. En effet, ce sont la composition et la structure des constituants de ce tissu qui lui confèrent ses propriétés mécaniques et sa fonction au sein du système musculo-squelettique (Figure 1).

### **V.2.1. La composition du tissu**

#### **V.2.1.a. Les chondrocytes : l'unique type cellulaire mature**

Les chondrocytes représentent 2% du volume du CA. Leur nombre, leur forme et leur taille varient en fonction de leur localisation dans le tissu (Tableau 2). Ils sont issus de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses embryonnaires et ont pour rôle le maintien de l'homéostasie du tissu par la synthèse et/ou la dégradation de la MEC (Gentili and Cancedda, 2009). La synthèse des protéines impliquées dans la production de la MEC (SOX9, AGG, COL II, COMP, Link) ou dans sa dégradation (MMPs, PGE2, IL-6, IL-11) peut être évaluée par la quantification des ARN messagers (ARNm) correspondants par RT-PCR quantitative (Lekanne Deprez et al., 2002). La détection et la quantification des protéines restent nécessaires mais cette quantification des ARNm est une bonne estimation de l'activité synthétique des cellules.

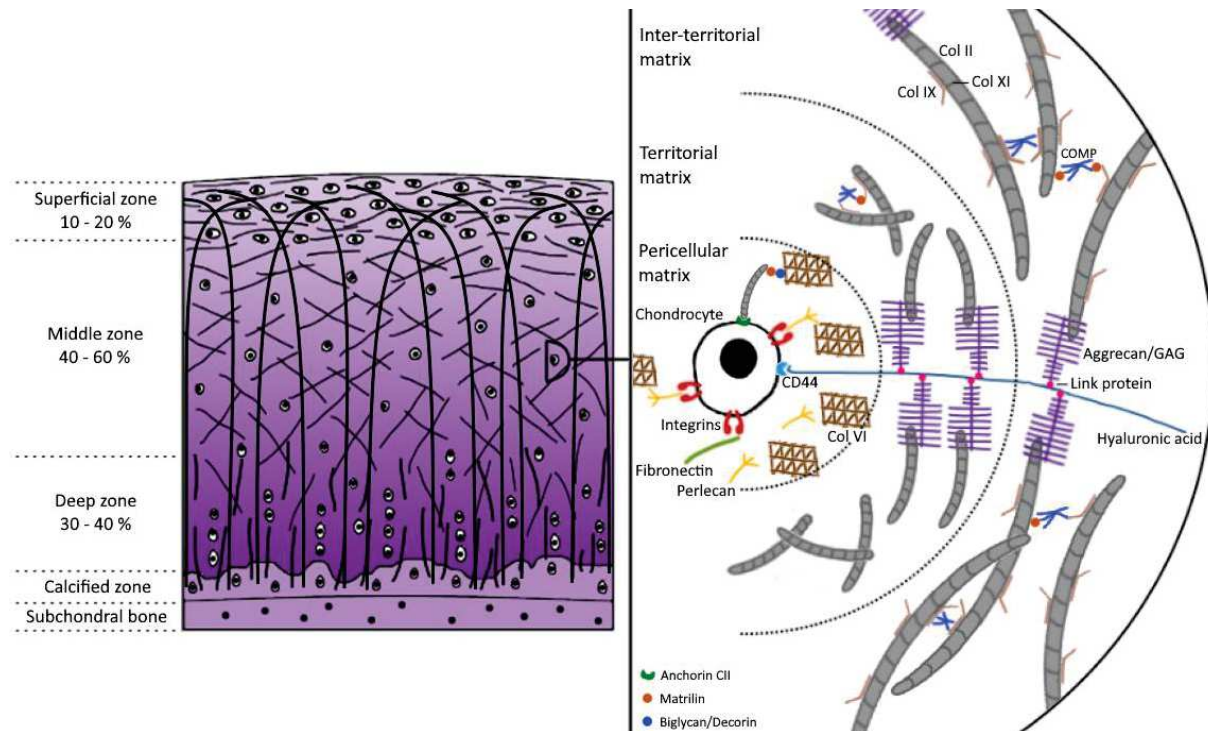


Figure 1 – Composition et structure du cartilage articulaire décrites selon trois zones et trois régions. Gauche : différentes zones constituent le cartilage articulaire de la surface au contact du liquide synovial à la zone la plus profonde en interaction avec l'os sous-chondral. Dans les trois zones, la concentration en protéoglycanes (PG) augmente avec la profondeur (dégradé de violet). Les fibres primaires de collagène de type II (COL II) ont une structure en arches gothiques, tandis que les fibres secondaires de COL II, plus fines, sont parallèles à la surface articulaire dans la zone superficielle et orientées de façon plus aléatoire dans les autres zones. Les chondrocytes sont plus nombreux dans la zone superficielle et organisés en colonnes dans la zone profonde. Droite : Dans les trois régions radiales, les chondrocytes sont liés à la matrice extracellulaire par de nombreuses molécules membranaires et de la matrice péricellulaire (intégrines, CD44, matriline, biglycane, perlécane, COL VI). Dans la matrice territoriale, la taille et le nombre de connexions des fibres de COL II aux protéines PG, COL XI, COL IX, COMP et matrilines augmentent jusqu'à la zone interterritoriale. Les PG sont liés aux chondrocytes et aux fibres de COL II par des protéines de liaison (CD44, Link) et des molécules d'acide hyaluronique.

Les chondrocytes ont un métabolisme majoritairement anaérobie, du fait du faible taux en oxygène qui se trouve dans le cartilage (2-6 %). Chaque cellule développe son propre environnement matriciel, l'espace péri-cellulaire, avec lequel elle interagit. Des protéines membranaires et des protéines de liaison telles que les intégrines, CD44, la fibronectine, le perlécane ainsi que les complexes biglycane/matriline-1 et biglycane/matriline-3 permettent ces interactions (Figure 1). Du fait de leur faible densité, les chondrocytes n'ont pas de contact direct entre eux mais des échanges par voie paracrine et endocrine peuvent avoir lieu. Les chondrocytes possèdent un faible potentiel de réplication, étant donné leur degré de différenciation, et leur conservation dépend du maintien d'un environnement optimal d'un point de vue biochimique et biomécanique.

#### V.2.1.b. La matrice extracellulaire

La MEC du cartilage représente 97% de son poids avec 70 à 80% d'eau (dont 30% d'eau liée), 15% de collagène et 9% d'agrecane (Aigner and Stöve, 2003). Les composants de la MEC sont observables en utilisant des méthodes d'immunohistochimie (Antons et al., 2018; Mainil-Varlet et al., 2010). Ces méthodes qui permettent d'identifier la présence et la répartition des protéines ne peuvent être que semi-quantitatives via des comparaisons entre échantillons. Les protéines peuvent être extraites et analysées par Western Blot ou ELISA. La première méthode est semi-quantitative puisque la quantité de protéines détectées dans un échantillon sous la forme d'une bande d'intensité variable est comparée à celle d'un autre échantillon (Mahmood and Yang, 2012). La technique ELISA permet, en utilisant une gamme, de quantifier de manière absolue les protéines (Clark et al., 1986).

##### i. Les collagènes

Trois principaux types de collagène sont observables dans le CA, les collagènes de type II (80%), IX et XI (15%). Les collagènes de type I, III, VI et X sont présents en bien moindres proportions et localisés dans certaines zones ou régions du tissu (Wachsmuth et al., 2006).

Le collagène de type II (COL II) est une molécule fibrillaire constituée de trois chaînes alpha identiques. Les chondrocytes synthétisent les triples hélices de collagène avec deux terminaisons globulaires (N et C). Ces terminaisons sont éliminées dans la MEC par des « procollagène peptidases », après que le tropocollagène ait été libéré dans l'espace extracellulaire (Layman and Ross, 1973). Les extrémités du tropocollagène étant libérées, les triples hélices peuvent s'assembler pour former les fibres striées de COL II (Figure 2). On notera la présence d'un collagène de type IIA ou IIB en fonction de l'épissage du brin d'ARN. Le collagène de type IIB est exprimé par les chondrocytes matures et comporte un exon de moins que le collagène de type IIA exprimé par les CSMS et les pré-chondrocytes (Fabre et al., 2016; McAlinden, 2014). Les chondrocytes sont en lien direct avec les fines fibres de COL II de la MPC par l'intermédiaire de la glycoprotéine membranaire « anchorine CII » (Mollenhauer et al., 1984).

Le collagène de type XI (COL XI) est aussi un collagène de type fibrillaire comportant 3 chaînes alpha différentes. Ces fibres sont un peu plus fines que les fibres de COL II et s'associent avec elles pour former des fibrilles de collagène (Figure 2). Lors de sa sécrétion, seule la terminaison C est éliminée. Le COL XI se trouve au centre des fibrilles de collagène, qu'il initie, et la terminaison N limite leur diamètre, au moins dans la zone péricellulaire. L'élimination de cette terminaison permet ensuite la formation de plus grosses fibrilles par fusion de fibrilles adjacentes (Martel-Pelletier et al., 2008).

Le collagène de type IX (COL IX) comporte trois hélices alpha différentes et un domaine globulaire. Il se trouve à la surface des fibrilles de collagène et de manière antiparallèle. Ainsi, il permet de lier des fibrilles de COL II et XI avec d'autres fibrilles de collagène ou d'autres éléments de la MEC comme des protéoglycanes (Figure 2).

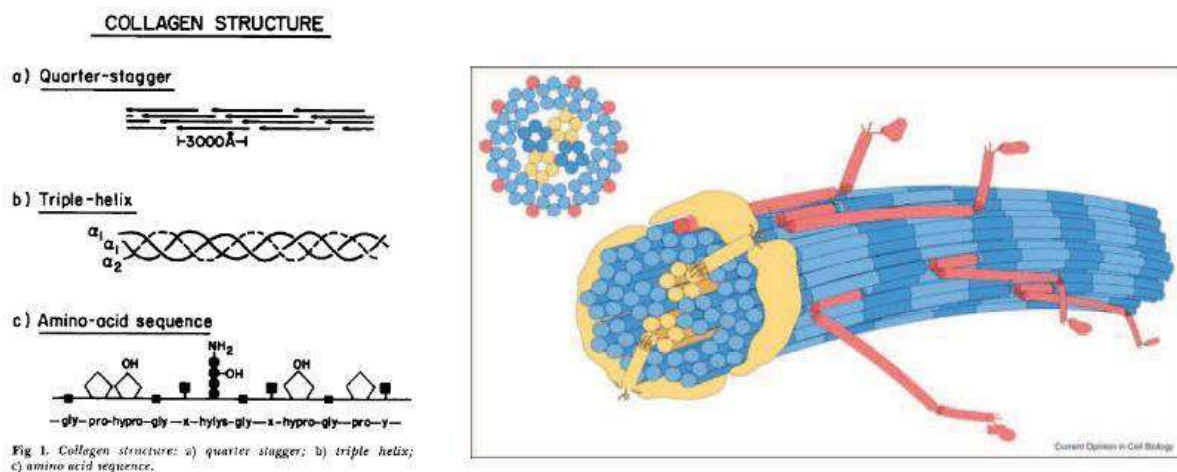


Figure 2 – Composition et structure des collagènes de types II, IX et XI au sein du cartilage articulaire. (Gauche) Les fibres de collagène sont composées de chaînes d'acides aminés (c) qui s'organisent en triples hélices appelées « tropocollagènes » (b). La fibre de collagène est un assemblage de tropocollagènes en quinconce (a) - d'après Lane and Weiss, 1975. (Droite) Les fibrilles de collagène II du cartilage articulaire sont un assemblage de fibres de collagène de type II (bleu), dimensionné entre autres par la présence de collagène de type XI (jaune) et lié aux autres molécules de la matrice extracellulaire par le biais du collagène de type IX en surface (rouge) – d'après Kadler, 2004.

Le collagène de type VI (COL VI), qui ne représente qu'1% des collagènes présents dans le cartilage, est composé de trois hélices alpha différentes. Il forme des filaments perlés qui se trouvent majoritairement dans la région péricellulaire (voir V.2.2.b) du cartilage mature et organisés selon une direction principale (McLeod et al., 2013; Vornehm et al., 1996). Le COL VI est un intermédiaire entre la MEC et les chondrocytes d'un point de vue mécanique et chimique. Il a un rôle de protection des chondrocytes et un rôle dans l'initiation de la mécanotransduction (Wilusz et al., 2014).

Le collagène de type I (COL I), collagène de type fibrillaire, généralement présent dans les fibrocartilages ou dans les tissus conjonctifs, a été identifié en surface du cartilage articulaire dans une très fine couche appelée périchondre. Il s'agirait d'un résidu de la couche périchondrale de la plaque de croissance fœtale. En effet, la colocalisation de collagène de type I et III ainsi que l'absence de différenciation des cellules en chondrocytes corroborent cette hypothèse (Vornehm et al., 1996).

Les collagènes de type III et V (COL III et COL V), tous deux fibrillaires, ont été mis en évidence dans la MEC en région interterritoriale. Le collagène de type III est généralement associé aux fibres de COL I ou de COL II (Wachsmuth et al., 2006).

Le collagène de type X (COL X) a été observé uniquement dans le cartilage calcifié et le long de la zone de séparation (« tidemark ») entre le cartilage mature et le cartilage calcifié. Il se trouve majoritairement dans la région péricellulaire sous forme de filaments fins mais s'associe aussi aux fibres de collagène de type II, IX et XI lorsqu'il est plus épais (Kirsch and von der Mark, 1990). C'est un marqueur de l'hypertrophie des chondrocytes (Schmid and Linsenmayer, 1990). Il est également majoritairement présent au niveau de la plaque de croissance située entre l'épiphyse et la métaphyse des os longs.

## ii. Les protéoglycanes

Les PG sont composés d'une protéine portant une ou plusieurs chaînes glucidiques appelées glycosaminoglycanes (GAG). L'agrécane est la protéine centrale du protéoglycane principalement présent dans le CA (90%). Elle porte trois domaines globulaires : G1 à l'extrémité N-terminal, G3 à l'extrémité C-terminal et G2 proche de G1. Entre les domaines G2 et G3 se trouve une partie linéaire sur laquelle se rattache plus d'une centaine de GAG, dont une trentaine de sulfates de kératane à partir de G2 puis une centaine de sulfates de chondroïtine (Carney and Muir, 1988). Le nom du PG provient généralement de celui de la protéine centrale. Les agrécanes, souvent reliés à un acide hyaluronique (AH) par l'intermédiaire d'une protéine de liaison (protéine Link) et de la zone globulaire G1, occupent l'espace entre les fibrilles de collagène. Ils permettent, grâce aux groupements carboxyles et sulfates des nombreuses chaînes glucidiques, de lier 30% de l'eau contenue dans le cartilage et de nombreux cations. Ainsi les agrégats d'agrécanes confèrent les propriétés osmotiques au CA. Les chondrocytes sont en lien direct avec ces composants de la MEC par le biais du récepteur membranaire CD44 à l'acide hyaluronique (Figure 1). Le biglycane, la décorine et la fibromoduline sont trois petits PG présents dans la MEC du CA (Figure 1) et ont un rôle dans la fibrillogenèse en interagissant avec les fibres de COL II (Ameye and Young, 2002; Douglas et al., 2006; Roughley, 2006). Le biglycane et la décorine se trouvent généralement proches des chondrocytes et participent à leur ancrage dans la MEC en interagissant directement avec le COL VI, et avec le COL II par l'intermédiaire des matrilines 1 et 3 (Wiberg et al., 2003). Le perlécane est aussi un PG localisé dans l'environnement proche des chondrocytes (Figure 1) (Wilusz et al., 2012a). Associé aux fibres de COL VI, il semble faire partie d'une voie de mécanotransduction (voir V.6.3) liée au facteur de croissance FGF2, retenu dans cet enchevêtrement fibrillaire (Vincent et al., 2007).

### iii. Les autres composants

L'organisation de la MEC du cartilage articulaire est maintenue par la présence de diverses protéines de liaison.

La protéine COMP (« Cartilage Oligomeric Matrix Protein ») est présente dans le tendon, les os et le CA (Figure 1). Elle peut lier les fibres de COL I et COL II entre elles participant ainsi à l'organisation de la MEC (Larsson et al., 1991).

La ténascine C est une protéine antiadhésive sécrétée lors de l'embryogenèse et maintenue dans le CA mature. Cette protéine peut être synthétisée de nouveau lors de blessures où la réorganisation de la MEC par les cellules sera nécessaire. Enfin, en surface du CA, les cellules expriment le gène PG4 à l'origine de la synthèse de la lubriline, une glycoprotéine lubrifiante pour la cavité articulaire.

Les matrilines sont des protéines de liaison au sein du CA. En particulier, les matrilines 1 et 3 sont présentes dans la MPC où elles peuvent être liées aux chondrocytes par l'intermédiaire des intégrines  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 5\beta 1$  (Firner et al., 2017; Makihira et al., 1999; Vincourt et al., 2012). Leurs liaisons directes à la protéine COMP, aux PG, fibres de COL II ou COL IX et, indirectes aux fibres de COL VI par l'intermédiaire du biglycane et de la décorine, permettent de créer de nombreuses connexions entre les éléments de la MEC (Firner et al., 2017; Klatt et al., 2011; Wiberg et al., 2003). La matriline 3 crée aussi des liens entre les composants de la MEC dans les régions territoriales et interterritoriales (Firner et al., 2017). Ce lien entre les chondrocytes et la MEC par les matrilines explique en partie leur rôle dans la mécanotransduction (Chen et al., 2016; Kanbe et al., 2007).

## *V.2.2. L'organisation du tissu*

Si la composition du CA paraît relativement simple, ce sont la répartition de ses composants ainsi que leur organisation qui créent la complexité de ce tissu. L'organisation du cartilage peut être décrite de deux manières, en fonction de la profondeur dans le cartilage, d'une part, et de la distance aux cellules, d'autre part (Figure 1).

### V.2.2.a. Les zones

Le CA, dont l'épaisseur est de l'ordre de quelques millimètres (Bingham et al., 2008; Henak et al., 2016), peut être divisé en 4 zones selon la profondeur : superficielle, intermédiaire, profonde et calcifiée (Figure 1, Tableau 2). Le collagène de type II est présent dans chaque zone. Il est l'échafaudage principal de la MEC autour duquel les autres protéines s'organisent (Wachsmuth et al., 2006).

| Zone                                     | Epaisseur | Fibres de collagène   | Chondrocytes   | Fonctions  |
|--|-----------|---|--|--|
| Superficielle ou <i>Lamina splendens</i> | 10-20%    | COL II :<br>parallèles à la surface, les plus fines ( $\varnothing \approx 20$ nm).       | Nombreux<br>Forme plate<br>$V \approx 800 \mu\text{m}^3$   | Résistance aux cisaillements<br>Protection des couches inférieures<br>Passage limité des grosses molécules entre le fluide synoviale et le cartilage |
| Intermédiaire                            | 40-60%    | COL II :<br>obliques, plus épaisses   | Peu nombreux<br>Sphériques<br>$V \approx 1500 \mu\text{m}^3$   | Première résistance à la compression<br>Transition entre la résistance aux forces de cisaillement et compression                                     |
| Profonde                                 | 30-40%    | COL II :<br>perpendiculaires à la surface, les plus épaisses ( $\varnothing = 70-120$ nm) | Nombreux<br>Sphériques<br>Colonnes parallèles aux fibres de Col II<br>$V \approx 1500 \mu\text{m}^3$ | Résistance aux forces de compression   |
| Cartilage calcifié                       |           | COL X et pas/peu II :<br>perpendiculaires à la surface                                    | Presque inexistants  | Adhésion du cartilage à l'os   |

Tableau 2 – Organisation du cartilage articulaire selon 4 zones : superficielle, intermédiaire, profonde et calcifiée.  $\varnothing$  : diamètre, V : volume – d'après Guilak et al., 1995; Sophia Fox et al., 2009 et Wachsmuth et al., 2006.

Dans la zone superficielle, les chondrocytes sont allongés et parallèles à la surface articulaire (Figure 1). Les fibres de COL II sont fines (20 nm de diamètre), parallèles à la surface articulaire et sont orientées principalement dans la direction de rotation de l'articulation (« split line »). Dans la zone intermédiaire, les chondrocytes sont ronds, plus volumineux, et en plus faible concentration. Les fibres de COL II sont plus épaisses, orientées de manière aléatoire mais obliques par rapport à la surface articulaire. Dans la zone profonde, les chondrocytes sont organisés en colonnes et alignés de manière perpendiculaire à la surface de l'articulation. Les fibres de COL II sont plus épaisses (70 à 120 nm de diamètre) mais moins nombreuses, et orientées perpendiculairement à la surface articulaire. Deux groupes de fibres de COL II peuvent être considérés. Une structure en arche gothique, pour les fibres primaires, qui parcourt le tissu en profondeur a été postulée (Benninghoff, 1925) puis observée en histologie et microscopie électronique (Zambrano et al., 1982). Les fibres secondaires, plus fines, sont orientées parallèlement à la surface articulaire dans la zone superficielle et de manière aléatoire dans les zones intermédiaire et profonde (Hunziker et al., 1997). Toutes les zones contiennent des PG mais leur concentration augmente avec la profondeur (Laasanen et al., 2003). En revanche, les protéines et PG de liaison précédemment présentés sont majoritairement présents dans la zone superficielle et la partie supérieure de la zone intermédiaire (Firner et al., 2017). Une quatrième zone de cartilage calcifié contient du COL X et très peu de cellules. C'est une zone d'ancrage du CA dans l'os sous-chondral par le biais des fibres de COL II.

### V.2.2.b. Les régions

Le cartilage peut être décomposé en 3 régions de plus en plus distantes de la cellule : péricellulaire, territoriale et interterritoriale (Figure 1).

La région péricellulaire correspond à l'environnement proche des chondrocytes. Ensemble, ils forment le chondron. Cette région, d'une épaisseur de 2 à 5  $\mu\text{m}$  (Youn et al., 2006), est riche en protéines issues de la synthèse des chondrocytes, et constitue le lieu d'initiation des mécanismes de transduction. Le COL VI semble créer une interface entre la MEC rigide (fibrilles de collagènes) et les cellules par des interactions avec les intégrines mais ce rôle et ces interactions ne sont pas clairement établis (Aigner and Stöve, 2003).

La région territoriale comporte un réseau de fines fibrilles de collagènes et de PG qui protègent les cellules des chargements et contribuent à la souplesse du cartilage.

La région interterritoriale, la plus large, comporte les plus grosses fibrilles de collagènes autour desquelles sont enchevêtrés les PG et autres protéines de liaison.

Au travers d'une richesse protéique et d'une grande organisation, la MEC cartilagineuse représente un environnement complexe, capable de réguler le phénotype des chondrocytes et de fournir un support mécanique indispensable à l'articulation à l'échelle tissulaire.

### **V.3. La conception de néo-tissus cartilagineux**

Le CA est un tissu robuste au regard des nombreuses contraintes auxquelles il est soumis au cours de la vie d'un individu. Cependant, l'accumulation de contraintes trop intenses ou le vieillissement lié à l'âge peuvent être à l'origine de lésions plus ou moins étendues au sein du tissu. Le CA, n'étant pas vascularisé et ayant peu de cellules progénitrices, est connu pour avoir de faibles capacités de régénération. Généralement, le tissu lésé est partiellement comblé par un tissu fibrocartilagineux dont les propriétés biochimiques et biomécaniques sont insuffisantes pour un cartilage de type articulaire (Caplan et al., 1997; Li et al., 2014; Whu et al., 2013). Actuellement, des traitements symptomatiques, tels que l'injection d'acide hyaluronique pour lubrifier l'articulation et favoriser le mouvement (Navarro-Sarabia et al., 2011), ou des anti-inflammatoires pour limiter l'inflammation et une dégradation accrue, permettent de réduire les douleurs et maintenir la mobilité de l'articulation mais ne permettent pas la réparation du tissu. Seules des techniques chirurgicales (microfracture, implantation de chondrocytes autologues, mosaïcoplastie) permettent à ce jour sa réparation. Pour autant, ces techniques sont insatisfaisantes du fait de nouvelles atteintes du tissu quelques années après la chirurgie. De nouvelles stratégies de réparation, usant de l'ingénierie tissulaire, sont évaluées au regard des chirurgies existantes. Ainsi, plusieurs substituts cartilagineux comportant (1) un support matriciel sans cellules, (2) un support matriciel avec des chondrocytes, (3) un support matriciel avec des cellules souches ou encore (4) des cellules sans support matriciel sont étudiés.

### V.3.1. Les techniques chirurgicales de réparation du cartilage articulaire

Les techniques chirurgicales actuellement proposées ont pour objectif la réparation du CA en amplifiant les mécanismes de réparation naturel, en apportant des chondrocytes afin d'augmenter le nombre de cellules dans le tissu et favoriser sa réparation, ou en comblant la lésion avec des greffons qui possèdent la composition et la structure du CA (Figure 3).

Les études portant sur le développement embryonnaire et le cartilage adulte (voir V.4) ont mis en évidence la présence de cellules souches progénitrices à la surface du CA ou dans les membranes synoviales (Alsalameh et al., 2004). Un recrutement et une prolifération de ces cellules peuvent avoir lieu lors de lésions du CA, aidant sa réparation. D'autre part, lors de lésions profondes qui atteignent l'os sous-chondral, la migration de cellules souches de la moelle osseuse (CSM-MO) vers la lésion a été observée (Zhang et al., 2020). Ces cellules ont la capacité de se différencier en chondrocytes (Delaine-Smith and Reilly, 2011). La microfracture (Figure 3A) est une technique de chirurgie visant à reproduire et amplifier ce phénomène pour stimuler la réparation du tissu. Elle est indiquée dans le cas de lésions profondes et peu étendues (inférieure à 2 cm) (D. Du et al., 2020). Une pointe est introduite au niveau de la lésion pour fracturer l'os sous-chondral et favoriser la migration des CSMs. Cependant, des défauts persistent au niveau du CA et de l'os sous-chondral (Zhang et al., 2018). Le nouveau tissu est souvent un cartilage de type fibreux, dont les propriétés mécaniques sont inférieures au cartilage hyalin (Kreuz et al., 2006; Wakitani et al., 1994).

L'implantation de chondrocytes autologues (ACI) consiste à injecter dans la lésion des chondrocytes matures, prêts à synthétiser une nouvelle MEC. Pour ce faire, un prélèvement de cartilage dans une zone non porteuse de l'articulation est réalisé afin d'isoler les chondrocytes. Ils sont ensuite amplifiés *in vitro* puis injectés dans la lésion. Cette chirurgie est indiquée dans le cas d'une lésion profonde, étendue (supérieure à 3 cm<sup>2</sup>) avec une arthrose limitée (D. Du et al., 2020). La réparation du CA suite à cette chirurgie a été suivie pour 72 patients âgés de 37 ans en moyenne jusqu'à dix ans (Moseley et al., 2010). Le score de Cincinnati a été amélioré pour 69% des patients et n'a pas évolué pour 12,5% des patients. 17% des chirurgies ont été mises en échec et ont nécessité une nouvelle opération après 2,5 ans environ. Afin de s'assurer du maintien des cellules dans la zone lésée, la 2<sup>ème</sup> génération d'ACI (Figure 3B, p-ACI, c-ACI) consiste à suturer du périoste, membrane conjonctive et fibreuse qui enveloppe les os, ou une membrane de collagène en surface pour délimiter la zone d'injection des chondrocytes. Un an après la chirurgie, la qualité du néo-tissu est variable selon les patients. Certains néo-tissus sont proches du cartilage hyalin alors que d'autres sont plus proches du cartilage fibreux et leur rigidité est inférieure à celle CA natif (Vasara et al., 2005). Une étude comparative des première et seconde génération d'ACI a été menée sur 10 ans avec des patients âgés de 31,7 ans en moyenne (Niemeyer et al., 2014). La seconde génération d'ACI permet d'obtenir de meilleurs résultats selon les scores Lysholm et IKDC mais 17,4% des patients des deux groupes ont subi une deuxième opération.

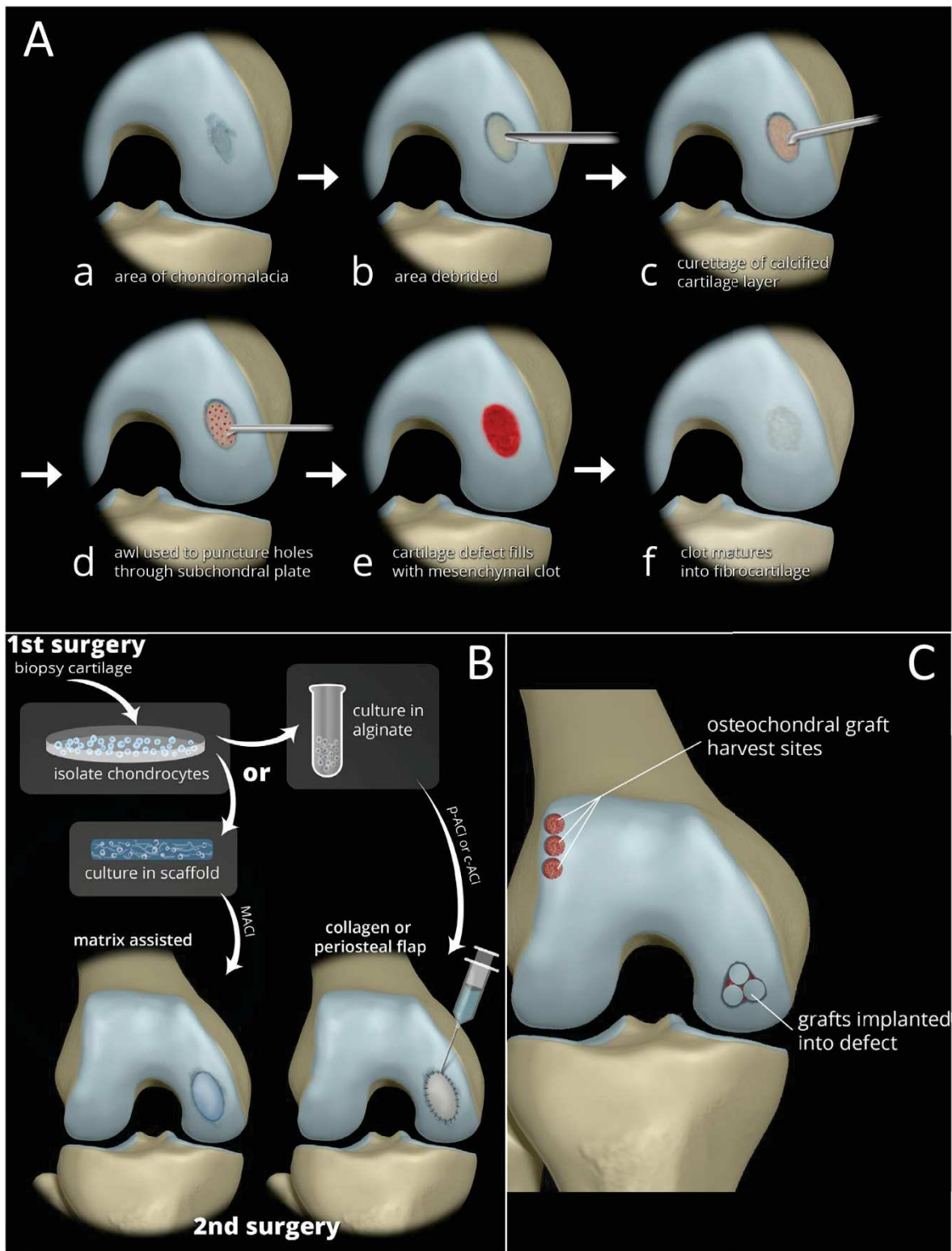


Figure 3 – Les chirurgies actuellement proposées afin de réparer des lésions du cartilage articulaire. (A) La microfraction permet l'invasion de la lésion par les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse et la formation d'un nouveau tissu souvent fibreux. (B) La seconde et troisième génération d'implantation de chondrocytes autologues (ACI et MACI, respectivement) nécessitent le prélèvement d'une biopsie, l'amplification des chondrocytes en culture et leur injection recouverte de périoste (p-ACI) ou d'une membrane de collagène (c-ACI), ou leur implantation accompagnée d'un support matriciel (scaffold, MACI). (C) La mosaïcoplastie consiste lors d'une seule chirurgie au prélèvement de greffons ostéocondraux ensuite implantés dans la lésion – modifié d'après Liu et al., 2019.

La mosaïcoplastie (ou greffe ostéochondrale) (Figure 3C) est une chirurgie permettant d'obtenir un CA de meilleure qualité pour des lésions profondes et localisées (inférieures à 3 cm<sup>2</sup>). Lors d'une greffe autologue, un greffon de CA est prélevé dans des zones non portantes de l'articulation ou d'une autre articulation sous forme de disques puis immédiatement implanté dans la lésion. La lésion est réparée avec un tissu mature qui possède la composition, la structure et les propriétés mécaniques adéquates. Cependant, cette chirurgie présente deux limitations majeures (Bentley et al., 2012; Demange and Gomoll, 2012; Gross et al., 2008). Le développement d'un fibrocartilage ou des problèmes de morbidité peuvent être observés dans la zone de prélèvement. La raison principale des échecs de cette technique est une mauvaise intégration des greffons du fait de fractures au niveau de l'os sous-chondral, une mauvaise jonction avec le tissu sain, ou une détérioration de leur contour. D'autre part, cette chirurgie, qui donne de bons résultats pour le genou, est plus difficile à réaliser au niveau de la hanche où la tête du fémur est très arrondie ; il faut alors procéder à l'implantation de chondrocytes (D. Du et al., 2020).

### *V.3.2. Les substituts sans cellules : recrutement de cellules in vivo*

Une cause pouvant être à l'origine de l'échec de la réparation du CA par microfracture est l'absence d'un support matriciel pour les cellules. Une stratégie de réparation consiste à déposer un support matriciel dans la lésion lors d'une seule chirurgie accompagnée ou non d'une microfracture (Erggelet et al., 2009). Ce sont des hydrogels (solutions aqueuses de polymères gélifiées), ou des « scaffolds » (échafaudages de biomatériaux solides créés par lyophilisation ou congélation d'un hydrogel (Chen et al., 2015; Ouwerx et al., 1998; Vikingsson et al., 2015), électrofilage (Doostmohammadi et al., 2020) ou fabrication additive (Miramini et al., 2020)) (Figure 4). L'apport d'une structure en 3D au sein de la lésion favorise la migration et la différenciation des cellules progénitrices du CA ou des CSMs et la sécrétion de leur propre MEC (Zhang et al., 2020). De plus, ces supports matriciels peuvent être fonctionnalisés par l'ajout de chimiokines, comme IL8 et IGF1 pour favoriser la migration des cellules voisines vers la lésion (Boushell et al., 2019; Park et al., 2015) ou de facteurs de croissance, comme FGF2 ou TGFβ1, pour favoriser la prolifération et la différenciation des cellules (Bertolo et al., 2015; Maehara et al., 2010). Des scaffolds à plusieurs couches, destinées au développement du CA et au développement de l'os sous-chondral pour améliorer l'intégration du néo-tissu, ont également été conçus (Kon et al., 2012). Alors qu'un certain nombre d'études pré-cliniques et cliniques ont été faites, peu de produits ont toutefois été commercialisés (Kon et al., 2012). Les résultats ont montré l'intérêt de ces substituts (Sofu et al., 2017) mais des variations inter-individuelles persistent. Une étude sur 24 mois a montré que le développement du néo-tissu était insuffisant pour la reprise d'une activité physique intense et qu'il était plus limité chez les personnes âgées (Di Martino et al., 2015). L'apport d'un hydrogel de chitosan en plus d'une microfracture a été évalué sur 5 ans avec de jeunes patients (34,3 et 40,1 ans en moyenne)(Shive et al., 2015). Un meilleur comblement ainsi qu'une meilleure architecture du tissu ont été observés en présence de l'hydrogel via une analyse par IRM par comparaison au tissu obtenu après une microfracture seule. Cependant, l'évaluation clinique 5 ans

après la chirurgie a montré une amélioration similaire de la réparation du CA par les deux techniques. Lors de la microfracture ou de l'implantation de supports matriciels sans cellule, l'apport du néo-tissu en cellules n'est pas contrôlé et peut-être insuffisant. La lésion peut alors n'être comblée que partiellement. Une manière de contrôler l'apport en cellules est d'implanter un support matriciel contenant déjà des cellules.

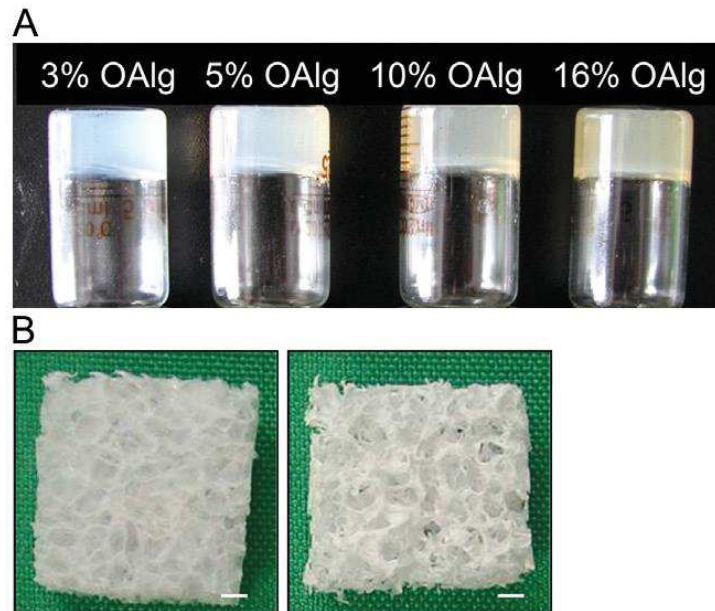


Figure 4 – Exemples d'hydrogels et de scaffolds utilisés pour constituer des néo-tissus cartilagineux. (A) Hydrogels de chitosan (2,5%) et d'alginate oxydée (3, 5, 10 et 16%) - d'après Xing et al., 2019. (B) Scaffold de poly-L-lactide (PLLA) avec 90% de porosité et une taille de pores de 0,3 mm (gauche) ou 0,6 mm (droite). Bar : 1 mm – d'après Tanaka et al., 2010.

### *V.3.3. Les substituts avec des chondrocytes ou chondrons : maintien du phénotype chondrocytaire*

Les première et seconde générations d'ACI n'étant pas toujours satisfaisantes, une troisième génération d'ACI a été élaborée et consiste à implanter des chondrocytes associés à un support matriciel (Figure 3B, MACI). L'utilisation de ce support permet de maintenir les cellules dans le néo-tissu et l'ajout de chondrocytes à la matrice exogène améliore la réparation du tissu par comparaison à une matrice exogène seule (Franceschi et al., 2005). La forme de ces substituts peut être ajustée et les supports matriciels sont conçus pour favoriser le maintien du phénotype chondrocytaire et la sécrétion d'une nouvelle MEC. Les hydrogels ou scaffolds utilisés sont composés de matériaux naturels, synthétiques ou mixtes (Figure 5). Les matériaux naturels comprennent les collagènes, l'acide hyaluronique, le chitosan ou encore la soie mais cette liste n'est pas exhaustive (Hu and Nukavarapu, 2019). Des substituts contenant de la MEC décellularisée ont été conçus à partir de prélèvements de

CA chez l'animal ou chez l'homme. L'atout de ce type de matrice est le très bon développement des cellules dans un environnement comportant des éléments de structure et des facteurs de croissance présents *in vivo* (Luo et al., 2016; Sutherland et al., 2015). Cependant, la composition de la matrice est variable et non parfaitement connue. De plus, un équilibre est à trouver entre la décellularisation et la conservation des composants de la MEC. Une multitude de matériaux synthétiques a été développée afin d'améliorer les propriétés mécaniques des substituts. Ce sont des polymères plus ou moins organisés dans des hydrogels ou scaffolds. Ces matrices exogènes ont une composition et une organisation maîtrisées et leur biocompatibilité est vérifiée. Cependant, l'adhésion des cellules et la production de MEC est souvent plus difficile. C'est pourquoi des substituts hybrides concilient des matériaux naturels et synthétiques (Chen et al., 2004; Mallick et al., 2018; Tanaka et al., 2010). D'autres supports matriciels intègrent des facteurs de croissance qui sont délivrés dans le temps pour favoriser le maintien du phénotype chondrocytaire (Almeida et al., 2014; Morille et al., 2015). Des substituts plus complexes sont conçus avec des gradients de composition ou de structure (Ren et al., 2016; Woodfield et al., 2005), ou des couches de différentes compositions (Kon et al., 2014) afin de mimer l'environnement des chondrocytes et favoriser l'obtention d'un cartilage de type articulaire.

Malgré le nombre de substituts développés, peu de scaffolds et hydrogels ont atteint les stades cliniques et la commercialisation (D. Du et al., 2020; Huang et al., 2016; Kon et al., 2014). Les quelques études cliniques montrent des résultats inégaux selon les patients et très peu présentent un cartilage dont l'organisation correspond à celle du CA, 2 ans après la chirurgie (Armiento et al., 2019; Selmi et al., 2008). D'autre part, l'utilisation de chondrocytes est remise en cause. En effet, l'utilisation de chondrocytes autologues nécessite deux chirurgies (prélèvement et implantation) et déstabilise la zone de prélèvement où l'apparition d'arthrose à long terme est favorisée. La disponibilité de chondrocytes allogéniques est plus grande mais le substitut peut être rejeté par une réaction immunitaire. Enfin, la culture en monocouche des chondrocytes, afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules, conduit à leur dédifférenciation partielle (Darling and Athanasiou, 2005; Stewart et al., 2000). Ainsi, le risque, à long terme, d'une seconde chirurgie voire du remplacement total de l'articulation par une prothèse reste élevé.

#### *V.3.4. Les substituts avec des cellules souches : différenciation chondrocytaire*

Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (CSM-MO) ou du tissu adipeux (CSM-TA) sont plus facilement accessibles que les chondrocytes et disponibles en plus grand nombre. Ces cellules adultes, très plastiques, peuvent être amplifiées jusqu'à 500 fois puis différenciées en cellules osseuses, adipeuses ou cartilagineuses (Magne et al., 2005; Maumus et al., 2011). Les CSMs sont utilisées dans le cadre de thérapies cellulaires où elles permettent de protéger le CA en limitant l'inflammation du tissu et sa dégradation (Hurne et al., 2012; Maumus et al., 2011; Yamasaki et al., 2014). En revanche, c'est dans le cadre de l'ingénierie tissulaire que la différenciation des cellules est induite, après implantation du tissu lorsque les cellules sont simplementensemencées sur un support matriciel ou avant implantation si la période de culture *in vitro* est prolongée, afin d'améliorer la

réparation du CA. De nombreuses études proposent l'utilisation de CSMs avec divers supports matriciels (Figure 5). L'environnement en trois dimensions apporté par ce support favorise l'initiation de la chondrogenèse des CSMs mais l'ajout de facteurs de croissance tels que TGF $\beta$  (exogènes ou endogènes) permet leur différenciation (Jakobsen et al., 2010).

De manière générale, les études comparant les néo-tissus générés à partir de CSMs ou de chondrocytes montrent que l'expression des marqueurs chondrocytaires et la sécrétion de MEC par les CSMs différenciées sont plus faibles, conduisant à des propriétés mécaniques inférieures (Huang et al., 2010b; Mauck et al., 2006; Vinardell et al., 2009). Néanmoins, le potentiel chondrogénique des CSMs a été confirmé par l'expression de marqueurs chondrocytaires comme les gènes *COL IIB*, *l'AGG* et *l'intégrine  $\alpha 10$* , qui peut varier selon le type de CSMs et l'environnement de culture (Fabre et al., 2019). En particulier, le potentiel chondrogénique des CSM-MO est supérieur à d'autres CSMs, notamment les CSM-TA (Fabre et al., 2019; Jakobsen et al., 2010; Li et al., 2015; Xu et al., 2017). Cependant, la production des composants caractéristiques de la MEC du CA s'accompagne de la production de composants tels que COL I et COL X, caractéristiques du fibrocartilage ou du cartilage hypertrophique, contrairement aux néo-tissus comportant des chondrocytes qui n'expriment pas ou faiblement ces marqueurs (Benders et al., 2014; Jakobsen et al., 2010). Cela signifie que la différenciation des CSMs *in vitro* et *in vivo* après implantation est imparfaite et ne reproduit pas totalement les événements moléculaires conduisant à la production d'un tissu mature ayant un phénotype stable dans le temps (Farrell et al., 2014). Enfin, contrairement aux chondrocytes, la sécrétion de MEC par les CSMs est plus tardive du fait de la cinétique de différenciation (Benders et al., 2014) qui, de plus, est variable d'un système de culture à un autre (Murdoch et al., 2007).

L'utilisation des CSMs pour la réparation du CA est plus récente que l'utilisation des chondrocytes et très peu d'essais cliniques ont été menés (Zumwalt and Reddy, 2020). D'une part, bien que la différenciation des CSMs en chondrocytes se produise *in vivo*, elle peut être inégale au sein du néo-tissu et dépend du donneur (Kim et al., 2018). D'autre part, de nombreux supports matriciels ont été développés avec divers matériaux et structures. Cependant, la maîtrise de leurs propriétés biochimiques et biomécaniques au cours du temps est difficile. Or, la composition (Nguyen et al., 2011) et les propriétés mécaniques (Olivares-Navarrete et al., 2017; Steward and Kelly, 2015) de l'environnement matriciel des CSMs influencent leur différenciation. De plus, le module d'élasticité du support matriciel est un des paramètres importants à ajuster. Il doit être proche de celui du CA pour que l'implant puisse rapidement supporter un chargement dans l'articulation. En revanche, localement, la rigidité du scaffold ne doit pas être trop élevée sous peine d'influencer la différenciation des CSMs vers le phénotype osseux et non cartilagineux (Olivares-Navarrete et al., 2017). En parallèle, les cellules remodelent le support matriciel en dégradant ses composants et sécrétant leur propre MEC (Gullotta et al., 2018; Rowland et al., 2016). Ainsi, le devenir du néo-tissu *in vivo* est difficile à prédire et doit faire l'objet de nombreuses investigations au court du temps.

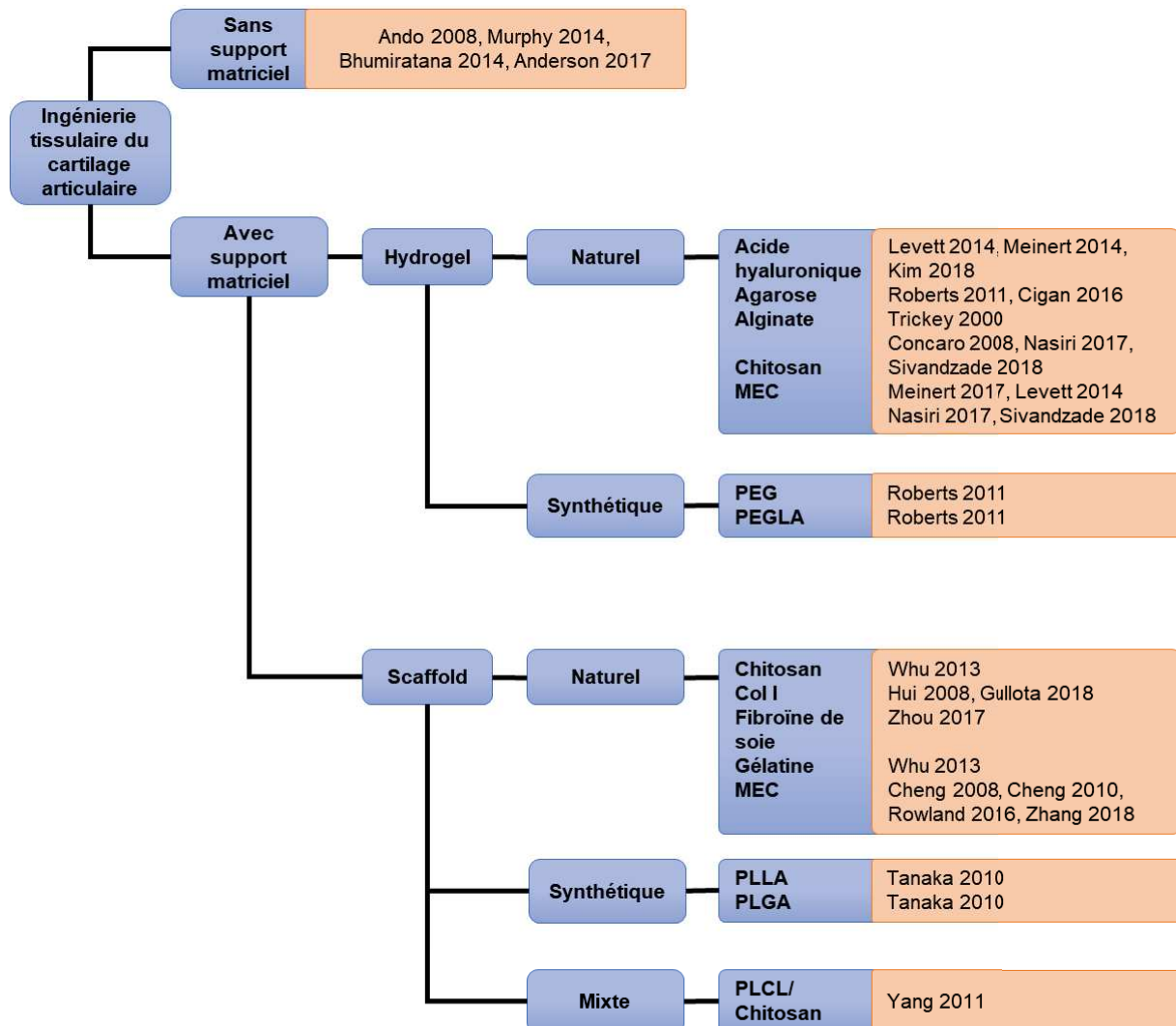


Figure 5 – Liste non exhaustive de matériaux utilisés pour la conception de néo-tissus pour l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. Les néo-tissus contenant des chondrocytes ou des cellules souches mésenchymateuses humains ont été conçus avec ou sans support matriciel. Des exemples de supports matriciels qui sont organisés sous forme d'hydrogels ou de scaffolds avec des matériaux d'origine naturels, synthétiques ou mixtes sont présentés.

### V.3.5. Le micropellet : un modèle de croissance embryonnaire

Alors que le développement des supports matriciels est en pleine expansion depuis plus de 20 ans, l'intérêt suscité par des substituts cartilagineux sans biomatériaux exogènes est plus récent (DuRaine et al., 2015). Il s'agit d'une approche de l'ingénierie tissulaire où un amas de cellules est formé par auto-assemblage ou auto-organisation. Diverses méthodes de culture sous forme de disques (Anderson et al., 2017; Murphy et al., 2015), de superpositions de couches de cellules (Maeda et al., 2011; Sato et al., 2014; Tani et al., 2010) ou de sphéroïdes appelés « micropellets » (Johnstone et al., 1998), où les cellules créent leur propre MEC, ont été développées pour des applications cliniques. La culture sous forme de micropellet est plus ancienne (Johnstone et al., 1998) et déjà impliquée dans une étude clinique en phase 3 en utilisant des chondrocytes ("Efficacy and Safety Study of co.Don Chondrosphere to Treat Cartilage Defects"; ClinicalTrials.gov," n.d.). Elle est aussi utilisée pour évaluer la différenciation ou le maintien du phénotype chondrocytaire (Hui et al., 2008; Kim et al., 2018; Vinardell et al., 2009) et constitue un modèle biologique d'étude de la croissance du CA (Barry et al., 2001; Johnstone et al., 1998).

Le micropellet est un néo-tissu issu de l'agrégation de cellules par centrifugation. Le culot de cellules obtenu se condense et forme une microsphère. Des micropellets de chondrons, chondrocytes ou cellules souches ont été étudiés. Cet environnement en 3D favorise la différenciation des CSMs et l'expression des gènes chondrocytaires, tels que *COL II* et *AGG*. L'expression de ces marqueurs est aussi maintenue dans les micropellets de chondrocytes pendant au moins 7 et 14 jours de culture (Zhang et al., 2004). L'expression des gènes chondrocytaires pour des CSMs en micropellets est multipliée par 4 en présence d'un facteur chondrogénique par comparaison à une culture en monocouche (Murdoch et al., 2007; Winter et al., 2003). Cependant, la sécrétion de MEC est différente selon les cellules. Il a été observé, qu'après 8 semaines de culture, un micropellet de chondrons était 3 fois plus gros qu'un micropellet de chondrocytes indiquant une meilleure sécrétion de la MEC par les chondrocytes entourés de leur MPC (Larson et al., 2002). Alors que les chondrocytes sont séparés par la MEC *in vivo*, ils sont en contact direct dans le micropellet créant des interactions cellules à cellules différentes des interactions cellules à MEC. La MPC des chondrons permet ces interactions et favorise l'organisation du *COL II*. Contrairement aux chondrocytes, la proximité des CSMs dans le micropellet favorise les échanges directs entre-elles et leur différenciation en milieu chondrogénique. Il a été observé que l'expression du *COL II* était plus rapide lors de la culture de CSMs en micropellets comparé à des CSMs incluses dans des billes d'alginate. En revanche, l'expression de *COL II* et *AGG* est plus faible après 14 jours de culture (Yang et al., 2004). Ainsi, la proximité des cellules favorise leur différenciation mais limite la sécrétion de la MEC. D'autre part, l'expression du *COL X*, signe de l'hypertrophie des chondrocytes, augmente dans les micropellets issus de CSMs (Dusfour et al., 2020), parfois de manière très précoce (Mwale et al., 2006; Pelttari et al., 2006), alors qu'il est très peu synthétisé dans les micropellets issus de chondrocytes (Pelttari et al., 2006). Finalement, une étude a montré une différenciation hétérogène des CSM-MO humaines lors de la culture en micropellet. Après 28 jours de culture (J28), lorsque la différenciation des CSMs était amorcée, une importante variabilité de l'expression des gènes *COL IIB* et *COL X* a été observée ainsi qu'une multiplication de l'expression

par 4 du gène *COL I*, par rapport à des micropellets de chondrocytes du CA (Karlsson et al., 2007). Indépendamment du type de cellule, d'autres facteurs comme l'âge du donneur peuvent influencer le développement des micropellets (Erickson et al., 2011). Du fait de l'accessibilité des CSMs, de la réduction des contraintes par rapport au prélèvement de chondrocytes et de la cohérence du modèle biologique du micropellet avec le développement embryonnaire du CA, l'utilisation des CSMs pour l'étude du développement des néo-tissus est intéressante. Cependant, le contrôle de la différenciation des cellules ainsi que la sécrétion de la MEC doivent être améliorés pour se rapprocher d'un CA natif.

Un des éléments essentiels au développement d'un micropellet de cartilage est le milieu de culture. En effet, les facteurs de croissance ont un rôle prépondérant dans la chondrogenèse des CSMs (Freyria and Mallein-Gerin, 2012). La dexaméthasone associée à un facteur de la famille des TGF $\beta$  est classiquement utilisée depuis que leur combinaison a montré son efficacité sur l'induction de la chondrogenèse de CSMs de lapin en micropellet (Johnstone et al., 1998). Une meilleure différenciation des CSMs humaines en micropellets a été obtenue avec les facteurs TGF $\beta$ 2 et TGF $\beta$ 3 comparés au TGF $\beta$ 1 (Barry et al., 2001), mais deux autres études n'ont pas montré ces différences, et ce, quelle que soit la capacité de différenciation des CSMs (Cals et al., 2012; Mueller et al., 2010). En revanche, l'ajout des facteurs de croissance BMP2, BMP4 et BMP6 à la présence de TGF $\beta$ 3 favorise d'autant plus la production d'AGG et COL II, ce qui se traduit par une augmentation de la taille et du poids des micropellets de CSMs humaines après 21 jours de culture et une modification de leur aspect (Figure 6) (Sekiya et al., 2005). Cependant, les facteurs de croissance des familles TGF $\beta$  et BMP favorisent l'apparition de COL X dans les micropellets ainsi que d'autres marqueurs de l'hypertrophie des chondrocytes (Cals et al., 2012; Sekiya et al., 2005), contrairement à ce qui a été observé *in vivo* où les isoformes de TGF $\beta$  sont connues pour limiter l'hypertrophie quand les facteurs de la famille des BMP l'augmentent (Khan et al., 2007; Rountree et al., 2004). Il semble qu'une manière de réduire la différenciation terminale des CSMs humaines en micropellets et donc leur hypertrophie soit d'apporter les facteurs de croissance de manière séquentielle comme le montre la réduction de l'expression des marqueurs hypertrophiques *Indian Hedgehog* (IHH) et *phosphatase alcaline* (AP) lors d'une séquence singulière d'apport en TGF $\beta$ 1 et BMP7 (Handorf and Li, 2014) et la réduction de l'expression de marqueurs hypertrophiques lors de l'ajout de FGF9 ou FGF18 après 14 jours de culture (Bosetti et al., 2012) tout en conservant, voire améliorant l'expression ou la sécrétion des marqueurs chondrocytaires. De même, l'apport de PTHrP en supplément du TGF $\beta$ 1 favorise la chondrogenèse de CSMs humaines en micropellets et limite leur hypertrophie lors d'une stimulation intermittente alors qu'un apport constant inhibe la chondrogenèse (Fischer et al., 2014). Enfin, l'accès des cellules aux nutriments est aussi important pour le développement des micropellets de cartilage. Une étude a montré qu'avec une augmentation du taux de glucose dans le milieu de culture, les micropellets obtenus étaient plus gros, la concentration en PG était plus importante et plus de cellules au centre du micropellet étaient différenciées (Mackay et al., 1998).

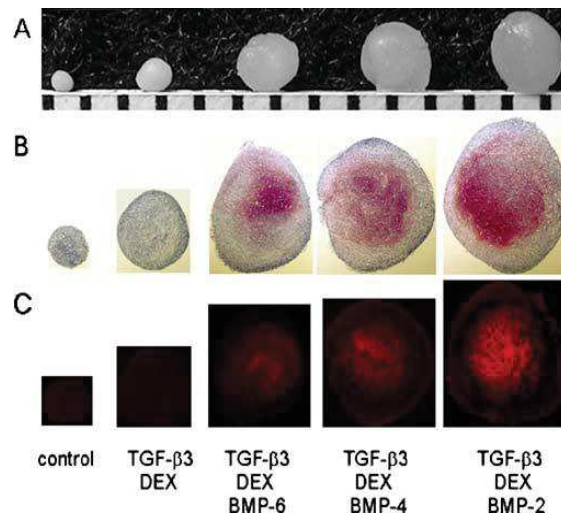


Figure 6 – Observation macroscopique de micropellets de cartilage et localisation des principaux composants de leur matrice extracellulaire. L'utilisation de facteurs de croissance comme TGFβ3, BMP2, BMP4 et BMP6 induit la différenciation des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine en chondrocytes. L'association du TGFβ3 avec les BMP et en particulier avec le BMP2 permet une augmentation de la taille du micropellet (A) qui est liée à une production plus importante de protéoglycanes mise en évidence par un marquage à la Safranine-O (B) et de collagène de type II observé par immunomarquage (C) après 21 jours de culture – d'après Sekiya et al., 2005.

Du fait de la forme du micropellet, il existe un gradient négatif de nutriments vers l'intérieur du micropellet ainsi que des tensions mécaniques à la surface. Ceci pourrait expliquer en partie l'hétérogénéité de la différenciation des CSMs et de la localisation de la MEC (Barry et al., 2001; Handorf and Li, 2014; Larson et al., 2002; Murdoch et al., 2007; Pelttari et al., 2006; Sekiya et al., 2005). La présence de PG et de COL II montre que les cellules du cœur du micropellet sont différenciées (Figure 6B-C). À la périphérie des micropellets, les cellules adoptent le phénotype des chondrocytes du fibrocartilage. Elles sont allongées, plus nombreuses (Figure 7 (3)) et sécrètent plus de COL I et de fibronectine que de COL II et d'AGG (Barry et al., 2001). Il est possible que, du fait des tensions dues à la croissance du micropellet, les cellules suivent une voie de différenciation plus proche des chondrocytes de la zone superficielle du CA ou des cellules du périchondrium.

Enfin, la teneur en dioxygène de l'environnement de culture a un impact sur la différenciation de micropellets de CSM de différentes tailles : 100-200 μm ou 1000-2000 μm. Le CA est pauvre en dioxygène du fait qu'il n'est pas vascularisé et peu d'études prennent en compte ce paramètre. Un milieu hypoxique (2% en O<sub>2</sub>) favorise l'expression des gènes *COL II* et *AGG* ainsi que la sécrétion de GAG après 14 jours de culture en présence de TGFβ1 (Markway et al., 2010). Cependant, l'augmentation est inférieure pour les micropellets de plus gros diamètres. Ceci est dû au fait que le micropellet, par sa taille, crée certainement un gradient de pression partielle en dioxygène qui diminue en se rapprochant du centre du micropellet. D'autre part, l'augmentation concerne aussi des gènes de l'hypertrophie des chondrocytes (*Runx2*, *Ostéocalcine*). Ainsi, la culture en environnement hypoxique favorise l'expression des gènes chondrocytaires mais peut aussi conduire à l'hypertrophie des chondrocytes.

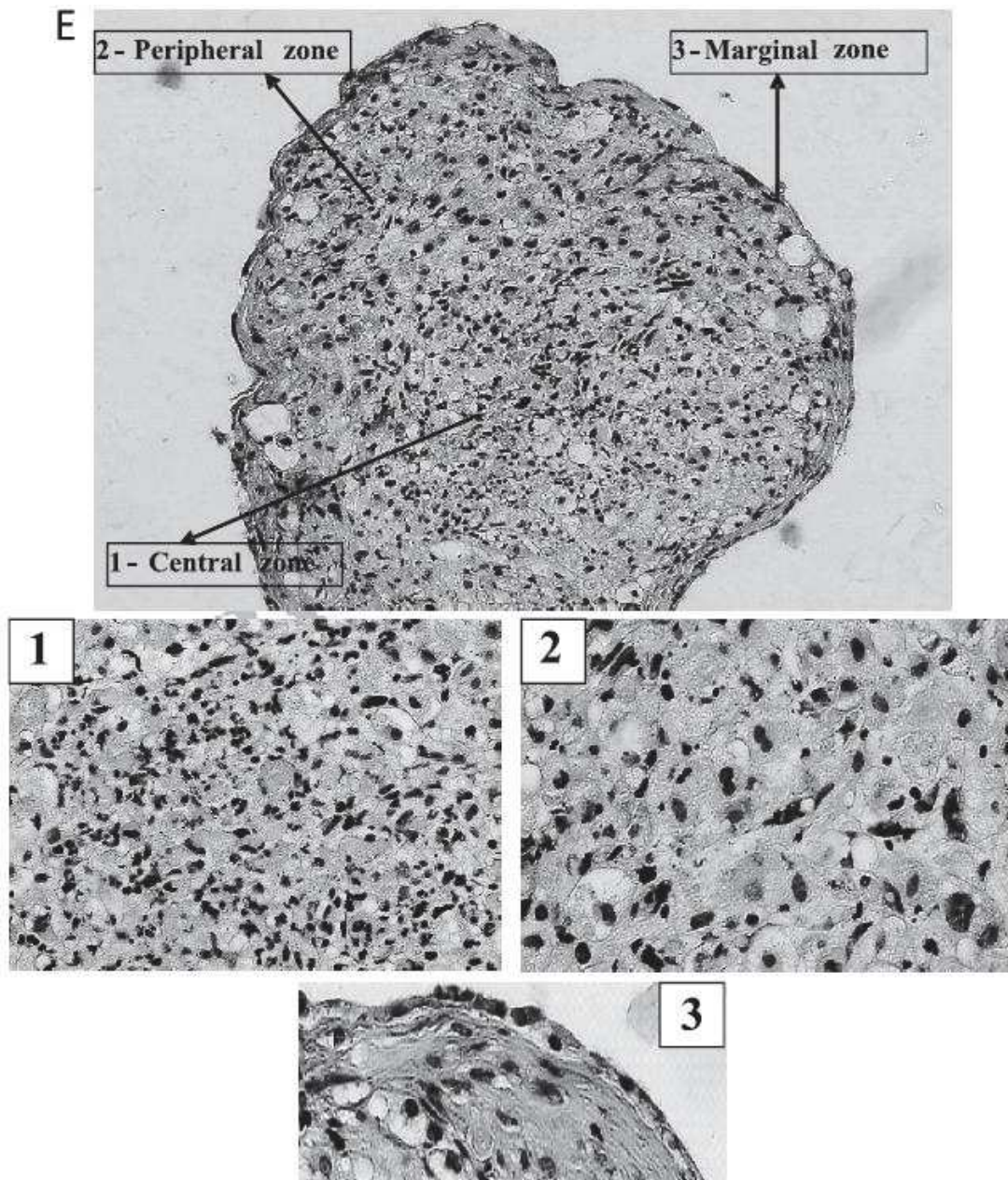


Figure 7 – Microscopie électronique à transmission de micropellets de cartilage issus de CSMs humaines montrant la forme des cellules dans la zone marginale (1), périphérique (2) et profonde (3) du micropellet de cartilage – d’après Eslaminejad et al., 2006.

Cette hétérogénéité du micropellet montre à la fois les avantages et les inconvénients de ce modèle biologique. Dans un premier temps, les CSMs entrent en contact et s'agrègent, récapitulant les étapes précoces du développement embryonnaire, ce qui favorise leur différenciation. Cependant, la compacité du micropellet rend la nutrition des cellules en son centre difficile et peut conduire à une faible sécrétion de MEC et parfois à la mort de certaines cellules. Le gradient de nutriment et les contraintes mécaniques de croissance du micropellet créent alors une distribution différentielle des composants de la MEC entre la périphérie et le centre. Ces gradients ne sont pas incompatibles avec l'organisation du cartilage mature *in vivo* telle que décrite dans le paragraphe V.2.2.a. Cependant, le micropellet reste très cellularisé avec une MEC de plus faible densité que le CA et moins organisée. Ainsi, le module d'élasticité du micropellet de cartilage après 29 jours de culture ( $179,9 \pm 18,8$  kPa) est bien inférieure au CA mature (Dusfour et al., 2020). L'ensemble de ces caractéristiques montre que le micropellet de cartilage obtenu après 29 jours de culture s'apparente au cartilage d'un nouveau-né. Par la suite, la synthèse de MEC n'augmente guère et on assiste à une différenciation hypertrophique des chondrocytes. Le modèle de micropellet permet donc l'initiation de la différenciation des CSMs et une production et organisation de la MEC conduisant à l'obtention d'un CA immature.

Les néo-tissus cartilagineux sans scaffold permettent d'éliminer les contraintes liées à des supports matriciels naturels ou synthétiques. Leurs propriétés biochimiques et biomécaniques sont proches du CA dans le cas de constructions avec des chondrocytes (DuRaine et al., 2015). Cependant, le nombre de cellules nécessaire pour obtenir des néo-tissus dont les propriétés mécaniques sont plus proches du CA est conséquent, entre 10 et 100 millions de cellules par mL et de l'ordre du million de cellules par néo-tissu. Ceci peut être problématique pour les néo-tissus issus de chondrocytes dont la disponibilité est réduite. En revanche, les CSMs sont plus accessibles mais donnent lieu à des tissus dont les propriétés biochimiques et biomécaniques sont plus faibles (DuRaine et al., 2015). Les CSMs restent néanmoins de bonnes candidates pour la construction de néo-tissus. L'étude approfondie de l'impact des facteurs de croissance biochimiques et biomécaniques est nécessaire à la compréhension du développement de ces tissus et l'amélioration de leurs propriétés biochimiques et biomécaniques.

La création de néo-tissus cartilagineux est un challenge en clinique puisque le CA est un tissu complexe dont la régénération est difficile malgré les multiples stratégies investiguées. Obtenir un tissu suffisamment mature pour répondre aux stimuli mécaniques *in vivo* après son implantation est nécessaire tout en favorisant son intégration au cartilage environnant. L'utilisation de scaffolds à multicouches permettant le remplacement du CA et de l'os sous-chondral est proposée afin d'améliorer leur intégration au niveau épiphysaire et de favoriser les interactions physiques et biochimiques entre les deux compartiments tissulaires. D'autre part, la cinétique de dégradation du support matriciel exogène et celle de la synthèse de MEC n'est pas parfaitement contrôlée, ce qui conduit à la diminution des propriétés des néo-tissus et une régénération difficile à long terme. Ces limites des stratégies actuelles d'ingénierie tissulaire pourraient être franchies grâce à une meilleure compréhension de la croissance des néo-tissus via leur analyse biochimique et biomécanique au cours du temps. C'est pourquoi, le modèle de micropellet, simple à mettre en place, raisonnable en quantité de cellules à utiliser et dont la fonction de modèle de croissance du CA a été montrée à de nombreuses reprises, a été choisi.

#### **V.4. Les stades de maturation du cartilage natif**

Le micropellet de cartilage issu de CSMs est décrit comme un modèle biologique récapitulant les étapes du développement du CA. Cependant, il semble nécessaire de redéfinir le développement global de ce tissu afin d'améliorer celui du micropellet. La formation des articulations est une phase clef du développement embryonnaire. En effet, elle permet de structurer la terminaison des os et de créer une interface qui permet à la fois le support et la mobilité du système musculosquelettique. Le CA du nouveau-né est un tissu immature dont la composition et l'organisation sont bien plus simples que celle du CA mature. Un long processus de maturation a lieu lors du développement post-natal du système musculosquelettique. À l'âge adulte ce tissu demeure stable avec un remodelage lent. C'est pourquoi, un déséquilibre du tissu lors du vieillissement est difficilement contrecarré.

##### **V.4.1. Le développement embryonnaire**

Initialement associé au développement des os longs, le développement embryonnaire du CA reste imparfaitement compris. Plusieurs hypothèses ont été émises sur l'origine des chondrocytes et l'ensemble du mécanisme de développement n'est pas encore élucidé. Au regard des résultats récents, le scénario suivant peut être envisagé (Chijimatsu and Saito, 2019; Decker, 2017) :

Les cellules des tissus osseux et cartilagineux ont pour origine les CSMs embryonnaires. À l'issue d'une première condensation, les CSMs se différencient en cartilage et constituent un continuum cartilagineux composé de cellules de la lignée chondrocytaire qui expriment les gènes *SOX9*, *COL II*, *Matn1* et *DCX*. La protéine *SOX9* est le facteur de transcription caractéristique de l'initiation de la chondrogenèse puisqu'il régule de manière positive l'expression des gènes *COL II*, *COL X*, *COL XI*, *COMP* et *AGG* lorsqu'il est phosphorylé (Delaine-Smith and Reilly, 2011; Lefebvre and Dvir-Ginzberg, 2017). Par l'action de facteurs de régulation locaux, comme *SOX11* et *TGFβ*, et systémiques comme *IHH*, *PTHrp*, ainsi que la présence de fibronectine dans la MEC, une condensation de CSMs allongées et orientées perpendiculairement à l'axe du membre crée l'interzone. Ces cellules sont caractérisées par l'expression du gène *GDF5* (Figure 8A-B), dont la durée d'expression impacte la destinée des cellules de la future articulation (Decker et al., 2017; Shwartz et al., 2016), et l'expression de deux autres marqueurs de l'interzone (*WNT9a* et *ERG*). Dans un premier temps, l'interzone est une fine couche de cellules, 2 à 3 chez l'homme (Edwards et al., 1994), issues de la dédifférenciation des chondrocytes du continuum cartilagineux – seule l'expression du gène *DCX* étant maintenue – tandis que les cellules du bord latéral de l'interzone sont issues du mésenchyme environnant (Storm and Kingsley, 1996). L'expression des gènes *GDF5*, *WNT9* et *ERG* s'étend ensuite aux cellules des surfaces articulaires opposées (Figure 8C-D)(Koyama et al., 2008). Récemment, il a été montré que les cellules de l'interzone, qui prolifèrent très lentement, ne sont pas à l'origine de son épaissement (Ray et al., 2015). En revanche, à l'extrémité des os longs, une prolifération active des chondrocytes a été observée dans une zone appelée « zone profonde de prolifération ». D'autre part, un recouvrement de l'expression des gènes de l'interzone ainsi que d'un gène caractéristique du phénotype chondrocytaire, *COL II*, a été observé. L'épaississement de l'interzone est alors lié au recrutement de chondrocytes de

la zone de prolifération profonde qui donneront naissance au cartilage articulaire. Le continuum cartilagineux est donc à l'origine de chondrocytes permanents dans le CA et transitoires dans l'os.

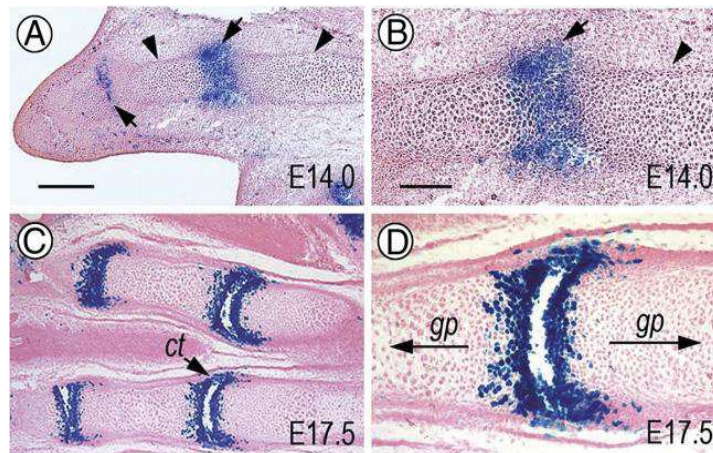


Figure 8 – Coupe longitudinale de l'extrémité d'un membre antérieur de la souris lors du développement embryonnaire montrant la genèse des articulations via l'expression du gène *GDF5*. (A - B) La première étape est la localisation des futures articulations interphalangiennes et métacarpo-phalangiennes (flèches), au sein du continuum cartilagineux (têtes de flèche) par la création d'une zone de condensation de cellules qui expriment *GDF5*, appelée « interzone ». (C - D) L'expression du gène *GDF5* s'étend ensuite aux 3 – 4 couches de cellules des surfaces articulaires opposées ainsi que des tissus de la capsule synoviale (ct). La plaque de croissance des os longs correspond à une zone bien distincte de l'articulation (gp) – d'après Koyama et al., 2008.

Le développement des articulations est issu d'une régulation complexe de l'expression génique des cellules (Koyama et al., 2008; Ray et al., 2015). Parallèlement, à la suite de l'expression du gène *GDF5*, les premiers stimuli mécaniques deviennent essentiels au développement de l'articulation (Shea et al., 2015). En effet, des fœtus de souris dont la genèse des muscles a été limitée ou dont la paralysie a été provoquée, développent des articulations anormales ou fusionnées (Kahn et al., 2009). Les mouvements *in utero* induits par l'activité de la mère ainsi que les premières contractions des cellules musculaires, qui ont lieu simultanément avec le développement précoce de l'articulation (Carry et al., 1983; Suzue, 1996), sont perçus par les mécanorécepteurs des cellules (voir V.6.3.a). La voie canonique des WNT est une des réponses des cellules puisque l'activité de la  $\beta$ -caténine est supérieure lorsque les contractions musculaires du fœtus peuvent avoir lieu (Kahn et al., 2009). De plus, l'expression de nombreux gènes, en particulier *WNT9a*, est modulée par la présence ou non de stimuli mécaniques (Rolfe et al., 2014) et maintenue en présence de stimuli (Kahn et al., 2009). Ainsi la différenciation des chondrocytes est contrôlée et permet la sécrétion de la première MEC du cartilage articulaire et des récepteurs cellulaires associés (Rolfe et al., 2014). Cette MEC particulière comprend majoritairement de l'acide hyaluronique (Khan et al., 2007), de la ténascine C (Pacifci et al., 1993) et de la lubricine (Koyama et al., 2008). La ténascine C est précocement exprimée dans le mésenchyme chondrogénique. Elle permet l'arrondissement des cellules par leur détachement de la MEC et

notamment de la fibronectine, protéine inhibitrice de la chondrogenèse. La lubricine et l'acide hyaluronique (AH) sont sécrétés plus tardivement, à l'issue du recrutement des chondrocytes du CA.

La dernière étape permettant la genèse de l'articulation est la cavitation. Alors que les chondrocytes sécrètent désormais leur MEC, une accumulation de plus en plus conséquente d'AH a lieu et aucune mort cellulaire par apoptose n'a été observée (Ito and Kida, 2000), comme il l'avait été suggéré initialement (Kimura and Shiota, 1996). Les récepteurs CD44 à l'AH que portent les cellules deviennent saturés et une cavité riche en AH se crée. La sécrétion de lubricine permet alors la lubrification de la cavité articulaire. Cependant, il a été observé que l'articulation finale était réduite par une immobilisation du fœtus et augmentée par une amplification des mouvements du fœtus. Ainsi, les stimuli mécaniques sont indispensables à la bonne régulation de la cavitation. En effet, les stimuli mécaniques favorisent la sécrétion d'AH et favorisent la séparation des deux couches de cartilage (Khan et al., 2007). Enfin, la ténascine C est considérée comme un créateur de barrières antiadhésives entre les éléments du squelette.

Le phénomène de cavitation, accompagné du développement des tissus de l'articulation, se poursuit petit à petit jusqu'à la naissance. Les cellules de l'interzone issues de la dédifférenciation des chondrocytes du continuum cartilagineux ainsi que des cellules qui ont migré aux abords médio-latéraux et antéro-postérieurs de l'interzone et qui expriment les gènes *GDF5* et *TGF $\beta$ 2* (récepteur au TGF $\beta$ ) sont à l'origine du reste des tissus de l'articulation : tissu synovial, ligaments intra-articulaires et ménisques pour le genou. La différenciation des chondrocytes est plus avancée puisque un gradient de l'expression de *COL IIB* avec la profondeur est observable au cours de la cavitation (Kahn et al., 2009). L'étude de fœtus humains âgés de 20 à 36 semaines a montré par spectroscopie infra-rouge une augmentation de la production du collagène ainsi que de l'organisation du tropocollagène en fibre puis fibrille et une diminution de la quantité de PG au cours de la croissance du CA du talon *in utero* (Mahmoodian et al., 2011). Cela s'est traduit d'un point de vue mécanique par une augmentation du module d'agrégation ( $59,9 \pm 2,11$  kPa et  $148 \pm 30,3$  kPa à 20 et 36 semaines, respectivement) et du module de Young ( $2,01 \pm 0,991$  kPa et  $46,3 \pm 10,3$  kPa à 20 et 36 semaines, respectivement) à l'équilibre, observé lors de tests de multi-relaxation en compression d'échantillons de 1,5 mm d'épaisseur (voir V.5). D'autre part, une étude du condyle fémoral du genou de fœtus de bovins d'une vingtaine de semaines a montré la présence de propriétés mécaniques déjà dépendantes de la profondeur du tissu lors de tests de multi-relaxation en compression confinée (Klein et al., 2007). Sur 1 mm d'épaisseur de CA correspondant à la zone superficielle et intermédiaire, la déformation du tissu était 4 fois plus faible en profondeur, correspondant à une rigidité du tissu 4 fois plus élevée. Le module d'agrégation moyen à l'équilibre était de  $89 \pm 32$  kPa. Ce gradient du module d'élasticité avec la profondeur est corrélé à une concentration croissante de collagène et de GAG avec la profondeur, alors que la densité cellulaire diminue.

Finalement, le développement embryonnaire du CA suit un schéma complexe de condensation, dédifférenciations et différenciations multiples du fait de la présence de facteurs de croissance biochimiques et biomécaniques, et de l'interaction entre les cellules et leur MEC qui se développent conjointement (Figure 9).

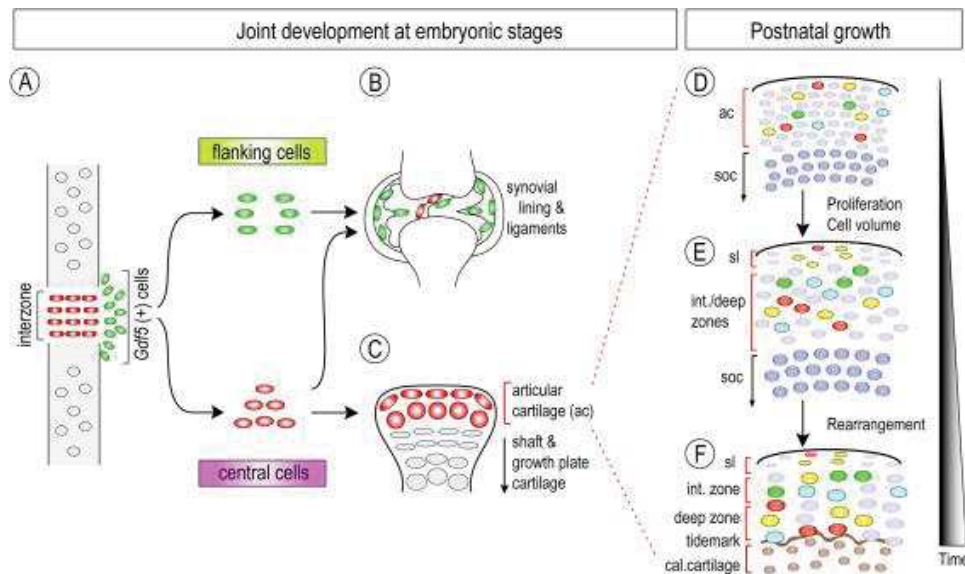


Figure 9 – Le développement du CA se fait en deux étapes ; une différenciation lors du développement embryonnaire puis une croissance du tissu lors du développement post-natal. (A) Lors du développement embryonnaire du cartilage artulaire, une condensation de cellules a lieu au sein du continuum cartilagineux pour former l'interzone. (B) Les cellules issues du mésenchyme environnant formeront l'ensemble des tissus de l'articulation hormis (C) le CA majoritairement créé à partir des cellules issues du continuum cartilagineux. Le CA s'épaissit et s'organise au cours du développement post-natal. (D-E) La prolifération des chondrocytes et l'augmentation de leur volume ainsi que la sécrétion de la MEC est à l'origine de l'épaississement du CA. (E-F) Une réorganisation des cellules a lieu de manière synchronisée avec l'organisation de la matrice extracellulaire du tissu jusqu'à atteindre un tissu mature à la maturité sexuelle – d'après Decker et al., 2017.

#### V.4.2. La croissance post-natale

A la naissance, le CA est un tissu très fin (6 à 8 couches de cellules chez la souris), isotrope, majoritairement composé de cellules et d'une faible quantité de MEC (Decker, 2017). Ce tissu ne ressemble donc en rien au cartilage mature, pauvre en cellules, riche en MEC, hétérogène et anisotrope. Ainsi, des étapes de maturation du tissu sont nécessaires.

Depuis la genèse du tissu artulaire et au début du développement post-natal, les chondrocytes prolifèrent lentement. Au fur et à mesure, les cellules filles s'étendent parallèlement à la surface artulaire dans la zone superficielle et plus ou moins perpendiculairement à la surface dans les zones plus profondes. Cependant, des clusters de cellules non complètement alignées sont observables et les colonnes de cellules obtenues plus tard ne sont pas issues d'une unique cellule mère, comme ce qui a été observé au niveau de la plaque de croissance (Decker, 2017). Cela signifie qu'une réorganisation des cellules filles a lieu a posteriori. La prolifération des cellules cesse assez rapidement alors que le tissu continue de s'étendre et de s'épaissir. D'une part, le volume des cellules des zones intermédiaire et profonde augmente. Chez la souris, une augmentation du volume des chondrocytes de

8% a été observée lors de leurs 2 premiers mois (période de maturation) de vie. D'autre part, les chondrocytes sécrètent de plus en plus de MEC et la mort par apoptose de cellules lors de leur réorganisation a cette fois été observée (Decker et al., 2017). Ainsi, au court du développement post-natal la densité des cellules diminue au profit de la densité de la MEC.

Le développement de la MEC et son organisation dans le CA ont été étudiés chez le porc dont la biochimie du tissu est proche de celle de l'homme (Gannon et al., 2015). Des biopsies de CA et d'os sous-chondral immatures ont été prélevées chez des porcelets de 4 et 8 semaines et à maturité chez des porcs de 1 et 3 ans. Entre ces échantillons, la composition de la MEC change. Le tissu, initialement riche en GAG, s'enrichit en collagène alors que la concentration en GAG diminue jusqu'à atteindre une densité en collagène plus importante qu'en GAG dans le CA mature. Le type de liaison entre les fibres de collagène change. D'autre part, dans le cartilage immature, les fibres de collagène sont fines (11 à 21 nm en moyennes à 4 semaine), n'ont pas d'orientation préférentielle et sont distribuées de manière homogène dans le tissu. Lors de la maturation, l'orientation progressive des fibres est observable au microscope biphotonique jusqu'à atteindre l'organisation en forme d'arche décrite par Benninghoff (1925), à l'âge de 3 ans. Une augmentation significative du diamètre des fibres ( $78 \pm 9,05$  nm en zone superficielle,  $125 \pm 7,8$  nm en zone intermédiaire et  $151 \pm 24,47$  en zone profonde) ainsi que de leur orientation a été confirmée au microscope aux ions hélium. Un test de compression non confinée a permis de mesurer l'évolution des propriétés mécaniques au cours de la croissance du tissu. Il a montré une augmentation significative du module d'élasticité et la mise en place d'un gradient d'élasticité avec la profondeur au cours de la maturation du CA (voir V.5). Des résultats similaires ont été observés chez le lapin (Julkunen et al., 2009). Chez la souris, il a été observé que la réorganisation des cellules était synchronisée avec celle de la MEC (Decker et al., 2017). De plus, contrairement à l'étape de prolifération des cellules, une mort cellulaire a été observée dans les zones intermédiaire et profonde mais le rôle de ce phénomène n'est pas clairement identifié. Il se peut que cela consolide le tissu ou permette de réguler la densité des cellules au sein du CA. Enfin, l'épaisseur du CA a été mesurée sur des images IRM chez l'homme (Jones et al., 2003) et sur des coupes histologiques chez la souris (Decker et al., 2017). Généralement, l'épaisseur du CA augmente lors de la croissance puis se stabilise ou parfois diminue, selon l'articulation, au profit de la densité du tissu et du recouvrement de l'ensemble de l'extrémité de l'os.

Plusieurs mécanismes de régulation moléculaires et mécaniques sont à l'origine de l'évolution de ce tissu lors du développement post-natal. Des facteurs de croissance sont présents à différents stades du développement du CA afin de réguler finement le phénotype des chondrocytes, notamment les voies de signalisation des TGF $\beta$ , WNT, FGF (Djouad et al., 2009). Alors que le facteur de croissance GDF5 disparaît dans le cartilage post-natal, l'expression du gène *TGF $\beta$ 1* est maintenue et l'action des BMP2 et BMP4 devient indispensable au maintien de l'expression des gènes de la MEC, *COL II* et *AGG* (Rountree et al., 2004). L'intervention de la voie canonique des WNT diminue au cours de la croissance du CA puisque l'activité de la  $\beta$ -caténine est maintenue au début de la croissance du CA puis diminue jusqu'à ne plus être détectable par immunohistologie dans le CA mature de la souris (Ning et al., 2012). Ceci permet une sécrétion de MEC très importante dans un premier temps puis le simple remodelage du tissu mature. La ténascine-C, toujours exprimée dans le CA lors de la croissance post-natale, est

importante pour le développement du tissu qui, sans celle-ci, possède plus de cellules, est plus fin et comporte donc moins de MEC (Gruber et al., 2020). La lubricine, quant à elle, n'est sécrétée plus que dans la zone superficielle du CA pour lubrifier la cavité articulaire. Seules certaines cellules dites progénitrices du CA conservent l'expression du gène *GDF5*. Ces cellules permettent l'expansion latérale du tissu puis la réparation du cartilage mature.

Les facteurs de croissance mécaniques sont aussi importants pour la sécrétion et l'organisation de la MEC. Si l'apparition du cil primaire (voir V.6.3.a) des chondrocytes quiescents est inhibée, le CA postpartum est fin, il ne s'épaissit pas, puis s'affine durant la croissance post-natale (Coveney et al., 2020). Le CA possède alors une surface endommagée et des ostéophytes. La réponse des chondrocytes à des stimuli mécaniques est donc nécessaire pour le développement du CA. Bien que l'épaississement du CA ait lieu chez des enfants peu actifs du fait de l'augmentation de la taille et du poids de l'enfant ainsi que des gestes du quotidien, l'épaisseur du CA est favorisée par la pratique d'activités sportives (Jones et al., 2003). Le volume du CA d'enfant n'ayant aucune activité sportive est 22 à 23% inférieur à des enfants ayant une activité sportive modérée. D'autre part, l'épaisseur du CA augmente de manière plus importante chez le jeune enfant que chez l'adolescent (Jones et al., 2003). Cela peut être lié à la décroissance de l'activité de la  $\beta$ -caténine puisque la voie canonique WNT est aussi reconnue comme voie de mécanotransduction (Hosseini et al., 2015; Öztürk et al., 2017). *In fine*, cela signifie que lors de la croissance, un capital cartilagineux peut être formé grâce à l'activité sportive qui stimule la sécrétion de la MEC et permet son organisation.

Finalement, lors de la croissance post-natale et jusqu'à la maturité sexuelle, le CA poursuit son développement. Les chondrocytes sont maintenant capables de sécréter une quantité très importante de MEC grâce à la présence des facteurs de croissance moléculaires et mécaniques. Enfin, lors du développement post-natal, les capacités de réparation du CA sont plus importantes qu'à l'âge adulte (Ikegawa et al., 2016; Matsuoka et al., 2015). Le mécanisme de réparation du CA immature est donc une piste de recherche pour la régénération du CA mature.

#### V.4.3. L'homéostasie du tissu adulte

A la maturité sexuelle, le CA atteint aussi sa maturité concernant son épaisseur, sa composition et son organisation. Des marques du développement du CA sont encore présentes. En zone superficielle, le gène *PG4* qui code pour la lubricine ou la protéine SPZ en fonction de l'épissage des exons est encore exprimé et permet la lubrification de la cavité articulaire (Decker et al., 2017).

Contrairement à l'os, où il y a des cellules spécifiques pour son développement et d'autres pour sa dégradation, le cartilage ne comporte qu'un type de cellule, les chondrocytes, qui permettent son remodelage. Les chondrocytes synthétisent à la fois les composants de la MEC mais aussi les enzymes qui la dégradent. La croissance, le maintien ou la dégradation du cartilage sont donc assurés par une "balance" entre la synthèse de la MEC et des enzymes de dégradation. Le remodelage du CA est étroitement lié aux demi-vies de ses composants principaux. L'observation du taux de carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ) dans le CA, lié au taux de  $^{14}\text{C}$  contenu dans l'atmosphère au moment de la synthèse des protéines, a

montré que le renouvellement des collagènes, dont la demi-vie est de l'ordre de 117 ans (Verzijl et al., 2000), est quasi nul contrairement au renouvellement des PG qui est bien plus rapide (Heinemeier et al., 2016). La demi-vie des PG est d'un quart de siècle pour les plus résistants (Maroudas et al., 1998). La lenteur du remodelage du CA est aussi liée à la faible concentration en facteurs de croissance du CA sain (Martel-Pelletier et al., 2008). Les facteurs de croissance présents l'étaient déjà lors du développement post-natal. Le TGF $\beta$  permet à la fois la synthèse des composants de la MEC par l'activation de SOX9, la dégradation via les MMP13 et ADAMTS-4 (agrécánases) tout en limitant une dégradation trop importante du tissu par l'inhibition des métalloprotéinases MMP1 et MMP9. Les BMPs (4, 6, 7, 9 et 13) favorisent la sécrétion de COL II et AGG mais peuvent conduire à l'hypertrophie des chondrocytes. Cependant, la présence d'antagonistes des BMPs limite leurs actions. La dégradation de la MEC permettant le remodelage est majoritairement due aux MMP2, MMP3, MMP11, ADAMTS4 et ADAMTS5. Les IGFs protègent le CA de l'inflammation en favorisant la production de récepteurs à l'IL-1 qui ne transmettent pas de signal à la cellule. De même, la glycoprotéine 39 protège le CA de l'inflammation en jouant le rôle de tampon en limitant l'expression des MMP1, MMP3 et MMP13. Le maintien et la protection du CA mature sont donc dus en partie à une fine régulation biochimique.

La seconde source principale de régulation de la balance du CA est le mouvement par le biais des voies de mécanotransduction (voir V.6.3) et de la nutrition du tissu. Le CA est naturellement soumis à diverses contraintes. En 1986, des mesures de pression ont été faites *in vivo* en utilisant une prothèse de hanche instrumentée (Hodge et al., 1986). Le CA de la tête du fémur perçoit une pression inférieure à 2 MPa quand une personne est assise et comprise entre 3 et 4 MPa quand la personne marche. Le chargement maximal mesuré fut de 18 MPa. Une autre étude a montré des niveaux de contraintes compris entre 3 et 10 MPa (Afoke et al., 1987). La déformation du CA lors de la flexion du genou de 0 à 120° à partir de la position debout a été mesurée sous IRM. L'analyse des images a montré que selon l'angle de flexion du genou le pic de déformation dans la zone de contact variait entre 22 et 30% (Bingham et al., 2008). Le maintien sur une jambe durant 300 secondes a provoqué un pic de déformation de 13,4% au niveau du genou (Hosseini et al., 2010) et de 32,4% au niveau de la cheville (Li et al., 2008). Enfin, la fréquence des chargements influence l'activité des chondrocytes (Elder and Athanasiou, 2009). Lors de la marche et de la course, la fréquence de la foulée, qui correspond à un cycle de charge-décharge, est comprise entre 0,83 et 1,95 Hz (Nilsson and Thorstensson, 1987). En contrôlant la fréquence de la foulée, cet intervalle peut être étendu à 0,41 (marche à basse fréquence) et 3,57 Hz (course à haute fréquence).

Sans ces mouvements, le CA dégénère. Deux études ont montré que l'immobilisation d'une articulation d'un chien entraînait une diminution du taux de PG, de collagène et du rapport sulfates de chondroïtine 6S sur sulfates de chondroïtine 4S (Jortikka et al., 1997; Müller et al., 1994). Ce dernier indique une diminution du renouvellement de la MEC. Elles ont aussi montré que ce phénomène était réversible si l'animal pouvait de nouveau mobiliser son articulation. D'autre part, la déstabilisation d'une articulation par la rupture d'un ligament affecte le cartilage. Des zones décolorées, fibreuses avec des ostéophytes apparaissent. Les taux de collagène et PG, et le rapport sulfates de chondroïtine 6S sur 4S diminuent. Il y a donc des signes de dédifférenciation et d'hypertrophie des chondrocytes. Des

synovites peuvent aussi être observées. Ainsi, la déstabilisation d'une articulation, impliquant une redistribution des forces sur le cartilage, peut conduire à l'altération du cartilage. Enfin, des chargements trop importants ou trop répétés, dus à l'obésité (Eskelinen et al., 2004; Gersing et al., 2017) ou à une activité physique trop intense, peuvent aussi conduire à l'altération du CA. Les stimuli mécaniques sont donc nécessaires au maintien du CA mais peuvent devenir néfastes s'ils sont trop importants et/ou mal répartis.

Enfin, lors de traumatismes du CA, une source de régénération du tissu sont les cellules recrutées dans l'articulation. D'une part, des cellules souches progénitrices du CA se trouvent à la surface du CA ainsi qu'à la périphérie de l'articulation. Ces cellules expriment des gènes tels que *GDF5*, *PG4* ou encore le gène du récepteur TGF $\beta$ R2 (Decker et al., 2017). Les premières sont impliquées dans la réparation de microlésions ou de l'érosion due à l'inflammation à la surface du cartilage alors que les secondes sont recrutées lors de lésions plus profondes. D'autre part, des CSM-MO peuvent être recrutées lors de lésions profondes. Ces cellules souches peuvent proliférer et se réorganiser de manière à régénérer le CA. Cependant, si les dommages sont trop importants, la réparation du tissu peut donner naissance à un tissu fibreux qui est de moins bonne qualité de manière structurelle et fonctionnelle que le tissu articulaire, et qui ne perdure pas dans le temps et est sujet à l'arthrose (Huang et al., 2016; Mienaltowski et al., 2009). Ainsi, les capacités de réparations du CA restent limitées.

En résumé, le CA est un tissu contenant des chondrocytes dont le maintien est assuré par diverses voies de régulation à la fois moléculaires et biomécaniques.

#### *V.4.4. Le vieillissement du tissu*

Le vieillissement du CA peut être considéré comme l'usure d'un matériau extrêmement sollicité et est associé au vieillissement global du système musculosquelettique (Loeser, 2004). Il se traduit par une altération de la MEC et du métabolisme des chondrocytes.

Tout d'abord, un amincissement du CA peut être observé comme le montre une réduction de l'épaisseur de 21% pour les femmes et de 13% pour les hommes du CA fémoral du genou mesuré sous IRM pour des tranches d'âge de 50 à 78 ans et de 20 à 30 ans (Hudelmaier et al., 2001). Les AGG sont moins nombreux et leur structure est modifiée. Ceci implique une réduction du nombre de GAG associés qui sont aussi plus petits. La conséquence de ces modifications est une réduction de l'attraction de l'eau. D'un point de vue biomécanique, cela implique une diminution du module d'élasticité à l'équilibre et une augmentation de la perméabilité (Armstrong and Mow, 1982). D'autre part, une glycosylation croissante des fibres de COL II avec l'âge augmente leur rigidité alors qu'elles ne sont pas renouvelées au cours de la vie d'un individu (Heinemeier et al., 2016). Enfin, il n'est pas rare d'observer des ostéophytes aux extrémités du CA. Ainsi, les propriétés mécaniques du CA et donc sa fonction peuvent être altérées au cours du vieillissement. Néanmoins, ces altérations peuvent demeurer indolores puisque souvent associées à une diminution de l'activité des personnes.

L'activité des chondrocytes est aussi altérée lors du vieillissement. Ces cellules dont le métabolisme était déjà reconnu pour être lent ont une activité anabolique réduite. Ceci est en accord avec la diminution du potentiel chondrogénique des chondrocytes avec l'âge, lors de cultures en micropellets (Erickson et al., 2011). Ceci peut être expliqué par la diminution des stimulations mécaniques, la présence de fragments de la MEC ou encore un déclin de l'activité endocrine (Hudelmaier et al., 2001). Le risque associé à cette altération du métabolisme des chondrocytes est leur difficulté à faire face à un nouvel événement traumatique ou une accélération du vieillissement. La capacité des chondrocytes à migrer a aussi diminué et peut donc limiter la possibilité de réparer une zone qui se dégrade (Mishima and Lotz, 2008).

Le vieillissement du CA n'est pas nécessairement associé à de l'arthrose puisqu'un certain équilibre peut être maintenu ainsi qu'une mobilité sans douleur. Le risque de développer de l'arthrose est lié à plusieurs facteurs, dont les prédispositions génétiques, l'obésité, l'anatomie ou la suite d'un événement traumatique qui sont majorés par le vieillissement. Dans ce cas, la balance entre synthèse et dégradation de la MEC est déséquilibrée et provoque une inflammation chronique. On assiste à une dérégulation des facteurs de croissance (Martel-Pelletier et al., 2008). Les BMPs ainsi que leurs antagonistes sont surexprimés. L'inflammation, caractérisée par la présence de cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6), provoque une surexpression des collagénases MMP1, MMP8 et MMP13. MMP13 est plus spécifique du COL II. Les fragments issus de la lyse par MMP13 peuvent être à nouveau dénaturés par les MMP2 et MMP9, également surexprimées. Étant donné le nombre de molécules que comporte une fibrille de collagène, cette dégradation reste très lente. La protéine ADAMTS5 a un rôle prédominant dans la dégradation des agrécanes dans l'arthrose. D'autres protéases comme la plasmine sont activées et dégradent les PG. Elles peuvent aussi activer les protéines de la famille des MMPs.

Le CA est donc un tissu complexe finement régulé dans l'espace et dans le temps et qui est caractérisé par (1) la présence de chondrocytes matures sécrétant un cartilage hyalin à l'issue du développement embryonnaire, (2) sa capacité à se renforcer au cours de la croissance et ce, d'autant plus qu'une activité sportive est pratiquée sans traumatisme, (3) la stabilité et la robustesse du tissu mature pour assurer ses fonctions. Cependant, les capacités du tissu à se réparer sont faibles. Ainsi, le tissu lésé est remplacé par un cartilage fibreux qui tend à dégénérer dans le temps en lésions d'arthrose. Étant donné la densité cellulaire du micropellet de cartilage, la composition de sa MEC, et sa structure après 21 jours de culture, il peut être considéré comme un CA de nouveau-né. Les facteurs de croissance TGF $\beta$  et BMP2 permettent le développement du néo-tissu mais un stade hypertrophique, non atteint dans le CA, est obtenu. L'utilisation de la PTHrP ou d'une culture en environnement hypoxique limite mais n'inhibe pas totalement l'hypertrophie des chondrocytes. Au regard des nombreux facteurs de croissance impliqués dans le développement du CA, dont certains ne sont pas encore identifiés probablement, il semble difficile de recréer un environnement biochimique complet pour favoriser le développement du micropellet de cartilage. Cependant, cette partie montre l'importance des stimulations mécaniques pour le développement embryonnaire et post-natal du CA. On peut donc supposer que recréer un environnement de stimulations biomécaniques pourrait repousser les limites liées au modèle de développement du micropellet de cartilage et permettre d'obtenir des informations pertinentes pour améliorer les stratégies d'ingénierie tissulaire et les applications cliniques.

## **V.5. La biomécanique et les outils de caractérisation du cartilage natif et des néo-tissus cartilagineux**

### **Article 1** : revue de la littérature

« Caractérisation biomécanique du cartilage articulaire :  
des notions de bases aux perspectives novatrices »

### **Volumetric tissue biomechanical characterization of articular cartilage: from basic notions to novel perspectives**

N. Petitjean, P. Cañadas, P. Royer, C. Jorgensen, S. Le Floc'h, D. Noël

En préparation

Le CA et les néo-tissus cartilagineux ont fait l'objet de nombreuses études montrant leur composition, leur structure ainsi que le métabolisme des cellules. Cependant, la fonction du CA est mécanique. Il est donc essentiel de compléter ces informations par des données biomécaniques. Les propriétés mécaniques des matériaux sont liées à leur composition et à leur structure. C'est pourquoi, la sécrétion de MEC ne permet pas à elle seule de garantir la fonction du néo-tissu *in vivo*. Le CA est un tissu dont les propriétés mécaniques sont complexes du fait de sa composition et de sa structure. Il est hétérogène et anisotrope. Un certain nombre d'outils ont été utilisés pour le caractériser et autant de paramètres pour le décrire. Cependant, il n'y a pas de consensus concernant son comportement biomécanique. En effet, lors d'analyses poussées des propriétés mécaniques du CA, des modèles viscoélastiques, poroélastiques ou poroviscoélastiques ont été utilisés. Cela signifie que le CA a été respectivement considéré comme un tissu visqueux, poreux, ou visqueux et poreux. Cependant, la viscosité et la perméabilité d'un matériau ne font pas appel aux mêmes mécanismes et correspondent chacun à des représentations différentes de la microstructure du CA. Afin de créer des néo-tissus adéquats pour combler des lésions cartilagineuses, il est nécessaire de faire un point sur ce sujet. La revue suivante résume l'état de l'art du comportement mécanique du CA, des techniques de caractérisation utilisées pour le tissu natif ou les néo-tissus humains ainsi que les perspectives envisageables afin de mieux comprendre ce tissu et de suivre son évolution *in vitro* et *in vivo*.

## 1. Introduction

Articular cartilage (AC), the thin tissue which covers the bone ends at the joints, is the tissue which ensures the transmission of forces between adjacent bones while allowing friction-less movements between them. Thus, the mechanical properties of AC, linked to its complex composition and structure, is of high importance regarding its function: this particular tissue needs therefore to exhibit a sufficient rigidity (or stiffness) to resist mechanical loading while being able to absorb a part of the contact energy in between the related bones.

Understanding mechanical behavior and being able to quantify its related parameters is crucial for AC diagnosis and repair. Indeed, AC is also known for its limited healing and repair capacities (Huey et al., 2012). As a result, AC damages and diseases such as degenerative osteoarthritis represent an important and increasing public health problem, in particular due to population ageing. Consequently, several surgical techniques have been developed during the last decades including microfracture, mosaicplasty, autologous chondrocytes implantation (ACI) as well as matrix-assisted ACI. However, when they exist, the benefits often appear to be non-lasting and the biomechanical properties of the repaired cartilage, often associated to a fibrocartilage phenotype, are generally lower than those of the original one (Alford and Cole, 2005; Du et al., 2020). More recently, various tissue engineering techniques have also been developed. However, even if they appear to be hopeful, few products reach clinical studies and commercialization (DuRaine et al., 2015; Huang et al., 2016; Kon et al., 2012, 2014; Zumwalt and Reddy, 2020).

In fact, a scientific and technological challenge in tissue engineering remains: the ability to mimic the biomechanical properties of AC in a sustainable way, i.e. without persistent deformation of the substitute material during time. To do so, it is necessary to precisely know these biomechanical properties. On the one hand, numerous studies have shown that using different types of (i) tissue samples, (ii) mechanical models, (iii) experimental techniques and (iv) types of tests, reveals an important variability of the resulting volumetric mechanical properties (i.e., the properties of the overall volume of the tested sample). Furthermore, most of the work published up until now has focused on the sole apparent Young's modulus without exploring the other volumetric mechanical properties linked to its time-dependent behavior. For example, compression testing is one of the first things that comes to mind when one wants to mechanically characterize a sample. The well-known Young's modulus, which represents the rigidity (or stiffness) of a material, can be

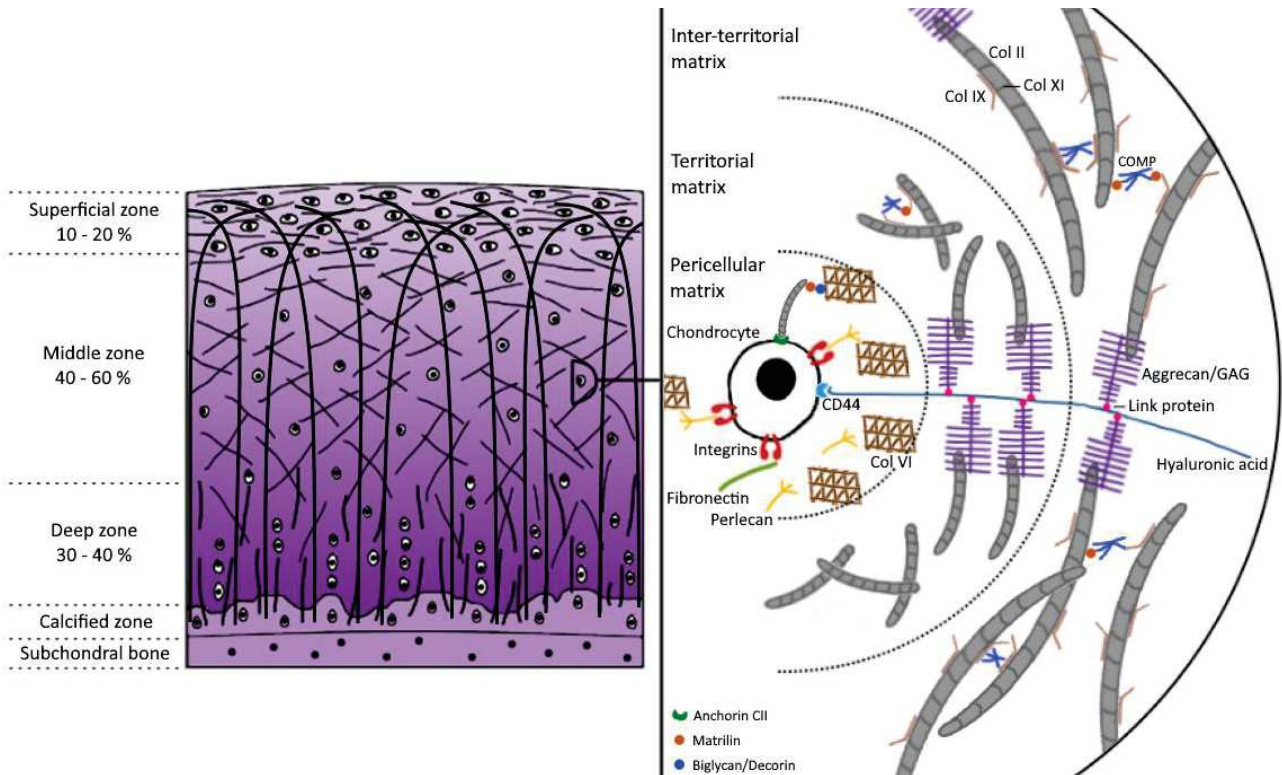
obtained by this type of test. Then it gives a first global information about the volumetric mechanical properties of the sample and is hugely used to evaluate the quality of articular cartilage. However, regarding the complexity of the multi-scale composition and structure of AC, the global Young's modulus alone does not give enough information. Furthermore, the time-dependent mechanical behavior of articular cartilage has been little studied.

On the other hand, since AC plays an important preventive role in the contact between bones, several published works have focused on the tribology of this tissue also considering the synovial liquid, i.e. the study of the mechanical properties of the AC surface in terms of friction and worn in function of its lubrication state. Indeed, in case of defects in the AC or in the synovium, movements between adjacent bones become rubbing, which can lead to severe pain and even bone damage. This topic, which has been studied for several decades (see for example Jones, 1934 or McCutchen, 1962), is currently highly developed through dozens of research teams around the world resulting in hundreds of articles per year (Zhou and Jin, 2015). It represents a research domain in itself, which requires specific theoretical and experimental tools (in particular, those in contact mechanics) and is out of the scope of the present article. Readers who wish to learn more about this topic can for example consult very complete reviews such as: Ateshian and Hung, 2006; Prekasan and Saju, 2016; Zhou and Jin, 2015.

Therefore the purpose of this paper is to give an update of the common volumetric biomechanical parameters which describe the mechanical behavior of AC in relation with its multi-scale composition and structure, and to explore novel and complementary properties as possible future standards in articular cartilage biomechanics. Thus, this review focuses on (1) the basic knowledge of the mechanical behavior in relation to the biochemical and structural composition of AC, (2) the parameters commonly used to estimate the mechanical properties of AC and (3) the remaining challenges in tissue engineering.

## 2. Basic knowledge of mechanical behavior of cartilage and its relationship to its biochemical composition

### 2.1. Articular cartilage composition and structure



*Fig. 1 – The distribution of chondrocytes, COL II primary and secondary fibers and PG is shown in the three zones (right) and three regions (left) of articular cartilage. In the three zones, PG concentration increases with the depth (darker purple). Primary COL II fibers have an arcade-like structure (biggest fibers), whereas secondary COL II fibers are parallel to the articular surface and more randomly oriented in other zones (smaller fibers). Chondrocytes are more numerous in the superficial zone and organized in columns in the deep zone. In the three radial regions, chondrocytes are linked to the extra-cellular matrix by many molecules of the pericellular matrix (anchorin CII, CD44, Integrins, fibronectin, perlecan, matrilin, biglycan, decorin). In the territorial matrix, the size and the number of connections between collagen fibers (Col II, Col XI and Col IX) and PG by COMP and matrilin proteins increase until the inter-territorial zone. PG are linked to chondrocytes by link proteins and hyaluronic acids and to COL II fibers.*

Articular cartilage is a conjunctive tissue, which is composed of 98% of extra-cellular matrix (ECM) and 2% of a unique differentiated cell type, the chondrocytes. Chondrocytes are highly specialized cells that synthesize and degrade the ECM. The ECM is mainly composed of water, which represents 70 to 80 percent of its weight. Proteoglycans (PG) and type II, IV, IX and XI collagens account for 5-15 and 60-70 percent in dry weight of ECM, respectively. Type II collagen (COL II) fibrils are bundles of fibers fixed by type IX and XI collagens (Riesle et al., 1998; Sherman et al., 2015), whereas type VI collagens are small sparse fibers, which surround chondrocytes. Several molecules allow chondrocytes to be connected to the ECM and the link between the ECM fibers: anchorin CII, CD44, Integrins, fibronectin, perlecan, matrilin, biglycan, decorin, Link, and COMP (Fig. 1).

Articular cartilage is a heterogeneous tissue with a specific organization in three zones (Sophia Fox et al., 2009) (Fig. 1), left part). In the superficial zone, chondrocytes are flattened and parallel to the articular surface. COL II fibers are thin (diameter of 20 nm), parallel to the articular surface and have a privileged orientation in the direction of articular rotation (split line). In the middle (transitional) zone, chondrocytes are spherical at low density. COL II fibers are thicker, obliquely and randomly oriented. In the deep zone, chondrocytes are organized in column and elongated perpendicularly to the articular surface. COL II fibers are thicker (diameter of 70 – 120 nm) but fewer, and oriented perpendicularly to the articular surface. All zones contain PG, whose diameter is only a few nanometers long, but their concentration increases with depth (Laasanen et al., 2003). COL II fibers can be divided into two groups. Primary fibers cross the tissue and have an arcade-like structure (Benninghoff, 1925; Matcher, 2015), whereas secondary thinner fibers are parallelly oriented to the articular surface in the superficial zone and randomly oriented in the transitional and deep zone (Hunziker et al., 1997). A fourth zone, deeper, is composed of type X collagen and very few cells. This zone anchors the COL II fibers, and therefore the cartilage, to the subchondral bone.

Articular cartilage can also be divided in three radial regions from chondrocytes (Fig. 1, right part). The pericellular region surrounds chondrocytes — both constitute the chondron — and contain a lot of proteins and the type VI collagen fibers synthesized by chondrocytes. Type VI collagen showed a principal orientation (McLeod et al., 2013). Its thickness is between 2 and 5  $\mu\text{m}$ . Then, the territorial region is composed of thin COL II fibers and PG. The interterritorial region is the largest region containing the large COL II fibers and many PG.

## **2.2. *In vivo physiological mechanical loads***

In vivo, articular cartilage can be subjected to significant stresses and, under physiological conditions, it generally sustains these loads by deforming without injury. In spite of the difficulty in obtaining *in vivo* data, some useful measurements have been performed by using instrumented implants with pressure or force sensors, in particular for the hip joint, since the middle of the 1960s (Rydell, 1966a, 1966b) or, more recently, by imaging techniques to evaluate the deformations.

In this regard, a brief historical summary of these experimental measures up to the 2000s is given by Bergmann et al (2001). Thus, by using such instrumented articular implants, these authors have measured the mechanical stresses that the prosthesis can undergo and extrapolated these results to evaluate the physiological loads submitted to the cartilage of the considered joint. In general, experimental data are provided in terms of contact area, of pressure and/or of force as a percentage of body weight (%BW), for several types of physical activities. For example, when walking, the hip joint is submitted to a resultant force between 238%BW (Bergmann et al., 2001) and 250%BW (Hodge et al., 1986) which is slightly inferior when standing on one leg (Bergmann et al., 2001). This resultant force can increase up to 580% when running (Hodge et al., 1986). When climbing up stairs the joint contact force is 251%BW, and 260%BW when going down stairs (Bergmann et al., 2001).

Furthermore, it is of great importance to notice that this contact force is not evenly distributed over the surface of the cartilage as it has been shown by Hodge and co-workers (Hodge et al., 1986). Indeed, in this study the authors have observed that the surface of the implant is submitted to a pressure that varies locally between -0.13 MPa (the minus sign indicates an attractive or cohesive force) to +7.14 MPa (the positive value reveals a compressive force), during standing, 6 months after surgery. The peak value attained 18 MPa one year after surgery, indicating that the muscle force (which increases with the duration of training, so with increasing time after surgery) may explain such a difference. Moreover, the authors have also observed that the location of the peak pressure varies in function of the type of physical activity. This can be explained again by the role of the muscle contraction which can vary in terms of both (i) the type of involved muscles and (ii) the level of contraction, depending on the considered activity.

Few published studies have concerned the evaluation of AC deformation. MRI measurements in tibiofemoral joint have shown a maximal axial deformation of 7% during different activities (Eckstein et al., 2005), whereas dual fluoroscopic system associated to MRI measured deformation between 7 and 30 % during walk or a weight-bearing single-leg lunge (Bingham et al., 2008; Liu et al., 2010). During knee flexion from 0 to 120° from the standing position, MRI images showed that depending on the angle of knee flexion, the peak deformation in the contact zone varied between 22 and 30% (Bingham et al., 2008). Holding one leg for 300 seconds resulted in a peak deformation of 13.4% at the knee (Hosseini et al., 2010) and 32.4% at the ankle (Li et al., 2008).

Finally, over the last twenty years, mechanical modeling tools combined with numerical simulations have been mainly used. For example Fabry et al (Fabry et al., 2013) have estimated the horizontal and vertical components of the contact force, starting from the data given in (Bergmann et al., 2001) but by using another numerical model. If the corresponding vertical component is close to the one founded by Bergman et al., they have obtained different values for the two horizontal components:  $F_x$  varies from -20 to +75%BW while  $F_y$  is generally negative until -125%BW during chair down and up, even if it attain 50%BW when climbing stairs (Fabry et al., 2013). In terms of pressure, the values resulting from numerical simulations seem to correspond to the ones measured by Hodge and coworkers. For example, (Gao et al., 2020) have obtained average pressure values in the order of 4-5 MPa while (Liu et al., 2019) have found from 2.04 to 7.78 MPa during one cycle of daily activities.

### **2.3. Mechanical behaviors of articular cartilage**

Articular cartilage is a strong tissue able to absorb and to distribute such physiological loads for many years without failure. To do so, AC exhibits specific mechanical behaviors to withstand the weight of these external loads. Due to the difficulties in performing *in vivo* measurements, many *in vitro* mechanical tests have then been made to highlight the mechanical behaviors of articular cartilage and understand its abilities. They can be divided into two categories: time-independent and time-dependent behaviors, each one revealing specific mechanical properties of AC. Furthermore, the mechanical properties of AC vary with location of loading (heterogeneity) and direction of analysis (anisotropy). Finally, when the load happens to be superior to the physiological one, some failure within AC may appear, leading to tissue damages.

### 2.3.1. Time-independent behaviors: the “elastic” behaviors of cartilage

*Pre-stressed thanks to osmotic pressure:* Naturally, without any mechanical action (even gravity and muscular forces), articular cartilage is prestressed. Indeed, a mechanical equilibrium is steadily maintained by the major elements (apart from water) of the constitutive extracellular matrix (ECM): COL II fibers and proteoglycans (PG) (Wilson et al., 2005b). The negative charges of PG retain cations, making the tissue hypertonic. Thus, water enters the tissue and creates an osmotic pressure. Moreover, repulsive forces caused by these nearly negative charges tend to separate molecules. This creates a chemical expansion and a swelling of the tissue. In response to this swelling, COL II fibers are stretched and, due to their stiffness, they limit the expansion of the tissue. This balance between repulsive and tensile forces enhances the rigidity of the overall material which is then prestressed. Finally, this force balance changes when applying an external loading leading to another mechanical equilibrium.

*Reversible deformations:* The elastic behavior of cartilage consists in its ability to recover an initial shape when the mechanical load is removed. Reversible deformation, or elasticity, has been the first behavior of articular cartilage revealed by compression, shear, traction or indentation tests. As long as the cartilage is not damaged, it returns to its initial state after loads (springback). This is due to the collagen fibers and PG, which show the same behavior, and water, which flows out and into the tissue during deformation/springback. Moreover, for a given stress, the ability of the sample to deform differs (Huang et al., 2003) and depends on its rigidity. In mechanics, the rigidity of a material is described by its Young’s modulus, which relates the stress to the strain (Fig. 2, plain curve). The rigidity of AC depends on the rigidity of its main component (COL II fibers and PG) and their connections.

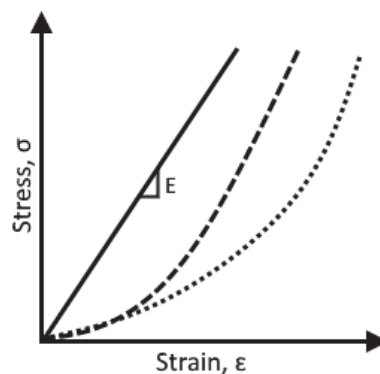


Fig. 2 – Linear (plain curve) and nonlinear (dotted curve) elastic behavior of materials. Linear elastic behavior with a nonlinear toe-region observed in articular cartilage (dashed curve). The Young’s modulus of the material is given by the ratio of stress to strain

*Compressible behavior:* Articular cartilage deformations are attended by changes of volume during loading. This tissue includes a solid phase with collagen fibers and PG, and a fluid phase with water and solutes. Each phase is considered to be incompressible because its respective volume does not change during overall deformation. This suggests that the change of volume of articular cartilage during compression is due to the loss of fluid.

### 2.3.2. Time-dependent behaviors: “poroviscoelastic” behaviors of cartilage

Since articular cartilage has a reversible behavior, it returns to its initial state after loads. However, this phenomenon takes time and a transitional phase, during which strain or stress values continue to change, is noticeable. This means that articular cartilage behaviors are time-dependent.

*Creep or relaxation behaviors* are traditionally called viscous behaviors. This corresponds to the evolution over time of strain (Fig. 3A) or stress (Fig. 3B) during the application of a constant stress or strain, respectively. Two origins of viscous behaviors are described in the literature (Mak, 1986). The flow-dependent viscous behavior is due to the porous structure of articular cartilage. The flow depends on pore size, pore tortuosity, PG concentration and creates frictions against the solid matrix. In this case, we talk about of poroelastic behavior. The flow-independent viscous behavior comes from the viscosity of the solid matrix. COL II fibers or PG slide relative to each other which creates frictions (Han et al., 2007). In this case, it is referenced to a viscoelastic behavior. Thus, during the transitional phase of creeping or relaxation, a part of the energy is lost, and deformation of the sample increase or the force it delivers decrease, respectively.

*Hysteretic behavior* is described by a difference between the load and unload phase of the stress-strain curve (Fig. 3C). This implies a loss or storage of energy during a cycle of load and release. The hysteresis is a result of the time-dependent behavior of articular cartilage and when several cycles of load are applied, a transitional and an equilibrium state of hysteresis loops are also observable. During transitional phase, the area in the center of hysteresis loop and stresses decreases, i.e. the loss of energy and the tissue stiffness decrease until reaching an equilibrium (Maier et al., 2017). This may be due to a reorganization of COL II fibers until they reach an optimal position in response to the solicitations.

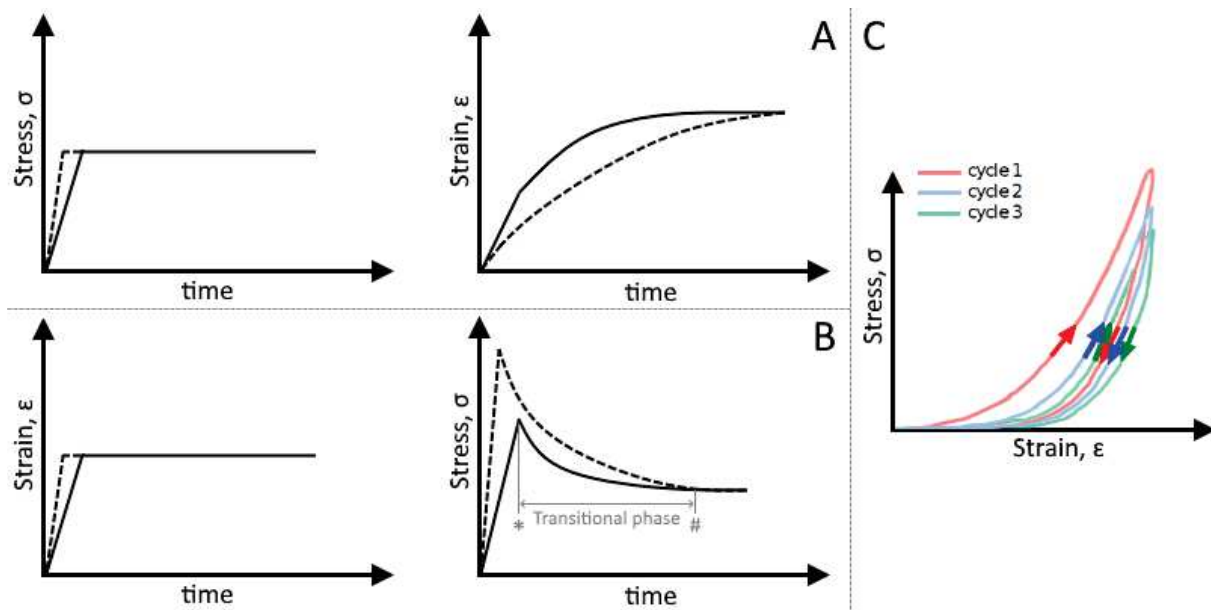


Fig. 3 – Behavior of articular cartilage during creep tests (A) or relaxation tests (B) with two loading rates and cyclic tests (C) of compression. Creep and relaxation tests show the instantaneous or dynamic response (\*) and the equilibrium response (#) of articular cartilage.

Naturally, time-dependent behaviors are also velocity-dependent. For creep or relaxation, instantaneous strain or stress respectively, and the time to reach the equilibrium increase with the ramp rate whereas the equilibrium strain or stress never change (Fig. 3A-B) (DiSilvestro et al., 2000a). These changes are linked to the capacity of the fluid to flow out and/or the viscosity of the solid phase. This leads to different apparent behaviors of articular cartilage depending on the rate of loading (Nia et al., 2011; Oloyede et al., 1992). With a very small velocity, the articular cartilage shows a quasi-independence of time and a high compressibility. In this case, the friction caused by the fluid phase during exudation is negligible. In addition, it is possible that such a low velocity allows time for the solid matrix lattice to reorganize itself optimally without having to dissipate energy. In theory, for a range of larger loading rate, the velocity of the fluid phase and the solid phase could be equal so only one phase could be described. Creep, relaxation and hysteresis would be only due to a flow-independent viscosity. Experimentally, there is no way to distinguish this behavior from the next one. For classical loading rate, the velocity of the fluid phase differs from the solid phase and creep, relaxation and hysteresis depend on both flow-dependent and flow-independent viscosity. The stress of dynamic response (Fig. 3B, \*) increases in a nonlinear manner with the loading rate (DiSilvestro et al., 2000a; Nia et al., 2011). The area of hysteresis loop decreases with the loading rate, which shows that energy dissipation is frequency-dependent (Park et al., 2004).

Finally, there is a loading rate limit where the tissue response is time independent again but without compressibility and hysteresis (Park et al., 2004). Indeed, high speed of a load and unload cycles does not give the time to the fluid to escape the tissue or to the COL II fibers to reorganize optimally (Nia et al., 2011). In general, the equilibrium elastic modulus is given by a low loading rate while a high loading rate allows to determine the dynamic elastic modulus. At different scales, the minimal frequency limit can change because fluid flow cannot be neglected in the same way (Park et al., 2009). Finally, this frequency or loading rate dependency implies that mechanical properties, obtained from a same technique and test, can be compared only if it concerns equilibrium data or dynamic data obtained at a similar loading rate.

### 2.3.3. *Non-linearity, heterogeneity and anisotropic behaviors*

*Non-linear behavior:* Change in mechanical behavior of AC have been shown with increasing loads. The stress (or strain) hardening is an increase in rigidity of AC with the increasing load (Chen et al., 2001; Park et al., 2009). This means that for the same increment in displacement, the increment in force will be even greater as the initial displacement is great (Fig. 2, dotted curve), hence the nonlinear behavior of articular cartilage. In particular, a gradual recruitment of COL II fibers and their change in orientation increases their tension resistance, even more that COL II fibers have a non-linear behavior (Responde et al., 2007; Sun et al., 2004). Moreover, the structural or geometrical nonlinearity is due to the crosslinks' recruitment during stretching. In some case, after the total recruitment of fiber network, the stiffness of the tissue does not change. These samples have a toe-region with a non-linear behavior then a linear behavior (Fig. 2, dashed curve) (Beck et al., 2016). Finally, the reorganization of ECM during compression changes the way that fluid phase can flow or the solid phase can dump and create a non-linear evolution of time-dependent behaviors (Boschetti and Peretti, 2008; Jurvelin et al., 2003).

*Anisotropic behavior:* In native AC, the orientation of type II and type VI collagen fibers is different in the three zones meaning that mechanical properties should be direction dependent.

*Heterogeneity:* Gradients of COL II fibers and PG with depth and the different compositions of AC in its regions lead to variation of mechanical properties in the tissue. Moreover, the organization of COL II fibers changes with depth which implies that anisotropy also changes with depth.

To summarize, the components and the complex structure of AC leads to time-independent and time dependent behaviors, which vary in the tissue according to its deformation during loads, anisotropy and heterogeneity.

### **3. Commonly used models and parameters to estimate articular cartilage mechanical properties**

The mechanical behaviors of AC presented in the previous section were shown consistent with its functions. However, theoretical modeling is needed to describe the mechanical behaviors of AC with adapted parameters then quantify its mechanical properties. Simple models, with significant assumptions, or complex models, which better describe the behavior of the AC, can be used, but with caution to their respective domains of relevance. In each case, several techniques and methods of characterization can be used depending on the mechanical properties investigated (Table 1).

#### ***3.1. Techniques, models, and parameters to assess the elastic properties of AC***

The biomechanical properties of cartilage are widely evaluated in most of the studies involving cartilage engineering. In many cases, cylindrical biopsies are used for measuring compression- and shear stress-responsive forces.

##### ***3.1.1. Parameters for the characterization of the elastic nature of cartilage: Young's modulus, Aggregate modulus, Shear modulus and Poisson ratio***

In most studies, AC is considered like a purely elastic material (neither poroelastic nor viscoelastic). The transient (time-dependent) responses of samples to mechanical load is not considered at this point. This assumption helps to simplify models used to estimate mechanical properties and to get comparative values between studies since the rate of deformation is not taken into account. To achieve these time-independent characterizations, one must apply mechanical loading at very low rate ( $10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ ) so that time-dependent responses are invisible, or wait for the mechanical response to remain constant (no evolution in time, Fig. 3B, #), which is sometimes quite difficult to obtain during experiments (Huang et al., 2003; Miller and Morgan, 2010).

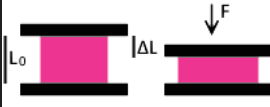
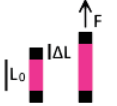
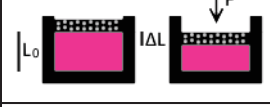
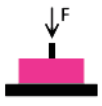
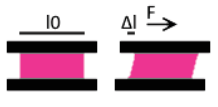

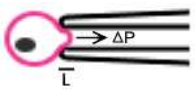
| Name of the technique     | Scheme of the technique   | Stress                   | Strain   | Elastic parameter   | Poisson ratio                          |
|---------------------------|---|--------------------------|--|---|--|
| A Unconfined compression  |    | $\sigma_1 = \frac{F}{S}$ | $\epsilon_1 = \frac{\Delta L}{L_0}, \epsilon_2 = \frac{\Delta l}{l_0}$ | Young's modulus<br>$E = \frac{\sigma_1}{\epsilon_1}$  | $\nu = \frac{-\epsilon_2}{\epsilon_1}$ |
| B Traction                |    | $\sigma_1 = \frac{F}{S}$ | $\epsilon_1 = \frac{\Delta L}{L_0}, \epsilon_2 = \frac{\Delta l}{l_0}$ | Young's modulus<br>$E = \frac{\sigma_1}{\epsilon_1}$  | $\nu = \frac{-\epsilon_2}{\epsilon_1}$ |
| C Confined compression    |    | $\sigma_1 = \frac{F}{S}$ | $\epsilon_1 = \frac{\Delta l}{l_0}, \epsilon_2 = \frac{\Delta L}{L_0}$ | Aggregate modulus<br>$Ha = \frac{\sigma_1}{\epsilon_1}$   |  |
| D Indentation             |    |                          |  | Aggregate modulus<br>$Ha = \frac{3F(1-\nu^2)}{4R^{1/2}\delta^{3/2}}$  |  |
| E Shear                   |    | $\sigma_1 = \frac{F}{S}$ | $\epsilon_2 = \frac{\Delta l}{l_0}$                                    | Shear modulus<br>$G = \frac{\sigma_1}{\epsilon_2}$  |  |
| F Micro/Nano indentation  |   |                          |  | Aggregate modulus<br>$Ha = \frac{3F(1-\nu^2)}{4R^{1/2}\delta^{3/2}}$  |  |
| G Micropipette aspiration |  | $\sigma = \Delta P$      |  | Young's modulus<br>$E = \frac{3a\Delta P\phi(\eta)}{2\pi L}, \eta = \frac{b-a}{a}$<br>$\phi(\eta)$ from the punch model |  |

Table 1 – Non-exhaustive list of techniques used to mechanically characterize articular cartilage. At millimetric scale, mechanical properties of articular cartilage biopsy can be determined with the force applied ( $F$ ), which leads to a stress ( $\sigma$ ) and strains ( $\epsilon$ ) during different mechanical tests. Young's modulus ( $E$ ) and Poisson's ratio ( $\nu$ ) are evaluated with unconfined compression (A) or tension test (B). Aggregate modulus ( $Ha$ ) is determined with confined compression (C) or indentation (D) test. The equation indicated for the evaluation of  $Ha$  with indentation test is valid for spherical tips. Shear modulus ( $G$ ) is evaluated with shear test (E). At microscale, aggregate modulus of the extracellular matrix can be evaluated by micro or nanoindentation (F) with the adapted equation for the spherical tips. Micropipette is a technique used to determine the Young's modulus of chondrocytes of chondrons with the punch model, knowing the difference in pressure applied and the inner ( $a$ ) and outer ( $b$ ) radius of the micropipette.

The simplest mechanical test is the compression test, also called unconfined compression test (Table 1A), where samples are compressed between two planar surfaces. A displacement or a force is applied on the sample, and the force (F) delivered by the sample or its length (L<sub>1</sub>), respectively, is measured. Knowing the surface (S) where the compression is applied and the thickness (L<sub>0</sub>) of the sample, the axial stress (σ<sub>1</sub>, Eq 1) and axial strain (ε<sub>1</sub>, Eq 2) can be deduced. The Young's modulus (E), which characterizes the stiffness (elasticity) of the sample, is given by relating the axial strain (ε<sub>1</sub>) to the axial stress (σ<sub>1</sub>) (Eq 3). The larger the Young's modulus, the stiffer the sample whereas the smaller the Young's modulus, the softer the sample. Measuring the lateral size of the sample (the diameter here) before (l<sub>0</sub>) and after (l<sub>1</sub>) compression is used to determine the lateral strain (ε<sub>2</sub>, Eq 4) and therefore the compressibility of the sample (ν, Poisson's ratio). The compressibility (Eq 5) is given by relating the lateral strain (ε<sub>2</sub>) to the axial strain (ε<sub>1</sub>). A completely compressible sample (ν=0) does not have lateral expansion during axial compression, so the volume of the sample changes. On the contrary, the volume of an incompressible sample (when ν=0.5) does not change under compression. Extension in both lateral directions offsets the axial compression. The Young's modulus in tension of AC can also be evaluated with traction test (Table 1B), generally made in the lateral direction of AC since it is a resulting deformation of the tissue during its load, *in vivo*.

$$\sigma_1 = \frac{F}{S} \quad (Eq\ 1), \quad \varepsilon_1 = \frac{L_1 - L_0}{L_0} \quad (Eq\ 2), \quad E = \frac{\sigma_1}{\varepsilon_1} \quad (Eq\ 3), \quad \varepsilon_2 = \frac{l_1 - l_0}{l_0} \quad (Eq\ 4), \quad \nu = \frac{-\varepsilon_2}{\varepsilon_1} \quad (Eq\ 5)$$

The aggregate modulus of AC is measured by confined compression (Table 1C). The sample is compressed in a cylindrical chamber by a rigid porous disk with adjusted diameters to prevent lateral expansion. The aggregate modulus can be determined like the Young's modulus by relating the axial strain (ε<sub>1</sub>) to the axial stress (σ<sub>1</sub>) In this way, the Poisson ratio is forced to be equal to zero. Thus, a relation between the aggregate modulus, the Young's modulus and the Poisson ratio exists (Eq 6). In this case, collagen fibers of AC cannot be stretched, therefore the aggregate modulus characterizes the matrix stiffness with water and PG as major components. The aggregate modulus can be measured during indentation test (Table 1D), when a spherical tips of 0.5 to 3 mm diameter indent the samples by 20 to 250 μm (Antons et al., 2018; Athanasiou et al., 1991; Richard et al., 2013). Due to the high increase in contact area during indentation test, specific equation, depending on the shape of the tips which can also be cylindrical, is needed. For spherical indenter, the equation is given in the Table 1, panel D.

$$Ha = \frac{E(1-\nu)}{(1+\nu)(1-2\nu)} \quad (Eq\ 6)$$

| Technique              | Sample  | Elastic moduli  | Poroviscoelastic parameters   | Reference                   |
|------------------------|---|---|---|-----------------------------|
| Unconfined compression | Femoral head  | $E_{eq} = 0.25 - 0.5 \text{ MPa}$<br>$\nu = 0.15 - 0.3$   |   | Boschetti., 2004            |
|                        | Femoral head  | Normal: $E_{eq} = 0.45 - 0.7 \text{ MPa}$<br>$E_{dyn} = 3 - 10 \text{ MPa}$<br>OA: $E_{eq} = 0.1 - 0.3 \text{ MPa}$<br>$E_{dyn} = 1 - 3 \text{ MPa}$  | Normal :<br>$k = 0.1 - 1 \times 10^{-14} \text{ m}^4/\text{Ns}$<br>OA :<br>$k = 1 - 3 \times 10^{-14} \text{ m}^4/\text{Ns}$  | Boschetti and Peretti, 2008 |
|                        | Femoral head  | $E_{eq} = 1.64 \pm 0.34 \text{ MPa}$<br>$\nu = 0.14 \pm 0.09$   |   | Démarteau, 2006             |
|                        | Knee  | Perpendicular to AC surface:<br>$E_{eq} = 0.581 \pm 0.168 \text{ MPa}$<br>$\nu = 0.158 \pm 0.148$<br>Tangential to AC surface:<br>$E_{eq} = 0.854 \pm 0.348 \text{ MPa}$<br>$\nu = 0.180 \pm 0.046$ |   | Jurvelin, 2003              |
|                        | Femoral condyle or tibial plateau with sous-chondral bone | Normal: $E_{dyn} = 446.6 \pm 417.3 \text{ MPa}$<br>OA: $E_{dyn} = 415.8 \pm 406.3 \text{ MPa}$  |   | Robinson, 2016              |
| Confined compression   | Lateral facet of patella                                  | $H_a\text{-eq} = 0.79 \pm 0.36 \text{ MPa}$   | $k = 0.47 \pm 0.36 \times 10^{-14} \text{ m}^4/\text{Ns}$   | Armstrong and Mow, 1982     |
|                        | Femoral head  | $H_a\text{-eq} = 0.25 - 0.5 \text{ MPa}$  | $k = 0.15 - 0.35 \times 10^{-13} \text{ m}^4/\text{Ns}$   | Boschetti., 2004            |
|                        | Femoral head  | $H_{a0.1}(\text{eq}) = 2.22 \pm 0.65 \text{ MPa}$   | $k = 1.1 \pm 0.6 \times 10^{-15} \text{ m}^2/\text{Pa.s}$   | Démarteau, 2006             |
|                        | Humeral head and glenoid biopsies                         | $H_{a0} = 0.14 \pm 0.06 \text{ MPa}$<br>$H_{a0.16} = 0.174 \pm 0.07 \text{ MPa}$  |   | Huang, 2005                 |
|                        | Knee  | Perpendicular to AC surface:<br>$H_a\text{-eq} = 0.845 \pm 0.383 \text{ MPa}$<br>Tangential to AC surface:<br>$H_a\text{-eq} = 1.237 \pm 0.486 \text{ MPa}$   | Perpendicular to AC surface:<br>$k = 3 - 39 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$<br>Tangential to AC surface:<br>$k = 3 - 15 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ | Jurvelin, 2003              |
| Traction               | Femoral head  | Normal: $E_{dyn} = 12 - 19 \text{ MPa}$<br>$E_{eq} = 7 - 13 \text{ MPa}$<br>OA: $E_{dyn} = 2 - 5 \text{ MPa}$<br>$E_{eq} = 2 - 3 \text{ MPa}$   |   | Boschetti and Peretti, 2008 |
|                        | Humeral head and glenoid                                  | $E_0 = 4.32 \pm 2.98 \text{ MPa}$<br>$E_{0.16} = 33.90 \pm 26.77 \text{ MPa}$   |   | Huang, 2005                 |
| Shear                  | Tibial plateau  | Along depth from AC surface:<br>0 - 500 $\mu\text{m}$ : $G^* = 0.4 - 1 \text{ MPa}$<br>500 $\mu\text{m}$ - : $G^* = 1 - 4 \text{ MPa}$  |   | Buckley, 2010               |
|                        | Talar and femoral locations                               | $G^* = 0.1 - 6 \text{ MPa}$   |   | Henak, 2016                 |
| Indentation            | Posterior femoral condyle                                 | Superficial zone to calcified zone :<br>$E_{dyn} = 0.020 \pm 0.003 \text{ MPa}$<br>$- 6.44 \pm 1.02 \text{ MPa}$  |   | Antons, 2018                |
|                        | Distal femoral head                                       | $H_a\text{-eq} = 0.606 \pm 0.145 \text{ MPa}$   | $K = 1.497 \pm 0.366 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$   | Athanasidou, 1991           |
|                        | Femoral head  | Normal: $E_{eq} = 1.8 \text{ MPa}$<br>$\nu = 0.47$<br>$H = 2.2 \text{ MPa}$<br>OA: $E_{eq} = 0.5 \text{ MPa}$<br>$\nu = 0.47$<br>$H = 0.6 \text{ MPa}$  | Normal:<br>$\mu = 218.7 \text{ MPa.s}$ , $\tau = 16.7 \text{ s}$<br>OA:<br>$\mu = 36.0 \text{ MPa.s}$ , $\tau = 9.0 \text{ s}$  | Richard, 2013               |

Table 2 – Mechanical properties of the human AC measured at the millimetric scale. Young’s modulus (E) and aggregate modulus (Ha) were determined at the equilibrium of AC ( $E_{eq}$  and  $H_a\text{-eq}$ ), when the tissue had the time to creep or relax, or during the load or immediately after its application ( $E_{dyn}$ ), when the tissue showed apparent modulus linked to its elasticity and viscous behaviors. Shear modulus ( $G^*$ ) was measured during cyclic load. Compressibility is characterized by the Poisson’s ratio ( $\nu$ ). When time-dependent behaviors were taken into account, the permeability (k), the viscosity ( $\mu$ ) and relaxation time ( $\tau$ ) were evaluated.

Shear modulus is evaluated with shear tests (Table 1E). The sample is placed between two planar surfaces. A low axial strain is applied to ensure the contact between the sample and both surfaces, then the upper surface is laterally displaced. The stress ( $\sigma_1$ ) applied is deduced from the force (F) and the surface of application (S). Then, the strain is given by relating the displacement of the upper surface ( $\Delta l$ ) to the initial length of the sample ( $l_0$ ) (Eq 7). This setting determines the shear modulus as the ratio between the stress and the strain, as for the Young's modulus (Eq 8).

$$\varepsilon_2 = \frac{\Delta l}{l_0} \text{ (Eq 7)}, G = \frac{\sigma_1}{\varepsilon_2} \text{ (Eq 8)}$$

These four parameters (Young's modulus, aggregate modulus and shear modulus, Poisson's ratio) completely characterize the elasticity of a material for small deformations when it is considered to be isotropic. They differ in the direction of the solicitation (axial or lateral) or in the boundary conditions (confined or unconfined) of the system, but all contribute to define the elastic moduli.

Table 2 recapitulates the different values of the elastic properties of OA and normal human AC which were driven at the millimetric scale. The elastic modulus at equilibrium, at this scale, ranges from 250 kPa to 13 MPa for normal AC. AC can be considered as a soft tissue compared to bone where compression test showed Young's modulus of 17 GPa for the femur (Couteau et al., 2020; Taylor et al., 2002). It can be noticed that Young's modulus obtained in compression where PG and water are the main actors is smaller than those obtained in tension since the response is related to COL II fibers which are stiffer. One explanation of the diversity of the results is the sample origin. AC mechanical properties varied depending on the species and joints and from a light to high weight-bearing area (LWA and HWA, respectively)(Athanasίου et al., 1991). PG are the main component which bear the compressive load whereas collagen fibers resist to the lateral expansion and the swelling of AC in LWA. Thus, compressive modulus is higher in HWA while tensile modulus is higher in LWA (Akizuki et al., 1986; Athanasίου et al., 1991). Caution must be made to the pre-strain state before the mechanical test which influence the equilibrium stiffness due to the non-linear elasticity of AC in the toe-region. The Poisson's ratio ranges from 0.14 to 0.47, with most of the values in the range of 0.14 to 0.18, indicating a compressible behavior. In case of OA, all elastic properties decreased because of the loss of PG, the increase in water content and the fibrillation of collagen fibers (Boschetti and Peretti, 2008; Richard et al., 2013).

### 3.1.2. *Variation of elastic properties of AC*

The elastic moduli determined in full biopsies with one step of load are global measurements that do not necessarily report the complex mechanical behavior of AC, which is crucial for its function. Some examples indicated that more specific methods of analysis than those previously presented are needed to understand and reproduce the elastic nature of AC.

The first noticeable thing is that when compressed, stretched or shear, the stiffness of the AC tissue samples increases with the load (Fig. 2, dotted line). This kind of observation can be made with the previously presented techniques by using several points of a stress-strain curve with a simple load at low rate, or by using multi-creep or multi-relaxation test, where several steps of stress or strain, respectively, are applied and equilibrium stress and strain determined. Thus, the elastic moduli and the compressibility are not constant. In AC, the nonlinearity, with an increase in elastic moduli, was particularly described for small values of strain, in the toe-region (Boschetti and Peretti, 2008; DiSilvestro et al., 2000b; Huang et al., 2005; Jurvelin et al., 2003). Thus, elastic properties are sometimes determined for the smallest strains obtained ( $E_0$ ) then for strains higher than 10% ( $E_{0.16}$  or  $H_{a0.1}$ ) (Table 2). Equations that describe such a behavior are nonlinear (the corresponding models are qualified as hyperelastic). Several hyperelastic models are used like Neo-Hookean, Mooney-Rivlin, Ogden, and discussed in (Brown et al., 2009; Freutel et al., 2014). Hyperelastic models are used to describe this non-linearity by fitting the equilibrium stress and strain results at each level of force or displacement (Brown et al., 2009; Freutel et al., 2014).

In addition to the non-linear behavior of AC, elastic moduli vary depending on directions and zones at millimetric scale. During unconfined compression of articular cartilage disks, radial strains of the disks evolved depending on their direction compared to that of the split line (Démarteau et al., 2006). Thus, the circular surface becomes elliptic (Robinson et al., 2016). Unconfined and confined compression test showed higher Young's modulus and aggregate modulus, respectively, in the direction of collagen fibers than in a perpendicular direction (Table 2). Although collagen fibers computerized in numerical model with only tensile properties (Fortin et al., 1999; Julkunen et al., 2008; Korhonen et al., 2003), experimentations have suggested that by their organization in AC they increase together the Young's modulus in compression of AC in their direction. Two methods showed the increase in Young's modulus or aggregate modulus with depth from the AC surface. An indentation with a spherical tip of 500  $\mu\text{m}$  diameter in a lateral direction along depth of an AC slice showed an progressive increase of aggregate modulus from 20 kPa  $\pm$  3 kPa into the superficial layer

to  $6.44 \pm 1.02$  MPa in the calcified zone (Antons et al., 2018). An increase in the Young's modulus and aggregate modulus with depth was also observed in the axial direction during unconfined and confined compression where strain of different zones through the depth was evaluated (Chen et al., 2001; Laasanen et al., 2003). Moreover, the compressibility was higher in the transitional zone ( $\nu \approx 0.4$ ), where the network of COL II fibers is slacker, compared to the superficial ( $\nu < 0.1$ ) and deep zone ( $\nu \approx 0.15$ ; Laasanen et al., 2003). However, mechanical characterization in tension with strip or biopsy from the superficial, intermediate or deep layers showed an increase in strains (decrease in stiffness) with depth because COL II fibers are less parallel to the articular surface with depth. Thus, the tissue is less retained by fibers in tension (Huang et al., 2005; Woo et al., 1976).

Anisotropy and heterogeneity of AC were investigated in the different zones of AC on microscale. Instrumented atomic force microscope, usually used for very-high-resolution microscopy, allows mechanical indentation on microscale with borosilicate microsphere of  $5 \mu\text{m}$  diameter (Table 1F). Like on the millimetric scale, the aggregate modulus can be determined with the Eq 6. Indentation tests in different direction and zone of pig or rabbit biopsies showed that in the superficial and deep zone, the tissue is stiffer in the direction of COL II fibers whereas the middle zone exhibits subtle anisotropy (McLeod et al., 2013; Tomkoria et al., 2004; Wilusz et al., 2012a). Anisotropic behavior of AC, linked to the organization of COL II fibers, is in adequation with the load born by the tissue. The surface is more subjected to stress in the split line direction while the deep zone of cartilage is more subjected to axial compression. Indentation tests at different depth in AC give contradictory results. In case of high rate of indentation, an increase in stiffness was observed with depth, whereas a decrease of stiffness of AC with depth was obtained with slow indentation (McLeod et al., 2013; Park et al., 2009; Tomkoria et al., 2004). In case of high rate of indentation, fluid does not have time to flow thus the osmotic pressure, which increases with depth because of the increase in PG concentration, is the main reaction to compression forces. In case of low rate of indentation, fluid movements are negligible and only the solid matrix (fibers and PG) stiffness is measured (McLeod et al., 2013). According to the evolution of the COL II fibers and PG concentrations with depth and their respective stiffness ( $E_{\text{Col}} = 384 \pm 50$  kPa,  $E_{\text{pg}} = 22,3 \pm 1,5$  kPa, Loparic et al., 2010), the solid matrix modulus decreased with depth. The results of literature also seem to indicate a difference of one order of magnitude between the elastic moduli estimated on the micrometric scale (1-500 kPa) and the elastic moduli estimated on the millimetric scale (300kPa to 10 MPa) (Table 3). These interesting results have to be confronted to structural explorations with

high magnificence imaging techniques (Kääb et al., 1998; Raub et al., 2008) together with numerical or theoretical models to explain the differences of values of elastic moduli between scales.

| Technique               | Sample   | Elastic moduli   | Porosity or viscoelastic parameters  | Reference         |
|-------------------------|--|--|--|-------------------|
| Indentation (AFM)       | Femoral condyle  | Normal: ECM: $E_{dyn} = 306 \pm 133$ kPa<br>PCM: $E_{dyn} = 104 \pm 51$ kPa.   |  | Darling, 2010     |
|                         | MSC and chondrocytes (from femoral head)                                       | Spherical chondrocytes:<br>$E_{eq} = 0.45 \pm 0.42$<br>Spherical MSC:<br>$E_{eq} = 0.52 \pm 0.60$ kPa<br>Spread chondrocytes:<br>$E_{eq} = 1.0 \pm 1.6$ kPa<br>Spread MSC:<br>$E_{eq} = 2.3 \pm 2.1$ kPa                         |  | Darling, 2008     |
|                         | Femoral condyle  | Normal: PCM: $E_{eq} = 137 \pm 22$ kPa<br>ECM: $E_{eq} = 491 \pm 112$ kPa<br>OA: PCM: $E_{eq} = 96 \pm 16$ kPa<br>ECM: $E_{eq} = 270 \pm 76$ kPa   |  | Wilusz, 2012a     |
| Micropipette aspiration | Chondrocytes in suspension in alginate beads (knees, hips, ankles, and elbows) | Normal chondrocytes:<br>$E_{eq} = 0.5 \pm 0.63$ kPa,<br>OA chondrocytes:<br>$E_{eq} = 0.67 \pm 0.86$ kPa   |  | Jones, 1999       |
|                         | Chondrocytes and chondrons (femoral head)                                      | Normal PCM:<br>Superficial layer:<br>$E_{eq} = 68,9 \pm 18,9$ kPa<br>Deep layer:<br>$E_{eq} = 62,0 \pm 30,5$ kPa<br>OA PCM:<br>Superficial layer:<br>$E_{eq} = 39.1 \pm 19.6$ kPa<br>Deep layer:<br>$E_{eq} = 43.9 \pm 23.0$ kPa |  | Alexopoulos, 2003 |
|                         | Chondrocytes and chondrons (femoral head)                                      | Normal PCM:<br>$E_{eq} = 38.7 \pm 16.2$ kPa<br>$\nu = 0.044 \pm 0.063$<br>OA PCM:<br>$E_{eq} = 23.5 \pm 12.9$ kPa<br>$\nu = 0.030 \pm 0.068$   | Normal PCM:<br>$k = 4.19 \pm 3.78 \times 10^{-17}$ m <sup>4</sup> /Ns<br>OA PCM:<br>$k = 10.2 \pm 9.38 \times 10^{-17}$ m <sup>4</sup> /Ns | Alexopoulos, 2005 |
|                         | Chondrocytes in suspension in alginate beads (knee and hips)                   | $E_{eq} = 0,24 \pm 0,11$ kPa   | $k = 4,2 \times 10^{-15}$ m <sup>4</sup> /Ns   | Trickey, 2000     |

Table 3 – Mechanical properties of the human AC, chondrons or chondrocytes measured on the microscopic scale. Young’s modulus (E) were determined at the equilibrium (eq), when the sample had the time to creep or relax, or during the load or immediately after its application (dyn), when the sample showed apparent modulus linked to its elasticity and viscous behaviors. Compressibility is characterized by the Poisson’s ratio ( $\nu$ ). When time-dependent behaviors were taken into account, permeability (k), viscosity ( $\mu$ ) and relaxation time ( $\tau$ ) were evaluated.

Finally, microscale measurements were made in the regions of AC in order to understand what loadings could be perceived by chondrocytes. In the pericellular matrix (PCM), a fluorescent labelling has displayed a positive gradient of type VI collagen fibers and a negative gradient of perlecan from chondrocytes (Wilusz et al., 2012b). A positive gradient of the elastic modulus from chondrocytes, which is in adequacy with the previous compound distribution, has been shown with the AFM technique (Table 1). Around the PCM, the growing assembly of COL II fibers creates a great increase of the elastic modulus. Finally, from chondrocytes, the stiffness increases and even more at the limit between the PCM and the next regions (Wilusz et al., 2012a) (Table 3). This gradient of stiffness could play a role in the protection of chondrocytes against huge strain or stress but also in the initiation of mechanotransduction signals. The AFM technique can also be used to measure the stiffness of cells and showed that the Young modulus of chondrocytes or MSCs was 2 or 3 order of magnitude lower than the PCM when cells were spread or spherical, respectively (Table 3). Note that the micropipette aspiration technique (Table 1G), widely used to evaluate the mechanical properties of cells, has shown the same mechanical properties for chondrocytes, MSCs and chondrons (PCM) with the AFM technique (Table 3). Again, the decrease of the Young's modulus due to OA has been observed in the PCM but not in chondrocytes (Jones et al., 1999).

### *3.1.3. Characterization of the swelling behavior of AC*

The swelling behavior is rarely analyzed since it is considered as the main phenomenon which explains the elasticity of AC at the equilibrium state. Indeed, the elastic moduli of AC can be related to the rate of change of osmotic pressure with dilatation (Ateshian et al., 2004). Thus, it is generally hidden in the elastic properties of AC. However, in models (multi-phasic, see 3.2.4), where the objective is to take into account physical phenomena to described and model the mechanical behavior of AC (Ateshian et al., 2004; Wilson et al., 2005a), the swelling behavior of AC due to PG can be added by considering an ionic phase. Parameters used in this case are the salt concentration of bathing solutions and proteoglycan fixed-charge density (FCD), which both influence the rate of change of osmotic pressure with dilatation (Ateshian et al., 2004, 2013). The fixed charge density is a molar concentration associated to a number of charges. In AC, FCD increase with depth and decrease with age in accordance with the evolution of PG concentration (Maroudas, 1968). FCD was measured in human articular cartilage by MRI measurement (7 Tesla) and happened to be  $0.18 \pm 0.08$  mEq/mL (Räsänen et al., 2016). Strains were inversely correlated with FCD which experimentally

confirmed the link between elastic moduli of AC and the FCD by their capacity to induce osmotic pressure. In a modeling study, the interval of FCD used for PCM was 0.0 to 0.25 mEq/mL and 0.005 to 0.2 mEq/mL for chondrocytes (Likhitpanichkul et al., 2005).

#### *3.1.4. Extreme mechanical behavior up to AC failure*

The analyses of knee arthroscopies have shown that lesions can occur in articular cartilage, in particular when a too high (i.e., non-physiological) loading is applied. Localized, osteochondral or chondral, or diffused osteoarthritis, osteochondritis dissecans, are mentioned in the study of Widuchowski and co-workers (Widuchowski et al., 2007). COL II fibers have an extreme strain from which they snap. Thus, the disrupted network of COL II fibers threatens the integrity of the tissue. Extreme behavior of articular cartilage was studied by applying high stress in compression or traction (Danso et al., 2014; Kerin et al., 1998; Woo et al., 1976). In case of fibers failure, force delivered by the sample for a given displacement decrease, hysteresis increases due to the increase in energy loss, and residual deformations remain after having released the loading (Kerin et al., 1998). The extreme strain can be called “yield point” (i.e., elasticity limit) since a part of the reversible deformation of the tissue disappeared i.e. initial shape of the tissue cannot be reached again. Failure strain of  $113.8 \pm 25.1\%$  in tension and  $30 \pm 7\%$  in compression, with an indenter of 7 mm diameter, were measured in bovine AC samples (Danso et al., 2014; Kerin et al., 1998). Failure in articular cartilage reduces the mechanical properties of the tissue and can promote chronic diseases.

#### ***3.2. Techniques, models, and parameters to assess viscous properties of AC***

Previously, we saw that articular cartilage can creep or relax due to its viscous behavior. Elastic moduli can be evaluated with the same techniques, during mechanical characterization with simple load at moderate or high rate, with the first stress and strain obtained when the load reaches its plateau during creep, multi-creep, relaxation or multi-relaxation tests or during cyclic tests at different frequencies. But they are “dynamic elastic moduli” which depend on the elasticity of AC and viscous behaviors (flow-independent or flow-dependent) and, therefore are higher than “equilibrium elastic moduli” (Table 2). Indeed, time-dependent behaviors imply that stress depends on time, strain rate and strain history, when the equilibrium is not reached. Considering flow-

independent, flow-dependent or both behaviors, viscoelastic, poroelastic or poroviscoelastic characterization of AC can be made. Finally, multi-phasic models have been developed to understand and reproduce the whole AC mechanical behavior.

### 3.2.1. Viscoelastic characterization

Viscoelastic media have a unique phase and changes in molecular arrangement are the origin of the time dependency (Wahlquist et al., 2017). Rheological models composed of purely elastic springs (to consider the material elasticity) and purely viscous dampers (to consider the energy dissipation) are often used to describe the behavior of viscoelastic materials. Four basic viscous models (Fig. 4), based on combinations of these elements, are mentioned in the literature (Zhou et al., 2016). Up today Zener model, or Standard Linear Solid model, and generalized Maxwell's models are commonly used to describe articular cartilage, PCM or chondrocytes behavior. The first one is able to describe either creep or stress relaxation and recovery compared to simpler models like Maxwell's and Kelvin-Voigt's. The second one takes into account several time constant due to the several viscous elements. One may notice that researchers have also developed many rheological models of viscoelastic materials by combining two or more of the four basic models (Zhou et al., 2016). By fitting experimental data of a creep or relaxation test to the numerical model, the viscosity of the sample can be determined as well as the dynamic and equilibrium elastic modulus and the Poisson's ratio. One study measured a viscosity of 218.7 MPa.s and 36.0 MPa.s in normal and OA human AC samples during an indentation test (Richard et al., 2013). A characteristic time of creep or relaxation can be evaluated and were 16.7 s and 9.0 s for the normal and OA samples. Finally, these parameters depend on strain due to the nonlinear behavior of articular cartilage.

Since articular cartilage is a porous tissue, which presents flow-dependent and flow-independent viscous behavior, viscoelasticity models are generally used to describe the solid phase in poroviscoelastic models (DiSilvestro et al., 2000b; García and Cortés, 2006; Huang et al., 2003). Chondrocytes or PCM are characterized with viscoelasticity model in many studies (Chen et al., 2013; Darling et al., 2008; Leipzig and Athanasiou, 2005; Trickey et al., 2000).

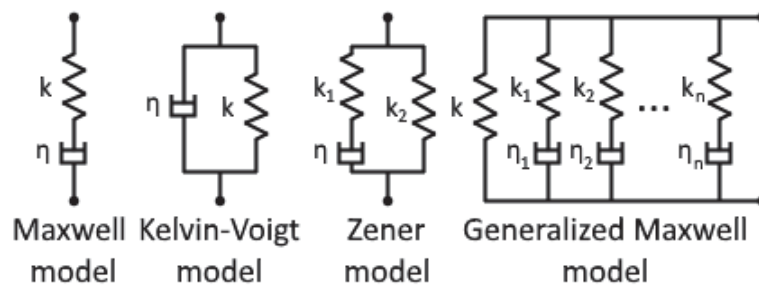


Fig. 4 – Constitutive models of viscoelasticity

### 3.2.2. Poroelastic characterizations

A number of biphasic models are used to describe articular cartilage. Indeed, porous models consider both the fluid (water and solutes) and the solid (PG and COL II fibers) phases of this tissue. Both phases are considered to be incompressible. In a first time, the solid phase can be considered as an elastic material (Huang et al., 2003; Laasanen et al., 2003; Miller and Morgan, 2010; Nia et al., 2011). However, a viscoelastic model is used for the solid phase to consider the flow-independent behavior (DiSilvestro et al., 2000b; García and Cortés, 2006; Huang et al., 2003). At the macroscopic scale, the poroviscoelastic models seem to be appropriate since both behaviors are needed to correctly reproduce axial and lateral response to an unconfined compression test (DiSilvestro et al., 2000b). Moreover, the first part of a creep test is mainly governed by flow-independent mechanism whereas the second part is mainly governed by the flow-dependent mechanism (DiSilvestro et al., 2000a). However, at the microscopic scale, only the flow-dependent mechanism seems to influence creep tests. At this scale, flow-dependent mechanism seems to dominate energy dissipation compared to the few molecular rearrangements and a poroelastic model could be enough to describe articular cartilage time-dependent behavior (Han et al., 2011; Nia et al., 2011; Wahlquist et al., 2017).

Permeability is the characteristic parameter of poroelastic model. It describes the ability of the fluid to escape from the tissue depending on pore size and tortuosity. AC has poor permeability with an order of magnitude between  $10^{-15}$  and  $10^{-13}$   $\text{m}^4/\text{Ns}$ . Moreover, permeability is lower in the superficial and deep zones than in the middle zone (Maroudas, 1968). In the superficial zone, a packing network of thin type II collagen fibers offers more resistance to the flow (Maroudas, 1968). With larger and less organized COL II fibers and a similar amount of proteoglycans, the permeability is greater. Since proteoglycans are responsible for water retention and decreased porosity, the permeability of cartilage decreases from the middle to the deep zone with the increase of

proteoglycans with depth (Maroudas, 1968). A gradient of permeability is also created by the distribution of type VI collagen fibers in the pericellular matrix. The pore size is larger next to chondrocytes than in extracellular matrix regions (Poole et al., 1987). The exchange of nutrients and waste around chondrocytes are certainly facilitated by this organization. Since fluid flow is affected by the orientation of COL II fibers, permeability has also been shown to be anisotropic (Miller and Morgan, 2010). Finally, during compression of AC, the change in orientation of fibers and the reduction of pore size decrease in a nonlinear way (Boschetti and Peretti, 2008; Jurvelin et al., 2003). In case of OA, the loss of PG, fibrillation of COL II fibers increases the pore size and therefore the permeability (Boschetti and Peretti, 2008). This induces easier fluid flow during load and the decrease of dynamic elastic modulus.

### *3.2.3. Fiber-reinforced poroelastic models used to characterize AC*

Fiber-reinforced poroelastic models consider a porous solid phase enriched in fibers, the COL II fibers, and a fluid phase. Since the organization of the COL II fibers is included, the anisotropy of the tissue is taken into account and the solid matrix, PG part, can be modelled as an isotropic material. The unconfined compression tests have shown the significance of this type of model since the results were not fitted by poroelastic models (Fortin et al., 1999). The difference between unconfined and confined compression test is that COL II fibers are stretched only in the first test. Behavior of articular cartilage during nanoindentation were also better represented by fiber-reinforced poroelastic models than isotropic poroelastic models (Nia et al., 2011). Generally, an isotropic incompressible linear elastic model is used for the solid matrix and an incompressible fluid for the fluid phase. Fibers are elastic (Fortin et al., 1999), hyperelastic (Korhonen et al., 2003) or viscoelastic (Julkunen et al., 2008) materials in tension and their orientation are taken into account. The compression behavior of fibers is neglected. Non homogenous structure of articular cartilage is also considered in these models in changing the elastic modulus of the solid phase and fibers and the permeability with depth (Julkunen et al., 2008). In reaching the articular cartilage structure, its behavior can be better described. In particular, this type of model allows us to identify the impact of COL II fibers or PG depletion and therefore their role (Julkunen et al., 2008; Korhonen et al., 2003). Complex simulations have been compared to experimental data (Korhonen et al., 2003). A loss of PG implies a slight decrease of the dynamic elastic modulus (instantaneous state) of the tissue ( $-17 \pm 11 \%$ ), whereas the equilibrium elastic modulus has really decreased ( $-63 \pm 27 \%$ ). This result states the fact that the osmotic pressure is the main force that can withstand compression at the

equilibrium state and with less PG, less water is retained (Ateshian et al., 2004). A loss of collagen implies a decrease in dynamic and equilibrium elastic modulus ( $-68 \pm 76 \%$  and  $-49 \pm 12 \%$  respectively). Simulations seem to have shown that the affected collagen network increases the pore size and makes the flow of water easier. Links between PG and collagen fibers are cut and increase pore size too. This also implies a loss of PG which decreases the equilibrium elastic modulus. Moreover, COL II fibers participate to the equilibrium state by supporting the radial tension caused by the axial compression. Finally, it seems that PG content mainly influences the equilibrium state whereas collagen content mainly influences the transient state by a change of the permeability.

#### *3.2.4. Multi-phasic models used to characterize AC*

For AC, multi-phasic models include both fluid and solid phases of a classic porous material but also an ionic phase. Indeed, cations are kept by PG that leads to a hypertonic tissue and creates osmotic pressure in the tissue. A balance between osmotic pressure and the tension of fibers implies a pre-stress in the tissue and governs equilibrium state during loading. Moreover, swelling pressure caused by the repulsion of PG's large negative groups can be taken into account. Wilson group (Wilson et al., 2005a) presents a fiber-reinforced tri-phasic model composed of an incompressible linear elastic solid phase, nonlinear viscoelastic model for primary and secondary fibers (see 2.1), an incompressible fluid phase, and an ionic phase where the swelling pressure depends on osmotic pressure and molecular extension. With this model, several parameters can be identified: Young's modulus and Poisson's ratio of the solid matrix, elastic modulus and viscosity of fibers, an amount of primary and secondary fibrils, permeability and other material constants. This complex model seems to well represent the articular cartilage behavior since the fit of different mechanical tests were validated. Quadri-phasic or tri-phasic models have been defined according to whether or not the anion and cation are taken into account separately. According to the more detailed review of Klika (Klika et al., 2016), swelling behavior of articular cartilage would be better described by quadri-phasic models.

Both last sections showed that mechanical properties of AC can be determined with different techniques and different test. For comparative study or preliminary analyses different hypotheses can be made in order to simplify the experimental methods and the data analysis. Thus, AC can be considered homogeneous, isotropic, linearity after the toe region ( $> 10\%$  of strain). So far models

that fit best the mechanical behavior of AC are fibre-reinforced poroviscoelastic models, anisotropic poroviscoelastic models or tri/quadri-phasic models. For global analysis of the tissue, anisotropy, nonlinear elasticity, nonlinear permeability, non-homogeneous distribution of components or various elasticity with depth are needed (Seifzadeh et al., 2011). In some cases, simpler viscoelasticity or elasticity models are used and succeed in fitting creep or relaxation tests. As we saw previously, viscoelasticity and pure elasticity are cases of poroelasticity. Thus, for multi-creep or multi-relaxation tests, a purely hyperelastic model can be used to describe the evolution of instantaneous or equilibrium strain (stress respectively) depending on the stress (strain respectively) applied. However, one important point concerns the dynamic and equilibrium elastic moduli. The influence of the rate of loading is clear when normal human AC biopsy has been loaded at 0.2%/s and 20%/s and the dynamic moduli obtained in compression have been 3 - 10 MPa and  $446.6 \pm 417.3$  MPa, respectively (Boschetti and Peretti, 2008; Robinson et al., 2016). This evaluation is interesting in comparative studies since in both studies the dynamic elastic modulus has been reduced in case of OA. This indicates that alteration of the composition and structure of AC during OA has affected both time-independent and time-dependent behavior of AC and its capacity to bear mechanical shocks. However, the comparison of these two moduli does not make sense contrary to the comparison of equilibrium elastic modulus which depends only on the intrinsic stiffness of samples. For slow creep or relaxation tests, poroelasticity or eventually poroviscoelasticity are preferred since flow of fluids are known in AC. Viscoelastic models could be used alone in a specific case, when the rate of fluid flow is similar to the deformation rate of the solid matrix but this critical rate is not known. A more detailed discussion about mechanical model for soft tissue is available in Freutel's review (Freutel et al., 2014).

Anyway, we have to be careful with the experimental conditions since the environment and the preparation of samples may change the estimated mechanical properties.

### ***3.3. Influence of experimental environmental parameters and of the sample preparation on AC mechanical properties.***

Tissue preservation before testing is a real issue since tests cannot always be made on fresh tissues. Contradictory data exist on the impact of cryopreservation on the mechanical properties of cartilage biopsies. On the one hand, a number of studies report absence of mechanical alteration on tissues preserved either at 4°C for 6 days, frozen at -20°C, in DMSO at -20°C or at -80°C (Changoor

et al., 2010; Kiefer et al., 1989; Zheng et al., 2009). Accordingly, similar mechanical properties for high frequencies were recorded for bovine samples stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  or  $-80^{\circ}\text{C}$  and thawed at  $37^{\circ}\text{C}$  (Szarko et al., 2010). On the other hand, the elasticity and permeability of cartilage samples from dogs and pigs decreased and increased, respectively, when preserved at  $4^{\circ}\text{C}$  during 12 days or when frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-80^{\circ}\text{C}$  (Changoor et al., 2010; Willett et al., 2005; Zheng et al., 2009). Tissue freezing can be used to prepare samples for analysis (AFM for instance), but the same preservation protocol has to be used to compare samples with respect to possible modifications related to freezing (Laasanen et al., 2003).

Modification of the composition of AC sample by enzymatic degradation can be used to evaluate the role of molecule in the mechanical behavior of AC (Li et al., 2001; Robinson et al., 2016). The type VII Collagenase degrades COL II fibers whereas chondroitinase ABC degrades PG and trypsin can be used to degrade both networks (Korhonen et al., 2003; Laasanen et al., 2003). We have to be aware of the collagen degradation which implies minor loss of PG. Indeed, PG are linked to COL II fibers and retained by them in the tissue. The depletion of PG is also a way to modify the osmotic pressure in the tissue.

The influence of two major environmental parameters has been evaluated: temperature and the tonicity of the sample bath. In healthy humans, a median temperature between  $31.4$  and  $32.8^{\circ}\text{C}$  has been measured in the knee intra-articular space (Becher et al., 2008; Horvath and Hollander, 1949). After 60 min of jogging or walking, an increase of  $7.9^{\circ}\text{C}$  or  $3.6^{\circ}\text{C}$  has been respectively shown while a decrease of  $2.5^{\circ}\text{C}$  has been noticed after 60 min of skiing. Thus, sport activity increases the temperature in joints but the environmental temperature can also have an impact (Abdel-Sayed et al., 2014b; Kim et al., 2002; Weinberger et al., 1989). Studies have demonstrated an increase in both dynamic and equilibrium stiffness by 150 and 8%, respectively; a faster stress relaxation (60% decrease of the time constant) and a significant higher permeability with increasing temperature (June and Fyhrrie, 2010; Torzilli, 1993). A change of the bath tonicity is a way to evaluate the osmotic pressure of articular cartilage. The role of COL II network and swelling of articular cartilage was highlighted using calibrated solution of polyethylene glycol (Basser et al., 1998). The balance between the osmotic pressure and load have also been shown (Maroudas and Bannan, 1981). The equilibrium elastic modulus decreases with the decrease of fixed charge density in the tissue or the increase of the bath tonicity. Inversely, the equilibrium elastic modulus increases with the increase of fixed charge density in the tissue or the decrease of the bath tonicity (Ateshian et al., 2003; Maroudas and Bannan, 1981).

In short, freeze-thaw cycle, temperature and isotonic bath influence the mechanical properties of samples. The most important for a comparative study is to keep the same protocol for all samples. Results obtained can be different compared to the literature but be discussed depending on these parameters. In addition, enzymatic degradation is an interesting process to evaluate the importance of different components for the mechanical properties. However, the degradation of the targeted molecules is not complete, and the degradation of other molecules can occur.

## **4.Challenges in creating new tissues mimicking AC**

AC cartilage has been described as a porohyperelastic materials with composition and structure gradients that lead to complex mechanical behavior. Today, the challenge concerns the AC repair, as it has poor self-repair capacity. Hopes are turned towards tissue engineering therapy for the replacement of injured tissue by new tissues generally based on biomaterials, cells, and growth factors. Since mechanics is the main function of AC, the mechanical properties of new tissue must be sufficient to bear loads *in vivo* and ensure its viability and the chondrocyte phenotype of cells. The selected studies (Table 4) for the analysis of the mechanical properties of engineered tissues involved new-tissues with or without cells and tested for biocompatibility with human chondrocytes or human mesenchymal stem cells. Some studies with scaffold-free new-tissues were included.

### ***4.1. Parameters investigated in new tissues***

Unconfined compression was the most used technique to evaluate the mechanical properties of new tissue in tissue engineering. Confined compression, tension, shear or indentation tests were more anecdotal. The dynamic and equilibrium elastic moduli were measured and showed that most of the designed biomaterials have poor elastic moduli at the millimetric scale (< 200 kPa). Even after some weeks of cell culture and ECM production, the equilibrium elastic modulus and sometimes the dynamic elastic modulus remain low (Cheng et al., 2008, 2010; Cigan et al., 2016; Concaro et al., 2008; Gullotta et al., 2018; Kim et al., 2018; Levett et al., 2014; Murphy et al., 2012). But the increase of cell concentration in new tissue has considerably increased their elastic moduli in compression (Cigan et al., 2016; Kim et al., 2018). Scaffolds which are more structured than hydrogels seem to show better elastic moduli (Tanaka et al., 2010; Zhou et al., 2017). Increasing the

concentration of component from few % to 10 to 20% could increase the elastic moduli of hydrogels (Roberts et al., 2011). Interestingly, higher mechanical properties in tension and compression were obtained with scaffold-free approaches (Anderson et al., 2017; Ando et al., 2008; Bhumiratana et al., 2014). However, high variability of elastic moduli has been shown depending on the technique used to make the scaffold-free constructs and the cell origin (Anderson et al., 2017; Ando et al., 2008; Bhumiratana et al., 2014; Murphy et al., 2015). Moreover, in some scaffold-free constructs, consisting of human chondroprogenitor cells in hypoxic condition and having a quite good equilibrium elastic modulus associated with an increase in PG and collagen production during 28 days, the dynamic elastic modulus determined on the day 28 was smaller than the equilibrium one (Anderson et al., 2017). This can be explained by lower collagen and PG than that of native mature AC and by a lack of collagen organization.

The dynamic and equilibrium elastic moduli have shown poor time-dependent and time-independent mechanical behavior of new tissues. However, no more mechanical parameters were investigated. Only one group has shown that the permeability in their new tissues remains 10 orders of magnitude higher than the one of AC, which can explain the poor dynamic elastic moduli and seems to be a drawback that has not been taken in account in most of the designs of biomaterials for replacing AC (Cheng et al., 2008, 2010). Another study presents a significant increase in elastic moduli ( $E_{dyn}$ ,  $E_{eq}$  and  $E^*$ ) and relaxation time due to the matrix production of cells in the scaffold during 3 weeks (Gullotta et al., 2018). However, the increase in viscous behavior of this tissue remains limited again since the  $E_{eq}$  and  $E_{dyn}$  are not significantly different. Finally, few studies analyze the failure stress or failure strain which has to be verified to minimize the risk of failure during solicitations *in vivo*. A failure strain of 31% in compression is similar to what observed in bovine AC (Danso et al., 2014). Moreover, the failure stress has increased with time showing an increase in tension resistance of free-scaffold constructs (Ando et al., 2008).

Few studies have managed to design a biomaterial that has proper mechanical properties with elastic moduli higher than 1 MPa (Tanaka et al., 2010; Zhou et al., 2017). However, knowing that lineage of cells is influenced by the surrounding matrix stiffness, one can wonder if higher mechanical properties could limit chondrogenesis of MSC or favor the dedifferentiation of chondrocytes (Olivares-Navarrete et al., 2017; Steward and Kelly, 2015). In the study of Zhou and Tanaka groups, gene expression or protein production were in favor of the hyalin cartilage development. One hypothesis is that like in AC, a gap exists between mechanical properties of these scaffolds on the millimetric and microscopic scale. Thus, the global mechanical properties which

were measured could be different, and higher, than those perceived by the cells. Further analyses of these new tissues are needed at microscale level in a biochemical and biomechanical manner to verify this hypothesis. Moreover, the mechanical properties of these scaffolds were not followed with seeded cells. Although neo-tissue with low initial mechanical properties or scaffold free showed increase of their elastic moduli with time, the evolution of mechanical properties of the scaffold with better initial mechanical properties remains elusive. Indeed, authors described a good synchronization between the degradation of PLGA matrix and the synthesis of AC matrix. However, these matrices must have different mechanical properties and the mechanical properties of these new tissues could increase or decrease due to this remodeling.

To sum it up, efforts have been made in mechanical characterization of new engineered tissue by analyzing different elastic moduli which give information about the time-independent and time-dependent behavior of AC. However, these data are not sufficient to understand how to improve the mechanical properties of these new tissues. First, multi-scale modelling seems needed to understand and describe the different mechanical properties observed in AC and which could be a key factor for the development of new engineered tissue which could have high elastic properties at the millimetric scale and relatively soft mechanical properties at the microscopic scale so that cells can produce the specific matrix of AC. Then, limits in terms of solicitations of these new tissues have to be measured in order to limit the risk of failure during load in vivo. Interestingly enough, predictive model based on observed strain is in development (Henak et al., 2017). Finally, the mechanical properties of new tissue need to be followed meanwhile, since remodeling occurs in the tissue. This can be made relatively easy in vitro. However, the techniques used imply the main development of new tissue in vivo. This introduces to the monitoring issues of implants in vivo.

| Technique              | Sample  | Elastic moduli   | Poro or viscoelastic parameters  | Reference         |
|------------------------|---|--|--|-------------------|
| Confined compression   | hASC porcine ECM scaffold                           | Ha-eq = 41 kPa (D0), 79 kPa (D28), 151 kPa (D42)   | $k = 0.33 \times 10^{-12} \text{ m}^4/\text{Ns}$ (D0), $0.055 \times 10^{-12} \text{ m}^4/\text{Ns}$ (D42)                               | Cheng., 2008      |
|                        | hAC porcine ECM scaffold                            | Ha-eq = 40 kPa (D7), 21 kPa (D28)  | $k \approx 0.028 \times 10^{-12} \text{ m}^4/\text{Ns}$ (D7), $0.0055 \times 10^{-12} \text{ m}^4/\text{Ns}$ (D28)                       | Cheng, 2010       |
| Indentation            | Scaffold<br>PLLA<br>PLGA                            | $E^*(\text{PLLA}) \approx 28 \text{ MPa}$<br>$E^*(\text{PLGA}) \approx 15 - 25 \text{ MPa}$<br>$E^*(\text{native}) \approx 16 \text{ MPa}$   |  | Tanaka, 2010      |
| Shear                  | hAC<br>Chitosan hydrogel                            | $G^* = 9.6 \text{ kPa}$ (D14), $14.6 \text{ kPa}$ (D28)  |  | Concaro, 2008     |
| Traction               | synovial derived-hMSC Scaffold free                 | $E_{\text{dyn}} \approx 3.5 \text{ MPa}$ (D14), $5 \text{ MPa}$ (D21)<br>Failure stress $\approx 0.1 \text{ MPa}$ (D7), $0.8 \text{ MPa}$ (D14), $1.35 \text{ MPa}$ (D21)  |  | Ando, 2008        |
|                        | hAC Scaffold free                                   | $E_{\text{dyn}} = 660 \pm 251 \text{ kPa}$ (hAC)<br>Failure stress = $292 \pm 113 \text{ kPa}$ (hAC)   |  | Murphy, 2015      |
| Unconfined compression | hAC and hACP (chondroprogenitors) Scaffold free     | $E_{\text{eq}}(\text{hAC}) < 100 \text{ kPa}$ (D28)<br>$E_{\text{eq}}(\text{hACP}) = 100 - 1000 \text{ kPa}$ (D28)<br>$E_{\text{dyn}} \approx 200 - 500 \text{ kPa}$ (D28)   |  | Anderson, 2017    |
|                        | hMSC Scaffold free                                  | $E_{\text{dyn}} = 788 \pm 200 \text{ kPa}$ (D3), $825 \pm 197 \text{ kPa}$ (D5), $457 \pm 46 \text{ kPa}$ (D7)   |  | Bhumiratana, 2014 |
|                        | hAC, TGF- $\beta$ 3 2% Agarose hydrogel             | Impact of TGF- $\beta$ 3, 20 mcells/tissues :<br>D14: $E_{\text{eq}} \approx 14 \text{ kPa}$<br>D42: $E_{\text{eq}}(\text{continual TGF-}\beta$ 3) $\approx 37 \text{ kPa}$<br>$E_{\text{eq}}(\text{TGF stopped at D14}) \approx 20 \text{ kPa}$<br>90 mcells/construct :<br>D28: $E_{\text{eq}} = 254 \pm 22 \text{ kPa}$<br>$E^* = 945 \pm 65 \text{ kPa}$ |  | Cigan, 2016       |
|                        | hMSC Equin COL I scaffold                           | D21:<br>$E_{\text{eq}}(\text{scaffold}) = 1.31 \pm 0.57 \text{ kPa}$<br>$E_{\text{eq}}(\text{scaffold} + \text{hMSC}) = 8.33 \pm 3.28 \text{ kPa}$<br>$E^*(\text{scaffold}) = 2.81 \pm 0.48 \text{ kPa}$<br>$E^*(\text{scaffold} + \text{hMSC}) = 55.87 \pm 9.84 \text{ kPa}$  | D21:<br>$\tau_{1/2}(\text{scaffold}) = 24.7 \pm 4.5 \text{ s}$<br>$\tau_{1/2}(\text{scaffold} + \text{cells}) = 48.7 \pm 11.7 \text{ s}$ | Gullotta, 2018    |
|                        | hMSC (20 or 60 mcells/mL) MeHA (1.5 or 2%) hydrogel | $E_{\text{eq}} = 30 - 53 \text{ kPa}$ (D56, 20 mcells/mL)<br>$E_{\text{eq}} = 50 - 87 \text{ kPa}$ (D56, 60 mcells/mL)<br>$E_{\text{dyn}} = 0.8 - 1.25 \text{ MPa}$ (D56, 60 mcells/mL)  |  | Kim, 2018         |
|                        | hAC MeHA/MeGel, 1% hydrogel                         | $E_{\text{eq}}(\text{Gel}) = 40 \text{ kPa}$ (D28)<br>$E_{\text{eq}}(\text{hAC-Gel}) = 41 \text{ kPa}$ (D1), $67 \text{ kPa}$ (D28), $86 \text{ kPa}$ (D63)<br>$E_{\text{dyn}} \approx 140 \text{ kPa}$ (D63)<br>Failure stress $\approx 50 \text{ kPa}$ , failure strain $\approx 0.32$ (D63)   |  | Levett, 2014      |
|                        | hAC and hMSC Scaffold free                          | $E_{\text{dyn}} = 231 \pm 25 \text{ kPa}$ (hMSC)<br>$82 \pm 36 \text{ kPa}$ (hAC)<br>$E_{\text{eq}} = 37 \pm 15 \text{ kPa}$ (hMSC)<br>$13 \pm 5 \text{ kPa}$ (hAC).   |  | Murphy, 2015      |
|                        | hMSC ECM porcine (7, 9, 10, 11%) scaffold           | $E_{\text{eq}}(\text{ECM}) = 10 - 35 \text{ kPa}$ (uniform pores)<br>$4 - 21 \text{ kPa}$ (aligned pores)<br>$E_{\text{eq}}(\text{ECM} + \text{hMSC}) = \text{increase to } 20 \text{ kPa}$ (7% ECM), decrease to $15 \text{ kPa}$ (9 and 11% ECM) (D28).  |  | Rowland, 2016     |

|  |   |   |   |
|--|---|---|---|
| hMSC<br>PLCL, Chitosan<br>scaffold                       | Edyn(PLCL) = 84 ± 12.5 kPa<br>Edyn(PLCL/C) = 128 ± 16.9kPa<br>D35 :<br>Edyn(PLCL + hMSC) = 386.3 ± 97.3 kPa<br>Edyn(PLCL/C + hMSC) 753.3 ± 210 kPa<br>Edyn(porc) = 10 MPa avec même para.                           |   | Yang, 2011                                |
| Hydrogel<br>Chitosan (2 or 5%)<br>Bovin ECM (2 or 3%)    | Edyn = 13 - 21 kPa  |   | Nasiri and<br>Mashayekhan,<br>2017        |
| Hydrogel<br>Agarose (10 or 15%)<br>PEG (15 or 20%)       | Eeq(Ag) ≈ 350 - 480 kPa<br>Eeq(PEG) ≈ 200 - 310 kPa<br>E0(Ag) ≈ 800 - 920 kPa<br>E0(PEG) ≈ 190 - 360 kPa<br>E'(Ag) = 1560 - 2110 kPa (10%), 2260 - 3220 kPa (15%)<br>E'(PEG) = 186 - 201 kPa (15%), 536 - 574 (20%) | E''(Ag) = 0.000 kPa (10%),<br>0.105 - 0.140 kPa (15%)<br>E''(PEG) = 0.000 kPa (15%),<br>0.029 - 0.030 kPa (20%) | Roberts, 2011                             |
| Hydrogel<br>Chitosan (2%)<br>Human ECM (0.5, 1,<br>1.5%) | Edyn = 10 - 150 kPa   |   | Sivandzade<br>and<br>Mashayekhan,<br>2018 |
| Scaffold<br>Silk/Silk-CS                                 | Eeq = 1.6 MPa (Silk/2% CS), 1.05 MPa (Silk)   |   | Zhou, 2017                                |

Table 4 – Mechanical properties of new tissue from tissue engineering with human cells at the millimetric scale. Young’s modulus (E) and aggregate modulus (Ha) were determined at the equilibrium of AC (Eeq and Ha-eq), when the tissue had the time to creep or relax, during the load or immediately after its application (Edyn) or during cyclical loads (E\*, G\*), when the tissue showed apparent modulus linked to its elasticity and viscous behaviors. Compressibility is characterized by the Poisson’s ratio (ν). When time-dependent behaviors were taken in account, the permeability (k), the viscosity (μ) and relaxation time (τ) were evaluated.

#### 4.2. Complementary parameters which could become standards

During the last decades, more importance has been given to weakly invasive techniques to evaluate the mechanical properties of biological tissue. These techniques could be interesting for diagnosis and to follow the mechanical properties of an engineered tissue before and after implantation.

New methods of mechanical assessments have derived from existing techniques for imaging or molecular analysis. Ultrasounds have been used for clinical imaging since tissues are distinguished by their stiffness. Thus, greater analysis of ultrasound signals can give information about the stiffness of tissues. Moreover, probe for arthroscopy can include an ultrasound probe for

Petitjean Noémie – Article 1 – In preparation

mechanical testing *in vivo* (Saarakkala et al., 2003). This still invasive technique can give information about cartilage behavior during compression *in vivo*. This type of test was also made *in vitro* (Arabshahi et al., 2018). However, it is always difficult to manage high-frequency ultrasounds and their significant attenuation. Weak scattering signals are obtained (Lopez et al., 2008).

The principle of magnetic resonance used for imaging is now used for elastography. A map of stiffness can be established. Studies deal with shear properties of articular cartilage (Hardy et al., 2005; Lopez et al., 2008). However, due the large shear stiffness of articular cartilage compared to other soft tissues and their thin thickness; spatial resolution has to be improved. Moreover, shear oscillations of high frequencies are needed but it means there is more attenuation of the signal. Near infrared spectroscopy is usually used for chemical analysis of materials. Hanifi et al., (2017) tried to use this technique for mechanical characterization. For now, they found correlation between polyglycolic acid, collagen, PG and water pics with mechanical properties of an engineered tissue.

Optical coherence tomography is a medical imaging used in dermatology, ophthalmology, oncology or cardiology. Blackburn group (Blackburn et al., 2019) showed a map of elastic modulus can be determined for compression and shear tests at difference depth of a 6 mm diameter biopsy. They found the stiffness gradient in depth for compression part again and showed that in shear the superficial part is stiffer.

New techniques of characterisation are based on acoustic or light wave. This suggests limited invasive technique. For now, they are available for biopsy or engineered tissue, but challenges remain for *in vivo* measures. Indeed, access to region of interest *in vivo* can be difficult and all these techniques have a limited exploration depth.

## 5. Conclusion

Articular cartilage is a widely studied complex tissue. It has been shown that conventional simple tests such as load and release cycles in unconfined compression give an insight tissue elasticity. However, as a result of its specific composition and structure, the biomechanical behaviors and properties of AC are complex. AC is mechanically described by its non-linear elasticity, viscosity, permeability and compressibility. A number of theoretical or numerical models were developed to reproduce these behaviors. Thus, many complementary techniques and tests for *in vitro* mechanical characterization have been presented here, in particular techniques at different scales and methods which reveal the poroviscoelastic nature of cartilage.

The dissipative nature of cartilage, closely linked to its poroviscoelastic behavior, is a key point which will enhance the development of new tissues. Several studies have outlined the importance of dissipation, both *in vivo* (Abdel-Sayed et al., 2014b) and *in vitro* on new tissues (Abdel-Sayed et al., 2014a). Nutrition of the cells may be enhanced during mechanical stimulations by finely tuning the dissipative and poroelastic properties of the new tissues.

Another key characteristic of AC is the multi-scale nature of its mechanical properties and behaviors. Thanks to its specific fibrous micro-structure and to the microstructural spatial gradients around the cells, AC exhibits low stiffness at the cellular scale and relatively high stiffness at the structural scale (millimetric scale). This difference of behavior at different scales is not fully understood and further investigations, thanks to multiscale modeling and multi-scale experimental techniques, are needed. This specificity is poorly taken into account in the current developments of biomaterials while it should be.

*In vivo*, traditional imaging used for diagnosis have mainly shown the alteration of the tissue composition whereas structural degradations could be detected earlier. Indeed, we can hypothesize structural degradations must begin before chemical depletions. Moreover, the mechanical properties of this tissue are due to its composition but even more to its structure (Bergholt et al., 2016). Thus, further developments are needed for *in vivo* mechanical characterization. These developments are also suitable in tissue engineering, where the new designed tissues are not optimal in terms of mechanical properties and need further routine characterization. Techniques for mechanical stimulations or characterization *in vitro* are available but *in vivo* there is currently no solution to follow the mechanical evolution of the implant. As for diagnosis, mechanical properties can give a first sign of right or wrong evolution of the implant. Thus, appropriate care and rehabilitation could be provided for.

## 6. Bibliography

- Abdel-Sayed, P., Darwiche, S.E., Kettenberger, U., Pioletti, D.P., 2014a. The role of energy dissipation of polymeric scaffolds in the mechanobiological modulation of chondrogenic expression. *Biomaterials* 35, 1890–1897. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.048>
- Abdel-Sayed, P., Moghadam, M.N., Salomir, R., Tchernin, D., Pioletti, D.P., 2014b. Intrinsic viscoelasticity increases temperature in knee cartilage under physiological loading. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 30, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.10.025>
- Akizuki, S., Mow, V.C., Müller, F., Pita, J.C., Howell, D.S., Manicourt, D.H., 1986. Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus. *Journal of Orthopaedic Research* 4, 379–392. <https://doi.org/10.1002/jor.1100040401>
- Alexopoulos, L.G., Haider, M.A., Vail, T.P., Guilak, F., 2003. Alterations in the mechanical properties of the human chondrocyte pericellular matrix with osteoarthritis. *J Biomech Eng* 125, 323–333.
- Alexopoulos, L.G., Williams, G.M., Upton, M.L., Setton, L.A., Guilak, F., 2005. Osteoarthritic changes in the biphasic mechanical properties of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage. *J Biomech* 38, 509–517. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.04.012>
- Alford, J.W., Cole, B.J., 2005. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med* 33, 295–306. <https://doi.org/10.1177/0363546504273510>
- Anderson, D.E., Markway, B.D., Weekes, K.J., McCarthy, H.E., Johnstone, B., 2017. Physioxia Promotes the Articular Chondrocyte-Like Phenotype in Human Chondroprogenitor-Derived Self-Organized Tissue. *Tissue Engineering Part A* 24, 264–274. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0510>
- Ando, W., Tateishi, K., Katakai, D., Hart, D.A., Higuchi, C., Nakata, K., Hashimoto, J., Fujie, H., Shino, K., Yoshikawa, H., Nakamura, N., 2008. In Vitro Generation of a Scaffold-Free Tissue-Engineered Construct (TEC) Derived from Human Synovial Mesenchymal Stem Cells: Biological and Mechanical Properties and Further Chondrogenic Potential. *Tissue Engineering Part A* 14, 2041–2049. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0015>
- Antons, J., Marascio, M.G.M., Nohava, J., Martin, R., Applegate, L.A., Bourban, P.E., Pioletti, D.P., 2018. Zone-dependent mechanical properties of human articular cartilage obtained by indentation measurements. *J Mater Sci Mater Med* 29, 57. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6066-0>
- Arabshahi, Z., Afara, I.O., Moody, H.R., Schrobback, K., Kashani, J., Fischer, N., Oloyede, A., Klein, T.J., 2018. A new mechanical indentation framework for functional assessment of articular cartilage. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 81, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.02.028>
- Armstrong, C.G., Mow, V.C., 1982. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. *J BJS* 64, 88.
- Ateshian, G.A., Chahine, N.O., Basalo, I.M., Hung, C.T., 2004. The correspondence between equilibrium biphasic and triphasic material properties in mixture models of articular cartilage. *Journal of Biomechanics* 37, 391–400. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(03\)00252-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(03)00252-5)

- Ateshian, G.A., Hung, C.T., 2006. The natural synovial joint: Properties of cartilage. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J: Journal of Engineering Tribology* 220, 657–670. <https://doi.org/10.1243/13506501JET86>
- Ateshian, G.A., Maas, S., Weiss, J.A., 2013. Multiphasic Finite Element Framework for Modeling Hydrated Mixtures With Multiple Neutral and Charged Solutes. *J Biomech Eng* 135. <https://doi.org/10.1115/1.4024823>
- Ateshian, G.A., Soltz, M.A., Mauck, R.L., Basalo, I.M., Hung, C.T., Michael Lai, W., 2003. The Role of Osmotic Pressure and Tension-Compression Nonlinearity in the Frictional Response of Articular Cartilage. *Transport in Porous Media* 50, 5–33. <https://doi.org/10.1023/A:1020618514874>
- Athanasίου, K.A., Rosenwasser, M.P., Buckwalter, J.A., Malinin, T.I., Mow, V.C., 1991. Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* 9, 330–340. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090304>
- Basser, P.J., Schneiderman, R., Bank, R.A., Wachtel, E., Maroudas, A., 1998. Mechanical properties of the collagen network in human articular cartilage as measured by osmotic stress technique. *Arch. Biochem. Biophys.* 351, 207–219. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0507>
- Becher, C., Springer, J., Feil, S., Cerulli, G., Paessler, H.H., 2008. Intra-articular temperatures of the knee in sports – An in-vivo study of jogging and alpine skiing. *BMC Musculoskelet Disord* 9, 46. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-9-46>
- Beck, E.C., Barragan, M., Tadros, M.H., Gehrke, S.H., Detamore, M.S., 2016. Approaching the compressive modulus of articular cartilage with a decellularized cartilage-based hydrogel. *Acta Biomaterialia* 38, 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.04.019>
- Benninghoff, A., 1925. Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. *Z.Zellforsch* 2, 783–862. <https://doi.org/10.1007/BF00583443>
- Bergholt, M.S., St-Pierre, J.-P., Offeddu, G.S., Parmar, P.A., Albro, M.B., Puetzer, J.L., Oyen, M.L., Stevens, M.M., 2016. Raman Spectroscopy Reveals New Insights into the Zonal Organization of Native and Tissue-Engineered Articular Cartilage. *ACS Cent. Sci.* 2, 885–895. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.6b00222>
- Bergmann, G., Deuretzbacher, G., Heller, M., Graichen, F., Rohlmann, A., Strauss, J., Duda, G.N., 2001. Hip contact forces and gait patterns from routine activities. *Journal of Biomechanics* 34, 859–871. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(01\)00040-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(01)00040-9)
- Bhumiratana, S., Eton, R.E., Oungoulian, S.R., Wan, L.Q., Ateshian, G.A., Vunjak-Novakovic, G., 2014. Large, stratified, and mechanically functional human cartilage grown in vitro by mesenchymal condensation. *PNAS* 111, 6940–6945. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324050111>
- Bingham, J.T., Papannagari, R., Van de Velde, S.K., Gross, C., Gill, T.J., Felson, D.T., Rubash, H.E., Li, G., 2008. In vivo cartilage contact deformation in the healthy human tibiofemoral joint. *Rheumatology (Oxford)* 47, 1622–1627. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken345>
- Blackburn, B.J., Motavalli, M., Ford, M.R., Welter, J.F., Mansour, J.M., Rollins, A.M., 2019. Ex vivo measurement of biaxial strain distribution in articular cartilage with optical coherence tomography (Conference Presentation), in: *Optical Elastography and Tissue Biomechanics VI*. Presented at the Optical Elastography and Tissue Biomechanics VI, International Society for Optics and Photonics, p. 1088006. <https://doi.org/10.1117/12.2509681>
- Boschetti, F., Pennati, G., Gervaso, F., Peretti, G.M., Dubini, G., 2004. Biomechanical properties of human articular cartilage under compressive loads. *Biorheology* 41, 159–166.
- Boschetti, F., Peretti, G.M., 2008. Tensile and compressive properties of healthy and osteoarthritic human articular cartilage. *Biorheology* 45, 337–344. <https://doi.org/10.3233/BIR-2008-0479>

- Brown, C.P., Nguyen, T.C., Moody, H.R., Crawford, R.W., Oloyede, A., 2009. Assessment of common hyperelastic constitutive equations for describing normal and osteoarthritic articular cartilage. *Proc Inst Mech Eng H* 223, 643–652. <https://doi.org/10.1243/09544119JEIM546>
- Buckley, M.R., Bergou, A.J., Fouchard, J., Bonassar, L.J., Cohen, I., 2010. High-resolution spatial mapping of shear properties in cartilage. *Journal of Biomechanics* 43, 796–800. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.10.012>
- Chen, A.C., Bae, W.C., Schinagl, R.M., Sah, R.L., 2001. Depth- and strain-dependent mechanical and electromechanical properties of full-thickness bovine articular cartilage in confined compression. *Journal of Biomechanics* 34, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(00\)00170-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(00)00170-6)
- Cheng, N.-C., Estes, B.T., Awad, H.A., Guilak, F., 2008. Chondrogenic Differentiation of Adipose-Derived Adult Stem Cells by a Porous Scaffold Derived from Native Articular Cartilage Extracellular Matrix. *Tissue Engineering Part A* 15, 231–241. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0253>
- Cheng, N.-C., Estes, B.T., Young, T.-H., Guilak, F., 2010. Engineered cartilage using primary chondrocytes cultured in a porous cartilage-derived matrix. *Regenerative Medicine* 6, 81–93. <https://doi.org/10.2217/rme.10.87>
- Cigan, A.D., Roach, B.L., Nims, R.J., Tan, A.R., Albrow, M.B., Stoker, A.M., Cook, J.L., Vunjak-Novakovic, G., Hung, C.T., Ateshian, G.A., 2016. High seeding density of human chondrocytes in agarose produces tissue-engineered cartilage approaching native mechanical and biochemical properties. *Journal of Biomechanics* 49, 1909–1917. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2016.04.039>
- Concaro, S., Nicklasson, E., Ellowsson, L., Lindahl, A., Brittberg, M., Gatenholm, P., 2008. Effect of cell seeding concentration on the quality of tissue engineered constructs loaded with adult human articular chondrocytes. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2, 14–21. <https://doi.org/10.1002/term.60>
- Couteau, B., Labey, L., Hobatho, M.C., Sloten, J.V., Arlaud, J.Y., Brignola, J.C., Labey, L., Hobatho, M.C., Sloten, J.V., Arlaud, J.Y., Brignola, J.C., 2020. Validation of a Three Dimensional Finite Element Model of a Femur with a Customized HIP Implant. [WWW Document]. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* 2. <https://doi.org/10.1201/9781003078289-21>
- Danso, E.K., Honkanen, J.T.J., Saarakkala, S., Korhonen, R.K., 2014. Comparison of nonlinear mechanical properties of bovine articular cartilage and meniscus. *Journal of Biomechanics* 47, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.09.015>
- Darling, E.M., Topel, M., Zauscher, S., Vail, T.P., Guilak, F., 2008. Viscoelastic properties of human mesenchymally-derived stem cells and primary osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes. *Journal of Biomechanics* 41, 454–464. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2007.06.019>
- Darling, E.M., Wilusz, R.E., Bolognesi, M.P., Zauscher, S., Guilak, F., 2010. Spatial mapping of the biomechanical properties of the pericellular matrix of articular cartilage measured in situ via atomic force microscopy. *Biophys. J.* 98, 2848–2856. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.03.037>
- Démartean, O., Pillet, L., Inaebnit, A., Borens, O., Quinn, T.M., 2006. Biomechanical characterization and in vitro mechanical injury of elderly human femoral head cartilage: comparison to adult bovine humeral head cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* 14, 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.12.011>
- DiSilvestro, M.R., Zhu, Q., Suh, J.-K.F., 2000a. Biphasic Poroviscoelastic Simulation of the Unconfined Compression of Articular Cartilage: II—Effect of Variable Strain Rates. *J Biomech Eng* 123, 198–200. <https://doi.org/10.1115/1.1351887>

- DiSilvestro, M.R., Zhu, Q., Wong, M., Jurvelin, J.S., Suh, J.-K.F., 2000b. Biphasic Poroviscoelastic Simulation of the Unconfined Compression of Articular Cartilage: I—Simultaneous Prediction of Reaction Force and Lateral Displacement. *J Biomech Eng* 123, 191–197. <https://doi.org/10.1115/1.1351890>
- Du, D., Hsu, P., Zhu, Z., Zhang, C., 2020. Current surgical options and innovation for repairing articular cartilage defects in the femoral head. *Journal of Orthopaedic Translation* 21, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2019.06.002>
- DuRaine, G.D., Brown, W.E., Hu, J.C., Athanasiou, K.A., 2015. Emergence of Scaffold-Free Approaches for Tissue Engineering Musculoskeletal Cartilages. *Ann Biomed Eng* 43, 543–554. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1161-y>
- Eckstein, F., Lemberger, B., Gratzke, C., Hudelmaier, M., Glaser, C., Englmeier, K., Reiser, M., 2005. In vivo cartilage deformation after different types of activity and its dependence on physical training status. *Ann Rheum Dis* 64, 291–295. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.022400>
- Fabry, C., Herrmann, S., Kaehler, M., Klinkenberg, E.-D., Woernle, C., Bader, R., 2013. Generation of physiological parameter sets for hip joint motions and loads during daily life activities for application in wear simulators of the artificial hip joint. *Medical Engineering & Physics* 35, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2012.07.014>
- Fortin, M., Soulhat, J., Shirazi-Adl, A., Hunziker, E.B., Buschmann, M.D., 1999. Unconfined Compression of Articular Cartilage: Nonlinear Behavior and Comparison With a Fibril-Reinforced Biphase Model. *J Biomech Eng* 122, 189–195. <https://doi.org/10.1115/1.429641>
- Freutel, M., Schmidt, H., Dürselen, L., Ignatius, A., Galbusera, F., 2014. Finite element modeling of soft tissues: Material models, tissue interaction and challenges. *Clinical Biomechanics* 29, 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2014.01.006>
- Gao, Y., Zhao, X., Chen, S., Zhang, J., Chen, Z., Jin, Z., 2020. Effects of Daily Activities and Position on Kinematics and Contact Mechanics of Dual Mobility Hip Implant. *J Healthc Eng* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8103523>
- Gullotta, F., Izzo, D., Scalera, F., Palazzo, B., Martin, I., Sannino, A., Gervaso, F., 2018. Biomechanical evaluation of hMSCs-based engineered cartilage for chondral tissue regeneration. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 86, 294–304. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.06.040>
- Han, L., Dean, D., Ortiz, C., Grodzinsky, A.J., 2007. Lateral Nanomechanics of Cartilage Aggrecan Macromolecules. *Biophysical Journal* 92, 1384–1398. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091397>
- Hanifi, A., Palukuru, U., McGoverin, C., Shockley, M., Frank, E., Grodzinsky, A., G. Spencer, R., Pleshko, N., 2017. Near infrared spectroscopic assessment of developing engineered tissues: correlations with compositional and mechanical properties. *Analyst* 142, 1320–1332. <https://doi.org/10.1039/C6AN02167K>
- Hardy, P.A., Ridler, A.C., Chiarot, C.B., Plewes, D.B., Henkelman, R.M., 2005. Imaging articular cartilage under compression—cartilage elastography. *Magnetic Resonance in Medicine* 53, 1065–1073. <https://doi.org/10.1002/mrm.20439>
- Henak, C.R., Bartell, L.R., Cohen, I., Bonassar, L.J., 2017. Multiscale Strain as a Predictor of Impact-Induced Fissuring in Articular Cartilage. *J Biomech Eng* 139, 0310041–0310048. <https://doi.org/10.1115/1.4034994>
- Henak, C.R., Ross, K.A., Bonnevie, E.D., Fortier, L.A., Cohen, I., Kennedy, J.G., Bonassar, L.J., 2016. Human talar and femoral cartilage have distinct mechanical properties near the articular surface. *Journal of Biomechanics* 49, 3320–3327. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2016.08.016>

- Hodge, W.A., Fijan, R.S., Carlson, K.L., Burgess, R.G., Harris, W.H., Mann, R.W., 1986. Contact pressures in the human hip joint measured in vivo. *PNAS* 83, 2879–2883.
- Horvath, S.M., Hollander, J.L., 1949. INTRA-ARTICULAR TEMPERATURE AS A MEASURE OF JOINT REACTION. *J Clin Invest* 28, 469–473. <https://doi.org/10.1172/JCI102092>
- Huang, B.J., Hu, J.C., Athanasiou, K.A., 2016. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. *Biomaterials* 98, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.04.018>
- Huang, C.-Y., Soltz, M.A., Kopacz, M., Mow, V.C., Ateshian, G.A., 2003. Experimental Verification of the Roles of Intrinsic Matrix Viscoelasticity and Tension-Compression Nonlinearity in the Biphasic Response of Cartilage. *J Biomech Eng* 125, 84–93. <https://doi.org/10.1115/1.1531656>
- Huang, C.-Y., Stankiewicz, A., Ateshian, G.A., Mow, V.C., 2005. Anisotropy, inhomogeneity, and tension–compression nonlinearity of human glenohumeral cartilage in finite deformation. *Journal of Biomechanics* 38, 799–809. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.05.006>
- Huey, D.J., Hu, J.C., Athanasiou, K.A., 2012. Unlike Bone, Cartilage Regeneration Remains Elusive. *Science* 338, 917–921. <https://doi.org/10.1126/science.1222454>
- Jones, E.S., 1934. Joint lubrication. *Lancet* 1426–1427.
- Jones, W.R., Ping Ting-Beall, H., Lee, G.M., Kelley, S.S., Hochmuth, R.M., Guilak, F., 1999. Alterations in the Young’s modulus and volumetric properties of chondrocytes isolated from normal and osteoarthritic human cartilage. *Journal of Biomechanics* 32, 119–127. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(98\)00166-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(98)00166-3)
- Julkunen, P., Korhonen, R.K., Herzog, W., Jurvelin, J.S., 2008. Uncertainties in indentation testing of articular cartilage: A fibril-reinforced poroviscoelastic study. *Medical Engineering & Physics* 30, 506–515. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2007.05.012>
- June, R.K., Fyhrie, D.P., 2010. Temperature effects in articular cartilage biomechanics. *Journal of Experimental Biology* 213, 3934–3940. <https://doi.org/10.1242/jeb.042960>
- Jurvelin, J.S., Buschmann, M.D., Hunziker, E.B., 2003. Mechanical anisotropy of the human knee articular cartilage in compression. *Proc Inst Mech Eng H* 217, 215–219. <https://doi.org/10.1243/095441103765212712>
- Kääb, M.J., Gwynn, I.A., Nötzli, H.P., 1998. Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. *J. Anat.* 193 ( Pt 1), 23–34.
- Kerin, A.J., Wisnom, M.R., Adams, M.A., 1998. The compressive strength of articular cartilage. *Proc Inst Mech Eng H* 212, 273–280. <https://doi.org/10.1243/0954411981534051>
- Kim, M., Erickson, I.E., Huang, A.H., Garrity, S.T., Mauck, R.L., Steinberg, D.R., 2018. Donor Variation and Optimization of Human Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis in Hyaluronic Acid. *Tissue Engineering Part A* 24, 1693–1703. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2017.0520>
- Kim, Y.H., Baek, S.S., Choi, K.S., Lee, S.G., Park, S.B., 2002. The Effect of Cold Air Application on Intra-Articular and Skin Temperatures in the Knee. *Yonsei Medical Journal* 43, 621–626. <https://doi.org/10.3349/ymj.2002.43.5.621>
- Kon, E., Filardo, G., Roffi, A., Andriolo, L., Marcacci, M., 2012. New trends for knee cartilage regeneration: from cell-free scaffolds to mesenchymal stem cells. *Curr Rev Musculoskelet Med* 5, 236–243. <https://doi.org/10.1007/s12178-012-9135-x>
- Kon, E., Perdisa, F., Filardo, G., Andriolo, L., Tentoni, F., Marcacci, M., 2014. Biomaterials for osteochondral reconstruction. *Developing Insights in Cartilage Repair* 99–108. [https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5385-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5385-6_6)
- Korhonen, R.K., Laasanen, M.S., Töyräs, J., Lappalainen, R., Helminen, H.J., Jurvelin, J.S., 2003. Fibril reinforced poroelastic model predicts specifically mechanical behavior of normal, proteoglycan depleted and collagen degraded articular cartilage. *Journal of Biomechanics* 36, 1373–1379. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(03\)00069-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(03)00069-1)

- Laasanen, M.S., Töyräs, J., Korhonen, R.K., Rieppo, J., Saarakkala, S., Nieminen, M.T., Hirvonen, J., Jurvelin, J.S., 2003. Biomechanical properties of knee articular cartilage. *Biorheology* 40, 133–140.
- Levett, P.A., Hutmacher, D.W., Malda, J., Klein, T.J., 2014. Hyaluronic Acid Enhances the Mechanical Properties of Tissue-Engineered Cartilage Constructs. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113216>
- Li, L.P., Buschmann, M.D., Shirazi-Adl, A., 2001. The Asymmetry of Transient Response in Compression Versus Release for Cartilage in Unconfined Compression. *J Biomech Eng* 123, 519–522. <https://doi.org/10.1115/1.1388295>
- Likhitpanichkul, M., Guo, X.E., Mow, V., 2005. The effect of matrix tension-compression nonlinearity and fixed negative charges on chondrocyte responses in cartilage. *Molecular & cellular biomechanics : MCB* 2, 191–204. <https://doi.org/10.3970/MCB.2005.002.191>
- Liu, F., Kozanek, M., Hosseini, A., Van de Velde, S.K., Gill, T.J., Rubash, H.E., Li, G., 2010. In vivo tibiofemoral cartilage deformation during the stance phase of gait. *Journal of Biomechanics* 43, 658–665. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.10.028>
- Liu, X., Zhang, X., Zhong, S., 2019. Motion Capture based Dynamic Assessment of Hip Joint Cartilage Contact Pressure during Daily Activities, in: *ICBBT'19*. <https://doi.org/10.1145/3340074.3340090>
- Lopez, O., Amrami, K.K., Manduca, A., Ehman, R.L., 2008. Characterization of the dynamic shear properties of hyaline cartilage using high-frequency dynamic MR elastography. *Magnetic Resonance in Medicine* 59, 356–364. <https://doi.org/10.1002/mrm.21474>
- Maier, F., Drissi, H., Pierce, D.M., 2017. Shear deformations of human articular cartilage: Certain mechanical anisotropies apparent at large but not small shear strains. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 65, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.08.012>
- Mak, A.F., 1986. The Apparent Viscoelastic Behavior of Articular Cartilage—The Contributions From the Intrinsic Matrix Viscoelasticity and Interstitial Fluid Flows. *J Biomech Eng* 108, 123–130. <https://doi.org/10.1115/1.3138591>
- Maroudas, A., 1968. Physicochemical Properties of Cartilage in the Light of Ion Exchange Theory. *Biophys J* 8, 575–595.
- Maroudas, A., Bannan, C., 1981. Measurement of swelling pressure in cartilage and comparison with the osmotic pressure of constituent proteoglycans. *Biorheology* 18, 619–632. <https://doi.org/10.3233/BIR-1981-183-624>
- Matcher, S.J., 2015. What can biophotonics tell us about the 3D microstructure of articular cartilage? *Quant Imaging Med Surg* 5, 143–158. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2014.12.03>
- McCutchen, C.W., 1962. The frictional properties of animal joints. *Wear* 5, 1–17. [https://doi.org/10.1016/0043-1648\(62\)90176-X](https://doi.org/10.1016/0043-1648(62)90176-X)
- McLeod, M.A., Wilusz, R.E., Guilak, F., 2013. Depth-Dependent Anisotropy of the Micromechanical Properties of the Extracellular and Pericellular Matrices of Articular Cartilage Evaluated via Atomic Force Microscopy. *J Biomech* 46, 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.09.003>
- Miller, G.J., Morgan, E.F., 2010. Use of microindentation to characterize the mechanical properties of articular cartilage: comparison of biphasic material properties across length scales. *Osteoarthritis and Cartilage* 18, 1051–1057. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2010.04.007>
- Murphy, C.M., Matsiko, A., Haugh, M.G., Gleeson, J.P., O'Brien, F.J., 2012. Mesenchymal stem cell fate is regulated by the composition and mechanical properties of collagen–glycosaminoglycan scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*,

- Special Issue on Tissue Engineering 11, 53–62.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.11.009>
- Murphy, M.K., Huey, D.J., Hu, J.C., Athanasiou, K.A., 2015. TGF- $\beta$ 1, GDF-5, and BMP-2 Stimulation Induces Chondrogenesis in Expanded Human Articular Chondrocytes and Marrow-Derived Stromal Cells. *STEM CELLS* 33, 762–773. <https://doi.org/10.1002/stem.1890>
- Nasiri, B., Mashayekhan, S., 2017. Fabrication of porous scaffolds with decellularized cartilage matrix for tissue engineering application. *Biologicals* 48, 39–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.05.008>
- Nia, H.T., Han, L., Li, Y., Ortiz, C., Grodzinsky, A., 2011. Poroelasticity of cartilage at the nanoscale. *Biophys. J.* 101, 2304–2313. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.09.011>
- Olivares-Navarrete, R., Lee, E.M., Smith, K., Hyzy, S.L., Doroudi, M., Williams, J.K., Gall, K., Boyan, B.D., Schwartz, Z., 2017. Substrate Stiffness Controls Osteoblastic and Chondrocytic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells without Exogenous Stimuli. *PLoS One* 12.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170312>
- Oloyede, A., Flachsman, R., Broom, N.D., 1992. The Dramatic Influence of Loading Velocity on the Compressive Response of Articular Cartilage. *Connective Tissue Research* 27, 211–224.  
<https://doi.org/10.3109/03008209209006997>
- Park, S., Costa, K.D., Ateshian, G.A., Hong, K.-S., 2009. Mechanical properties of bovine articular cartilage under microscale indentation loading from atomic force microscopy  
Mechanical properties of bovine articular cartilage under microscale indentation loading from atomic force microscopy. *Proc Inst Mech Eng H* 223, 339–347.  
<https://doi.org/10.1243/09544119JEIM516>
- Park, S., Hung, C.T., Ateshian, G.A., 2004. Mechanical response of bovine articular cartilage under dynamic unconfined compression loading at physiological stress levels. *Osteoarthritis and Cartilage* 12, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2003.08.005>
- Poole, C.A., Flint, M.H., Beaumont, B.W., 1987. Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J. Orthop. Res.* 5, 509–522. <https://doi.org/10.1002/jor.1100050406>
- Prekasan, D., Saju, K.K., 2016. Review of the Tribological Characteristics of Synovial Fluid. *Procedia Technology*, 1st Global Colloquium on Recent Advancements and Effectual Researches in Engineering, Science and Technology - RAEREST 2016 on April 22 & 23 April 2016 25, 1170–1174. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.08.235>
- Räsänen, L.P., Tanska, P., Mononen, M.E., Lammentausta, E., Zbýň, Š., Venäläinen, M.S., Szomolanyi, P., Donkelaar, C.V. van, Jurvelin, J., Trattning, S., Nieminen, M., Korhonen, R., 2016. Spatial variation of fixed charge density in knee joint cartilage from sodium MRI - Implication on knee joint mechanics under static loading. *Journal of biomechanics* 49, 3387–3396. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2016.09.011>
- Raub, C.B., Unruh, J., Suresh, V., Krasieva, T., Lindmo, T., Gratton, E., Tromberg, B.J., George, S.C., 2008. Image Correlation Spectroscopy of Multiphoton Images Correlates with Collagen Mechanical Properties. *Biophysical Journal* 94, 2361–2373.  
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120006>
- Responde, D.J., Natoli, R.M., Athanasiou, K.A., 2007. Collagens of articular cartilage: structure, function, and importance in tissue engineering. *Crit Rev Biomed Eng* 35, 363–411.
- Richard, F., Villars, M., Thibaud, S., 2013. Viscoelastic modeling and quantitative experimental characterization of normal and osteoarthritic human articular cartilage using indentation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 24, 41–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.04.012>

- Riesle, J., Hollander, A.P., Langer, R., Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G., 1998. Collagen in tissue-engineered cartilage: Types, structure, and crosslinks. *Journal of Cellular Biochemistry* 71, 313–327. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(19981201\)71:3<313::AID-JCB1>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19981201)71:3<313::AID-JCB1>3.0.CO;2-C)
- Roberts, J.J., Earnshaw, A., Ferguson, V.L., Bryant, S.J., 2011. Comparative study of the viscoelastic mechanical behavior of agarose and poly(ethylene glycol) hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 99B, 158–169. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31883>
- Robinson, D.L., Kersh, M.E., Walsh, N.C., Ackland, D.C., de Steiger, R.N., Pandey, M.G., 2016. Mechanical properties of normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 61, 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.01.015>
- Rowland, C.R., Colucci, L.A., Guilak, F., 2016. Fabrication of anatomically-shaped cartilage constructs using decellularized cartilage-derived matrix scaffolds. *Biomaterials* 91, 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.012>
- Rydell, N.W., 1966a. Intravital Measurements of Forces Acting on the Hip-Joint, in: Evans, F.G. (Ed.), *Studies on the Anatomy and Function of Bone and Joints*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 52–68. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-99909-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-99909-3_4)
- Rydell, N.W., 1966b. Forces Acting on the Femoral Head-Prosthesis: A Study on Strain Gauge Supplied Prostheses in Living Persons. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 37, 1–132. <https://doi.org/10.3109/ort.1966.37.suppl-88.01>
- Saarakkala, S., Laasanen, M.S., Jurvelin, J.S., Törrönen, K., Lammi, M.J., Lappalainen, R., Töyräs, J., 2003. Ultrasound indentation of normal and spontaneously degenerated bovine articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 11, 697–705. [https://doi.org/10.1016/S1063-4584\(03\)00154-7](https://doi.org/10.1016/S1063-4584(03)00154-7)
- Seifzadeh, A., Wang, J., Oguamanam, D.C.D., Papini, M., 2011. A Nonlinear Biphasic Fiber-Reinforced Porohyperviscoelastic Model of Articular Cartilage Incorporating Fiber Reorientation and Dispersion. *J Biomech Eng* 133, 081004–081004-8. <https://doi.org/10.1115/1.4004832>
- Sherman, V.R., Yang, W., Meyers, M.A., 2015. The materials science of collagen. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, SI:Collagen mechanics* 52, 22–50. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.05.023>
- Sivandzade, F., Mashayekhan, S., 2018. Design and fabrication of injectable microcarriers composed of acellular cartilage matrix and chitosan. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 29, 683–700. <https://doi.org/10.1080/09205063.2018.1433422>
- Sophia Fox, A.J., Bedi, A., Rodeo, S.A., 2009. The Basic Science of Articular Cartilage. *Sports Health* 1, 461–468. <https://doi.org/10.1177/1941738109350438>
- Steward, A.J., Kelly, D.J., 2015. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J. Anat.* 227, 717–731. <https://doi.org/10.1111/joa.12243>
- Sun, Y.-L., Luo, Z.-P., Fertala, A., An, K.-N., 2004. Stretching type II collagen with optical tweezers. *Journal of Biomechanics* 37, 1665–1669. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.02.028>
- Tanaka, Y., Yamaoka, H., Nishizawa, S., Nagata, S., Ogasawara, T., Asawa, Y., Fujihara, Y., Takato, T., Hoshi, K., 2010. The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte/atelocollagen based tissue-engineered cartilage. *Biomaterials* 31, 4506–4516. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.028>
- Taylor, W.R., Roland, E., Ploeg, H., Hertig, D., Klabunde, R., Warner, M.D., Hobatho, M.C., Rakotomanana, L., Clift, S.E., 2002. Determination of orthotropic bone elastic constants using FEA and modal analysis. *Journal of Biomechanics* 35, 767–773. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(02\)00022-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(02)00022-2)

- Tomkoria, S., Patel, R.V., Mao, J.J., 2004. Heterogeneous nanomechanical properties of superficial and zonal regions of articular cartilage of the rabbit proximal radius condyle by atomic force microscopy. *Medical Engineering & Physics* 26, 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2004.07.006>
- Torzilli, P.A., 1993. Effects of temperature, concentration and articular surface removal on transient solute diffusion in articular cartilage. *Med. Biol. Eng. Comput.* 31, S93–S98. <https://doi.org/10.1007/BF02446656>
- Trickey, W.R., Lee, G.M., Guilak, F., 2000. Viscoelastic properties of chondrocytes from normal and osteoarthritic human cartilage. *J. Orthop. Res.* 18, 891–898. <https://doi.org/10.1002/jor.1100180607>
- Weinberger, A., Fadilah, R., Lev, A., Pinkhas, J., 1989. Intra-articular temperature measurements after superficial heating. *Scand J Rehabil Med* 21, 55–57.
- Widuchowski, W., Widuchowski, J., Trzaska, T., 2007. Articular cartilage defects: Study of 25,124 knee arthroscopies. *The Knee* 14, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.knee.2007.02.001>
- Wilson, W., van Donkelaar, C.C., van Rietbergen, B., Huiskes, R., 2005a. A fibril-reinforced poroviscoelastic swelling model for articular cartilage. *Journal of Biomechanics* 38, 1195–1204. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.07.003>
- Wilson, W., van Donkelaar, C.C., van Rietbergen, R., Huiskes, R., 2005b. The role of computational models in the search for the mechanical behavior and damage mechanisms of articular cartilage. *Medical Engineering & Physics, Advances in the finite element modelling of soft tissue deformation* 27, 810–826. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2005.03.004>
- Wilusz, R.E., DeFrate, L.E., Guilak, F., 2012a. Immunofluorescence-guided atomic force microscopy to measure the micromechanical properties of the pericellular matrix of porcine articular cartilage. *J R Soc Interface* 9, 2997–3007. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0314>
- Wilusz, R.E., DeFrate, L.E., Guilak, F., 2012b. A biomechanical role for perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol.* 31, 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.05.002>
- Woo, S.L.-Y., Akeson, W.H., Jemmott, G.F., 1976. Measurements of nonhomogeneous, directional mechanical properties of articular cartilage in tension. *Journal of Biomechanics* 9, 785–791. [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(76\)90186-X](https://doi.org/10.1016/0021-9290(76)90186-X)
- Yang, Z., Wu, Y., Li, C., Zhang, T., Zou, Y., Hui, J.H.P., Ge, Z., Lee, E.H., 2011. Improved Mesenchymal Stem Cells Attachment and In Vitro Cartilage Tissue Formation on Chitosan-Modified Poly(L-Lactide-co-Epsilon-Caprolactone) Scaffold. *Tissue Engineering Part A* 18, 242–251. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0315>
- Zhou, F., Zhang, X., Cai, D., Li, J., Mu, Q., Zhang, W., Zhu, S., Jiang, Y., Shen, W., Zhang, S., Ouyang, H.W., 2017. Silk fibroin-chondroitin sulfate scaffold with immuno-inhibition property for articular cartilage repair. *Acta Biomaterialia* 63, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.09.005>
- Zhou, Z.R., Jin, Z.M., 2015. Biotribology: Recent progresses and future perspectives. *Biosurface and Biotribology* 1, 3–24. <https://doi.org/10.1016/j.bsbt.2015.03.001>
- Zumwalt, M., Reddy, A.P., 2020. Stem Cells for Treatment of Musculoskeletal Conditions - Orthopaedic/Sports Medicine Applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, Stem Cells and Their Applications to Human Diseases* 1866, 165624. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165624>

## **V.6. Les stimulations biomécaniques comme facteur de croissance mécanique des néo-tissus cartilagineux**

En condition statique (sans stimulus mécanique), la croissance des néo-tissus est limitée, tant d'un point de vue biochimique que biomécanique (Chiang and Jiang, 2009; Dusfour et al., 2020; Ofek et al., 2008). Or, le CA est un tissu soumis à de nombreuses contraintes mécaniques *in vivo*. L'observation du chargement des articulations par imagerie à résonance magnétique a mis en évidence des déformations complexes dont le cisaillement, la compression et la traction (Chan et al., 2016). Des pressions hydrostatiques pourraient avoir lieu au sein du CA du fait de l'augmentation de la pression du fluide interstitiel mais cette hypothèse est encore sujette à des interrogations (Adams, 2006; Elder and Athanasiou, 2009). Ainsi, les stimulations mécaniques pourraient constituer un nouveau facteur de croissance et améliorer la qualité et la durabilité de ces néo-tissus pour se rapprocher du tissu cartilagineux natif. De plus, alors que le micropellet est considéré comme un modèle de croissance du CA, très peu d'études montrent l'impact des stimulations mécaniques pourtant présentes dès le développement embryonnaire (voir V.4.1).

### **V.6.1. Maintien du phénotype chondrocytaire par stimulation mécanique**

Lors de la création de néo-tissus à partir de chondrocytes, il a été montré qu'un cartilage souvent fibreux était obtenu. Au cours de l'expansion cellulaire, permettant d'obtenir un nombre de cellules suffisant pour créer le néo-tissu, les chondrocytes se différencient partiellement. Des facteurs de croissance peuvent être utilisés pour favoriser la re-différenciation des cellules mais l'obtention de chondrocytes matures et fonctionnels reste difficile. L'application de stimuli mécaniques par pressions hydrostatiques, compressions, cisaillements ou tensions pourraient améliorer les propriétés des néo-tissus.

#### **V.6.1.a. Pressions hydrostatiques**

L'impact de stimulations via des pressions hydrostatiques a été le premier effet mécanique étudié. La connaissance de la composition du tissu a mené à l'hypothèse selon laquelle les chondrocytes pouvaient être soumis à des pressions hydrostatiques. En effet, le cartilage comporte de nombreux GAG capables de retenir de l'eau. D'autre part, la compression rapide de biopsie montre que l'eau ne s'échappe pas du tissu par comparaison à une compression lente (Sah et al., 1989). Une augmentation de la pression du fluide interstitiel peut donc avoir lieu et pourrait être à l'origine de ces pressions hydrostatiques. Cependant, l'attraction de l'eau par les GAG est aussi à l'origine des précontraintes du CA. Or, lors du relâchement de ces précontraintes en modifiant la tonicité du bain d'une biopsie, des déformations non uniformes ont été observées (Narmoneva et al., 1999). Plus récemment, les interrogations portent sur la possibilité de générer des pressions hydrostatiques dans une MEC riche en fibres et parcourue par des nanopores qui pourraient créer des pressions différentielles et non homogènes au sein du tissu (Adams, 2006). Néanmoins, de nombreuses études ont montré un impact positif de l'application de pressions hydrostatiques *in vitro* en augmentant la pression du milieu de culture ou par l'intermédiaire d'un gaz (Elder and Athanasiou, 2009).

La pression hydrostatique appliquée ne doit pas être trop grande sous peine d'endommager les cellules. A plus de 30 MPa, la synthèse de MEC par des chondrocytes bovins en monocouche ou dans une biopsie diminue puisqu'une altération de l'appareil de golgi et une dépolarisation des microtubules ont été observées (Hall et al., 1991; Parkkinen et al., 1993b, 1995). Si la sollicitation est cyclique, les altérations sont atténuées (Parkkinen et al., 1993b). A 15 MPa, seulement une partie des cellules étaient sujettes à ces altérations et le nombre diminue encore si la sollicitation est cyclique. La protéine HSP70, qui signe un environnement stressant pour les cellules, est sécrétée, à court terme, lors de l'application de pressions de 50 MPa et, à long terme, de manière croissante à partir de 5 MPa (Takahashi et al., 1998).

Lors de cultures de chondrocytes bovins et humains en monocouche (2D), l'efficacité de stimulations cycliques est reconnue (Ikenoue et al., 2003; Parkkinen et al., 1993a; Smith et al., 1996, 2000). Une meilleure synthèse de PG, GAG, COL II et de TGF $\beta$ 1 endogènes a été observée pour des amplitudes comprises entre 1 et 10 MPa et des fréquences comprises entre de 0,25 et 1 Hz. En dessous de 0,25 Hz, la synthèse de MEC peut être identique à celle d'un échantillon non sollicité, voir inférieure (Parkkinen et al., 1993a). L'accumulation de ces stimulations durant 4 à 8 h par jour et pendant plusieurs jours est favorable (Smith 2000, Ikenoue 2003). Il semble que le temps nécessaire à l'activation de la sécrétion des composants de la MEC par des sollicitations, soit moins long pour les PG que pour le COL II : 1 contre 4 jours (Ikenoue et al., 2003).

Lors de cultures en trois dimensions (3D), des stimulations statiques et cycliques favorisent la synthèse de la MEC. Des stimulations d'une amplitude comprise entre 1 et 10 MPa, une fréquence de 0,25 à 1 Hz durant 1 à 4 heures par jour durant 10 jours à 5 semaines permettent une bonne synthèse de la MEC (Carver and Heath, 1999; Elder and Athanasiou, 2008; Hall et al., 1991; Hu and Athanasiou, 2006; Mizuno et al., 2002; Toyoda et al., 2003a, 2003b). Une étude comparative a montré que sur une construction en 3D de chondrocytes de jeunes bovins sans scaffold, des stimulations statiques d'amplitudes de 5 et 10 MPa augmentaient de manière significative l'accumulation de GAG et de collagène ainsi que les modules d'élasticités en compression confinée ou non confinée (Elder and Athanasiou, 2008). Une stimulation cyclique à 10 MPa et 1 Hz a permis d'augmenter de manière significative l'accumulation de GAG et les modules d'élasticité en compression confinée ou non confinée. La synergie des stimulations mécaniques et biochimiques a été mise en évidence lors de cette étude puisque le module d'élasticité des néo-tissus est multiplié par 1.5 ou 1.2 et l'accumulation de collagène par 2 ou 1.8 lors de l'utilisation de TGF $\beta$ 1 et de stimuli statiques à 10 MPa, par rapport aux néo-tissus sans facteur de croissance ou sans stimulation respectivement.

En résumé, du fait de l'état différencié des chondrocytes, la sécrétion de MEC est possible immédiatement et est augmentée par des stimuli mécaniques de type pression hydrostatique et/ou des facteurs de croissance (Elder and Athanasiou, 2008; Mizuno et al., 2002).

### V.6.1.b. Compressions

*In vivo*, une réduction de l'épaisseur du CA par l'application du poids du corps de l'individu a été observée sous IRM. Ainsi, le CA est naturellement soumis à des compressions axiales (Chan et al., 2016; Eckstein et al., 2006; Halonen et al., 2013). *In situ*, il a été montré que ces compressions déforment les chondrocytes (Choi et al., 2007; Guilak et al., 1999). Il est à noter que ces compressions non confinées, s'accompagnent nécessairement de dilatations dans la direction transverse et d'efforts de cisaillements, non quantifiés dans les études. Afin de comprendre l'impact de ces compressions sur les chondrocytes par le biais de biopsies ou d'améliorer des néo-tissus comportant des chondrocytes, de nombreuses études sur l'animal ont quantifié l'expression des gènes ou l'accumulation de MEC à l'issue de compressions axiales.

Des stimulations statiques ou cycliques par compression entre deux surfaces planes favorisent le phénotype chondrocytaire. Cependant, plusieurs études montrent que les stimulations cycliques sont plus favorables (Elder et al., 2000; Tran et al., 2011). L'amplitude des stimulations est généralement comprise entre 10 et 20 % de déformation, des forces de 0,5 à 20 N ou contraintes de 20 à 40 kPa (Bougault et al., 2012; Grad et al., 2012; Hoenig et al., 2011; Mauck et al., 2000, 2003, 2007; Tran et al., 2011). Une étude sur des biopsies de bovins a montré une variation de l'impact des stimulations d'une amplitude de 1 à 5 % en fonction de la fréquence (Sah et al., 1989). A faible fréquence de stimulations ( $f < 0.001$  Hz), les compressions font sortir le fluide des tissus et inhibent la synthèse de MEC. En revanche, pour des fréquences comprises entre 0,01 et 1 Hz, la pression augmente dans le tissu et la synthèse de la MEC aussi. D'autre part, une variation de l'impact de la fréquence des stimulations a été observée selon que les chondrocytes de bovins appartiennent au cœur ou à la périphérie d'un hydrogel d'agarose (Mauck et al., 2007). Ainsi, des fréquences de 1 et 3 Hz sont favorables aux chondrocytes du cœur tandis que des fréquences de 0,33 et 3 Hz sont plus favorables aux chondrocytes de la périphérie. La durée de stimulation est très variable, de 5 min seulement à 4h par jour. Il a été montré avec des chondrocytes murins dans un gel d'agarose que des stimulations de 5 min pendant 6 jours sont perçues par les cellules dont des voies de mécanotransduction sont activées, et une trentaine de minutes par jour permet déjà de modifier leur expression génique (Bougault et al., 2012). Cependant, l'accumulation des stimulations semble importante pour augmenter la synthèse de la MEC et notamment celle des agrécanes (Mauck et al., 2007). Pour autant, des stimulations continues de chondrocytes bovins dans un gel d'agarose durant 24 ou 48 heures n'ont pas été favorables par comparaison à des stimulations intermittentes (Chowdhury et al., 2003).

Bien que les stimulations aient rapidement un impact sur l'expression des gènes du phénotype chondrocytaire, peu d'articles montrent une réelle accumulation de MEC. En revanche, les propriétés mécaniques de néo-tissus issus de chondrocytes porcins sans scaffold ont augmenté de manière significative grâce à une organisation de la MEC (Hoenig et al., 2011). Après 21 jours de culture (J21) d'un gel d'agarose contenant des chondrocytes bovins, les propriétés mécaniques tendaient à se stabiliser pour des néo-tissus uniquement stimulés mécaniquement ou uniquement en présence de TGF $\beta$  (Mauck et al., 2003). L'accumulation des stimulations biomécaniques et biochimiques a permis une augmentation progressive des paramètres biomécaniques du tissu jusqu'à atteindre une

multiplication par 2 du module d'agrégation à l'équilibre et une contrainte instantanée multipliée par 6 à J35. La sécrétion de GAG a augmenté de manière significative (x1,3 à J21) et l'accumulation de collagène a été multipliée par 2 par rapport au contrôle uniquement stimulé mécaniquement et par 1,1 par rapport au contrôle en présence de TGF $\beta$ 1 uniquement, à J35. Ainsi, les stimulations biomécaniques ou biochimiques via un facteur de croissance de la famille des TGF $\beta$  permettent individuellement le maintien du phénotype chondrocytaire et la sécrétion de MEC mais peuvent agir en synergie. Enfin, cela montre que la compression des néo-tissus réorganise leur structure avant même qu'une augmentation de la sécrétion de MEC, issue de la régulation positive de l'expression des gènes associés, ait lieu. Enfin, une variabilité des résultats est notable d'un néo-tissu à l'autre. Les stimulations mécaniques n'ont parfois aucun effet (Villanueva et al., 2008).

#### V.6.1.c. Cisaillements de la matrice solide et cisaillements fluidiques

Lors du mouvement des articulations, la compression, de manière indirecte, et le glissement entre les cartilages opposés entraîne un cisaillement. Il a été aussi observé que la prise en charge du poids du corps crée à la fois de la compression mais aussi du cisaillement (Chan et al., 2016). Ainsi des études traitent de stimuli en cisaillement seul ou en complément de stimuli en compression.

L'application de contraintes de cisaillement pur par le contact d'une plaque est une tâche difficile. Un article présente un cisaillement de 0,5 à 6% d'une biopsie de CA de bovin à une fréquence de 0,1 Hz (Jin et al., 2003). Généralement, une compression axiale est nécessaire pour maintenir le contact entre le matériau et le tissu. Cette précontrainte correspond à une déformation axiale statique de 5 à 10% (Grad et al., 2012; Meinert et al., 2017; Waldman et al., 2003). Le cisaillement est ensuite appliqué selon une torsion ou un cisaillement simple. La torsion correspond à une rotation de la plateforme supérieure de plus ou moins 25°, soit une amplitude de 50° (Grad et al., 2012). L'amplitude du cisaillement simple varie d'un article à l'autre. A J14, la déformation de 50% en cisaillement, d'un hydrogel de gélatine et d'AH contenant des chondrocytes humains a favorisé la synthèse des gènes chondrocytaires et diminué l'expression du gène *COL 1*, 2 heures après la stimulation (Meinert et al., 2017). A plus long terme, 1 et 4 semaines après le début des stimulations (J28), de faibles déformations (2% seulement) seraient suffisantes à la sécrétion de MEC par des chondrocytes bovins dans un scaffold de phosphate de calcium (Waldman et al., 2003). La fréquence des stimulations est généralement de 0,1 ou 1 Hz. Alors que certains articles ne présentent qu'un cisaillement cyclique (Waldman et al., 2003), d'autres conjuguent cette stimulation avec une compression cyclique de même fréquence (Grad et al., 2012; Meinert et al., 2017). L'utilisation simultanée de ces deux types de stimulation favorise l'obtention de néo-tissus homogènes, augmente leur module d'élasticité mais pas toujours la sécrétion de MEC par comparaison à des stimulations par compression uniquement (Grad et al., 2012; Meinert et al., 2017). Les durées de stimulation sont variables d'une étude à une autre, de 6 minutes à 24h.

Des stimuli par cisaillement sont aussi appliqués sur des biopsies ou des néo-tissus via un flux du milieu de culture (Marsano et al., 2006; Raimondi et al., 2004; Tran et al., 2011; Vunjak-Novakovic

et al., 1999). L'application de flux à la surface des échantillons à un taux compris entre 0,5 et 5 ml/min favorise la sécrétion de GAG et COL II dans la zone superficielle de l'échantillon (Chen et al., 2012; Raimondi et al., 2004; Vunjak-Novakovic et al., 1999). En effet, le flux en surface permet à la fois d'exercer un cisaillement de l'échantillon et favorise les transports à l'intérieur du néo-tissu d'agarose mais selon un gradient négatif avec la profondeur (Chen et al., 2012). Ainsi, une perfusion forcée du néo-tissu favorise un développement plus homogène et l'augmentation de ses propriétés mécaniques (Raimondi et al., 2004; Tran et al., 2011; Vunjak-Novakovic et al., 1999; Zhu et al., 2015). Il a même été montré que l'impact de la perfusion pouvait être similaire à l'application d'une pression hydrostatique ou d'une compression axiale (Tran et al., 2011; Zhu et al., 2015). Le bénéfice des stimulations mécaniques pourrait donc résider en grande partie dans la meilleure nutrition du tissu.

#### V.6.1.d. Tensions

Lors de petites déformations du CA par compression, les fibres se réalignent mais lorsque la déformation est plus importante, elles peuvent être étirées. La mise en tension des cellules dans le CA est une stimulation indirecte qui a lieu selon la direction parallèle à la surface articulaire. En effet, le CA n'étant pas parfaitement compressible, voir proche de l'incompressibilité dans le cas de stimulations rapides, il s'étend latéralement lors d'une compression axiale. L'augmentation de la contrainte en tension est aussi fonction de la concentration en COL II, du nombre de liaisons entre les fibres de collagène ainsi qu'avec les agrécans (Akizuki et al., 1986; Kempson et al., 1973; Schmidt et al., 1990). Ainsi, les cellules peuvent subir une compression dans la direction axiale et une tension dans la direction latérale. La tension n'étant pas la stimulation mécanique prédominante des chondrocytes, peu d'études s'intéressent à leur impact.

Lors de culture de chondrocytes en monocouche (2D), l'application de contraintes en tension par une pression négative sur une chambre de culture n'a pas été favorable à la synthèse et au maintien de la MEC du CA. L'expression des gènes *AGG* et *COL II* a été divisée par 3 et 4 respectivement, à la suite 24 heures de stimulations, tandis que l'expression des gènes *MMP1* et *MMP13* a été multipliée respectivement par 3 et 3,5 (Liu et al., 2016).

Lors de la culture en 3D, deux articles montrent que l'activité synthétique des chondrocytes inclus dans un gel de fibrine a été diminuée par les stimulations en tension, et ce dès une déformation du gel de 1 à 5% (Connelly et al., 2004; Vanderploeg et al., 2004). Ces stimulations ayant été conduites durant au moins 48 h, il est possible que ce soit la durée de la stimulation qui soit délétère plus que la stimulation en elle-même. A contrario, une étude portant sur un néo-tissu de chondrocytes sans scaffold montre la multiplication par 6 du module d'élasticité en tension grâce à des stimulations mécaniques continues durant 5 jours à partir de J7. Cependant, alors qu'une quantification du collagène et des GAG a été faite, aucune donnée ne montre concrètement l'augmentation de la synthèse de ces composants par les cellules. Il est possible que cette amélioration ne soit due qu'à la réorganisation de la MEC, cette fois appuyée par une augmentation significative de l'expression de gènes du remodelage de la MEC (*ADAMTS1*, *LOXL4*). Enfin, ces stimulations permettent d'améliorer les propriétés mécaniques du tissu

en tension et de créer son anisotropie, mais les propriétés en compression restent très faibles par rapport au CA natif (Lee et al., 2017).

En conclusion, les stimulations en tension ne semblent pas être favorables au développement du tissu cartilagineux. Cependant très peu de paramètres de stimulation ont été testés jusqu'à présent.

### *V.6.2. Chondrogenèse des cellules souches mésenchymateuses par stimulation mécanique*

Lors du développement embryonnaire, l'apparition de stimuli mécaniques actifs ou passifs, nécessaires au bon développement de l'articulation et du CA, est précoce. *In vitro*, cela correspond à la stimulation des néo-tissus comportant des CSMs. Les stimulations mécaniques peuvent être appliquées afin d'initier la chondrogenèse des CSMs dès la création des néo-tissus. Elles peuvent aussi être appliquées à la suite d'une période de préculture afin de stimuler des cellules en cours de différenciation et améliorer leur activité synthétique.

#### V.6.2.a. Pressions hydrostatiques

Les stimulations par pressions hydrostatiques sont relativement simples à mettre en place et ce quelle que soit la rigidité du tissu. Du fait de la nature de ces stimulations, les tissus ne subissent pas de grandes déformations. Ainsi, le risque d'altération de leur intégrité est limité. Des CSM-MO, CSM-TA ou CSMs issues de membranes synoviales ont été stimulées lors de culture dans un gel d'agarose ou sous forme de micropellet (Angele et al., 2003; Carroll et al., 2014; Finger et al., 2007; Liu et al., 2013; Meyer et al., 2011; Miyanishi et al., 2006a; Ogawa et al., 2009; Vinardell et al., 2012). Des stimulations dynamiques, d'amplitudes comprises entre 0,1 et 10 MPa à une fréquence de 0,5 ou 1 Hz, 1 ou 4 heures par jour pendant plusieurs jours sont généralement appliquées.

A l'issue de 7 ou 14 jours de stimulation, l'expression des gènes chondrocytaires (*SOX9*, *AGG*, *COL II*) augmente par rapport aux témoins non sollicités à J14 et J21 (Miyanishi et al., 2006a; Ogawa et al., 2009; Vinardell et al., 2012). Il a été noté une légère augmentation de l'accumulation de PG, GAGs et collagène mais celle-ci repose surtout dans la synthèse de la MEC par un plus grand nombre de cellules au cœur du néo-tissu (Angele et al., 2003; Meyer et al., 2011). Ainsi, les néo-tissus soumis à des stimulations mécaniques sont plus homogènes. Ceci implique que les pressions hydrostatiques dynamiques favorisent la chondrogenèse des CSMs et l'organisation du tissu dès sa création. Ces stimulations peuvent être suffisantes pour initier la différenciation des CSMs (Finger et al., 2007), mais cette dernière est bien meilleure lors de l'ajout d'un facteur de croissance de la famille des TGFβ (Miyanishi et al., 2006a). Enfin, les stimulations ne permettent pas, à ce stade, l'augmentation des propriétés mécaniques du néo-tissu (Meyer et al., 2011).

Après 5 à 6 semaines de stimulation à hauteur de 5 fois par semaine durant 1 ou 4 heures par jour, une accumulation significativement supérieure de collagènes et d'agrécans a été observée

notamment au cœur du néo-tissu (Carroll et al., 2014; Meyer et al., 2011). De plus, une semaine de stimulation au début du développement du néo-tissu suffit à augmenter de manière significative l'expression des gènes chondrocytaires et l'accumulation de collagène, PG et GAG à l'issue de 3 à 4 semaines (Angele et al., 2003; Ogawa et al., 2009). Le module d'élasticité à l'équilibre et le module d'élasticité dynamique de néo-tissus ont été mesurés après 5 à 6 semaines de culture en effectuant un test de relaxation en compression à 10 % de déformation et d'un test cyclique à 1 % d'oscillations autour des 10 % de déformation à 1 Hz. Deux études montrent une multiplication par 2 du module d'élasticité dynamique (150 à 300 kPa (Meyer et al., 2011) et 250 à 500 kPa (Carroll et al., 2014)), et une dernière montre une augmentation significative de 50 kPa (Liu et al., 2013). Une seule étude montre une augmentation significative du module d'élasticité à l'équilibre (Carroll et al., 2014). Ceci est en accord avec une augmentation généralement plus importante de la quantité de collagène, qui impacte en majorité le module d'élasticité dynamique, par rapport aux GAG, qui impactent en majorité le module d'élasticité à l'équilibre, dans ces néo-tissus (voir V.5). Ainsi, l'application de pressions hydrostatiques favorise la synthèse de MEC et permet une augmentation des propriétés mécaniques des néo-tissus, mais cela demande quelques semaines.

#### V.6.2.b. Compressions

La stimulation mécanique immédiate des CSMs par compression n'est possible que lorsqu'elles sont incluses dans un hydrogel ou un scaffold. La culture sans support matriciel donne naissance à un néo-tissu ayant de trop faibles propriétés mécaniques durant les premiers jours.

Quel que soit le type de néo-tissu, des stimulations mécaniques cycliques, plus favorables à la différenciation des CSMs en chondrocytes que des stimulations statiques (Mouw et al., 2007), ont été appliquées (Angele et al., 2004; Campbell et al., 2006; Horner et al., 2016; Huang et al., 2010a, 2004; Michalopoulos et al., 2012; Mouw et al., 2007; Pelaez et al., 2008; Thorpe et al., 2010). L'amplitude de déformation de ces stimulations est comprise entre 10 et 15%. Il a même été montré, qu'en milieu ostéogénique, cette gamme d'amplitudes permet la chondrogenèse de CSMs humaines alors qu'une amplitude de 5% favorise l'ostéogénèse. En revanche, une stimulation de 20% conduit à une expression des gènes chondrocytaires plus faible que pour une stimulation à 15%. Ainsi, l'amplitude des stimulations doit être suffisamment importante pour favoriser la chondrogenèse des cellules mais un chargement trop important conduit aussi à une moins bonne différenciation (Horner et al., 2016). Quand une contrainte est appliquée, l'amplitude retenue est comprise entre 7,99 et 9,5 kPa. Les fréquences des stimulations ayant conduit à la différenciation des CSMs sont comprises entre 0,15 et 1 Hz. 1 Hz est la fréquence donnant généralement les meilleurs résultats (Pelaez et al., 2008). Généralement, les stimulations continues sont appliquées de 1 à 4 heures par jour.

Une augmentation de l'expression des gènes *COL II*, *AGG* et *TGFβ1* endogène lors de stimulations mécaniques des CSMs, appliquées dès les premiers jours, a montré la capacité des stimulations mécaniques à induire la différenciation des CSMs (Angele et al., 2004; Huang et al., 2010a, 2004; Pelaez et al., 2008). Deux articles, présentant la stimulation de CSM-MO humaines (cas 1) ou

bovines (cas 2) dans un scaffold d'AH-gélatine ou un hydrogel d'agarose, respectivement, ont montré une régulation positive et croissante de l'expression des gènes *AGG* et *COL II* par rapport au témoin non stimulé, en présence de TGF $\beta$ , de J7 à J14 (Angele et al., 2004; Huang et al., 2010a) mais le niveau d'expression est similaire au témoin non stimulé à J21. D'une part, le cas 1, où la stimulation n'est appliquée que pendant les 7 premiers jours, présente une augmentation de l'accumulation de MEC tandis que le cas 2, où les néo-tissus ont été stimulés 5 jours par semaine pendant 3 semaines montre une accumulation de MEC et des propriétés mécaniques significativement inférieures au témoin non stimulé. Or, une meilleure viabilité cellulaire au cours des 3 premiers jours de culture de CSM-MO humaines dans un gel de fibrine sous stimulations mécaniques suggère que l'augmentation de l'expression des gènes pourrait être due à un plus grand nombre de cellules en différenciation (Pelaez et al., 2008). D'autre part, la mesure de la quantité de GAG sécrétés par ces néo-tissus lors de stimulations 5 fois par semaine pendant 3 semaines, montre une augmentation significative de la quantité de GAG rapporté à la quantité d'ADN à J21, mais les sécrétions se trouvent majoritairement dans le milieu de culture et les néo-tissus ne comportent pas significativement plus de GAG (Schätti et al., 2011). Enfin, l'analyse de l'expression des gènes *AGG*, *COL I* et *COL II* à la suite d'une unique stimulation de CSM-MO bovines dans un gel d'agarose à J8 ou J16 montre une régulation positive de ces gènes uniquement à J16 (Mouw et al., 2007). A plus long terme, la stimulation de CSM-MO bovines dans un hydrogel d'agarose à partir de J21 à raison de 5 fois par semaine pendant 3 semaines a montré de meilleures propriétés mécaniques pour une accumulation de la MEC équivalente mais répartie de manière homogène (Huang et al., 2010a). A contrario, une étude sur des CSM-MO porcines dans un gel d'agarose a montré une inhibition de la chondrogenèse par des stimuli en compression de 1 heure par jour, 5 fois par semaine pendant 6 semaines et pas de modification de la composition et des propriétés mécaniques de la MEC par l'ajout de ces stimuli de la 3<sup>ème</sup> à la 6<sup>ème</sup> semaine (Thorpe et al., 2010). Les auteurs ont même conclu en plébiscitant l'utilisation d'une période de culture plus grande des CSMs en présence d'un facteur de croissance pour former un néo-tissu plus mature avant qu'il puisse percevoir des stimuli mécaniques *in vivo*.

En conclusion, il semble que les stimulations mécaniques précoces et répétées favorisent la différenciation d'un plus grand nombre de cellules et une régulation positive de l'expression des gènes chondrocytaires. Cependant, appliquer ces stimulations durant 3 semaines n'améliore pas les propriétés biochimiques et biomécaniques du néo-tissu puisque les produits de la synthèse des cellules ne sont pas conservés dans le néo-tissu. L'application plus tardive de nouveaux stimuli pourrait favoriser l'organisation de la MEC sécrétée par les cellules déjà différenciées.

#### V.6.2.c. Cisaillements de la matrice solide et cisaillements fluidiques

De même que pour des stimulations en compression, les stimulations en cisaillement nécessitent la présence d'un support matriciel. Elles sont donc appliquées sur des néo-tissus comportant un scaffold ou un hydrogel, ou sur un néo-tissu sans support matriciel ayant eu un temps de prématuration. Seules les stimulations par flux peuvent être appliquées sur tout néo-tissu dès sa création.

L'application de contraintes de cisaillement via contact avec un matériau est généralement accompagnée d'une précontrainte en compression axiale. Cette précontrainte correspond à une déformation axiale de 10% en statique. A ma connaissance, un seul article présente l'impact du seul cisaillement par une torsion oscillatoire d'amplitude 25° (Schätti et al., 2011). Généralement, les articles présentent les résultats associés à une compression cyclique seule, accompagnée d'un cisaillement simple (Huang et al., 2012) ou d'une torsion (Gardner et al., 2017; Li et al., 2009; Neumann et al., 2013, 2015; Schätti et al., 2011). L'ajout d'une compression cyclique de 5 à 20% conduisant à une contrainte axiale de 15 à 30% agit en synergie avec la rotation de +/- 25° (donc 50° d'amplitude) ou un cisaillement simple avec un taux de 25 à 50%/s. Dans ces conditions, l'expression des gènes chondrocytaires (*SOX9*, *AGG*, *COL II*, *COMP*) est significativement plus élevée qu'un contrôle sans stimulation mais aussi équivalent ou significativement augmentée par rapport à un cisaillement seul ou une compression seule (Schätti et al., 2011). La fréquence 1 Hz est plus efficace que la fréquence 0,1 Hz pour des stimulations durant 1 heure par jour à raison de 5 à 6 jours par semaine pendant 1 à 4 semaines.

Le flux du milieu ou la perfusion des néo-tissus ont été peu utilisés lorsqu'il s'agit de CSMs. Les CSMs semblent très sensibles aux flux et leur différenciation peut changer selon la vitesse à laquelle ils sont appliqués (Lu et al., 2016). Par exemple, l'application d'un flux correspondant à 1 Pa de cisaillement de manière instantanée favorise la différenciation de CSMs murines en monocouche via une augmentation de la sécrétion de GAG, alors que l'application du flux avec un débit qui augmente de manière linéaire durant 2 min favorise la différenciation ostéocytaire via un signal calcique plus élevé et un assemblage des filaments d'actine. Il semble que ces stimulations aient un meilleur impact sur le développement de néo-tissus comportant des chondrocytes plutôt que des CSMs (Henrionnet et al., 2012). Enfin, la perfusion de micropellets de cartilage a majoritairement favorisé leur hypertrophie sans influencer positivement sur la sécrétion de MEC de type hyalin (Kock et al., 2014).

#### V.6.2.d. Tensions

Comme pour les néo-tissus comportant des chondrocytes, peu d'études se sont intéressées à l'impact de stimulations mécaniques en tension sur la différenciation des CSMs. Un groupe a montré, par l'observation de l'incorporation de sulfates, que des CSMs incluses dans un scaffold constitué de COL I et GAG synthétisaient plus de GAG lors d'une stimulation en tension de 10% à une fréquence de 1 Hz et durant une semaine (L. McMahon et al., 2008; L. A. McMahon et al., 2008). L'impact de compressions et de tensions sur le phénotype de CSM-MO humaines incluses dans un gel d'alginate a été évalué (Haudenschild et al., 2009). Il a été observé que des tensions de 5% à 0,1 Hz génèrent la multiplication par 1,99 du volume des cellules ainsi que leur distorsion. Cela a conduit à une diminution de l'expression des gènes chondrocytaires et une augmentation de gènes ostéocytaires. Par comparaison, des compressions de 10% à 0,1 Hz ont généré la diminution du volume cellulaire (multiplié par 0,688) et très peu de distorsion, conduisant à la régulation positive de l'expression des gènes chondrocytaires. Enfin, les stimulations mécaniques par tension sont généralement utilisées pour l'ostéogenèse des CSMs plutôt que la chondrogenèse (Kearney et al., 2010; Steward and Kelly, 2015).

#### V.6.2.e. Autres méthodes

De manière plus anecdotique, certains articles présentent des stimulations mécaniques en utilisant le magnétisme ou des ultrasons.

Par le magnétisme, les stimulations mécaniques peuvent être appliquées à l'échelle du tissu, lorsque celui-ci est courbé par la présence d'un aimant par exemple (Fuhrer et al., 2013), ou à l'échelle cellulaire par la mise en mouvement de particules magnétiques (Dikina et al., 2017) ou l'application d'un champ électromagnétique (Parate et al., 2017). Dans le premier cas, la répétition de stimulations cycliques journalières jusqu'à 3 à 5 semaines favorise la différenciation chondrocytaire de CSMs humaines et l'accumulation des AGG, GAG et COL II et ce, de manière d'autant plus importante lorsqu'un milieu de culture favorisant la chondrogenèse est utilisé (Dexaméthasone, ITS, TGF $\beta$ 1). L'application d'une force de 4,9 pN grâce aux particules magnétiques sur une construction de CSM-MO humaines sans scaffold n'a en revanche pas amélioré leur différenciation et la sécrétion de MEC. Les stimulations mécaniques de micropellets de CSM-MO humaines par électromagnétisme ont régulé positivement l'expression des gènes *SOX9*, *AGG* et *COL II* pour une amplitude de 2 mT et seulement 10 min de stimulations après 1 et 3 semaines de culture. La sécrétion de MEC spécifique du CA après 3 semaines de culture a aussi été améliorée. Dans ce cas, la répétition des stimulations est défavorable au maintien de l'expression et de la sécrétion de *COL II*, donc au maintien du phénotype chondrocytaire.

Les stimulations mécaniques par ultrasons impliquent de plus faibles déformations et sont peut-être moins invasives que les stimulations précédemment présentées. Leur fréquence de l'ordre du mégaHertz se rapproche de la fréquence de résonance des cellules, 5 MHz environ (Louw et al., 2013). Les ultrasons favorisent aussi la différenciation de CSM-MO humaines ou de léporidés et la sécrétion de MEC, en synergie avec les facteurs de croissance (Choi et al., 2013; Thakurta et al., 2016).

#### *V.6.3. Réponse des cellules aux stimuli mécaniques par les voies de mécanotransduction*

Les chondrocytes ou CSMs sont capables de répondre à des stimuli mécaniques en activant des voies de transductions intracellulaires qui aboutissent à des changements d'expression génique. Ce phénomène, appelé mécanotransduction, est observable pour divers types de cellules (neurones, myocytes, cellules endothéliales des vaisseaux sanguins ...). Dans le CA, les composants de la MPC ainsi que de la membrane plasmique sont les récepteurs des stimuli mécaniques et les acteurs de la transformation de ces stimuli en messages biochimiques. La modification de ces protéines conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire. Ces voies sont constituées de protéines qui régulent les unes les autres leur activation jusqu'à modifier l'expression des gènes de la cellule (Figure 10).

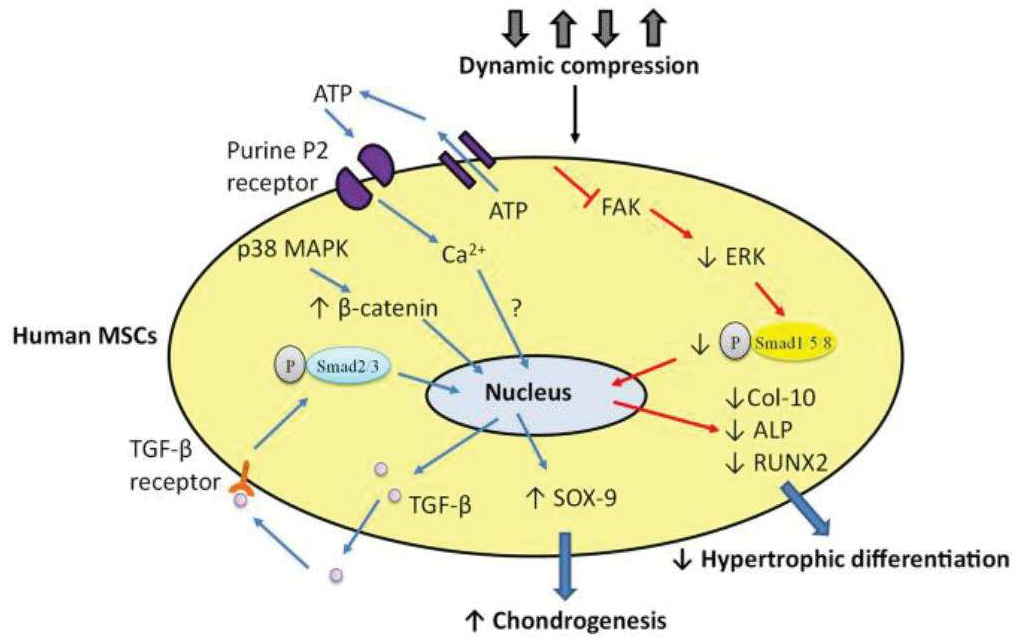


Figure 10 – Schéma non exhaustif des voies de mécano-transduction mises en évidence lors de la stimulation mécanique de chondrocytes ou CSMs en cours de différenciation – d’après Choi et al., 2018.

#### V.6.3.a. Les récepteurs mécaniques

Les stimuli mécaniques sont principalement convertis en énergie biochimique. Ce sont la MPC et la membrane plasmique des chondrocytes qui permettent cette conversion par le biais de leurs déformations et de récepteurs mécano-dépendants.

##### i. Les récepteurs aux facteurs de croissance libérés par la MPC

Le premier acteur de la mécano-transduction dans le CA est la MPC (Vincent et al., 2007; Zhao et al., 2020) avec qui les chondrocytes sont en contact direct (Figure 1). La MPC a un rôle protecteur des chondrocytes grâce à des propriétés mécaniques inférieures à la MEC globale ( $104 \pm 51$  kPa,  $306 \pm 133$  kPa chez l’homme, respectivement) (Darling et al., 2010). Contrairement à la MEC, les propriétés mécaniques de la MPC ne changent pas selon les zones du CA (McLeod et al., 2013; Wilusz et al., 2012b), seule son épaisseur augmente avec la profondeur (Youn et al., 2006). En revanche, le module d’élasticité augmente en s’éloignant du chondrocyte (Darling et al., 2010; Wilusz et al., 2012a, 2012b). Du fait de la diminution du rapport entre le module d’élasticité de la MPC et de la MEC, on peut supposer que les grandes déformations subies en zone superficielle sont atténuées par la MPC et que celle-ci amplifie les plus faibles déformations des zones intermédiaire et profonde (Wilusz et al., 2012b). En étant reliée au chondrocyte par l’intermédiaire du cil primaire, des intégrines et d’autres protéines membranaires comme CD44, la MPC permet de protéger la cellule et de réguler les voies de mécano-transduction en modulant les déformations de la membrane plasmique des cellules.

La MPC contient un certain nombre de protéines structurales ou bioactives. Sa déformation, lors de stimuli mécaniques, favorise la libération de facteurs de croissance ou leur mise en contact direct avec les récepteurs membranaires. Le facteur de croissance fibroblastique (FGF2) fait partie des facteurs impliqués dans la mécanotransduction. Dans la MPC, il est lié aux groupements héparanes sulfates des perlécans (Vincent et al., 2007). Or, il a été observé par immunohistologie que les perlécans se trouvent dans la couronne intérieure de la MPC (Wilusz et al., 2012a). Ainsi lors de stimuli mécaniques, il est possible que la déformation de la MPC, donc celle des perlécans, rapproche le FGF2 de son récepteur. D'autres facteurs de croissance comme les TGF $\beta$ , les BMP et le facteur de croissance des tissus conjonctif (CTGF) se trouvent dans la MPC, liés à des PG. Par des mécanismes non élucidés, ils peuvent se fixer sur leurs récepteurs membranaires lors de stimuli mécaniques, probablement en les rapprochant comme cela a été montré pour le FGF2 (Fang et al., 2017; Tang et al., 2018; Yan et al., 2011).

#### ii. Le cil : une antenne cellulaire

Le cil primaire est une structure tubulaire et protubérante qui constitue un organite sensoriel des chondrocytes (Figure 11) (Ruhlen and Marberry, 2014). L'axonème, constitué de 9 doublets de microtubules, forme le squelette de cette structure. Il est entouré par la membrane de la cellule et ancré dans le cytosol grâce à un des deux centrioles utilisés lors de la division cellulaire (mitose). C'est pourquoi le cil primaire ne peut être présent que lorsque la cellule est à un stade quiescent, hors du cycle cellulaire (Pitaval et al., 2010). La taille du cil est comprise entre 1 et 2,5  $\mu\text{m}$  (McGlashan et al., 2010) et son orientation est parallèle, dans la zone superficielle, et perpendiculaire, dans la zone profonde, à la surface articulaire (Farnum and Wilsman, 2011).

Le cil primaire est un élément nécessaire à la différenciation des CSMs en chondrocytes. En effet, il a été montré avec des CSM-MO de souris que l'inhibition de la synthèse de la protéine IFT80, qui permet la mise en place du cil primaire, diminue la chondrogenèse des CSMs et la production d'AGG et COL II (Wang et al., 2013). *In vivo*, si l'apparition du cil primaire des chondrocytes de souris est inhibée, le CA obtenu est plus riche en cellules et plus épais mais plus souple que le CA normal. Il semble que l'organisation du CA lors de sa maturation, en partie liée à l'organisation des cellules et à l'apoptose de certaines, n'ait pas lieu. Ajouté à cela, l'augmentation de l'expression de marqueurs de l'hypertrophie des chondrocytes montre que le phénotype chondrocytaire n'est pas maintenu et qu'un cartilage arthrosique se développe (Chang et al., 2012; Irianto et al., 2014). A contrario, le cil primaire est présent dans plus de chondrocytes bovins dans des conditions d'arthrose (50% de plus) et il est associé à une augmentation de leur taille et une orientation différente (McGlashan et al., 2008). D'autre part, l'expression du gène AGG et la synthèse de GAG par des chondrocytes de souris n'est pas activée par des compressions mécaniques s'ils ne possèdent pas de cil primaire (Wann et al., 2012).

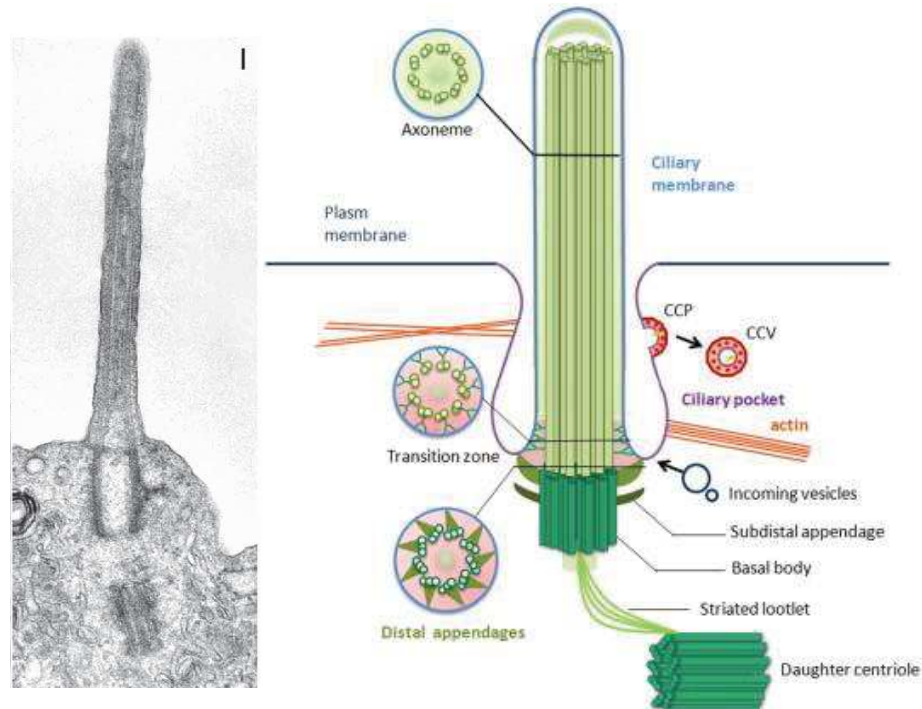


Figure 11 – Cil primaire des chondrocytes du sternum d'embryon de poulet observé au microscope électronique. Bar : 100 nm – d'après Jensen et al., 2004. Schéma de la structure du cil primaire – d'après Ke and Yang, 2014.

Le cil primaire est une structure cellulaire dont la taille varie en fonction de l'environnement de la cellule. Par exemple, l'inhibition de l'activité de la protéine ROCK, qui favorise les fibres de stress par assemblage du cytosquelette d'actine, augmente la taille du cil des chondrocytes (McMurray et al., 2013). Ainsi, le relief et la rigidité de l'environnement des chondrocytes modulent la taille du cil par l'intermédiaire de la voie de signalisation de la protéine ROCK et du remaniement du cytosquelette d'actine. D'autre part, la taille du cil primaire est sensible aux stimuli mécaniques. Il a été observé *in vivo*, chez le cheval, que le cil des chondrocytes était plus petit dans les zones du cartilage chargées que dans les zones non chargées (Farnum and Wilsman, 2011). *In vitro*, la taille du cil primaire de chondrocytes bovins soumis à une compression cyclique de 15 % à 1 Hz a diminué après 24 et 48 h de stimulation. Néanmoins, 72 h après ces chargements, les cils ont retrouvé leur taille initiale. Enfin, sans chargement, la taille des cils augmente jusqu'à atteindre 2,2  $\mu\text{m}$  environ (McGlashan et al., 2010). Ce changement de taille pourrait être un élément de régulation des réponses cellulaires aux stimuli environnementaux. En effet, la diminution de la taille du cil primaire des chondrocytes lors d'une succession de stimuli mécaniques pourrait limiter la sensibilité des cellules et une réponse excessive alors que son augmentation pourrait exacerber la sensibilité et une réponse efficace.

La perception des stimuli mécaniques par le cil primaire est due aux mouvements passifs du cil qui sont induits par ces stimuli. Dans de nombreux tissus, ce sont les flux hydriques qui courbent le cil primaire et initient les voies de mécanotransduction (Ferreira et al., 2019; Spasic and Jacobs, 2017).

Cependant, le cil primaire des chondrocytes porte des intégrines dont les liaisons avec la MEC ont été observées (Jensen et al., 2004; McGlashan et al., 2006). Ainsi, le cil serait courbé par la déformation de la MEC. La courbure du cil implique une déformation de la membrane donc la modification de la forme de certaines protéines. Parmi elles, on peut citer le canal calcique mécano-dépendant TRPV4 (O'Connor et al., 2014; Phan et al., 2009), le connexon qui est un canal constitué de 6 protéines « connexines 43 » et qui permet la libération d'ATP dans le milieu extracellulaire (Knight et al., 2009), ainsi que les différentes protéines qui interagissent avec la MEC comme les intégrines  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  et  $\beta 1$ , et NG2 (McGlashan et al., 2006). Enfin, les stimuli mécaniques régulent aussi l'expression des gènes associés à la fonction du cil primaire (Bougault et al., 2012).

Finalement, le cil peut être considéré comme une "antenne" qui perçoit les modifications biochimiques et biomécaniques de la MEC grâce à divers récepteurs membranaires chimio- ou mécano-dépendants. La modification de la taille du cil semble être un mécanisme de régulation supplémentaire des réponses cellulaires (Tao et al., 2020).

### iii. Les Intégrines

Les intégrines sont une famille de protéines bien connues car elles interviennent dans la régulation de la prolifération, la différenciation, la survie et la migration des cellules par le biais des interactions cellules-cellules ou cellules-MEC (Loeser, 2014). 24 hétérodimères de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  existent grâce aux 18 sous-unités  $\alpha$  et aux 8 sous-unités  $\beta$  différentes (Docheva et al., 2014). Ces protéines sont dites "transmembranaires" car elles possèdent un domaine extracellulaire qui permet les liaisons avec la MEC, un domaine membranaire qui maintient la protéine au sein de la bicouche phospholipidique, et un domaine intracellulaire qui interagit avec les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et des protéines à activité kinase (Loeser, 2014). L'ensemble de ces protéines crée un point focal d'adhésion à la MEC. Les chondrocytes expriment plusieurs types d'intégrines qui se lient à différents composants de la MEC dont les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha 10\beta 1$  (Sadler 2004, Docheva 2014). La quantification de l'expression des intégrines, notamment de la sous-unité  $\alpha 10$ , est un marqueur de différenciation des chondrocytes (Gouttenoire et al., 2010). L'inhibition de l'expression de ces protéines limite la prolifération des chondrocytes, favorise leur dédifférenciation ou leur apoptose, et limite leur hypertrophie (Woods et al., 2007). Ainsi, une régulation fine de l'expression de ces protéines et des interactions qu'elles entretiennent avec la MEC semble nécessaire pour maintenir le phénotype chondrocytaire du CA.

Les intégrines sont impliquées dans l'initiation de nombreuses voies de transduction comme les voies des FAK et MAPK, des flux calciques mais aussi les Rho GTPases (RhoA, Rac1, CDC42) (DeLise et al., 2000). En particulier, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est décrite comme un récepteur aux stimuli mécaniques qui implique le recrutement de protéines au niveau du complexe d'adhésion focale et interagit avec les canaux ioniques voisins (Millward-Sadler and Salter, 2004; Salter et al., 2001). L'augmentation de l'expression des gènes *MMP3*, *AGG* et *COL II* suite à des compressions de 15% à la fréquence de 1 Hz n'est pas observée lorsque la liaison des intégrines à la MEC est inhibée (Kock et al., 2009). D'autre part, si l'intégrine est liée à un ligand autre qu'une protéine de la MEC, la prolifération et la synthèse de

PG par les chondrocytes sont inhibées (Chowdhury et al., 2004), alors que liée à la MEC, la synthèse de PG et GAG augmente sous stimuli mécaniques (Millward-Sadler et al., 1999). De plus, les stimulations mécaniques impliquent une augmentation de l'expression des gènes codant pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .

De manière plus générale, le rôle des intégrines dans la différenciation des CSMs et le maintien du phénotype chondrocytaire est difficile à identifier. En effet, il a été montré que pour des CSMs de porc cultivées sur un substrat rigide (25 kPa), la chondrogenèse était défavorisée par rapport à un substrat plus souple (0.5 kPa) (Steward et al., 2013). Or, il y a plus de liaisons intégrines-MEC sur un substrat rigide. De plus, la chondrogenèse sur ce substrat était de nouveau favorisée en présence du groupement RGD qui empêche l'attachement des intégrines (Steward et al., 2013). En revanche, lors de stimulations mécaniques, ce sont les CSMs cultivées sur un substrat rigide qui répondent le mieux et cet effet est supprimé si la liaison des intégrines avec la MEC est inhibée (Steward et al., 2013, 2014). Ainsi, un trop grand nombre de liaisons des cellules à la MEC via des intégrines est défavorable à la chondrogenèse mais ces liens sont nécessaires à la réponse aux stimuli mécaniques par mécanotransduction (Steward 2013). D'autres études ont fait le même constat avec des chondrocytes (Loeser, 2014). Enfin, les signaux issus des intégrines peuvent être bouleversés par la présence de fragments de fibronectine et conduire à la sécrétion de protéines de dégradation de la MEC (Bader et al., 2011).

Pour conclure sur les intégrines, il a été montré qu'elles permettent de lier les chondrocytes ou les CSMs à la MEC ou au substrat de culture et que cela implique différents types de réponse des cellules. Les intégrines permettent soit de favoriser ou d'inhiber la chondrogenèse et la synthèse de MEC en fonction de l'environnement mécanique des cellules.

#### iv. Les canaux ioniques

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires qui ménagent en leur cœur un canal. Ce canal peut être sélectif ou non à certains ions et son ouverture est généralement régulée. En observant la différence de potentiel membranaire, plusieurs études ont mis en évidence l'ouverture de canaux mécano-dépendants lors de l'étirement ou de la déformation de la membrane des chondrocytes (G. Du et al., 2020, p. 4; Mobasheri et al., 2010; Rocio Servin-Vences et al., 2017). Les canaux ciblés sont de type potassique (Mobasheri et al., 2010) ou calcique. Les mécanismes d'ouverture des canaux ne sont pas totalement élucidés. En ce qui concerne les canaux calciques, il semble que la déformation de la membrane plutôt que son étirement soit favorable à l'ouverture du canal TRPV4 alors que le canal Piezo 1 peut s'ouvrir dans les deux cas (Rocio Servin-Vences et al., 2017). Une autre étude montre que l'ouverture de TRPV4, Piezo 1 et Piezo 2 dépend de l'étirement de la membrane. Pour un étirement de 3 et 8% des chondrocytes, le canal TRPV4 est ouvert principalement puis les canaux Piezo 1 et 2 à 13% et seulement le canal Piezo 2 à 18% (Du et al., 2016). Enfin, le canal TRPV4 est sensible à la tonicité du milieu extracellulaire (O'Connor et al., 2014; Phan et al., 2009). Quelle que soit la tonicité initiale, la diminution de la tonicité (i.e. le passage à un milieu plus hypotonique) favorise l'ouverture du

canal (O'Connor et al., 2014). Cela pourrait s'apparenter au retour de l'eau dans le tissu à la suite d'une compression, par exemple.

Un canal ionique non sélectif, le connexon, habituellement impliqué dans la communication intercellulaire (jonction « gap ») a été identifié comme étant un mécanorécepteur (Garcia and Knight, 2010; Knight et al., 2009). Il est composé de 6 connexines qui forment un demi-canal. Lors de stimulations mécaniques, son ouverture a été observée ainsi que la libération d'ATP.

#### V.6.3.b. Les voies de transduction du signal

Les stimuli mécaniques provoquent le changement de conformation de diverses protéines ou la fixation de ligands de la MPC sur leurs récepteurs. De nombreuses voies de signalisation intracellulaire sont alors activées (Figure 10).

##### i. Modifications du cytosquelette

Le cytosquelette, qui constitue le squelette de la cellule, est impliqué dans la réponse des cellules aux stimulations mécaniques. En effet, il a été montré que les CSMs en milieu chondrogénique, répondent plus aux stimuli mécaniques lorsqu'elles possèdent plus de fibres de stress car cultivées sur un substrat plus rigide par comparaison à des cellules cultivées sur un substrat plus souple et ayant moins de fibres de stress (Steward et al., 2013, 2014). D'autre part, une réorganisation des filaments d'actine, des filaments intermédiaires et des microtubules a été observée par immunofluorescence lors de stimulations mécaniques (Knight et al., 2006; Steward et al., 2013, 2014).

Alors que la modification de l'organisation des microtubules n'est pas expliquée, celle des filaments d'actine et des filaments intermédiaires, notamment de la vimentine, est liée aux points d'adhésion focaux. Lors de l'apport de ligands RGD, qui occupent les sites de fixation à la MEC des intégrines, les pressions hydrostatiques ou compressions ne permettent pas la modification de ces filaments. En effet, lors de stimulations mécaniques, des protéines du cytosol se rattachent au complexe d'adhérence focal et initient une cascade de phosphorylation d'autres protéines. Cette association est observable dès la première minute après le début de compressions mécaniques à 0,33 Hz. Une des conséquences de ce cheminement est la régulation de l'activation de la protéine ROCK qui stabilise le cytosquelette d'actine et favorise la création de fibres de stress (Haudenschild et al., 2010; Woods et al., 2007).

La régulation de l'organisation du cytosquelette est très fine puisqu'elle peut être favorable ou défavorable au maintien du phénotype chondrocytaire. Les CSMs ayant plus de fibres de stress se différencient moins mais répondent mieux aux stimuli mécaniques, au regard de l'expression des gènes chondrocytaires. Ainsi, le cytosquelette est un élément impliqué dans la réponse des cellules aux stimuli mécaniques. Deux voies de réponse ont été mises en évidence : la mécanotransmission et la mécanotransduction. La mécanotransmission est une voie de régulation du phénotype cellulaire par une modification directe de la forme du noyau (Martins et al., 2012). Elle implique la transmission de forces/déformations par le biais du cytosquelette. Cette voie est très peu étudiée chez les chondrocytes

ou les CSMs lors de la chondrogenèse car ces cellules sont arrondies avec peu de fibres de stress, par comparaison à d'autres types cellulaires. Le cytosquelette étant impliqué dans le transport moléculaire intracellulaire, il pourrait être un intermédiaire des voies de mécanotransduction. Enfin, la modification du cytosquelette entraîne une modification de la rigidité des cellules. Ainsi, les déformations de la cellule modulées par sa rigidité pourraient être un mécanisme de régulation de la perception des stimuli mécaniques et des voies de mécanotransduction sous-jacentes.

## ii. Interactions moléculaires

La réponse des cellules aux stimuli mécaniques est modulée par différentes voies de signalisation moléculaire qui interfèrent souvent les unes avec les autres (Beier and Loeser, 2010; Zhang et al., 2015, 2014). En particulier, les voies de signalisation des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) et du TGF $\beta$  sont activées par des stimulations cycliques (Bougault et al., 2012).

La liaison ligand-récepteur de plusieurs facteurs de croissance lors de la déformation de la MPC active leurs voies de transduction. FGF2 active les voies des MAPK avec la phosphorylation de ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases) (Vincent et al., 2004). L'activation de la voie de signalisation du TGF $\beta$  par des compressions cycliques a été mise en évidence à plusieurs reprises. Une augmentation de l'expression du gène des deux récepteurs du TGF $\beta$ , de *C-JUN* et de *SOX9* ainsi que la production de leurs protéines associées a été observée après la stimulation de CSM-MO de léporidés dans un gel d'agarose à partir de J2 et pendant 48 heures (Huang et al., 2005). L'activation des SMAD-2 et -3 par phosphorylation a été observée lors de stimulations mécaniques à J16 pour des CSM-MO de bovins dans un gel d'agarose ou à J6 pour des chondrocytes murins dans un gel d'agarose (Bougault et al., 2012; Mouw et al., 2007). Enfin une seconde vague d'activation de cette voie de signalisation est possible du fait de la liaison des TGF $\beta$ 1 et TGF $\beta$ 3, produits par les cellules lors de stimulations mécaniques, à leurs récepteurs (Huang et al., 2004; Li et al., 2010; Ye et al., 2014). La phosphorylation des SMAD-2 et -3 aboutit à la régulation positive de l'expression du gène *SOX9* (Zhang et al., 2014).

Le complexe d'adhésion focal est à l'origine de diverses voies de mécanotransduction. Il implique les voies des MAPK par l'intermédiaire de FAK (Focal Adhesion Kinase) ainsi que les GTPases comme RhoA/Rac1/ROCK (Salter et al., 2001; Steward and Kelly, 2015; Xu et al., 2012). A la suite d'une stimulation mécanique de chondrocytes murins dans un gel d'agarose, il a été observé une activation transitoire de la voie des MAPK via ERK1/2 ainsi qu'une augmentation non significative de la phosphorylation de FAK et des SMAD1/5/8 (Bougault et al., 2008, 2012). Or, cette voie de signalisation conduit à la différenciation hypertrophique des chondrocytes principalement via la régulation positive de l'expression du gène *Runx2* (van der Kraan et al., 2009). Cependant, lors de stimulations répétées pendant 3 semaines de CSM-MO humaines dans un scaffold de PLCL/chitosan à partir de J21, le nombre de point focaux associés à la quantité d'intégrine  $\beta$ 1 a diminué ainsi que la quantité des protéines phosphorylées FAK et ERK1/2 et des marqueurs hypertrophiques COL X, MMP13, ALP et RUNX2 (Zhang et al., 2015). Cela signifie que la répétition des stimulations mécaniques permet de diminuer le nombre de point focaux, l'activation des voies de signalisation associées et la différenciation hypertrophique des chondrocytes. L'activité de la protéine ROCK est influencée par les points

d'adhésion focaux via des protéines G et RhoA (Beier and Loeser, 2010) ainsi que par l'organisation des filaments d'actine (Allen et al., 2012). La protéine ROCK est largement décrite comme une protéine limitant la chondrogenèse et favorisant l'hypertrophie des chondrocytes (Strzelecka-Kiliszek et al., 2017). Cependant, la protéine ROCK est capable d'activer directement la protéine SOX9 par phosphorylation (Haudenschild et al., 2010) et il a été montré que selon le degré de polymérisation du cytosquelette, la protéine ROCK pouvait favoriser la chondrogenèse (Allen et al., 2012). Etant donné son lien avec des éléments sensibles aux stimuli mécaniques, il est possible qu'elle ait aussi un rôle dans la mécanotransduction.

La  $\beta$ -caténine est une molécule des voies de signalisation des WNT. Sa concentration et sa localisation dans la cellule sont connues pour être finement régulées, puisque en trop faible ou trop forte concentration elle provoque un développement anormal du CA ainsi que des dommages ou une hypertrophie (Yuasa et al., 2008; Zhang et al., 2014). Lors de la culture en 2D d'une lignée de chondrocytes (ATDC5), une augmentation transitoire de la localisation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau a été observé (Niu et al., 2016). La régulation de son activité est liée aux voies des MAPK, en particulier par l'activation de la p38 MAPK (Thornton et al., 2008) qui a été observée lors de stimulations mécaniques (Bougault et al., 2008, 2012). A contrario, l'activation des voies de signalisation par les points d'adhésions focaux entraîne la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine (Lee et al., 2000), qui conduit à son élimination (Zhang et al., 2014).

L'ouverture des différents canaux présentés plus haut entraîne l'hyperpolarisation de la membrane et l'entrée de calcium dans la cellule. Le  $\text{Ca}^{2+}$  constitue un messager secondaire qui dans le cytosol engendre l'activation de plusieurs voies de signalisation (Martínez-Moreno et al., 2019). Il permet la phosphorylation de la protéine kinase A (PKA) par l'intermédiaire de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP). La PKA permet ensuite la phosphorylation de la protéine SOX9. Le  $\text{Ca}^{2+}$  permet aussi d'activer la voie des MAPK (p38 MAPK, ERK1/2) qui elle-même favorise la synthèse du facteur de croissance CTGF. Ce dernier participe à la régulation positive des gènes *AGG* et *COL II*.

Enfin, les nombreuses voies de mécanotransduction présentées peuvent être initiées au niveau du cil qui porte la plupart des récepteurs aux facteurs de croissance, protéines d'adhésion, protéines G et canaux ioniques. Cependant, la voie de mécanotransduction principalement associée au cil primaire est la voie de signalisation Hedgehog qui favorise la différenciation hypertrophique des chondrocytes (Lin et al., 2009). Lorsque le cil atteint une taille maximale par un manque de stimulation ou une taille très réduite par des stimulations trop intenses, la voie de signalisation Hedgehog est activée (Chang et al., 2012; Panadero et al., 2016).

L'ensemble des voies de mécanotransduction montre une fine régulation du phénotype chondrocytaire par les stimulations mécaniques. Certaines voies de signalisation sont atténuées lorsque des stimulations mécaniques raisonnables sont appliquées comme la voie de signalisation Hedgehog par l'intermédiaire de la taille du cil primaire. D'autres sont atténuées par une inhibition de la synthèse des récepteurs mécano-dépendants comme l'intégrine  $\beta 1$ . Enfin, des voies favorables à la chondrogenèse sont activées par la mise en présence des facteurs de croissance avec leur récepteurs membranaires et la synthèse de ces facteurs de croissance comme  $\text{TGF}\beta$ . Les stimulations mécaniques interviennent donc dans des boucles de régulation des chondrocytes.

Les stimulations mécaniques peuvent être considérées comme un nouveau « facteur de croissance » des néo-tissus cartilagineux (Tableau 3). Elles favorisent le maintien de la différenciation des chondrocytes et engendrent ou favorisent la différenciation des CSMs. Deux mécanismes qui pourraient favoriser le développement des néo-tissus sont envisageables. D'une part, les stimulations mécaniques créent des flux interstitiels et permettent une meilleure nutrition des cellules. D'autre part, les stimulations modifient le métabolisme des cellules par le biais de voies de mécano-transduction. Il a en effet été observé que pour des stimulations par pressions hydrostatiques, compressions ou cisaillements principalement, l'expression des gènes de la chondrogenèse était régulée positivement. Ceci est souvent accompagné d'une augmentation de l'expression des gènes *COL I* et *COL X* qui reste minoritaire mais qui est signe de différenciation inégale au sein du néo-tissu. Une augmentation de l'accumulation de GAG, PG et collagène a été observée, souvent accompagnée d'une augmentation des propriétés mécaniques des néo-tissus quand celles-ci ont été mesurées. Les stimulations ont aussi un rôle protecteur puisqu'elles limitent l'inflammation induite par la présence d'IL-1 $\beta$  (Guilak, 2011; Ramachandran et al., 2011). Cependant, les néo-tissus stimulés mécaniquement n'atteignent pas nécessairement les propriétés mécaniques requises pour qu'ils puissent remplir leur rôle après implantation (Huang et al., 2010b). D'autre part, certaines problématiques ne sont pas totalement résolues. Quel est le meilleur moment pour réaliser des stimulations mécaniques ? Cela semble dépendre des cellules (chondrocytes ou CSMs), des modèles de culture et du type de stimulation. Quelles sont les contraintes ou déformations perçues par les cellules ? Il a été montré que, lors de stimulations mécaniques, la déformation des cellules et leurs réponses dépendent du matériau dans lequel elles se trouvent (Steward et al., 2013, 2014; Villanueva et al., 2008). Or, la littérature informe sur les déformations ou les contraintes appliquées sur les néo-tissus mais très rarement sur les déformations subies par les cellules ou sur les contraintes qu'elles perçoivent réellement (Likhitpanichkul et al., 2005).

| Stimuli mécaniques       | Cellules     | Amplitude  | Fréquence   | Durée par jour |
|--------------------------|--------------|--|-------------|----------------|
| Pressions hydrostatiques | Chondrocytes | 1 - 10 MPa   | 0.25 - 1 Hz | 4 h - 8 h      |
|                          | CSMs         | 0.1 - 10 MPa   | 0.5 - 1 Hz  | 1 h - 4 h      |
| Compressions             | Chondrocytes | 10 - 20%<br>0.5 - 20 N<br>20 - 40 kPa                            | 0.01 - 1 Hz | 5 min - 4 h    |
|                          | CSMs         | 10 - 15%<br>7.99 - 9.5 kPa                                       | 0.15 - 1 Hz | 1 h - 4 h      |
| Cisaillements            | Chondrocytes | Cisaillement simple :<br>0.5 - 50%<br>Rotation : $\pm 25^\circ$  | 0.1 - 1 Hz  | 6 min - 24 h   |
|                          | CSMs         | Cisaillement simple :<br>25 - 50%/s<br>Rotation : $\pm 25^\circ$ | 0.1 - 1 Hz  | 1 h            |
| Tensions                 | CSMs         | 10%  | 1 Hz        | 24 h           |

Tableau 3 – Stimulations mécaniques ayant conduit à la régulation positive de l'expression des gènes de la chondrogenèse ou à l'accumulation de matrice extracellulaire pour des biopsies, ou des néo-tissus, comportant des chondrocytes ou des cellules souches mésenchymateuses (CSMs).

Enfin, le micropellet de cartilage est un modèle biologique de croissance du CA dont on connaît les limites en terme de différenciation et de croissance après 29 jours de culture (Dusfour et al., 2020). Il est souvent utilisé comme témoin de différenciation par comparaison à d'autres méthodes de culture (Campbell et al., 2006; Huang et al., 2004; Liu et al., 2013). Cependant, seuls quelques articles présentent l'impact de stimulations par champs électromagnétiques (Parate et al., 2017) ou pressions hydrostatiques (Angele et al., 2003; Miyanishi et al., 2006a, 2006b; Safshekan et al., 2012) sur le développement de micropellets issus de CSMs. Or, ces stimulations, qui ont eues un impact positif sur l'expression des gènes chondrocytaires et l'accumulation de MEC, n'impliquent que des déformations infinitésimales des micropellets. Or le CA, est déformé de manière non négligeable sous le poids du corps ou la mise en mouvements des articulations. C'est pourquoi, il semble légitime de s'intéresser à l'impact de stimulations mécaniques qui induisent la déformation des micropellets de cartilage sur leur développement, tant d'un point de vue biochimique que biomécanique. Cependant, il n'existe aucun dispositif qui permette la stimulation et la caractérisation mécanique de microsphères comme les micropellets de cartilage. Afin, d'appliquer des stimulations mécaniques entraînant la déformation de micropellets de cartilage et de suivre l'évolution de leurs propriétés mécaniques en plus de leurs propriétés biochimiques et comprendre les mécanismes de réponse aux stimuli mécaniques de ces néo-tissus, il est donc nécessaire de développer un dispositif dédié.

## **V.7. Objectif des travaux**

Dans le chapitre introductif, les caractéristiques biochimiques et biomécaniques du CA ont été détaillées. Elles montrent la complexité de ce tissu et la manière dont il est façonné par son environnement biochimique et biomécanique. À maturité, le CA est stable avec un remodelage lent. C'est pourquoi, le rétablissement naturel de l'équilibre du tissu après un traumatisme ou son maintien lors du vieillissement est difficile. Différentes solutions d'aide à la réparation ou régénération du CA ont été proposées ou sont utilisées, mais l'obtention d'un cartilage de bonne qualité à long terme reste difficile. Alors que la croissance du CA natif est mieux comprise, il semble que la croissance des substituts cartilagineux ne le soit que partiellement. Le micropellet de cartilage, lorsqu'il est généré à partir de CSMs est décrit comme un modèle biologique de croissance du cartilage. Pour autant, sa croissance est limitée et un phénotype de cartilage mature et fonctionnel n'est pas obtenu. La différenciation des cellules est hétérogène et la sécrétion de MEC limitée. Ses propriétés mécaniques demeurent insuffisantes par comparaison à un tissu natif mature, ce qui peut être lié à un manque d'organisation de la MEC ou un défaut d'apport en stimuli biochimiques ou biomécaniques. L'utilisation de divers facteurs de croissance peut améliorer le phénotype chondrocytaire des cellules mais la MEC est trop faiblement impactée par ces modifications. Afin de reproduire l'environnement de croissance du CA *in vivo*, les micropellets de cartilage pourraient être stimulés mécaniquement, ce qui a été très peu étudié par comparaison à d'autres néo-tissus cartilagineux. Sa petite taille (800 µm environ à 21 jours de culture) et sa forme sphérique imparfaite en sont peut-être la cause. Aucun dispositif existant ne peut, de manière répétable, permettre la stimulation et caractérisation de micropellets de cartilage. Afin de mieux comprendre le développement des néo-tissus cartilagineux développés à partir de CSMs, il est nécessaire d'évaluer le développement du micropellet au cours du temps sous l'influence de facteurs de croissance biochimiques et biomécaniques adaptés.

Ainsi les objectifs de mon travail de thèse étaient les suivants :

- Développer et valider un dispositif permettant de stimuler et caractériser mécaniquement des microsphères.
- Observer l'impact de stimulations mécaniques complexes sur le développement de micropellets de cartilage à court terme.

## **VI. Contribution à l'évaluation de l'impact de stimulations mécaniques sur la croissance de micropellets de cartilage via le développement d'un dispositif adapté.**

### ***VI.1. Nouveau dispositif fluide de stimulation et caractérisation mécanique pour des micropellets de cartilage***

Suite à l'étude de la littérature, nous avons choisi le micropellet de cartilage comme modèle de croissance biologique du CA sous stimulation mécanique. Pour cela, des dispositifs qui, idéalement, permettent à la fois de stimuler et de caractériser mécaniquement les micropellets sont nécessaires. Cependant, les dispositifs classiques sont difficiles à utiliser pour une microsphère irrégulière et de petite taille. C'est pourquoi, avant mon arrivée au LMGC, un dispositif fluide répondant à ce cahier des charges a été conçu. Néanmoins, un certain nombre de mises au point ainsi que sa validation étaient nécessaires avant de pouvoir utiliser ce dispositif avec des micropellets de cartilage qui sont un matériel précieux.

#### *VI.1.1. Mise au point d'un dispositif*

##### *VI.1.1.a. Choix du dispositif*

La première contrainte dans l'étape de conception était de développer un dispositif permettant d'analyser l'effet des stimulations mécaniques sur les micropellets de cartilage via la quantification des gènes chondrocytaires par RT-PCR semi-quantitative. Pour cela, le dispositif doit permettre de stimuler conjointement 6 micropellets qui sont ensuite regroupés afin d'obtenir suffisamment d'ARN total. Plusieurs méthodes de stimulation mécanique ont été envisagées comme l'utilisation de compressions axiales, de champs magnétiques ou de centrifugations. Cependant, chacune de ces méthodes présente une contre-indication. L'application de compressions axiales (Figure 12A) ne permet pas d'obtenir des déformations identiques, et donc reproductibles, d'un micropellet à un autre du fait de leur forme irrégulière. L'application de champs magnétiques (Figure 12B) nécessiterait l'utilisation de particules magnétiques. L'inclusion de particules magnétiques est possible dans un gel mais difficile à réaliser dans un micropellet. D'autre part, l'utilisation de nanoparticules magnétiques que les cellules peuvent phagocyter aurait permis ce type de stimulation, mais il est fort probable que la présence de ces nanoparticules perturbe les voies de mécano-transduction. Enfin, la centrifugation répétée des micropellets (Figure 12C) engendrerait leur déformation, et ce, de manière répétée et reproductible. Cependant, une vitesse de rotation très élevée serait nécessaire pour déformer suffisamment le micropellet et pourrait altérer la viabilité et la fonctionnalité des cellules. L'utilisation d'un système fluide permettrait, en revanche, d'appliquer une pression commune à tous les micropellets, en respectant les conditions de culture et pourrait être ajustée afin de ne pas être délétère pour les cellules. L'objectif étant d'engendrer une déformation des micropellets, l'application d'une pression hydrostatique qui déforme de manière infinitésimale les micropellets, n'a pas été envisagée. C'est pourquoi le concept suivant a été imaginé (Figure 12D).

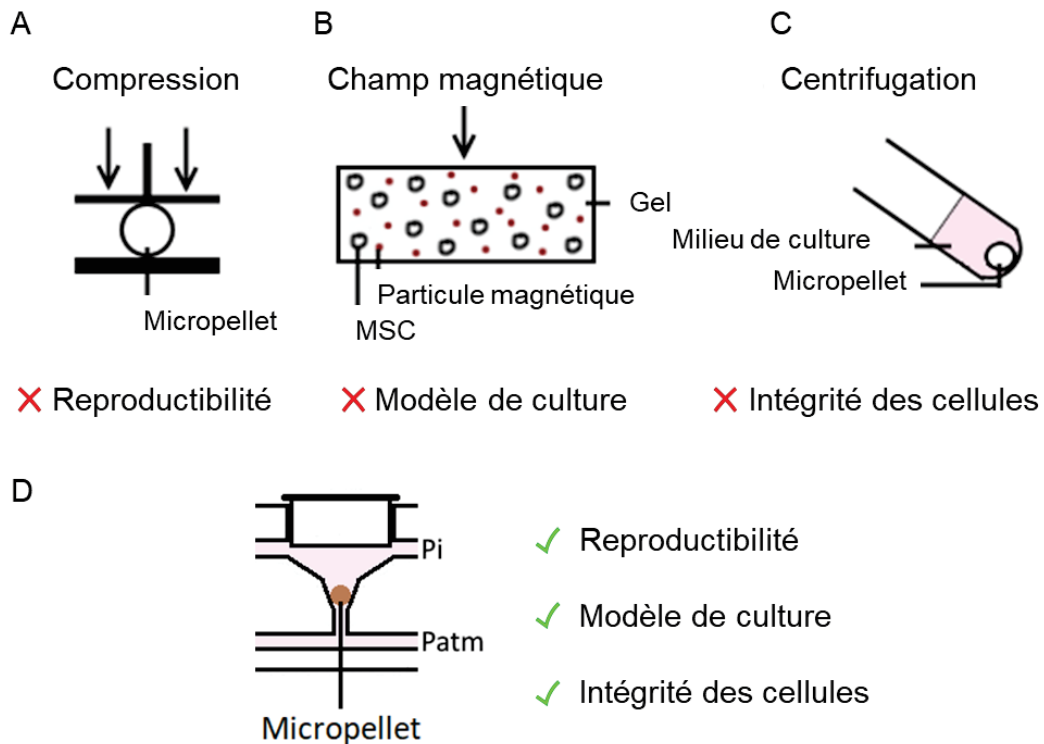


Figure 12 – Concepts de stimulation mécanique envisagé pour la stimulation de micropellets de cartilage. (A) compression uniaxiale, (B) méthode magnétique, (C) centrifugation et (D) le nouveau concept fluide.  $P_i$  est la pression imposée à la partie supérieure du micropellet,  $P_{atm}$  la pression atmosphérique imposée à la partie inférieure du micropellet.

Le principe est de déposer un micropellet dans un cône dont les extrémités supérieure et inférieure sont reliées à un circuit fluide. Une pression positive est appliquée au-dessus du micropellet, tandis que la pression atmosphérique est conservée en dessous. Ainsi, le micropellet peut s'enfoncer dans le cône et être déformé. En fonction de sa taille, de ses propriétés mécaniques et de la pression positive appliquée, le micropellet s'enfonce plus ou moins dans le cône.

### VI.1.1.b. Cahier des charges

Le dispositif a été développé en suivant trois objectifs principaux : (1) stimuler et (2) caractériser mécaniquement des micropellets de cartilage, et ce, (3) à différents stades au cours de leur croissance (Tableau 4).

| Objectifs                | Besoins   | Solutions   |
|--------------------------|---|---|
| Stimuler et caractériser | Générer divers signaux de pression                    | Pompes péristaltiques<br>Capteur de pression<br>Contrôle des pompes : Arduino, python   |
|                          | Observer la déformation de chaque micropellet         | Caméra avec une résolution suffisante<br>Déplacement latéral du support caméra<br>Contrôle caméra : python<br>Contrôle déplacement caméra : Arduino, python   |
| Au cours du temps        | Respecter l'environnement de culture des micropellets | Dispositif conservé dans un incubateur de culture :<br><ul style="list-style-type: none"> <li>- Taille</li> <li>- Etanchéité pour l'électronique</li> <li>- Matériaux résistants à la chaleur, à l'humidité ou protégés</li> <li>- Support cuve indépendant</li> <li>- Alimentation, connexion du système via des câbles ne perturbant pas le fonctionnement de l'incubateur</li> </ul><br>Circuit fluidique contenant du milieu de culture :<br><ul style="list-style-type: none"> <li>- Tubes souples médicaux pour les pompes péristaltiques</li> <li>- Matériaux inoxydables, stérilisables ou à vocation alimentaire</li> <li>- Cuve en résine biocompatible</li> <li>- Ergonomie pour l'insertion des micropellets et le changement du milieu de culture</li> </ul> |

Tableau 4 – Cahier des charges du dispositif de stimulation et caractérisation mécaniques des micropellets de cartilage.

Six micropellets sont disposés dans six puits d'une cuve en résine créée par impression 3D (voir VI.1.2). Le circuit fluidique se décompose en une partie haute (i.e. au-dessus des micropellets) que des pompes péristaltiques peuvent mettre en pression et une partie basse (i.e. en-dessous des micropellets) maintenue à pression atmosphérique grâce à deux chambres ouvertes de part et d'autre de la cuve. Les pompes péristaltiques permettent d'appliquer différents signaux de pression pour les stimulations et caractérisations mécaniques. Le capteur de pression permet de mesurer l'évolution de la pression et d'effectuer un contrôle actif de la pression appliquée grâce à la boîte de commande comprenant deux cartes Arduino. Une caméra permet d'observer l'enfoncement des micropellets dans leur cône afin d'évaluer leur déformation et identifier les propriétés mécaniques des micropellets. Enfin, le dispositif permet le suivi de la croissance des micropellets au cours du temps. Il permet donc de maintenir l'environnement de culture des cellules. Ainsi, il a été conçu pour entrer dans un incubateur de culture cellulaire, permettre le changement du milieu de culture relativement aisément et ne pas être source de contaminations.

#### VI.1.1.c. Dimensionnement du cône

Le cône dans lequel sont stimulés et caractérisés les micropellets doit permettre l'observation du déplacement des micropellets verticalement. Cependant, il semble que plus l'angle d'ouverture du cône est obtus plus le micropellet est sujet au frottement. Or, des frottements trop importants pourraient altérer le micropellet et la viabilité cellulaire. De plus, il est difficile de connaître le coefficient de frottement entre le micropellet et la résine de la cuve ; il est donc nécessaire de minimiser l'influence de ce coefficient de frottement sur les déformations de la microsphère pour minimiser l'erreur commise lors du calcul de ses propriétés mécaniques. D'autre part, un angle d'ouverture trop obtus limiterait le déplacement vertical du micropellet dans le cône. Or, il semble que ce critère soit le plus aisément mesurable pour déterminer les propriétés mécaniques des micropellets. Afin de déterminer l'angle d'ouverture du cône optimal, une étude numérique a été menée.

Un modèle éléments finis a été créé de manière à représenter la configuration d'une microsphère de 1 mm de diamètre dans un cône (Figure 13A). Le diamètre du tube terminal de la cuve (200  $\mu\text{m}$ ) a été choisi en fonction des possibilités d'usinage de la cuve après impression 3D. Un modèle axisymétrique, comportant deux barres rigides pour délimiter le cône et un demi-disque déformable maillé en triangle, a été conçu avec le logiciel GMSH (Geuzaine and Remacle, 2009). En utilisant le logiciel LMGC90 (Dubois and Mozul, 2017), l'enfoncement du micropellet dans le cône a été simulé pour différents angles d'ouverture du cône et des coefficients de frottement extrêmes au regard des données de la littérature concernant des néo-tissus sans scaffold (0 et 0,5)(Ando et al., 2007; Bhumiratana et al., 2014; Fujie and Nakamura, 2013; Whitney et al., 2017). La pression partielle est appliquée sur les nœuds supérieurs de la microsphère puis éliminée lorsque ces nœuds entrent en contact avec le cône. Une loi néo-Hookéenne hyperélastique a été utilisée.

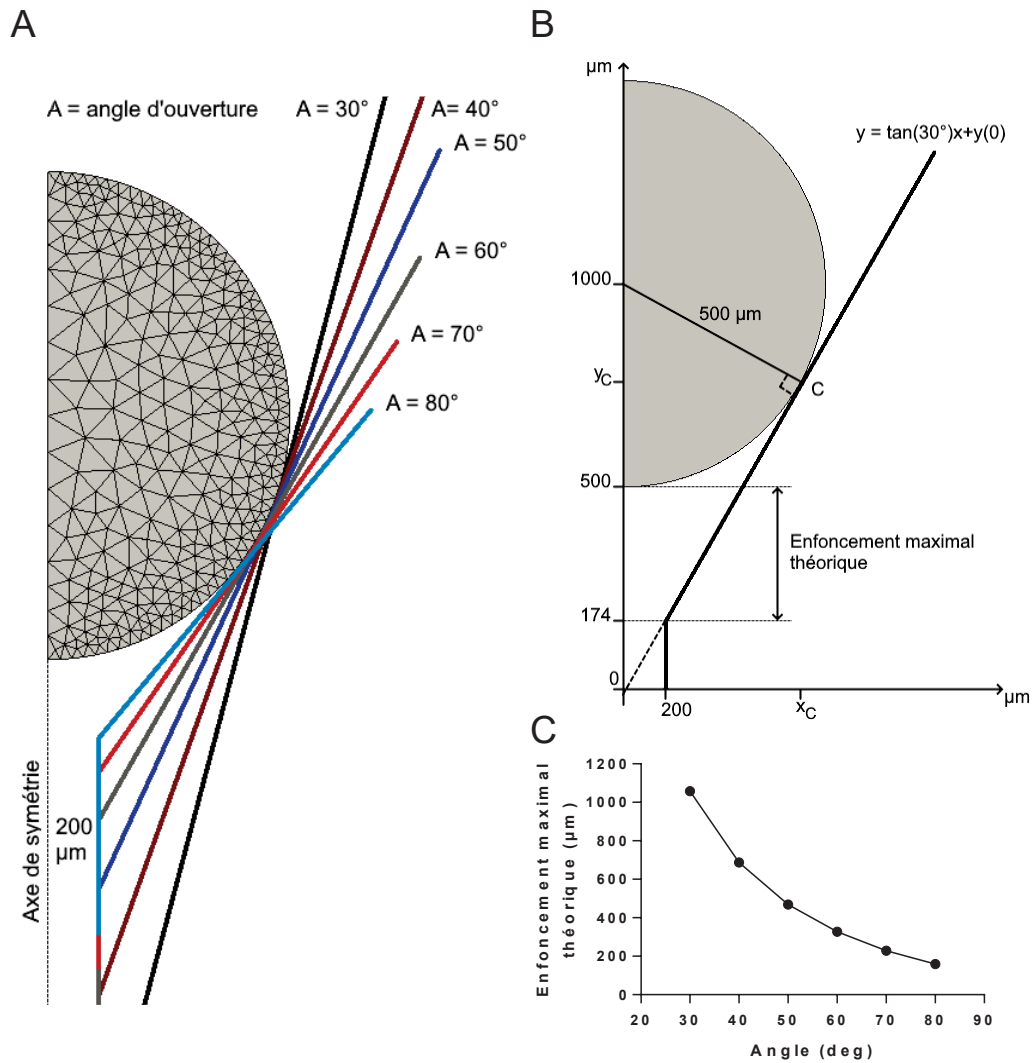


Figure 13 – Modélisations d'une microsphère de 1 mm de diamètre, déposée dans un cône dont l'angle d'ouverture varie de 30 à 80°, et qui possède un tube terminal de 200 µm de diamètre. (A) Modèle éléments finis axisymétrique représentant la position relative des cônes par rapport à la microsphère en fonction de leur angle d'ouverture. (B) Méthode géométrique d'évaluation de l'enfoncement maximal de la microsphère dans un cône de 60° avant d'atteindre l'entrée du tube terminal. (C) Enfoncement maximal théorique d'une microsphère de 1 mm de diamètre dans un cône dont l'angle d'ouverture varie de 30 à 80° avant d'atteindre le tube terminal de 200 µm de diamètre.

L'observation du positionnement de cônes dont l'angle d'ouverture ( $\theta$ ) varie de 30 à 80° (Figure 13A) montre que l'espace entre l'extrémité inférieure (bas) de la microsphère au repos et le début du cylindre qui termine le cône se réduit à mesure que l'angle augmente. Nous avons fixé cette limite d'enfoncement, afin de simplifier l'analyse du problème mécanique et d'augmenter la potentialité de déformations réversibles, au fait de ne pas faire pénétrer la microsphère dans la partie cylindrique du dispositif. Par une analyse purement géométrique (Figure 13B), le calcul suivant a été effectué. Le point de contact (C) entre la microsphère et le cône a été déterminé en calculant la position du point du demi-cercle qui, relié au centre de la microsphère, crée un segment perpendiculaire à la tangente du cercle d'angle d'inclinaison égal à  $\theta/2$ . En utilisant le point C, on peut déterminer l'équation de la droite qui représente le cône. Cette équation est ensuite utilisée pour déterminer la position de l'initiation du tube terminal. Enfin, en utilisant la position de l'extrémité inférieure de la microsphère et l'entrée du tube terminal, on peut calculer l'enfoncement potentiel maximal de la microsphère. Ainsi, en utilisant des angles d'ouverture de 30 à 80°, le déplacement potentiel maximal varie de 1059 à 159  $\mu\text{m}$ , respectivement (Figure 13C). Or, la résolution de la caméra choisie est de 2.65  $\mu\text{m}$ , ce qui est un facteur limitant du dispositif : en effet, un déplacement trop faible ne sera pas mesuré de manière précise par le système de caméra associé à l'analyse d'image. Afin d'augmenter la précision de mesure du dispositif, il convient donc de choisir le plus petit angle possible, afin de maximiser les déplacements.

Les simulations, quant à elles, ont montré de manière complémentaire que plus l'angle d'ouverture est petit, plus l'influence du coefficient de frottement sur l'enfoncement des microsphères augmente (Figure 14A). Les résultats de cette étude numérique nous poussent, contrairement à l'analyse purement géométrique, à choisir un angle le plus élevé possible de manière à obtenir une quasi-indépendance des déplacements de la microsphère vis-à-vis du coefficient de frottement (inconnu) et ne pas biaiser la mesure de l'élasticité de la microsphère. La différence d'enfoncement de la microsphère selon l'angle d'ouverture du cône a été observée en fonction du ratio de la pression sur le module d'élasticité (voir VI.1.2) équivalent au déplacement maximal théorique dans le cône d'angle d'ouverture 80°. On observe une différence d'enfoncement de 56,14% à 25,74% pour un angle de 30 à 80° quand on analyse le déplacement de l'extrémité inférieure de la microsphère (Bas). De même, une différence d'enfoncement de 39,97% à 11,53% est observable pour le déplacement de l'extrémité supérieure de la microsphère (Haut). Pour un angle de 60°, on remarque que la réduction d'enfoncement global de la microsphère due au frottement s'accompagne d'une diminution de la différence d'enfoncement entre son extrémité supérieure et inférieure (Figure 14B). Pour l'enfoncement maximal théorique (326,79  $\mu\text{m}$ ), on observe une différence de déplacement de 17,49% et 35,71% pour le haut et le bas de la microsphère, respectivement, entre une simulation avec frottement nul et une simulation avec frottement maximal.

Un angle d'ouverture du cône 60° a été choisi : c'est un compromis entre la possibilité d'enfoncer la microsphère jusqu'à 400  $\mu\text{m}$  avant que son entrée dans la partie cylindrique du dispositif n'impacte sa déformation (Figure 14B) et le fait d'avoir une influence limitée du coefficient de frottement sur les déplacements (25%), déplacements qui seront utilisés pour l'identification des propriétés matériaux.

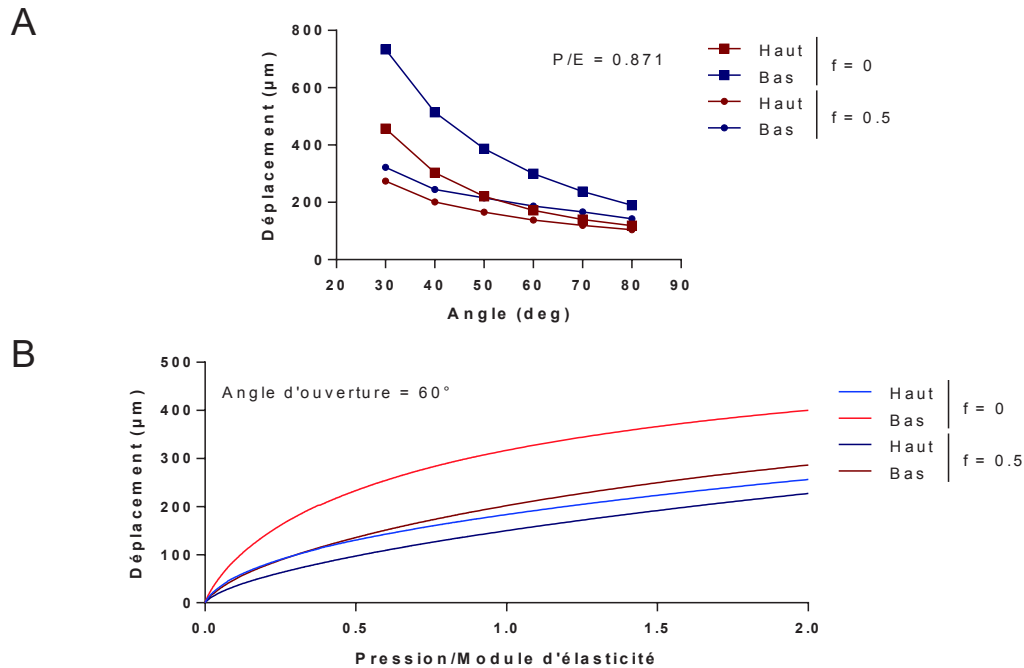


Figure 14 – Influence de l'angle d'ouverture du cône sur l'enfoncement des microsphères en fonction de leur coefficient de frottement. (A) Déplacement de l'extrémité inférieure (Bas) et supérieure (Haut) de la microsphère dans un cône dont l'angle d'ouverture varie de 30 à 80° en fonction du frottement ( $f = 0$  ou  $f = 0.5$ ) pour la pression équivalente au déplacement maximal du cône d'angle d'ouverture 80°. (B) Impact du frottement ( $f = 0$  ou  $f = 0,5$ ) sur le déplacement de l'extrémité inférieure (Bas) et supérieure (Haut) de la microsphère dans un cône d'angle d'ouverture égal à 60° au cours de son enfoncement.

A l'issue de l'ajustement du design de la cuve grâce aux simulations numériques, des scripts Arduino et Python permettant la stimulation et la caractérisation des microsphères ont été mis au point. Ces scripts permettent de contrôler les mouvements des pompes péristaltiques par l'intermédiaire d'une carte Arduino Genuino Uno. L'étude bibliographique a montré que des signaux statiques ou dynamiques avaient été utilisés pour la stimulation de néo-tissus. Les signaux dynamiques de type sinusoïdal ont été majoritairement utilisés (Angele et al., 2003; Carroll et al., 2014; Huang et al., 2004; Meinert et al., 2017; Meyer et al., 2011; Ogawa et al., 2009; Schätti et al., 2011; Waldman et al., 2003) mais certaines études ont présenté des stimulations avec des signaux carrés (Bougault et al., 2012; Parkkinen et al., 1993a). Enfin, la maîtrise de ces différents signaux de pression est aussi nécessaire pour les caractérisations mécaniques. Ainsi, la mise au point du système a consisté en la mise en place de trois types de signaux : constant, sinusoïdal et carré. Une pompe ne comportant qu'un seul galet permet d'ajuster la forme du signal pendant qu'une seconde pompe comportant plusieurs galets permet de maintenir une pression minimale. En effet, lors de stimulations sinusoïdales, nous avons observé que le passage de la sinusoïde par la pression atmosphérique pouvait entraîner un rebond des microsphères ; nous avons donc choisi pour la suite de toujours stimuler les microsphères avec une pression minimale. De plus, une vanne anti-retour a été ajoutée au système afin de stabiliser les signaux de pression lors de la mise en mouvement de la pompe multi-galets. Les autres scripts développés permettent de contrôler le déplacement de la caméra devant chacune des microsphères, i.e. chacun des puits de la cuve, et les acquisitions de pressions et d'images.

*VI.1.2. Validation des capacités du dispositif à stimuler et caractériser mécaniquement des microsphères*

**Article 2** : article original

« Validation d'un nouveau dispositif fluïdique pour la stimulation et la caractérisation mécanique de microsphères : un premier pas vers la caractérisation du cartilage »

**Validation of a new device for mechanical stimulation and characterization of microspheres: a first step towards cartilage characterization**

N. Petitjean, G. Dusfour, P. Cañadas, M. Maumus, P. Valorge, S. Devic,  
J. Berthelot, E. Belamie, P. Royer, C. Jorgensen, D. Noël, S. Le Floc'h

Sous presse pour le journal *Materials Science and Engineering: C*

La conception du système et ses commandes étant établies, une campagne d'essais utilisant des microsphères d'alginate, des microsphères de collagène et des microsphères de collagène réticulé a été menée afin de confirmer les capacités du dispositif à stimuler et caractériser mécaniquement des microsphères. Pour ce faire, des billes de collagène réticulé ont été soumises à trois tests de compression : un test de compression dans le nouveau dispositif fluide encadré par deux tests de compression dans un système de caractérisation mécanique conventionnel (compression uni-axiale, entre deux surfaces planes). Les deux autres types de microsphères ont aussi été caractérisées avec le système fluide. La qualité des signaux de pression (sinusoïdal, carré, constant) a été vérifiée en analysant leur forme et le respect de leur(s) pression(s) de consigne, lors des stimulations des différents types de microsphères. La répétabilité et la reproductibilité des signaux ont été évaluées grâce à des stimulations de 30 min pour 3 groupes de chaque type de microsphère. L'étude du système de compression fluide nous a permis de mettre en évidence une sensibilité au coefficient de Poisson remarquable. Aucune différence significative n'a été observée entre le module d'élasticité obtenu pour les billes de collagène réticulé dans les deux systèmes de caractérisation. D'autre part, le module d'élasticité a été conservé au cours des trois tests. L'évaluation de la forme des signaux ainsi que des pressions consignées a montré que le système était capable de générer des signaux de pression constants et sinusoïdaux avec précision pour une fréquence donnée et différentes amplitudes. Un fluage de la pression a été observé pour chaque plateau du signal carré créant une variabilité plus importante des pressions autour de leurs valeurs de consigne. L'analyse de la variabilité au cours du temps ou selon les groupes stimulés a montré que les signaux constants et carrés étaient plus répétables et reproductibles que le signal sinusoïdal. Finalement, le système fluide développé est capable de stimuler et caractériser mécaniquement des microsphères de différentes tailles (diamètre compris entre 900 et 1500  $\mu\text{m}$ ) et de différentes propriétés mécaniques (module d'élasticité compris entre 1,5 et 30 kPa, coefficient de Poisson compris entre 0,25 et 0,499).

## Validation of a new fluidic device for mechanical stimulation and characterization of microspheres: a first step towards cartilage characterization

N. Petitjean<sup>1,2</sup>, G. Dusfour<sup>1</sup>, P. Cañadas<sup>1</sup>, M. Maumus<sup>2</sup>, P. Valorge<sup>1</sup>, S. Devic<sup>1</sup>, J. Berthelot<sup>3,4</sup>, E. Belamie<sup>3,4</sup>, P. Royer<sup>1</sup>, C. Jorgensen<sup>2,5</sup>, D. Noël<sup>2,5,#</sup>, S. Le Floc'h<sup>1,#</sup>

#: equally contributing authors

<sup>1</sup>LMGC, Univ Montpellier, CNRS, Montpellier, France; <sup>2</sup>IRMB, Univ Montpellier, INSERM, Montpellier, France; <sup>3</sup>ICGM, Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France; <sup>4</sup>EPHE, PSL Research University, 75014, Paris, France; <sup>5</sup>Clinical Immunology and Osteoarticular Disease Therapeutic Unit, Department of Rheumatology, CHU Montpellier, France.

\* Corresponding author: Simon Le Floc'h, PhD

LMGC - UMR 5508 Université de Montpellier - CC048 163 rue Auguste Broussonnet  
34090 MONTPELLIER, France

Tel: +33 4 67 14 39 90 - E-mail: [simon.le-floch@umontpellier.fr](mailto:simon.le-floch@umontpellier.fr)

## Highlights

- A new device was validated to mechanically stimulate and characterize microspheres.
- Stimulation of microspheres with a diameter between 900 and 1500  $\mu\text{m}$  is possible.
- Microspheres of different Young's moduli (1.46-29.56 kPa) can be stimulated.

## Abstract

Articular cartilage is made of chondrocytes surrounded by their extracellular matrix that can both sense and respond to various mechanical stimuli. One of the most widely used in vitro model to study cartilage growth is the model of mesenchymal stromal cells-derived cartilage micropellet. However, mechanical stimulation of micropellets has never been reported probably because of their small size and imperfect round shape. The objective of the study was to develop an original custom-made device allowing both the mechanical stimulation and characterization of cartilage micropellets. The fluidic-based device was designed for the concomitant stimulation or characterization of six microspheres placed into the conical wells of a tank. In the present study, the device was validated using alginate-, collagen- and crosslinked collagen-based microspheres. Different types and ranges of pressure signals (square, sinusoidal and constant) were applied. The mechanical properties of microspheres were equivalent to those determined by a conventional compression test. Accuracy, repeatability and reproducibility of all types of pressure signals were demonstrated even though square signals were less accurate and sinusoidal signals were less reproducible than the others. The interest of this new device lies in the reliability to mechanically stimulate and characterize microspheres with diameters in the range of 900 to 1500  $\mu\text{m}$ . Mechanical stimulation can be performed on six microspheres in parallel allowing the mechanical and molecular characterization of the same group of cartilage micropellets. The device will be useful to evaluate the growth of cartilage micropellets under mechanical stimuli.

**Keywords:** cartilage, microsphere, device, biomechanics, characterization, stimulation.

## 1 .Introduction

Articular cartilage is a highly organized connective tissue that covers the long bones. Its composition and structure lead to complex mechanical behavior so that the cartilage ensures smooth movements and facilitates efficient transmission of forces in joint. Chondrocytes surrounded by their extracellular matrix (ECM) play an essential weight-bearing role in the joint and can both sense and respond to various mechanical stimuli (Demoor et al., 2014). However, in degenerative diseases or after injuries, cartilage does not respond properly to mechanical stimulation and fails to regenerate. Current strategies to repair cartilage include bone marrow stimulation, mosaicplasty, autologous chondrocyte implantation (ACI) and matrix-assisted chondrocyte implantation (MACI). However, successful clinical results are limited on the long-term and widely depend on the type of cartilage lesions and inter-patient variability (Ringe et al., 2012). Several types of biomaterials are being developed to provide optimal scaffolds for mature and stable cartilage formation but the mechanical properties of new tissues and the way they respond to mechanical stimulation are often sub-optimal. Therefore, a better understanding of the mechanobiological and biomechanical response of the native cartilage during growth would greatly help to improve current approaches of cartilage engineering.

The cartilage micropellet model is relevant and widely used to study in vitro the growth of cartilage after differentiation of mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) into chondrocytes (Johnstone et al., 1998). This model recapitulates the different steps from MSC condensation to proliferation and differentiation into chondrocytes that secrete the specific ECM characterized by the production of type II collagen, aggrecans and other proteoglycans. However, the mechanical characterization of cartilage micropellets has been poorly investigated. We recently showed that compression of micropellets between two planar surfaces allowed to measure their global mechanical properties at different time points during differentiation (Dusfour et al., 2020). The increase of stiffness was correlated to the production of cartilage ECM components as measured at the molecular level. Similar data were previously obtained using the same micropellet culture model and hydrostatic pressure stimulation during 14 days (Miyaniishi et al., 2006). Two other studies reported the zonal variation of elastic modulus in cartilage micropellets obtained after 14 day culture of expanded human nasal chondrocytes and after 21 day differentiation of induced pluripotent

stem cells using atomic force microscopy. However, one limitation of this technique is the need to use cryosections of micropellets and the inability to measure the mechanical properties overtime on the same micropellets. Finally, mechanical stimulation of chondrocytes embedded in collagen microspheres by compression between two planar surfaces has also been reported (Au-yeung et al., 2009). This method applies strain and stress that depend on the size of the microspheres and is not appropriate to determine the impact of stimulation amplitude on the mechanical properties of multiple spheres at a time. The reasons are that such cartilage microspheres are small, variable in size and exhibit an imperfect round shape. Therefore, compression of micropellets in a fluidic system would probably be the best method for the most accurate stimulation of multiple spheres at a time, which has never been reported to date, and the characterization of their mechanical properties.

The objective of the study was to develop an original custom-made fluidic device allowing both the mechanical stimulation and the characterization of microscale and round objects, such as cartilage microspheres. The device was developed to stimulate and characterize concomitantly six microspheres and was validated by comparison with a conventional method by using alginate and collagen microspheres.

## **2 .Materials and methods**

### ***2.1 . Design of the custom-made device***

The custom-made device consists of a fluidic system in which six microspheres (spheres with a diameter ranging from 900 to 1500  $\mu\text{m}$ ) can be pressurized within a stereolithography-3D-printed transparent and biocompatible resin tank (Clear Resin, Formlabs, Markershop, Le Mans, France) as depicted (Fig. 1A). The device is sized to allow the position of the entire fluid circuit and the other components within a standard cell culture incubator (Fig. 1B). In the 6 conical wells tank, the upper part of the wells is pressurized by two peristaltic pumps (15KS series, Boxer, Flow Technique, Entzheim, France), while the lower part is connected to two chambers at atmospheric pressure ( $P_{\text{atm}}$ ). The two peristaltic pumps, which are programmed for stepwise movements, contain one or six rollers (single-roller or multi-roller pumps, respectively). The single-roller pump is used to manage the shape of

pressure signals (square, sinusoidal, constant) while the multi-roller pump is used to maintain a minimum pressure in case of leakage. Three sizes of soft tubes are used for the single-roller pump (i.e., 2.4, 3.2 and 4.8 mm of internal diameter; Pharm-A-Line™, Boxer, Flow Technique, Entzheim, France) and 4.8 mm tubes for the multi-roller pump. The tank is filled with 20 mL of culture medium. The microspheres are introduced by the openings on top of each cone and tightly fitting caps close each opening on top of the tank. The pressure acquisition is carried out by rated pressure sensors with variable ranges of 25, 100 and 500 kPa (ADP5121, ADP5141, ADP5161, Panasonic, Farnell, Limonest, France). A camera (Mako, Allied Vision, Stemmer Imaging, Suresnes, France), mounted on a motorized stage, is used to follow the oscillations of each microsphere in the cones of the transparent tank (Fig. 1C). Two led bars are attached to the camera support to adapt the lighting of microspheres. The peristaltic pumps and the intensity of the led bars are controlled by an Arduino board (Genuino Uno, Arduino, USA) whereas the displacement of camera, the acquisition of pictures and the pressure are controlled by a second Arduino board (M0 Pro, USA). A computer is connected to the two Arduino boards and to the camera in order to launch python scripts and collect the data.

## **2.2 . Conventional device**

In the conventional device, one microsphere is immersed in a chamber and compressed between two parallel planar surfaces as previously described (Dusfour et al., 2020). The lower planar surface is guided by a linear actuator (Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany) and can approach step-by-step until entering in contact with the microsphere. The upper one is linked to a miniature S Beam load cell (LSB200, FutekInc., Irvine, USA).

## **2.3 . Generation of microspheres**

The alginate microspheres (AM) were made with a sodium alginate solution at a concentration of 3% (w/v) in 0.15 M NaCl (Sigma-Aldrich, Lyon, France). The solution was then extruded through a syringe into a 0.1 M CaCl<sub>2</sub> solution under magnetic stirring. Alginate microspheres were allowed to crosslink for 24 hours and were stored in distilled water at room temperature (RT) until use.

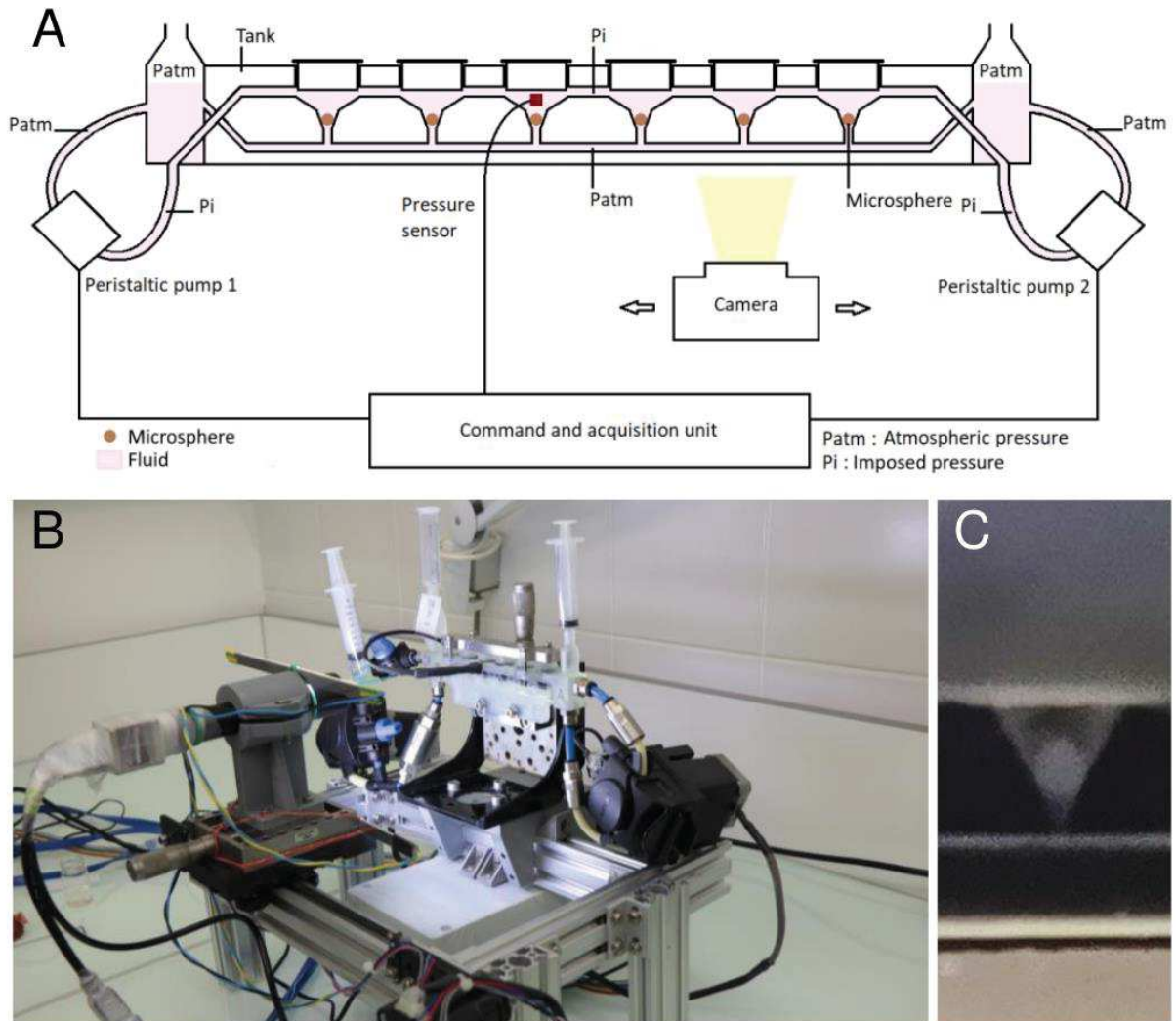


Fig. 1. Custom-made fluidic device for mechanical stimulation and characterization of microspheres. (A) Schematic representation of the device. Six microspheres can be placed into the conical wells of the tank which is filled with fluid (pink color). A positive pressure ( $P_i$ ) is applied at the top of microspheres whereas atmospheric pressure ( $P_{atm}$ ) is maintained at the bottom. (B) Picture of the device comprising the tank, the peristaltic pumps, the camera and the other components. (C) Magnification of one cone of the tank showing a microsphere under the pressure sensor.

The collagen microspheres (CM) were made with a solution of type I collagen extracted from rat tail tendons as described (Mathieu et al., 2014). Drops of collagen solution (9 mg/mL) were produced with a syringe pump set at 0.02 mL/min into a bath of fluorinated oil (Hydrofluoroether, HFE) and 1 % triblock copolymer surfactant. The resulting emulsion was placed in a desiccator for 24 hours in the presence of ammonia vapors to increase the pH, which induces the fibrillation of collagen and solidification of the drops. The CM were then washed three times with pure HFE to remove the excess of surfactant, then rinsed three times and stored in PBS at RT.

The crosslinked collagen microspheres (CCM) were obtained by incubating the CM in a 100 mM buffer solution of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES). After adjusting the solution pH to 5.5, the crosslinking agent (EDC: 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide) was added in excess at the rate of 20-30 µg/mL of the initial collagen solution and kept under stirring for 2 hours. The CCM were finally rinsed three times and stored in PBS at RT. Populations of small and large CCM were generated.

## **2.4 . Mechanical testing**

### *2.4.1 . Fluidic compression test in the custom-made device*

Before compression, a picture of each microsphere was taken to determine its initial position in the cone at atmospheric pressure. A multi-creep test on crosslink collagen microspheres was used by applying six pressure stages held for 2 minutes. The relative pressure was incrementally increased: 5.1, 6.8, 8.5, 10.3, 12.0 and 13.7 kPa, corresponding to 1.72 kPa ramps at 57.3 kPa/s from the first stage. At each pressure stage, the sinking of microspheres in the cone were recorded using the dedicated camera. The resulting displacements of the top (blue cross) and bottom (red cross) ends (see Fig. 3A and 3B) of each microsphere were estimated through image analysis using a *python* code with *OpenCV* library (*threshold* function). In order to get rid of lateral motions that could occur in the segmentation procedure, only vertical displacements were recorded.

#### 2.4.2 . Conventional compression test

Before and after the fluidic compression test, the microspheres were individually tested in the conventional device. Each microsphere was introduced in the chamber and a multi-relaxation compression test was used. Ten ramps of 30  $\mu\text{m}$  at 100  $\mu\text{m/s}$  were performed. The motor displacement was maintained during 10 sec for the three first stages, 20 sec for the following three and 30 sec for the last stages. A minimum rest of 30 min between each test was applied to allow microspheres to achieve a full elastic recovery.

#### 2.4.3 . Finite element modeling

Two finite element (FE) models using a compressible neo-Hookean hyperelastic energy density (Equation 1) were created by using the LMGC90 software (Dubois and Mozul, 2017) to simulate the deformation of the spheres in both cases, the conventional and fluidic compression tests.

$$\psi = \frac{\mu}{2}(I_1 - 3 - 2\ln(J)) + \frac{\lambda}{2}\ln^2(J) \quad \text{Equation 1}$$

With:  $\mu$  the shear modulus and  $\lambda$  the bulk modulus

$I_1 = \text{tr}C$  is the first invariant of the right Cauchy-Green tensor  $C = F^T F$   
with  $F$  the deformation gradient

$J = \det(F)$  the determinant of the deformation gradient

The meshes were built with *GMSH* (Geuzaine and Remacle, 2009) with 667 triangles and 4167 quadrangles, for the fluidic compression test and the standard compression test, respectively. Axisymmetric models have been used since microspheres were assumed to be spherical in shape. In both models (conventional and fluidic compression tests), the contact problem was solved at each pressure stage using the Discrete Element Method described in Dubois and Mozul, (2017) and contact areas were automatically updated.

For the fluidic compression test, half a disk of 1 mm diameter was defined by the vertical axis of symmetry (Fig. 2A). A pressure was applied to each node at the top of the disk, which

resulted in disk compression into the cone walls. Each node that encountered the walls was no longer subject to the imposed pressure. The displacements of the top and of the bottom of the microsphere were recorded.

For the conventional compression test, a quarter disk was defined by two vertical and horizontal symmetry axes, as previously reported (Petitjean et al., 2019). A rigid bar parallel to the horizontal axis was used to compress the microsphere for a given displacement. The force developed by the microsphere, which depends on its mechanical properties, was recorded.

The plateau and the cone walls were considered as rigid body since the elastic modulus of tank material and plateau is 4 orders of magnitude higher (more than 1.25 GPa according to the manufacturer) than the mean elastic modulus of microspheres (between 1 and 30 kPa).

#### 2.4.4 . Estimation of the Young's modulus and Poisson's ratio

The Young's modulus and Poisson's ratio of the microspheres were evaluated at the equilibrium state, to estimate their elastic properties (i.e. after relaxation or creep phenomena) and to avoid the influence of the loading rate (DiSilvestro et al., 2000). For the fluidic compression test, only the displacements at the end of each pressure stage were used in the estimation of the mechanical properties. A 2 min waiting time (relaxation time) allowed the stabilization of the deformation of the microsphere within the cone. The mean pressure employed was calculated at each stage. For the conventional compression test, the force developed by the microsphere was measured at equilibrium when the force changed by less than 0.008 mN during 10 sec, at each compression stage.

For the fluidic compression test, the Young's modulus of microspheres was determined by an identification procedure which minimized the squared difference between the pressure applied experimentally and the one given by the numerical FE model from the measured displacements. For the conventional compression test, the squared difference between the measured force and the one given by the numerical FE model was minimized. A non-linear minimization procedure (*least square procedure* from *scipy.optimize* module, with a Trust Region algorithm, in *python*) was used in the parameter identifications.

In order to reduce the computing time of the FE simulation of the fluidic compression, the problem was nondimensionalized by using two dimensionless ratios. In other words, the

identification procedure takes advantage of the fact that even if the mechanical responses are highly non-linear (i.e., the force increases non-linearly with the driven displacement), these responses are strictly proportional to the size and Young's modulus of the microspheres, as it is shown in the results section. Furthermore, an interpolation procedure using a lookup-table of pre-calculated numerical mechanical responses was developed. All the FE simulations were driven on an HPC cluster with 28 core and 128 GB of RAM.

#### *2.4.5 . Statistical analysis concerning mechanical characterizations.*

Statistical analysis was performed for the comparison of the Young's moduli of small CCM obtained with the fluidic and the conventional compression tests using *GraphPad Prism 7* software (San Diego, USA). Data assumed a Gaussian distribution according to the Agostino-Pearson omnibus normality test and were analyzed using paired t tests. Statistical analysis was performed for the comparison of the Young's moduli and the Poisson's ratios of the alginate-, collagen- and small crosslinked collagen-based microspheres by using Mann-Whitney tests. Data were represented in a boxplot chart.

### **2.5 . Mechanical stimulations**

#### *2.5.1 . Stimulation tests*

Three groups of six microspheres were stimulated by a square, sinusoidal or constant signal of pressure during 30 min. This stimulation time seemed appropriate by reference to what is usually applied on engineered tissue (Natenstedt et al., 2015). Stimulations with the different signals were consecutively performed on the same group of microspheres after 5-minute pauses. The minimum and maximum relative pressures of dynamic signals (i.e., square and sinusoidal) and the mean relative pressure of static signals (i.e., constant) were adapted to the size and stiffness of microspheres (Table 1). The frequency of the dynamic signals was 1 Hz. The frequency of acquisition pressure was 200 Hz for square signals and 100 Hz for the other signals.

|  | Large crosslinked collagen microspheres | Alginate microspheres | Small crosslinked collagen microspheres | Collagen microspheres |
|--|---|-----------------------|---|-----------------------|
| Minimum pressure for dynamic signals (kPa) | 20                                      | 5                     | 2                                       | 1                     |
| Maximum pressure for dynamic signals (kPa) | 120                                     | 30                    | 12                                      | 6                     |
| Mean pressure for static signal (kPa)      | 75                                      | 17.5                  | 7.5                                     | 3.5                   |
| Pressure sensor (kPa)                      | 500                                     | 100                   | 100                                     | 25                    |
| Diameter of the tube used in the pump (mm) | 4.8                                     | 3.2                   | 3.2                                     | 2.4                   |

Table 1. Signal characteristics and experimental parameters used for the stimulation of microspheres, depending on the types of tested microspheres.

### 2.5.2 . Pressure signal analyses

The signal accuracy was evaluated by determining the mean absolute error between experimental and theoretical signals. For the square signal, additional mean absolute errors were computed for the two transitional parts of the signal, and the minimum and maximum stages.

Repeatability and reproducibility of signals were assessed by analyzing the minimum and maximum pressures of the dynamic signals and the mean pressures of static signal. For square signals, the minimum and maximum stages were isolated by retaining 86% of each half-period, in order to exclude the transitional part of the signal. For sinusoidal signals, the minimum and maximum pressures were identified for each period. The repeatability of the signals was evaluated for each experiment by estimating the standard deviations of the period, of the maximum pressure, of the minimum pressure, and of the mean pressure along the 30 minutes. Signal reproducibility was estimated using the standard deviations of the mean of the signal criteria considering three experiments that were driven with the same experimental parameters and the same microspheres at different time within the same week.

### 3 .Results

#### 3.1 . FE modeling simulation of the fluidic compression and verification of the usefulness of the dimensionless ratios

The complex deformation of a microsphere in a cone was depicted by a FE modeling simulation (Fig. 2A). In the upper part of the microsphere, the determinant of the deformation gradient tensor, illustrated in (Fig. 2A), indicates a local decrease in volume during the compression, while it increases slightly in the lower part.

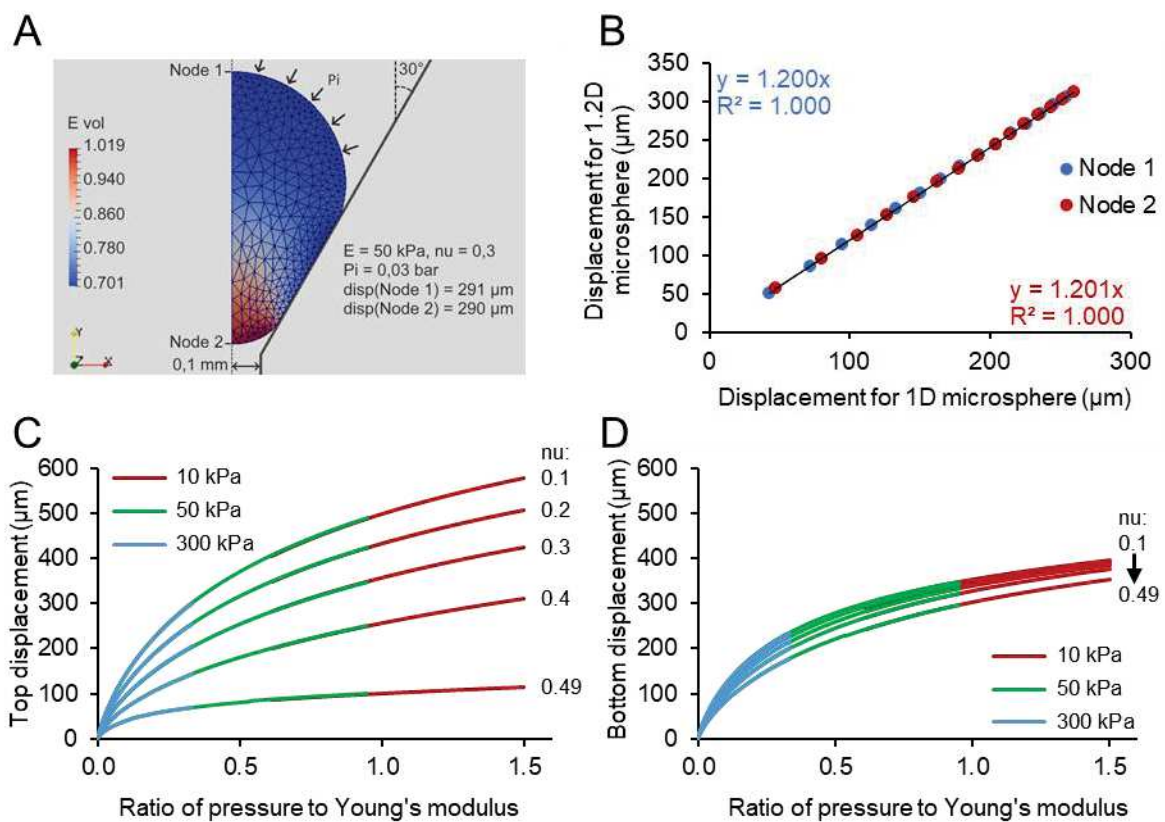


Fig. 2. Simulation of the sinking of a microsphere into a cone of the custom-made device. (A) Finite element modelling simulation for a 1 mm microsphere with a Young's modulus  $E$  of 50 kPa, a Poisson's ratio  $\nu$  of 0.3 and an imposed pressure  $P_i$  of 3 kPa. The displacements of the top (Node 1) and bottom (Node 2) ends of the microsphere are saved for the inverse analyses and the determination of microsphere mechanical properties. "E vol" indicates the volume change (equal to unity if no volume change), namely the determinant of the deformation gradient tensor in the finite strain theory. (B) Comparison of the displacements of the top (blue circle) and bottom (red circle) ends of two microspheres of 1 and 1.2 mm of diameter (1D and 1.2D). (C) Displacements of the top end of a microsphere depending on the ratio of the imposed pressure to the Young's modulus of the microsphere. Curves were built with 15 simulations: 3 Young's moduli (10, 50, 300 kPa) and 5 Poisson's ratios (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.49). (D) Displacements of the bottom end of a microsphere depending on the ratio of the imposed pressure to the Young's modulus of the microsphere as obtained in (C).

The impact of microsphere diameter on the displacements of the top (Node 1) and bottom (Node 2) ends was simulated with microspheres of 1 and 1.2 mm diameter (1D and 1.2D microspheres;  $E = 50 \text{ kPa}$ ,  $\nu = 0.3$ ). For each end, the displacements of the 1.2D microsphere were plotted as a function of the displacements of the 1D microsphere (Fig. 2B). A perfect correlation between the displacements of the top and bottom ends was indicated by the correlation coefficient  $R^2$  while the curve gradient was equal to 1.2, which corresponds to the ratio of the two microsphere diameters. Therefore, the displacement solutions of this hyperelastic non-linear contact problem are strictly proportionate to the radius of the microspheres. In other words, experimental displacements can be divided by the radius of the microsphere in order to compare them to the displacements estimated by FE modeling simulation using a microsphere of 1 mm of diameter. The identification procedure has therefore been simplified, as simulations of a sphere of 1 mm of diameter are sufficient to identify the mechanical properties of microspheres of different diameters.

Moreover, the displacement of the top and bottom ends of a 1D microsphere was evaluated for different Poisson's ratios and Young's moduli as indicated in Fig. 2C-D. The relationship between the displacement of the top or the bottom ends and the ratio between the pressure applied ( $P_i$ ) and the Young's modulus ( $E$ ) were shown in Fig. 2C-D. The top and the bottom displacements of microspheres of different Young's moduli were strictly identical if plotted as a function of the pressure to Young's modulus ratio. Therefore, the displacement solution was found to be strictly proportionate to the Young's modulus. Again, the identification procedure has taken advantage of using the proportionality between the displacement and the Young's modulus of the microsphere. The parameter that has a non-linear influence on the displacements is the Poisson's ratio. No nondimensionalization could therefore be proposed.

### **3.2 . A limited computation time while estimating the mechanical properties**

The different simplifications led to the creation of a lookup-table with the sinking of a microsphere of 1 mm of diameter for three Young's moduli (10, 50 and 300 kPa) and six Poisson's ratios (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.49, 0.499). Eighteen simulations were computed for a total of 18 days computation time since each simulation lasted 5 to 48h. Then, the calculation of the mechanical properties of a microsphere, by interpolation of this table, took less than 5

seconds. Thus, the total computation time needed to determine the mechanical properties of the 62 microspheres of this study with the minimization procedure was greatly reduced. Moreover, any additional computation time that would be required for characterizing other types of microspheres will be short, as no additional FE simulation will be needed.

### 3.3. Comparison of the mechanical properties estimated using the new fluidic and the conventional compression device.

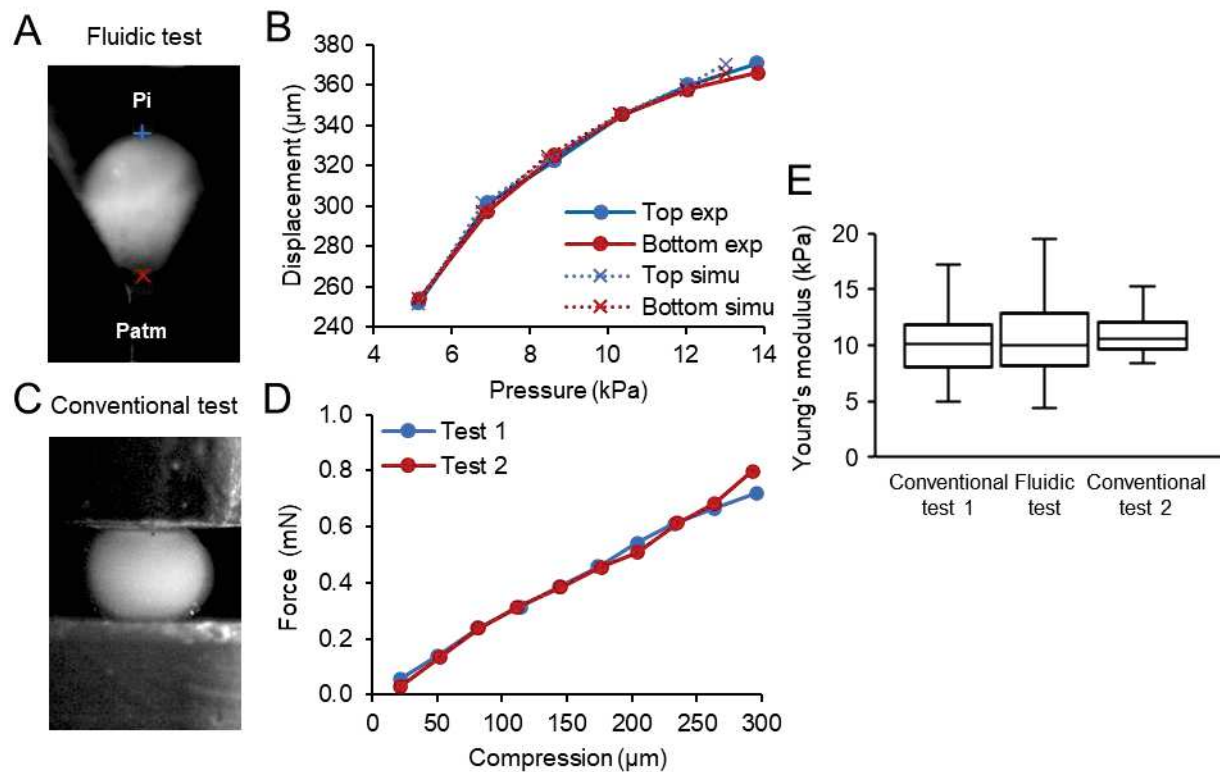


Fig. 3. Mechanical characterization of small crosslinked collagen microspheres. (A) Microsphere in the custom-made device under fluidic pressure (blue cross: top end; red cross: bottom end;  $P_i$ : induced pressure,  $P_{atm}$ : atmospheric pressure). (B) Representative displacement of a microsphere at the equilibrium of each stage of pressure during the fluidic compression test (exp: experimental data, simu: simulated data). (C) Microsphere in the conventional device between two planar surfaces during a compression test. (D) Representative graph of the force developed by a microsphere following conventional compression tests before (Test 1) and after (Test 2) the fluidic compression test. (E) Median Young's modulus of microspheres determined by inverse analysis using the fluidic and conventional compression tests.  $n=16$  independent microspheres.

Small crosslinked collagen microspheres (small CCM of  $1.15 \pm 1.10$  mm diameter) were characterized using the conventional device before and after their characterization using the custom-made device.

During the compression of microspheres within the fluidic device, displacements of both ends (top and bottom) were successfully estimated thanks to the camera (Fig. 3A-B). Compression tests were performed on the same microspheres using the conventional device (Fig. 3C). Forces developed by the microspheres as a function of compression were identical before (Test 1) and after (Test 2) the fluidic compression test (Fig. 3D).

The mechanical properties of microspheres were first analyzed using the data recorded during the fluidic compression test. The root mean square error between the experimental and the simulated ratios of the pressure to Young's modulus was 0.0427. This ratio remained within the range of 0.265 to 1.498, indicating a good fit between simulated and experimental curves (Fig. 3B). The Poisson's ratio was estimated at  $0.35 \pm 0.05$ . This Poisson's ratio was then used in the inverse analysis of the conventional compression test to determine the Young's modulus. The mean Young's modulus of microspheres measured with the fluidic device was  $10.58 \pm 3.93$  kPa and it was not significantly different of that measured with the conventional compression tests (Fig. 3E). These results indicated that microspheres were not altered in the fluidic custom-made device and validated this device as appropriate to measure the mechanical properties of microspheres.

### ***3.4 . Capacity of the fluidic device to characterize microspheres with a wide range of stiffness.***

To further test the capacity of the mechanical characterization procedure with the fluidic device, two other types of microspheres with different chemical and mechanical characteristics were used: alginate microspheres (AM) and collagen microspheres (CM). The microsphere diameters ranged from 0.95 mm to 1.33 mm for the CM and, from 1.15 mm to 1.24 mm for the AM. The stiffness of microspheres was very different according to the type of biomaterials (Fig. 4A). As expected, the small CCM were 3-fold stiffer than CM while AM were the stiffest samples. The large range of estimated Young's moduli (1.46 kPa to 29.56 kPa) indicated that the characterization procedure using the fluidic system could estimate a wide

range of rigidity of microspheres with variable sizes. While the classical compression device, equipped with a very sensitive force-sensor of 0.1 N capacity at full range, could not attain the required sensitivity, the fluidic device, equipped with a 25 kPa pressure sensor, could precisely calculate the mechanical properties of very soft matter with stiffness as low as 1 kPa. Simultaneously, the compressibility of microspheres was assessed by calculating the Poisson's ratio. It indicated that CM and small CCM were compressible, while AM were almost incompressible with a Poisson's ratio close to 0.5 (Fig. 4B).

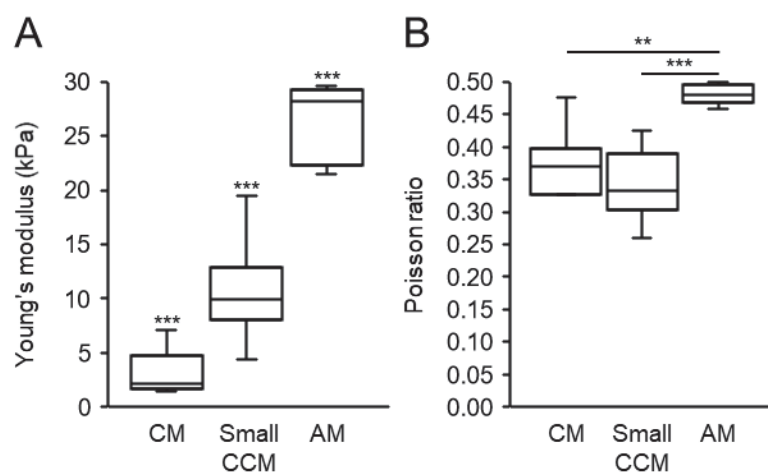


Fig. 4. Mechanical properties of the tested microspheres. Young's modulus (A) and Poisson's ratio (B) obtained for collagen based-microspheres (CM), small crosslinked collagen based-microspheres (small CCM) and alginate microspheres (AG) with the custom-made device. Statistical differences: \*\* p = 0.002 and \*\*\* p ≤ 0.0005.

### 3.5 . Ability of the fluidic device to drive mechanical stimulations with variable pressure signals on small crosslinked collagen microspheres

Different types of mechanical stimulation were tested using the small CCM. Square, sinusoidal, or constant pressure signals were generated thanks to the stepwise control of the single-roller pump for 30 min. For each for each pressure signal, three independent experiments were conducted with identical pressure parameters to estimate the reproducibility of the fluidic compression experiment. Typical signals for square, sinusoidal and constant signal of pressure are shown in (Fig. 5A).

The amplitude, frequency and shape of signals were analyzed. A difference between the target and experimental values of 0.62 and 0.09 kPa for the minimum pressures ( $P_m$ ) and, 0.28 and 0.32 kPa for the maximum pressures ( $P^m$ ) was measured for the square and sinusoidal signals, respectively. A difference of 0.17 kPa was measured for the constant signal. A small difference (less than 0.5%) was observed between the set and measured periods of the dynamic signals. The global shape of the signals had also a good accuracy as shown by an acceptable mean absolute error of the signals (0.90, 0.49 and 0.24 kPa for the square, sinusoidal and constant signals, respectively) considering the targeted pressure range (from 2 to 12 kPa). The higher mean absolute error of pressure observed with square signals was due to the non-instantaneous change of pressure during the transitional phases: the mean absolute error raised up to 5.82 kPa during the transitional times as compared to around 0.77 kPa during the stage times. Moreover, the stage of the square signal showed a creep of pressure, which led to a higher error compared to the sinusoidal signal. These results indicated that constant and sinusoidal signals had a better shape than square signals.

The repeatability of signals was tested during a 30 min stimulation period. The standard deviation of  $P_m$  and  $P^m$  was 0.27 and 0.29 kPa for the sinusoidal signals and the standard deviations of pressure were 0.14 kPa for the constant signals (Fig. 5B). For the square signals, the standard deviations of  $P_m$  (0.74 kPa) and  $P^m$  (0.94 kPa) were slightly higher and this was due to the creep of pressure, as shown in Fig. 5B. Moreover, the periods of dynamic signals were extremely repeatable (1.63% and 1.31% of variation for the square and sinusoidal signals, respectively). This showed a better repeatability for square signals than for sinusoidal signals.

Reproducibility of signals was tested by stimulating three groups of small CCM. The standard deviations of signals were 0.38 and 0.25 kPa for  $P_m$  and  $P^m$  of square signals, 0.15 and 0.29 kPa for  $P_m$  and  $P^m$  of sinusoidal signals and 0.12 kPa for constant signals. Moreover, the periods of dynamic signals were extremely reproducible (0.07% and 0.11% of variation between groups for the square and sinusoidal signals, respectively). This demonstrated that pressure signals were reproducible between different experiments.

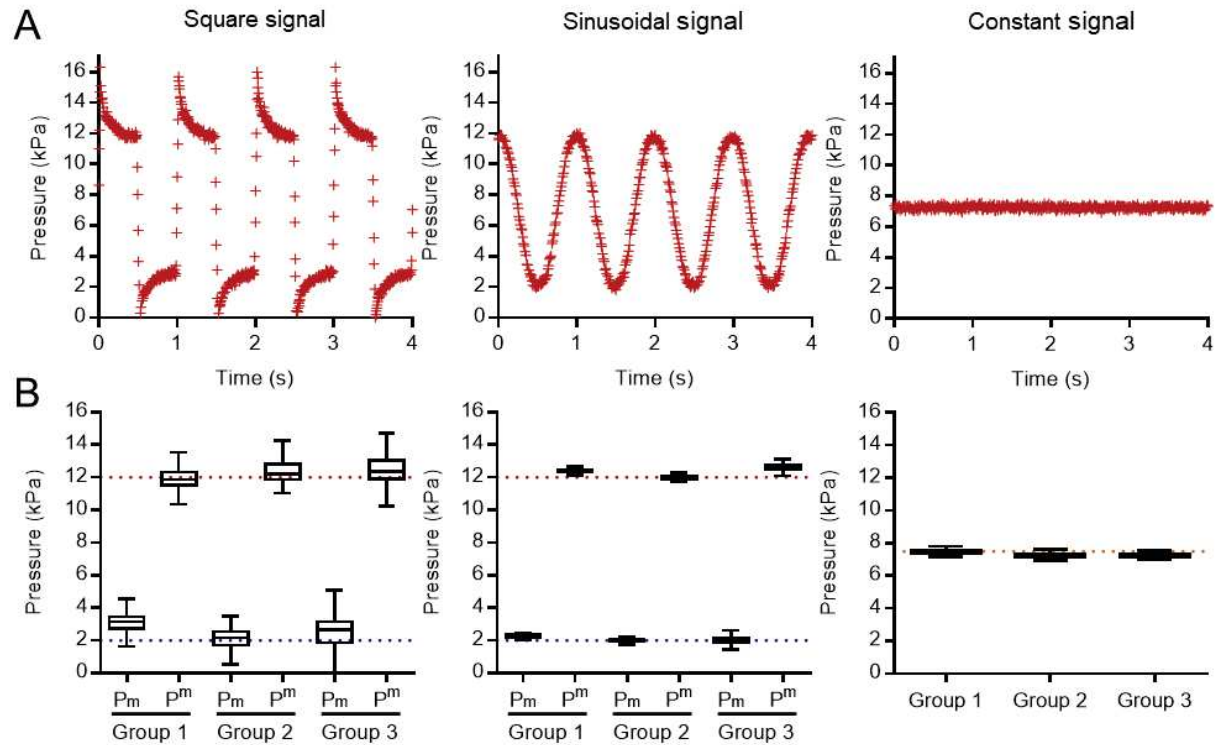


Fig. 5. Square, sinusoidal and constant signal of pressure applied on small crosslinked collagen microspheres. (A) Representative square, sinusoidal and constant signals of pressure generated during the stimulation of small crosslinked collagen microspheres. (B) Boxplot charts present the distribution of maximum ( $P_m$ ) and minimum ( $P_m$ ) pressures of square (left column), or sinusoidal signals (center column) and the distribution of pressures ( $P$ ) of the constant signals (right column).  $P_m$ ,  $P_m$  and  $P$  are compared to the maximum (red dashed line), minimum (blue dashed line) and mean (orange dashed line) targeted value, respectively. For each type of pressure signal, three groups of 6 microspheres were stimulated for 30 min.

### 3.6. Ability of the fluidic device to drive mechanical stimulations on microspheres of variable sizes and mechanical properties

The quality of the pressure signals driven by the fluidic system could be influenced in particular by the size and mechanical properties of the microspheres. Moreover, the amplitude of stimulation needs to be adapted to the type of microsphere, since too low pressure could induce no deformation and too high pressure could destroy the microspheres in the cone. Thus, different types of mechanical stimulation were tested again using large crosslinked microspheres (large CCM), AM and CM. The precision of the amplitude of the pressure signals, repeatability and reproducibility were found similar whatever the microspheres and the range of pressures used (Fig. 6A-C). For stimulating large CMM, which

are  $1.37 \pm 0.09$  mm in diameter versus  $1.15 \pm 0.10$  mm for small CCM, a higher stimulation pressure using a sensor with a wider range of pressures and a larger soft tube for the single-roller pump were chosen. The results (Fig. 6A) indicated similar accuracy, repeatability and reproducibility of the signals obtained with the small and large CCM, except for  $P_m$  of the dynamic signals where the repeatability and reproducibility were twice better in the case of the larger CCM.

Depending on the Young's moduli of the microspheres tested, the ranges of stimulation pressures were adjusted (Table 1). Thus, the sensor with the smallest range and the smallest soft tube was used for CM. The root mean square error tended to increase with the decrease of range of pressures but stayed under 20%, 16% and 4% for the sinusoidal, square and constant signals, respectively, which indicated that the shape of signals was accurate. Similarly, the repeatability and reproducibility of all parameters tended to deteriorate with the decrease of ranges of pressures (Fig. 6A-C). Variability remained under 5% for the ramp signal and under 7% for the  $P^m$  of dynamic signals but the variability of  $P_m$  (minimum pressure at each period) reached 25%. We noticed a wider distribution of the values of the quality criteria for the sinusoidal and constant signals in the first group of CM (Fig. 6C). The stabilization of signals was obtained only after 10 min of stimulation in that specific case. During the remaining stimulation time (20 min), the standard deviation of signal parameters was less than 2.5% showing a good repeatability. The periods of dynamic signals were also extremely repeatable and reproducible since the variability of this criteria never reached 1%. The results indicated that  $P_m$  are difficult to generate in a repeatable and reproducible manner when close to  $P_{atm}$ .

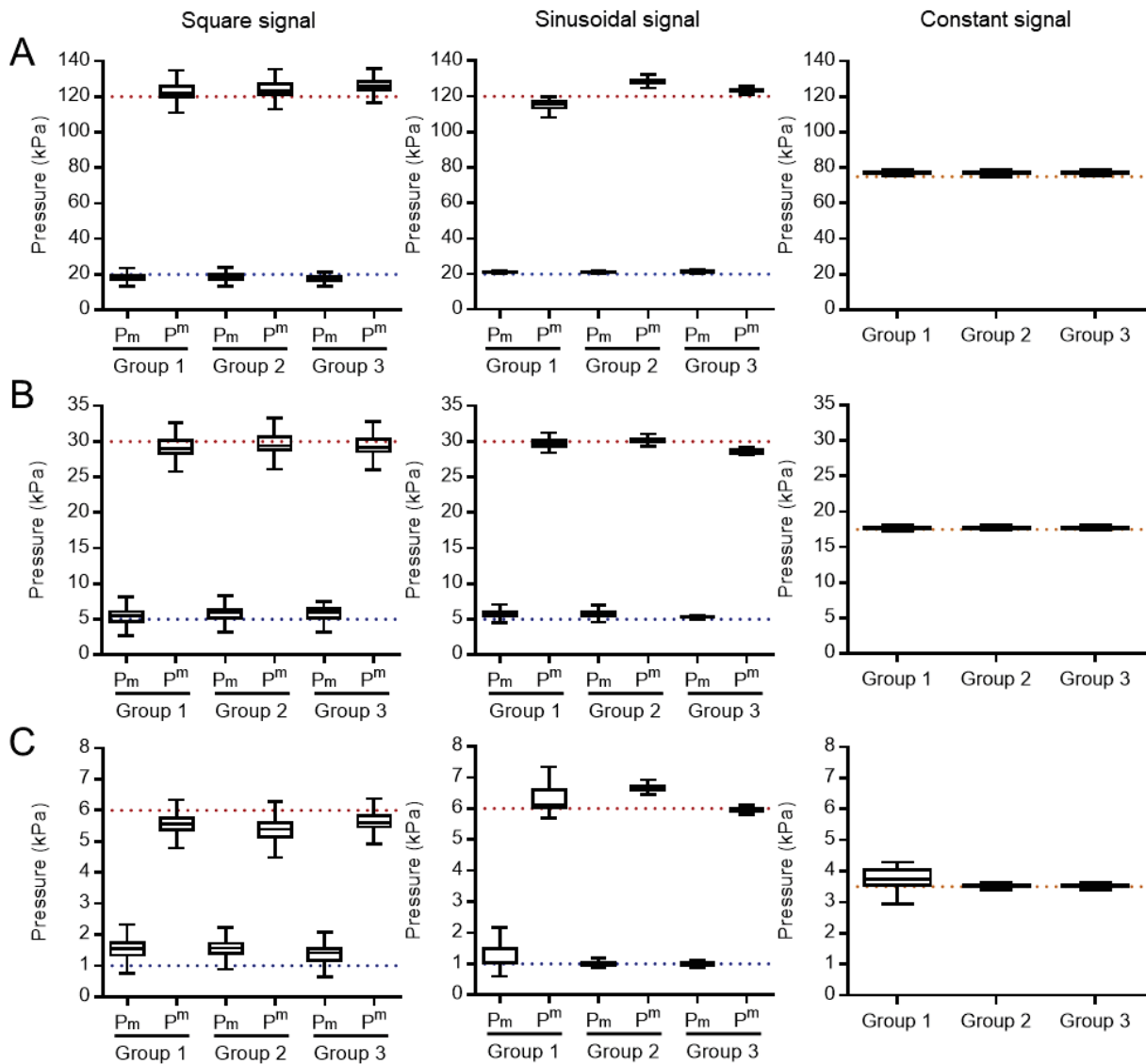


Fig. 6. Repeatability and reproducibility of pressure signals applied on the different types of microspheres. Square, sinusoidal or constant signals of pressure were applied on large crosslinked collagen microspheres (A), alginate microspheres (B) and collagen microspheres (C). Boxplot charts present the distribution of maximum ( $P^m$ ) and minimum ( $P_m$ ) pressures of square (left column), or sinusoidal signals (center column) and the distribution of pressures ( $P$ ) of the constant signals (right column).  $P^m$ ,  $P_m$  and  $P$  are compared to the maximum (red dashed line), minimum (blue dashed line) and mean (orange dashed line) targeted value, respectively. For each type of pressure signal and each type of microspheres, three groups of 6 microspheres were stimulated during 30 min.

## 4 . Discussion

The present custom-made fluidic device was designed for the mechanical stimulation and characterization of cartilage micropellets and validated here using collagen- and alginate-based microspheres. Our study demonstrates that the device is appropriate and accurate to mechanically stimulate and characterize microspheres in the micrometer range (typically from 900 to 1500  $\mu\text{m}$  in diameter), with different stiffness and compressibility. It allows to load under compression six microspheres simultaneously, using a wide range of precisely defined pressure and frequency regimes. Moreover, the interest of the device will be to provide enough biological material for transcriptomic and proteomic characterization of the six cartilage micropellets that will have been submitted to identical mechanical stimulations. It could also be used to periodically stimulate cartilage micropellets during the differentiation process while maintaining them in the culture medium, within the device.

The fluidic device was designed to stimulate mechanically soft materials by integrating a sensitive pressure sensor, small pressurizing tubes, a sensitive and adequate camera and, control units. Mechanical stimulations were applied on microspheres using different types of pressure signals. The accuracy of the shape of pressure signals, which are rarely described in studies assessing the impact of dynamic mechanical stimulation, was determined (Salinas et al., 2018). The precision of the sinusoidal and constant pressure signals was shown to be good but that of square signals was not perfect probably due to the creep of the pressure stages. Three possible sources of creep were identified: (i) a change of microspheres shape during the stages, (ii) leakages of the fluid between the spheres and the device, and (iii) a creep of the soft tubes used within the pumps, which all might impact the creep of the pressure stage. The imperfect round shape of microspheres or the position in the cone may lead to fluid flow through the cone. The visco-elasticity of soft tubes could also explain the symmetry observed between the creep of the  $P_m$  and  $P^m$  stages. Currently, only the mean values of the minimum pressure stage use the feedback of the pressure signal. The accuracy of square pressure signals should be improved through the modification of the closed-loop control of the pump. Of importance, all signals were repeatable and reproducible, even though the square and constant signals were more reproducible than the sinusoidal signal. For all shapes of pressure signals, the most challenging parameter to control is  $P_m$ , which can be difficult to maintain stable as it allows to stabilize the microspheres within the cones.

Along with the demonstration of the accuracy of signal shapes, repeatability and reproducibility, the adaptability of the fluidic device is another main interest. This adaptability was shown by its capacity to stimulate microspheres with different diameters and mechanical properties (Young's moduli from 1.5 to 30 kPa and Poisson's ratio from 0.25 to 0.499). Various amplitudes of relative pressure can be generated (from 5 to 100 kPa), which means that the fluidic system can test samples with a wide range of stiffness. Moreover, the device is up scalable to samples of smaller or larger sizes since tanks are 3D printed and can be resized at custom.

Combined to the new fluidic device, a fast numerical procedure to identify the Young's moduli and the Poisson's ratios of the microspheres was specifically developed for this study. The computation time revealed to be a key point as a relatively high number of microspheres had to be characterized. The total computational cost of the identification procedure is mainly due to the resolution of the FE numerical simulations. Taking advantage of two dimensionless ratios, an interpolation method, which used a few FE numerical solutions of the problem, was successful to identify the mechanical properties of the microspheres. This method drastically reduced the overall computation time of the study. When the initial database of FE simulations is completed, a major advantage of such a method is that the computation time is reduced to less than 5 seconds for each microsphere to be characterized. This will allow to mechanically characterize many samples, without elevated computational costs.

The accuracy of mechanical property measures was also demonstrated with microspheres with different chemical and mechanical properties. Indeed, the measures of the Young's moduli of small CCM obtained with the conventional test were similar to those obtained in the fluidic device and the same accuracy of results was obtained with stiffer alginate microspheres as tested (Petitjean et al., 2019). Using our custom-made fluidic device and a fast numerical FEM-based identification procedure, the Young's modulus values obtained for CM were found to be in the range of those determined for collagen microspheres or gels in other studies (Chan et al., 2008; Ramtani et al., 2010; Yamamura et al., 2007). However, the values of Young's modulus for AM were lower than the expected value of 200 kPa previously reported (Ouwerx et al., 1998). In this last study, an alginate solution with medium viscosity was used while we used an alginate solution with low viscosity. Moreover, they measured an instantaneous elastic modulus with a compression increase at the rate of 0.03 mm/s, which tends to increase the apparent Young's modulus with increasing viscosity.

In the study, only the elastic parameters (Young's modulus and Poisson's ratio) were estimated. However, studying the viscoelastic behavior of such biomaterials is of first importance and could be assessed in future studies using our fluidic system (Edelsten et al., 2010; Mak, 1986). Up today, the major limitation of such future visco-hyperelastic characterizations seems to be the computation time.

In the present study, several assumptions were adopted for the mechanical characterization of microspheres. First, microspheres with the most spherical shape were selected, in order to get experimental data consistent with the numerical model. An exact axisymmetry is difficult to achieve due to the irregular shape of microspheres but, considering a sufficiently large number of random samples, the distribution of measured parameters should reflect the intrinsic behavior of the material. Second, a quite simple hyperelastic law was chosen for the FE model, which may not perfectly reproduce the mechanical behavior of microspheres. However, within the pressure range which was used, a Neo-Hookean model could describe with a sufficient quality the behavior of the material, even though collagen fibers are generally described by a non-linear hyperelastic behavior (Fung, 2013). The largest error source of mechanical characterization with the fluidic device was the tracking procedure. The resolution of recorded pictures was 2.65  $\mu\text{m}$  for a range of microsphere displacements during compression tests between 200 to 400  $\mu\text{m}$ . Moreover, the quality of pictures, notably the contrast between the microsphere and the background of the tank, is the key factor for accurate tracking.

## **5 .Conclusion**

The main interest of this new custom-made fluidic device lies in the reliability to mechanically stimulate and characterize microspheres made of soft materials in a single system. Three types of pressure signals can be generated to stimulate microspheres by a non-destructive compression test in a repeatable and reproducible manner. The validation of the fluidic device to stimulate and characterize microspheres of different sizes and stiffness was the first step before its use for measuring the mechanical properties of cartilage micropellets. Of note, six MSC-based cartilage micropellets, regardless of their size and shape, can be mechanically stimulated in parallel allowing both the molecular and mechanical characterization on the same group of samples. The perspectives are to evaluate the growth

of cartilage micropellets under mechanical stimuli in a longitudinal differentiation study while keeping the microspheres in the device in the differentiation medium throughout the differentiation process.

### **Acknowledgements**

We thank Yvan Duhamel from Pro3D platform (Univ Montpellier) for 3D-printing of the fluidic device tank and Gille Camp and Quentin Chapelier from COMPEX platform (LMGC) for the fabrication of some parts of the device.

### **Funding**

We gratefully acknowledge funding support from Inserm and the University of Montpellier. This work benefitted from a French State grant managed by the French National Research Agency under the Investments for the Future programme (LabEx NUMEV, reference n°ANR-10-LABX-20). This work has received financial support from CNRS through the MITI interdisciplinary programs (AAP "Osez l'interdisciplinarité 2018", MoTiV Project).

### **Declarations of interest**

The authors disclose any financial or personal conflict of interest.

### **Authors contributions**

**N. Petitjean:** methodology, investigation, writing-original draft preparation. **G. Dufour:** conceptualization, methodology, software. **P. Canadas:** conceptualization. **M. Maumus:** investigation. **P. Valorge:** conceptualization, investigation. **S. Devic:** conceptualization, investigation. **J. Berthelot:** investigation. **E. Belamie:** investigation. **P. Royer:** methodology. **C. Jorgensen:** review-editing. **D. Noël:** conceptualization, writing-review and editing, supervision. **S. Le Floc'h:** conceptualization, methodology, writing-review and editing, supervision.

## References

- Au-yeung, K.L., Sze, K.Y., Sham, M.H., Chan, B.P., 2009. Development of a Micromanipulator-Based Loading Device for Mechanoregulation Study of Human Mesenchymal Stem Cells in Three-Dimensional Collagen Constructs. *Tissue Engineering Part C: Methods* 16, 93–107. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0707>
- Chan, B.P., Li, C.H., Au-Yeung, K.L., Sze, K.Y., Ngan, A.H.W., 2008. A Microplate Compression Method for Elastic Modulus Measurement of Soft and Viscoelastic Collagen Microspheres. *Ann Biomed Eng* 36, 1254–1267. <https://doi.org/10.1007/s10439-008-9507-y>
- Demoor, M., Ollitrault, D., Leduc-gomez, T., Bouyoucef, M., Hervieu, M., Fabre, H., Lafont, J., Denoix, J.-M., Audigié, F., Mallein-Gerin, F., Legendre, F., Galera, P., 2014. Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochimica et biophysica acta* 1840. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.030>
- DiSilvestro, M.R., Zhu, Q., Wong, M., Jurvelin, J.S., Suh, J.-K.F., 2000. Biphasic Poroviscoelastic Simulation of the Unconfined Compression of Articular Cartilage: I— Simultaneous Prediction of Reaction Force and Lateral Displacement. *J Biomech Eng* 123, 191–197. <https://doi.org/10.1115/1.1351890>
- Dubois, F., Mozul, R., 2017. LMGC90. Presented at the 13e colloque national en calcul des structures.
- Dusfour, G., Maumus, M., Cañadas, P., Ambard, D., Jorgensen, C., Noël, D., Le Floc'h, S., 2020. Mesenchymal stem cells-derived cartilage micropellets: A relevant in vitro model for biomechanical and mechanobiological studies of cartilage growth. *Materials Science and Engineering: C* 112, 110808. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110808>
- Edelsten, L., E. Jeffrey, J., V. Burgin, L., M. Aspden, R., 2010. Viscoelastic deformation of articular cartilage during impact loading. *Soft Matter* 6, 5206–5212. <https://doi.org/10.1039/C0SM00097C>
- Fung, Y.C., 2013. *Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues*. Springer Science & Business Media.
- Geuzaine, C., Remacle, J.-F., 2009. Gmsh: A 3-D Finite Element Mesh Generator with Built-in Pre- and Post-Processing Facilities. *International Journal for Numerical Methods in Engineering* 79, 1309–1331. <https://doi.org/10.1002/nme.2579>
- Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., Yoo, J.U., 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research* 238, 265–272. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3858>
- Mak, A.F., 1986. The Apparent Viscoelastic Behavior of Articular Cartilage—The Contributions From the Intrinsic Matrix Viscoelasticity and Interstitial Fluid Flows. *J Biomech Eng* 108, 123–130. <https://doi.org/10.1115/1.3138591>
- Mathieu, M., Vigier, S., Labour, M.-N., Jorgensen, C., Belamie, E., Noël, D., 2014. Induction of mesenchymal stem cell differentiation and cartilage formation by cross-linker-free collagen microspheres. *European Cells and Materials* 28, 82–97. <https://doi.org/10.22203/eCM.v028a07>
- Miyaniishi, K., Trindade, M.C.D., Lindsey, D.P., Beaupré, G.S., Carter, D.R., Goodman, S.B., Schurman, D.J., Smith, R.L., 2006. Effects of hydrostatic pressure and transforming

- growth factor-beta 3 on adult human mesenchymal stem cell chondrogenesis in vitro. *Tissue Eng.* 12, 1419–1428. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1419>
- Natenstedt, J., Kok, A.C., Dankelman, J., Tuijthof, G.J., 2015. What quantitative mechanical loading stimulates in vitro cultivation best? *J Exp Orthop* 2. <https://doi.org/10.1186/s40634-015-0029-x>
- Ouwerx, C., Velings, N., Mestdagh, M.M., Axelos, M.A.V., 1998. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks* 6, 393–408. [https://doi.org/10.1016/S0966-7822\(98\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0966-7822(98)00035-5)
- Petitjean, N., Maumus, M., Dusfour, G., Cañadas, P., Jorgensen, C., Royer, P., Noël, D., Floc'h, S.L., 2019. Validation of a new technique dedicated to the mechanical characterisation of cartilage micropellets. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* 22, S296–S298. <https://doi.org/10.1080/10255842.2020.1714919>
- Ramtani, S., TAKAHASHI-IÑIGUEZ, Y., Helary, C., GEIGER, D., GUILLE, M., 2010. Mechanical behavior under unconfined compression loading of dense fibrillar collagen matrices mimetic living tissues. *Journal of Mechanics in Medicine and Biology - J MECH MED BIOL* 10. <https://doi.org/10.1142/S0219519410003290>
- Ringe, J., Burmester, G.R., Sittinger, M., 2012. Regenerative medicine in rheumatic disease—progress in tissue engineering. *Nature Reviews Rheumatology* 8, 493–498. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.98>
- Salinas, E.Y., Hu, J.C., Athanasiou, K., 2018. A Guide for Using Mechanical Stimulation to Enhance Tissue-Engineered Articular Cartilage Properties. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 24, 345–358. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2018.0006>
- Yamamura, N., Sudo, R., Ikeda, M., Tanishita, K., 2007. Effects of the Mechanical Properties of Collagen Gel on the In Vitro Formation of Microvessel Networks by Endothelial Cells. *Tissue Engineering* 13, 1443–1453. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0333>

## ***VI.2. L'évaluation de la réponse à court terme des micropellets de cartilage à des stimulations mécaniques***

Seulement deux types de stimulation des micropellets ont été présentés dans la littérature (Miyanishi et al., 2006a, 2006b; Parate et al., 2017; Safshekan et al., 2012). Des pressions hydrostatiques (5 ou 10 MPa) et des champs électromagnétiques de faible intensité (2 mT) ont été appliqués un jour seulement après la formation des micropellets de CSMs. Les deux types de stimulations dynamiques avec des intensités, fréquences et durées différentes ont été favorables à l'expression des gènes chondrocytaires (*SOX9*, *AGG* et *COL IIB*). Alors que l'application de pressions hydrostatiques est efficace avec des stimulations à 0,5 ou 1 Hz, durant 4 heures par jour pendant plusieurs jours, seule une dizaine de minutes de stimulation électromagnétique, à 15 Hz, le premier jour, est efficace après 1 et 3 semaines de culture. Ces articles montrent des paramètres et des types de stimulations différents. Or, le dispositif développé dans le cadre de ce projet permet d'appliquer un nouveau type de stimulation qui engendre de plus grandes déformations des micropellets. C'est pourquoi, une première étape de mise au point du protocole expérimental était nécessaire. Ensuite, l'objectif était, pour la première fois, d'observer l'impact de grandes déformations sur le développement des micropellets de cartilage. Pour ce faire, les premières investigations ont été menées en observant l'impact de divers paramètres de stimulation sur le développement des micropellets de cartilage.

### ***VI.2.1. Culture des cellules souches mésenchymateuses***

Au cours de ce projet, des CSMs humaines issues de la moelle osseuse de deux donneurs ont été utilisées. Les cellules ont tout d'abord été amplifiées jusqu'au passage 5 dans un milieu de culture classique de prolifération ( $\alpha$ MEM, 10% sérum de veau fœtal, 2 mM glutamine, 1 ng/ml bFGF, 100 U/ml pénicilline et 100  $\mu$ g/ml streptomycine). Les micropellets ont ensuite été obtenus par centrifugation de 250 000 cellules à 300 g pendant 5 min dans des tubes coniques de 15 mL. Les micropellets ont été cultivés jusqu'à 14 ou 21 jours dans 0.5 mL de milieu de culture chondrogénique (DMEM, 1 mM sodium pyruvate, 0.35 mM proline, 170  $\mu$ M acide ascorbique-2-phosphate, 1% ITS, 0.1  $\mu$ M dexaméthasone et 10 ng/mL TGF $\beta$ 3).

### ***VI.2.2. Mise en place du protocole de stimulation***

Pour ce projet, nous souhaitons analyser, dans un premier temps, l'impact des stimuli mécaniques sur le phénotype des cellules en analysant l'expression des gènes *SOX9*, *AGG* et *COL IIB*. Plusieurs problématiques se sont alors posées. Nous nous sommes demandé (1) à quel temps il était préférable d'observer l'expression de ces gènes, (2) à partir de combien de jours de culture nous pouvions stimuler mécaniquement les micropellets et (3) si ces stimulations devaient être continues ou discontinues.

#### VI.2.2.a. 24 heures sont suffisantes pour observer l'impact des stimulations mécaniques sur l'expression géniques des micropellets

Afin de déterminer à quel temps il était plus opportun d'observer l'expression des gènes des cellules après l'application de stimuli mécaniques, nous avons choisi d'analyser les échantillons 24, 48 ou 72 heures après leur stimulation. Ces stimulations ont été faites, après 21 jours de culture des micropellets, par pression sinusoïdale à une fréquence de 1 Hz, une amplitude de  $12,86 \pm 4,90$  kPa et une pression minimale ( $P_m$ ) de  $3,33 \pm 0,35$  kPa durant 30 minutes. Après 21 jours de culture, la différenciation des CSMs est amorcée et le micropellet admet déjà une certaine rigidité (Dusfour et al., 2020). 1 Hz est la fréquence de stimulation la plus utilisée et est généralement favorable à l'expression des gènes chondrocytaires. L'amplitude choisie est incluse dans la gamme de contraintes utilisées pour la compression de néo-tissus de chondrocytes ou de CSMs (voir V.6.1.b et V.6.2.b).

La Figure 15A montre que l'expression du gène *SOX9* reste stable durant les 72 heures après les stimulations. En revanche, les stimuli ont régulé positivement l'expression des gènes *AGG* et *COL IIB*. Cette régulation est transitoire puisque l'expression de ces gènes diminue 48 et 72 heures après. Ainsi, observer l'expression des gènes chondrocytaires après 24 heures semble être suffisant.

#### VI.2.2.b. 21 jours de préculture sont nécessaires pour appliquer des stimulations mécaniques via le dispositif fluide

L'analyse de l'expression des gènes pour évaluer la différenciation chondrocytaire des CSMs dans le modèle biologique du micropellet est souvent réalisée après 21 jours de culture (Huang et al., 2004; Liu et al., 2013). La différenciation des CSMs est pourtant progressive. L'expression du gène *AGG* augmente dès les premiers jours après l'induction de la culture en micropellets des CSMs. L'expression du gène *COL II* augmente plus tardivement, plus d'une dizaine de jours après (Barry et al., 2001). De même les propriétés mécaniques des micropellets augmentent au cours des 21 premiers jours de culture mais ne sont pas mesurables à J7 (Dusfour et al., 2020). Ainsi, stimuler mécaniquement des micropellets de 7 jours avec notre dispositif était peu envisageable du fait de la très faible rigidité des objets à ce stade mais nous avons testé l'impact de stimulations sur des micropellets après 14 ou 21 jours de culture. Des stimulations sinusoïdales de fréquence 1 Hz, d'amplitude  $10,85 \pm 5,68$  kPa et de  $P_m$   $3,40 \pm 0,36$  kPa ont été appliquées durant 30 minutes.

Lors de ces expérimentations, la manipulation des micropellets de 21 jours était plus aisée que celle des micropellets de 14 jours. Ces dernières étaient plus souples et moins denses, ce qui rend plus difficile leur maintien dans le cône.

La Figure 15B montre que la différenciation des CSMs au sein du micropellet augmente entre les jours 14 et 21 puisqu'une augmentation de l'expression des gènes *SOX9*, *AGG* et *COL IIB* est observable (NS J14 et NS J21). À la suite des stimulations mécaniques, l'expression des trois gènes est augmentée à J21 tandis que seule l'augmentation de l'expression du gène *AGG* est identifiable à J14. Par comparaison des groupes stimulés à leur témoin respectif, l'expression du gène *SOX9* est

multipliée par 0,41 à J14 et par 3,53 en moyenne à J21. On remarque une tendance à l'augmentation de l'expression des gènes *AGG* et *COL IIB* à l'issue des stimulations des micropellets de 14 jours puisqu'elle est multipliée par 1,95 environ mais cette augmentation est plus importante pour les micropellets de 21 jours puisque l'expression des gènes est multipliée par 3,91 en moyenne pour le gène *AGG* et par 8.64 pour le gène *COL IIB*.

L'ensemble de ces résultats d'expression des gènes *AGG*, *COL IIB* et *SOX9* montre que les stimuli mécaniques appliqués avec le système fluïdique sont plus adaptés et favorables pour des micropellets de 21 jours.

#### VI.2.2.c. L'application de stimulations mécaniques continues est néfaste à l'expression des gènes chondrocytaires

Lors de la mise en place du protocole, nous avons également essayé de changer l'orientation des micropellets en cours des stimulations afin de répartir de manière plus homogène les contraintes. Pour se faire, nous avons découpé les 30 min de stimulation en 10 cycles de 3 minutes de stimulation et 23 secondes de pause. Ces 23 secondes sont composées de 15 secondes à pression atmosphérique ( $P_{atm}$ ) et 8 secondes de mise en pression pour retrouver la  $P_m$  du signal de stimulation. Cette découpe du signal avait pour objectif le rebond des micropellets dans leur cône et leur changement de position. Si cette technique était efficace pour les premiers cycles, ce n'était pas le cas pour les suivants. En effet, la pression positive appliquée crée un fluage des micropellets dans leur cône et leur extraction du cône à l'issue des stimulations nécessite une pression négative relativement à  $P_{atm}$ . Etant donné l'inefficacité de cette technique, nous avons éliminé l'utilisation de cycles de stimulation et appliqué une stimulation continue. Cependant, la Figure 15C montre que pour des stimulations sinusoïdales de fréquence 1 Hz, d'amplitude  $12,9 \pm 5,36$  kPa et de  $P_m$   $4,33 \pm 1,70$  kPa, durant 30 min, l'application de ces stimulations de manière continue a conduit à la diminution de l'expression des gènes chondrocytaires par comparaison à des stimulations intermittentes qui ont généré une régulation positive de ces gènes. Nous avons donc conservé par la suite des stimulations intermittentes. En revanche, les pauses de 23 secondes ont été maintenues à  $P_m$  afin que l'orientation de l'ensemble des micropellets soit conservée tout au long de la stimulation et éviter le rebond aléatoire des micropellets lors des premiers cycles de stimulations.

Ces résultats préliminaires ont montré la faisabilité de la stimulation mécanique de micropellets de cartilage par le dispositif fluïdique que nous avons développé. En effet, les stimulations mécaniques ont provoqué la déformation des micropellets dans leur cône et la modification de l'expression des gènes. Aucune différence significative n'a été observée pour ces résultats qui indiquent donc seulement des tendances. Néanmoins, ces expériences préliminaires ont servi à mettre en place le protocole de stimulation tel que défini ultérieurement.

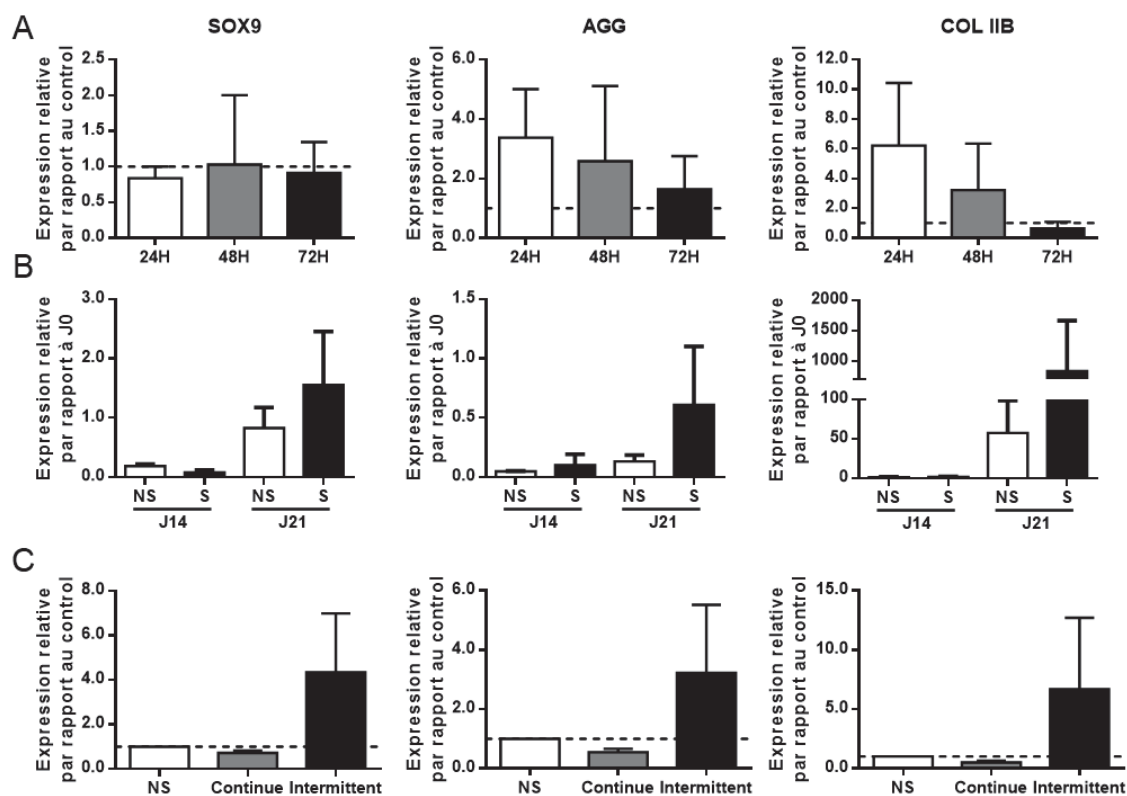


Figure 15 – Expression des gènes chondrocytaires par des micropellets de cartilages lors de l'évaluation des paramètres expérimentaux nécessaire à la mise en place d'un protocole de stimulation des micropellets de cartilage avec le dispositif fluïdique. (A) Expression des gènes chondrocytaires à 24, 48 et 72 heures après la stimulation de micropellets de CA à J21 (n = 2 ou 3). Les résultats sont normalisés par rapport au contrôle non stimulé. (B) Expression des gènes chondrocytaires à J22 de micropellets de 14 ou 21 jours (J14 ou J21 et, n = 2 ou 4, respectivement) stimulés mécaniquement ou non (S ou NS, respectivement) en fonction de l'expression de ces gènes lors de la mise en micropellet (J0). (C) Impact de stimulations mécaniques continues (n = 4) ou intermittentes (n = 3) sur l'expression des gènes chondrocytaires de micropellets de 21 jours par comparaison au témoin non stimulé (NS).

À noter qu'une irrégularité des amplitudes des sinusoides a été observée lors de ces expérimentations. Le signal sinusoidal est généré par un mouvement oscillatoire régulier du galet de la pompe mono-galet. L'amplitude de déplacement du galet est déterminée lors d'une session d'initiation des stimulations par des incréments de déplacements jusqu'à obtenir la bonne amplitude. Cependant, si l'enfoncement des micropellets dans leur cône évolue au cours des stimulations et que les fuites de fluide dans les cônes, du fait de la forme irrégulière des micropellets change, l'amplitude de pression obtenue au cours de la stimulation change aussi. Ainsi, la programmation du signal sinusoidal nécessite de nouveaux ajustements pour être adaptatif au cours des stimulations. Nous avons donc fait le choix de stimuler les micropellets avec un signal de pression carré pour la suite des investigations. Ce dernier a été décrit précédemment (voir VI.1.2), comme répétable et reproductible. De plus, le fluage des plateaux de pression a été éliminé en utilisant un rétrocontrôle de la pompe mono-galet (voir VI.2.3).

VI.2.3. Analyse de l'impact de divers paramètres de stimulation mécanique sur le développement des micropellets à court terme

**Article 3** : article original

« Les stimulations mécaniques favorisent le phénotype chondrocytaire lors de la culture en micropellet de cellules souches mésenchymateuses humaines »

**Fluidic-based mechanical stimulation enhances the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in micropellets**

N. Petitjean, P. Cañadas, P. Royer, C. Jorgensen, S. Le Floc'h, D. Noël

En préparation

Les micropellets de cartilage sont le modèle de référence pour étudier de manière biochimique la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes. Cela a permis de mettre en évidence l'intérêt de ce modèle pour modéliser la croissance du cartilage articulaire (CA) et la production de matrice extracellulaire (MEC). Cependant, les micropellets de cartilage ne reproduisent pas totalement la formation d'un tissu adulte et n'atteignent pas les propriétés mécaniques du CA mature. Un facteur environnemental crucial dans la maturation du CA est la stimulation mécanique qui favorise la sécrétion et l'organisation de la MEC. Or, les seules études montrant l'impact de stimulations mécaniques sur la croissance de micropellets de cartilage n'utilisent que des procédés impliquant une déformation infinitésimale du micropellet (pression hydrostatique, champ électromagnétique). Malgré leur effet bénéfique, elles ne reproduisent pas nécessairement les stimulations complexes subies par le CA *in vivo*. C'est pourquoi, le dispositif précédemment développé et validé pour la stimulation et la caractérisation mécaniques de microsphères pourrait être un bon outil pour améliorer la production de MEC par les micropellets de cartilage et la quantifier d'un point de vue biomécanique. Une étude paramétrique visant à évaluer l'impact de stimulations mécaniques impliquant, pour la première fois, des déformations des micropellets de cartilage a été réalisée en procédant à l'application d'un signal de pression carré à différentes amplitudes (3,5 kPa, 7 kPa et 14 kPa), fréquences (0,25 Hz, 0,5 Hz, 1 Hz et 2 Hz) et pour différentes durées (15 min, 30 min et 60 min) à J21. L'impact de la répétition des

stimulations (1 Hz, 30 min) a ensuite été évalué au cours d'une journée (7 kPa) puis d'une semaine (3,5 ou 7 kPa). Une analyse de l'expression des gènes chondrocytaires (*SOX9*, *AGG*, *COL IIB*) a été réalisée 24 heures après la dernière stimulation. Un test de multi-fluage a été effectué pour évaluer les propriétés mécaniques des micropellets à J21 et à l'issue de trois jours de stimulation mécanique (J26). Un modèle éléments finis axisymétrique avec une loi Néo-Hookéenne hyperélastique a été utilisé afin d'analyser les déformations des micropellets au cours des stimulations mécaniques ainsi que leurs propriétés mécaniques. Une régulation positive de l'expression des trois gènes (*SOX9*, *AGG* et *COL IIB*) a été observée pour les durées 30 et 60 min, les fréquences 1 et 2 Hz ainsi que pour les trois amplitudes. La répétition au cours de la journée de ces stimulations diminue l'expression des gènes. En revanche, la répétition de ces stimulations tous les jours pour une amplitude de 3.5 kPa a régulé positivement l'expression du gène *COL IIB*, et la répétition trois fois par semaine de stimulations avec 7 kPa d'amplitude a régulé positivement l'expression des gènes *AGG* et *COL IIB*. L'analyse des déformations des micropellets en utilisant le modèle éléments finis a montré des déformations en compression et tension d'amplitudes comprises entre 0 et 40% selon les directions radiale, circonférentielle et longitudinale. L'analyse de coupes histologiques et du contenu en ADN des micropellets suggère que les déformations ne provoquent pas d'altérations majeures. En revanche, les stimulations à 7 kPa, 1 Hz pendant 30 min qui ont montré une régulation positive et significative des gènes *SOX9* et *AGG*, montrent aussi la régulation positive de l'expression du gène *MMP13*, caractéristique de l'activité catabolique du cartilage. Ceci suggère que l'intensité des stimulations appliquées pourrait être trop élevée. Enfin, la caractérisation mécanique de micropellets à J21 a montré un module d'élasticité de  $47,58 \pm 26,24$  kPa et un coefficient de Poisson de  $0,46 \pm 0,02$ . En revanche, la non-linéarité du comportement élastique des micropellets à J26 a rendu l'analyse de leurs propriétés mécaniques via le modèle numérique utilisé, moins adéquat. Étonnamment, les propriétés biomécaniques des micropellets stimulés se sont révélées plus faibles que celles obtenues pour des micropellets de 21 jours non stimulés. Pour conclure, nous avons démontré que des stimulations mécaniques provoquées par le dispositif fluidique que nous avons développé permettent de stimuler l'expression des gènes chondrocytaires. La répétition de ces expérimentations est nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs et valider ainsi les résultats préliminaires obtenus. L'analyse de l'impact d'une plus petite amplitude de pression pour de plus petites déformations des micropellets serait à tester, sur l'expression des gènes chondrocytaires et cataboliques. Le modèle numérique a permis d'estimer les déformations des micropellets ainsi que leurs propriétés mécaniques. Cependant, du fait de leur forme irrégulière et du comportement non-linéaire qu'elles acquièrent au cours de la croissance, le modèle numérique doit être amélioré.

## **1 .Introduction**

Articular cartilage (AC), which covers the long bones, is a highly organized connective tissue that ensures smooth movements and facilitates efficient transmission of forces in the joint. These properties mainly depend on its composition and structure that lead to a complex mechanical behavior. However, degenerative diseases or injuries cause biochemical and biomechanical alterations and current strategies for cartilage repair lead to limited recovery on the long-term (Niemeyer et al., 2014; Ringe et al., 2012). These strategies are based on tissue engineering using multipotent adult cells, primarily mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) or chondrocytes combined with a scaffold (Goldberg et al., 2017; Liu et al., 2017). However, failure to obtain a tissue that retains its properties over the long term are likely related to the lack of proper stimulation, either biochemical or biomechanical and highlight the need of a better understanding of cartilage growth processes.

The cartilage micropellet is a relevant and widely used model to study *in vitro* the growth of AC after differentiation of MSCs into chondrocytes (Johnstone et al., 1998). This model recapitulates the different stages of cartilage development from MSC condensation to proliferation and differentiation into chondrocytes that secrete the specific extracellular matrix (ECM) characterized by the production of type II collagen, aggrecan and other proteoglycans. However, the cartilage micropellet does not totally reproduce a mature adult AC and evidence for fibrocartilage and hypertrophic cartilage formation has been reported (Karlsson et al., 2007; Mwale et al., 2006; Pelttari et al., 2006). Efforts have been made to limit hypertrophic differentiation by using sequential exposures of different growth factors (Fischer et al., 2014; Handorf and Li, 2014; Indrawattana et al., 2004). However, the composition and organization of the micropellet ECM remain heterogeneous. This is consistent with the few studies that have evaluated the mechanical properties of micropellets and their poor stiffness that is closer to post-natal AC than to adult AC (Diekman et al., 2012; Dusfour et al., 2020; Ichinose et al., 2005; Peñuela et al., 2014). Since biomechanical stimulation is essential for embryonic and post-natal development of AC to native adult AC, mechanical stimulation could be the missing parameter to improve ECM secretion and organization (Coveney et al., 2020; Jones et al., 2003; Shea et al., 2015).

The impact of mechanical stimulation on cartilage micropellets has poorly been investigated. Although AC is stimulated by compression, tension and shear deformations in

vivo, the techniques used in vitro to stimulate micropellets generated slight mechanical deformations (Chan et al., 2016). To our knowledge, only two types of mechanical stimulation were used: hydrostatic pressures (5 or 10 MPa) and weak electromagnetic fields (2 mT), one or four days after micropellet formation (Angele et al., 2003; Miyanishi et al., 2006a, 2006b; Parate et al., 2017; Safshekan et al., 2012). Both types of dynamic stimulation with different intensities, frequencies and durations induced an increased expression of chondrocyte genes (Sox9, Aggrecan and type II Collagen). While hydrostatic pressures at 0.5 or 1 Hz, for 4 hours per day for several days were effective, only one ten-minute-long electromagnetic stimulation, at 15 Hz, was effective to stimulate gene expression after 1 and 3 weeks. The impact of mechanical stimuli that generate greater deformations has not been investigated yet on cartilage micropellets.

The objective of this study was to mechanically stimulate and characterize cartilage micropellets by using a new dedicated device that has been previously validated for cell-free biomaterial-based microspheres (Petitjean et al., 2020). First, we evaluated the impact of different parameters of biomechanical stimulation on the expression of ECM-related chondrocyte genes. Second, we assessed the impact of repeated stimulations during one-day and one-week experiments. Finally, the mechanical properties of stimulated cartilage micropellets were determined using the same device.

## **2 .Materials and methods**

### ***2.1 . MSC isolation and chondrogenic differentiation in micropellets***

Human MSCs were isolated from the bone marrow of patients with osteoarthritis undergoing knee arthroplasty after informed consent and approval by the French Ministry of Research and Innovation and the Personal data Protection ethics Committee (CPP) of Languedoc-Roussillon (approval DC-2010-1185). The cells were expanded and used at passage 5 after medium changes twice in a week, as described (Maria et al., 2016). Chondrogenic differentiation was induced using the 3D micropellet model by centrifuging  $2.5 \times 10^5$  MSCs in 15 ml conical tubes at 300 g for 5 min. Chondro-inductive medium (DMEM high glucose, 0.1  $\mu$ M dexamethasone, 1 mM sodium pyruvate, 170  $\mu$ M ascorbic-2-phosphate

acid, 1% insulin/transferrin/selenic acid, and 0.35 mM proline), supplemented with 10 ng/mL TGF $\beta$ 3 (Bio-Techne, Lille) was changed every 3 days for 21 days.

## **2.2 . Mechanical stimulations**

### *2.2.1 . Mechanical loading device*

A previously validated device for mechanical stimulation and characterization of microspheres was used to stimulate the micropellets (Petitjean et al., 2020). Briefly, this is a fluidic system which consists of a tank with 6 conical wells for the concomitant stimulation of 6 micropellets. Positive pressure is applied at the top of the microspheres while atmospheric pressure is kept at the bottom. The difference in pressure causes the micropellets to sink into their cones and be deformed. The 20 mL of medium contained in the whole circuit is activated by 2 peristaltic pumps. The device is held at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified cell culture incubator.

### *2.2.2 . Mechanical stimulation with different signal parameters*

Mechanical stimulations were performed for groups of 6 micropellets recovered at day 21 of differentiation. Micropellets were subjected to cyclical pressure in a square waveform with different amplitudes (3.5, 7 and 14 kPa), frequencies (0.25, 0.5, 1 and 2 Hz) and durations (15, 30 and 60 min). Each parameter was tested independently keeping a middle value for the others, as indicated in Table 1. The square signal was overlaid with a minimum pressure ( $P_m$ ) of 50% of the amplitude of signal in order to keep micropellets in their cones. Stimulations were conducted with alternate cycles of 180 sec of pressure and 23 sec of rest at  $P_m$  for a total of 30 min of stimulation. A free-swelling control consisted of a group of micropellets left in the device without stimulation. Thereafter, micropellets were returned to their tubes for 24 h before being analyzed.

### *2.2.3 . Repetition of mechanical stimulations*

Repeated stimulations along a day were tested by applying once, twice or three mechanical stimulations at 7 kPa, 1 Hz for 30 min on the day 21. Then, micropellets were returned to their tubes for 24 h before being analyzed. Repeated stimulations along a week

were made in stimulating micropellets for one, three or five days at 3.5 or 7 kPa, 1 Hz for 30 min from day 21. The three days of stimulation were done on day 1, 3 and 5. Two free-swelling controls were constituted with 6 micropellets kept in their tubes and 6 others in a tank without stimulation. The medium was not changed during the 6 days except for the first control, but a slow flow was daily applied to renew the medium around the micropellets. TGFβ3 was added to the medium on the 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> days. Micropellets were analyzed on day 26.

| <b>Duration<br/>(A = 0.07 bar, F = 1 Hz)</b> | <b>Frequency<br/>(A = 0.07 bar, T = 30 min)</b> | <b>Amplitude<br/>(F = 1 Hz, T = 30 min)</b> |
|--|---|---|
| 15min  | 0.25 Hz   | 3.5 kPa                                     |
| 30min  | 0.5 Hz  | 7.0 kPa                                     |
| 60min  | 1 Hz  | 14.0 kPa                                    |
|  | 2 Hz  |   |

Table 1 – Parameters of square pressure signal tested in the fluidic device. Each parameter was tested while keeping the mean parameter for the others.

### **2.3 . RT-qPCR**

Each group of 6 micropellets was washed in phosphate buffered saline (PBS) and stored at -80°C before RT-qPCR analysis. Total RNA was extracted from micropellets using the RNeasy microKit (Qiagen, Courtaboeuf) after mechanical dissociation using Ultra-Turrax® homogenizer. Total RNA (0.2 µg) was then reverse transcribed using the M-MLV reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific, Villebon-sur-Yvette). Primers for chondrocyte markers were designed using the Primer3 software (Table 2) and purchased from MWG (Eurofinsgenomics, Courtaboeuf). PCR reactions were carried out using 10 ng of cDNA, 5 µmol/L of each primer, and 5 µL 2X SybrGreen PCR Master Mix (Roche, Meylan). The following cycling conditions were used: 95°C for 5 min; then 40 cycles at 95°C for 15 s; 64°C for 10 s, and 72°C for 20 s in a Vii7 Real-Time PCR System (Life Technologies, Courtaboeuf). Gene expression was analyzed using the comparative Ct method ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) after normalization to the housekeeping gene RSP9 and comparison with the non-stimulated control group.

#### 2.4 . *Histological analysis*

Micropellets were fixed in 3.7% formaldehyde for 1 h and processed for routine histology. Deparaffinized micropellet sections (3 µm) were stained with Safranin O/Fast Green.

#### 2.5 . *Quantification of DNA*

DNA content was assessed in micropellets using the CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Villebon-sur-Yvette). Briefly, 300 µL of CyQUANT® reagent were added to micropellets before mechanical dissociation. After centrifugation at 15000 g for 3 min, 200 µL of supernatant were transferred to a well of a flat-bottom, solid black 96-well plate and the emitted fluorescence read with excitation/emission wavelengths of 480/520 nm on a microplate reader (Varioskan, ThermoFisher scientific, Villebon-sur-Yvette). A comparative cell number for each sample was determined by relating the sample fluorescence to the fluorescence of 2.5x10<sup>6</sup> cells frozen at day 0.

| Gene symbol | Gene name  | Sequence Forward               | Sequence Reverse                    |
|-------------|--|--------------------------------|-------------------------------------|
| ADAMTS5     | A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs | CTCCACGCAGCCTT-<br>CACTGT      | TGGGTGGCATCGTA-<br>GGTCTG           |
| AGG         | Aggrecan   | TCGAGGACAGCGAGGCC              | TCGAGGGTGTAGCGT-<br>GTAGAGA         |
| AP          | Alkaline phosphatase   | CCACGTCTTCACAT-<br>TTGGTG      | GCAGTGAAGGGCTT-<br>CTTGTC           |
| COL I       | Collagen type I  | CCTGGATGCCATCA-<br>AAGTCT      | CGCCATACTCGAAC-<br>TGAAT            |
| COL IIB     | Collagen type IIB  | CAGACGCTGGTGCTGCT              | TCCTGGTTGCCGGACAT                   |
| COL X       | Collagen type X  | TGCTGCCACAAATA-<br>CCCTTT      | GTGGACCAGGAGTA-<br>CCTTGC           |
| LINK        | Link protein   | TTCCACAAGCACAA-<br>ACTTTACACAT | GTGAAACTGAGTTT-<br>TGTATAACCTCTCAGT |
| MMP13       | Matrix Metalloproteinase 13                                    | TAAGGAGCATGGCG-<br>ACTTCT      | GTCTGGCGTTTTTG-<br>GATGTT           |
| RSP9        | Ribosomal small protein 9                                      | ATGAAGGACGGGAT-<br>GTTTAC      | GATTACATCCTGGG-<br>CCTGAA           |
| RUNX2       | Runt-related transcription factor 2                            | CGGAATGCCTCTGC-<br>TGTTAT      | TTCCCGAGGTCCAT-<br>CTACTG           |
| SOX9        | Sex Determining Region Y-Box 9                                 | AGGTGCTCAAAGGC-<br>TACGAC      | GTAATCCGGGTGGT-<br>CCTTCT           |
| SPARC       | Secreted Aroetin, Acidic, Cysteine-Rich                        | AAAGCACAAAGGCAG-<br>AAAGGA     | GGTGGGCTTGATGA-<br>CTCTGT           |

Table 2 - Primer sequences

## **2.6 . Biomechanical analysis**

### *2.6.1 . Finite elements model*

The finite element model created with the software LMG90 (Dubois and Mozul, 2017) is axisymmetric (Petitjean et al., 2020). The numerical model simulates the sinking of a micropellet, represented by half a disk meshed by the software *GMSH* with 1760 triangles (Geuzaine and Remacle, 2009) and employing a Neo-Hookean hyperelastic law, in the cone. The cone is simulated by rigid wells. A friction-less contact law is used between the micropellet and the cone.

### *2.6.2 . Deformation of micropellets caused by loading*

Twenty images of each micropellet, equivalent to ten images per period of pressure signal, were recorded in the middle of each cycle of stimulation. The oscillations of the micropellets following the dynamics of the pressure signal were analyzed by determining the resulting displacements of the top and bottom ends of micropellets through image analysis using a *python* code with *OpenCV* library (*threshold* function). The average sinking of micropellets at the beginning (first stimulation cycle) and the end (last stimulation cycle) of the 30 min of stimulation was determined by calculating the average displacement of the bottom of micropellets. All displacements were normalized to micropellet diameters, calculated from the area of the micropellets before applying pressure. As described in a previous study (Petitjean et al., 2020), the displacement fields only depend on the ratio of the pressure to the Young's modulus and on the Poisson's ratio. The mean value of the Poisson's ratio of 0.45 was used, as identified for 21 days micropellets. The displacement fields were then estimated at a particular value of the ratio of the pressure to the Young's modulus. This value was identified so that the displacement of the bottom of the simulated microsphere corresponded to the mean one measured experimentally on micropellets. The strains of the micropellets in radial, circumferential and longitudinal directions, Von Mises strains, and their change of volume ( $J$ ) were recorded.

### *2.6.3 . Mechanical characterization*

Mechanical characterization of micropellets was made on day 21 or after one week of repeated stimulations on day 26. As described in a previous study (Petitjean et al., 2020), a multi-creep test was made by applying eight steps of pressure with an increment of  $1.97 \text{ kPa} \pm 0.43 \text{ kPa}$ , each maintained for 120 s. The displacement of the top and the bottom of micropellets was recorded by the camera. The last image at each step of pressure was used to determine the mechanical properties at equilibrium, after a relaxation time. Young's moduli and Poisson ratios of micropellets were then calculated by inverse analysis.

### **2.7 . Statistical analysis**

GraphPad Prism 7 software (San Diego, USA) was used to perform the statistical analyses. Since data did not pass the Agostino-Pearson omnibus normality test, the non-parametric Wilcoxon signed rank test was used to compare the gene expression of the 1-day and 21-day micropellets and the gene expression of the stimulated and non-stimulated samples. The multiple comparison test between simulated samples was performed with the Kruskal-Wallis test. This test was also used to compare the oscillations of micropellets in their cones and their average sinking at the beginning and the end of the 30 min of stimulations for each amplitude and the mechanical properties of the different micropellet groups.

## **3 . Results**

### **3.1 . Mechanical stimulation induced micropellet deformation**

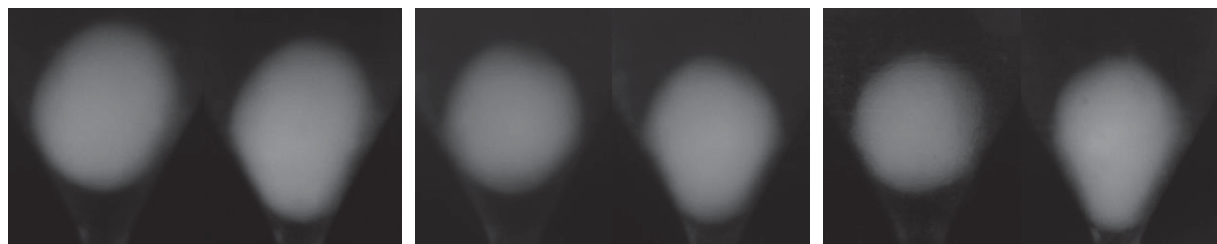
A systematic analysis of images was made to determine the range of micropellet deformations for the different amplitudes of stimulation. A simple observation of the camera images showed that micropellets were deformed whatever the pressure amplitude (Fig. 1A). Before applying pressure, visible micropellet diameters were recorded in all groups (Fig. 1B). The sinking of micropellets in their cones during stimulation can be described as an average sinking superimposed by oscillations, which are 22 times smaller. No significant difference of the sinking of micropellets was observed between the beginning (Initial) and

the end (Final) of stimulations (30 min) (Fig. 1C). However, the sinking of the “3.5 kPa” micropellet group was significantly lower than the sinking of the “14 kPa” micropellet group, at the beginning and at the end of stimulations. Oscillations of the micropellet bottom ends were significantly higher than the oscillations of the micropellet top ends, but no significant difference was observed between the different groups (Fig. 1D).

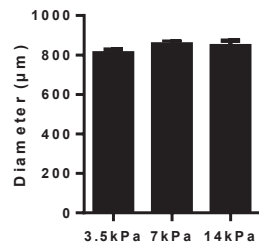
Local strains on micropellets were then estimated using the finite element model. During stimulation, the micropellet was compressed in the radial ( $E_r$ ) and circumferential ( $E_\theta$ ) directions by the shape of the cone, except for a thin layer at the bottom of the micropellet and the small area that is brought into contact with the cone (Fig. 1E). In the longitudinal direction ( $E_y$ ), the upper part and the thin layer at the bottom were compressed whereas the rest of the micropellet was stretched. The spread of the Von Mises strains shows that the middle part of the micropellet, from its center to the contact zone with the cone, undergoes higher deformations than the upper part and the thin layer at the bottom. These deformations create an increased volume of the middle part while the upper part and the thin layer at the bottom decreased in volume.

The distribution, in terms of volume, of strains in each direction and change of volume as a function of micropellet sinking was analyzed by tracking the strain and volume of the elements in the numerical model (Fig. 1F). The strains in the “14 kPa” group were spread compared to those in the “3.5 kPa” and “7 kPa” groups as shown by increased compressions in all directions and change of volume. Maximal compression exceeded 30% in radial and circumferential directions for the “14 kPa” group while remaining under 25% for the two other groups. By integrating the distribution curves, we evaluated that 15.24%, 0.62% and 29.36% of the volume of the 14 kPa” group were deformed by less than 5% in the radial, circumferential and longitudinal directions respectively, compared to 63.98%, 37.24% and 75.02% for the two other groups. Whatever the group, strains between 10% and 20% applied to  $16.69\% \pm 0.96\%$ ,  $27.19\% \pm 2.49\%$  and  $13.39\% \pm 1.36\%$  of micropellet volume in the radial, circumferential and longitudinal directions, respectively.  $35.16\% \pm 1.60\%$  of the micropellets is stretched in the longitudinal direction. Finally, the average change of volume decreased from 97.89% to 94.30% with increasing stimulus amplitude.

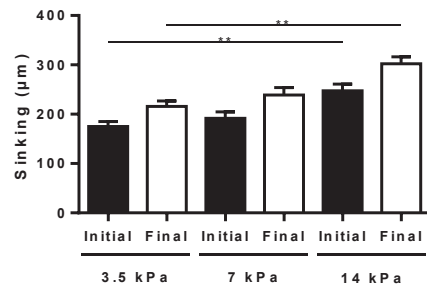
A



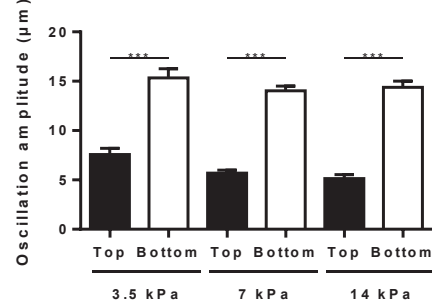
B



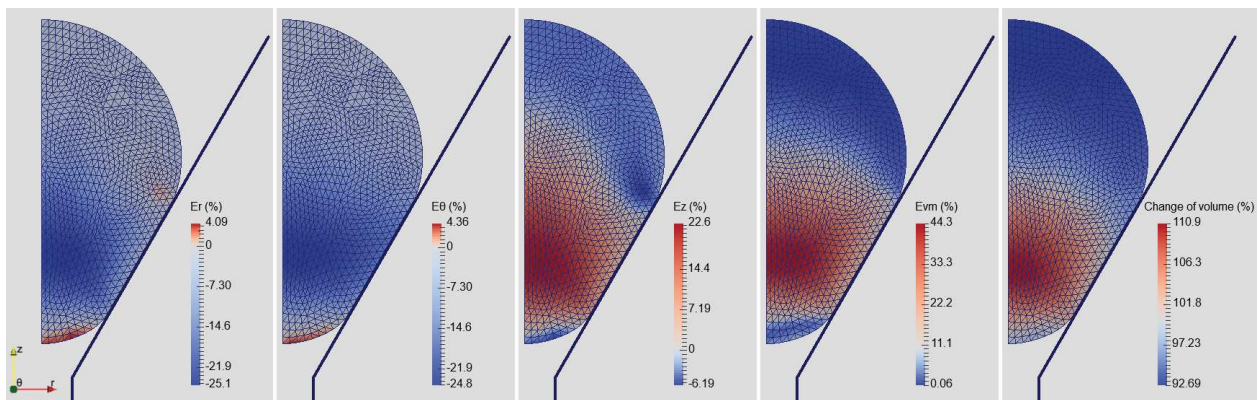
C



D



E



F

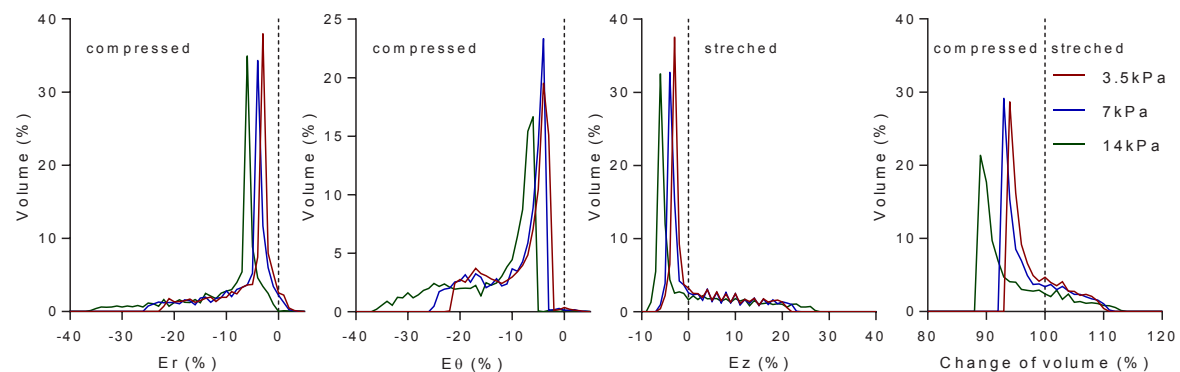


Fig. 1 – Deformation of cartilage micropellets induced by mechanical stimulation. (A) Sinking of micropellets in their cones observed with a 2.65  $\mu\text{m}$  resolution camera. (B) Diameter of the 15-20 micropellets studied. (C) Average sinking of micropellets in their cone at the beginning (Initial) and end (Final) of 30 min of stimulations depending on the pressure amplitude. (D) Average amplitude of oscillations of the micropellet top and bottom ends depending on pressure amplitude. (E) Localization of radial ( $E_r$ ), circumferential ( $E_\theta$ ) and longitudinal ( $E_z$ ) strains, the Von Mises strain ( $E_{vm}$ ) and the volume change of micropellets during stimulation, from left to right respectively, shown by a finite element model. (F) Distribution in volume of  $E_r$ ,  $E_\theta$ ,  $E_z$  and volume change in micropellets depending on pressure amplitudes and estimated by the finite element model. Statistical analysis used test Kruskal-Wallis test and results are expressed as \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

### **3.2 . Mechanical stimulation increased the expression of chondrocyte markers**

Mechanical stimulation with different square wave pressure signals was performed on cartilage micropellets on day 21 (Fig. 2A-B). Chondrocyte differentiation of MSCs cultured in micropellets was confirmed by the up-regulation of the three main chondrocyte markers (Sox9, Aggrecan and type IIB collagen) (Fig. 2C). The impact of different durations, frequencies and amplitudes were tested on the expression of the three chondrocyte genes (Fig. 2D). Although the results were not significant because of the low number of repetitions, mechanical stimulation seemed to increase the gene expression when applied for 30 or 60 min. Stimulations at 1 Hz showed the highest upregulation of SOX9 and AGG. An increase in COL IIB expression was also observed at 2 Hz frequency but results were heterogeneous. No clear tendency was noticed for the different amplitudes used. For the condition 7 kPa, 1 Hz, 30 min which was repeated several times, we analyzed the expression of different markers and found out that only *SOX9*, *AGG* and *MMP13* were significantly upregulated (Fig. 2E). No significant regulation of *LINK*, fibrotic (*COL I*) or hypertrophic markers (*ADAMTS5*, *COL X*, *RUNX2* *SPARC* and *AP*) was observed.

### **3.3 . Micropellets are not altered by mechanical stimulation**

As moderate to large deformations of micropellets were generated during stimulation, structural integrity of micropellets was analyzed. Histological staining with Safranin-O/Fast green confirmed that proteoglycans were produced in the micropellets as shown by the red staining of the ECM (Fig. 3A). A peripheral zone with elongated cells and the core zone with characteristic chondrocyte lacunae were observed. No obvious structural alteration was noticed in stimulated micropellets compared to the control. We also quantified the DNA content in stimulated and control micropellets or MSCs ( $2.5 \times 10^5$  cells). The DNA content tended to decrease at day 1 but increased on day 22, whatever the condition (Fig. 3B). A slight decrease in DNA content was observed in stimulated micropellets compared to the non-stimulated control. These preliminary results suggested that one round of mechanical stimulation did not induce profound modifications on the integrity of cartilage micropellets.

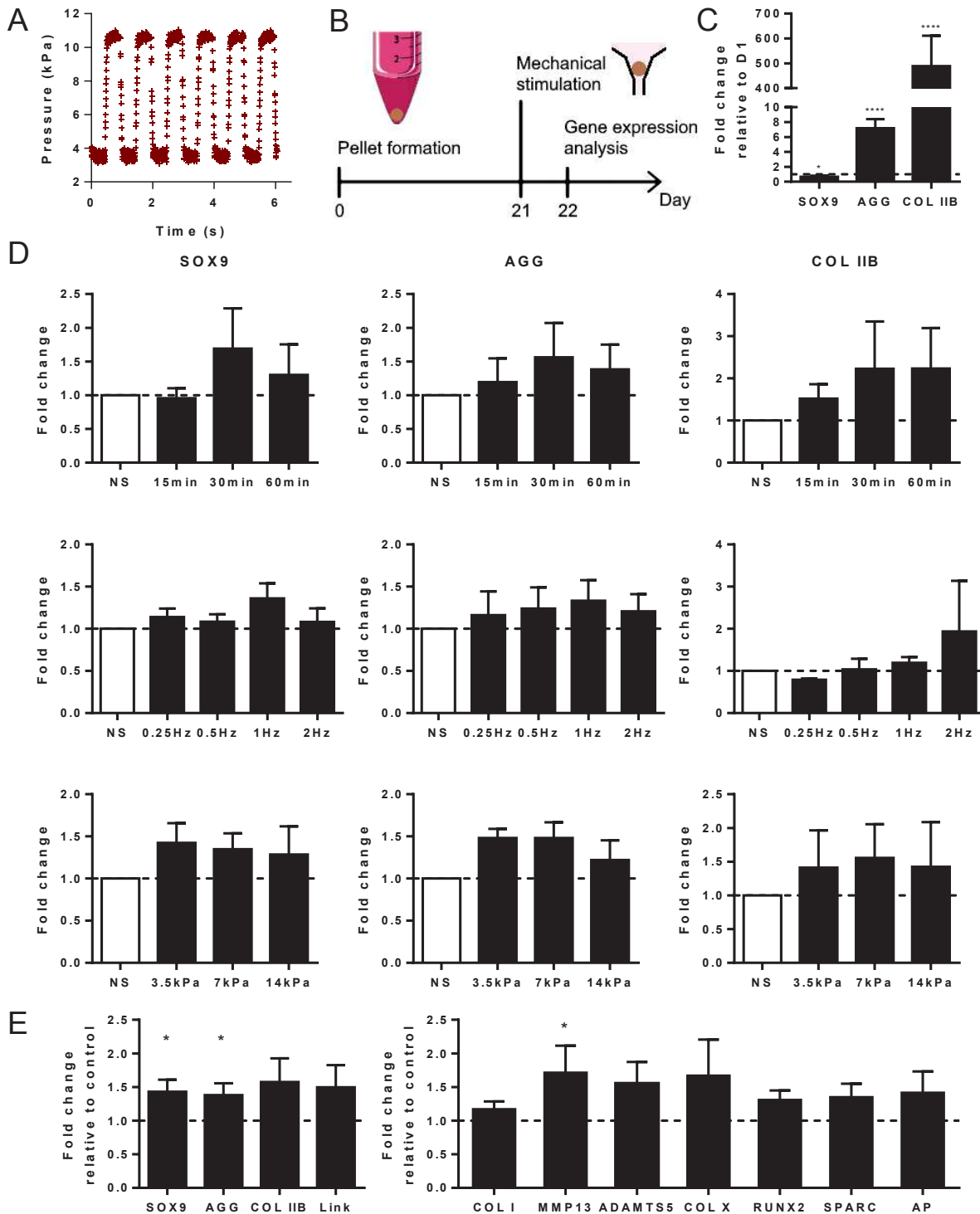


Fig. 2 – Mechanical stimulation of mesenchymal stem cells-derived cartilage micropellets. (A) Representative square-wave pressure signal generated by the device. (B) Experimental design to study the impact of mechanical stimulations with different pressure signal parameters on gene expression in micropellets. (C) Expression of *SOX9*, aggrecan (*AGG*) and type IIB collagen (*COL IIB*) genes in micropellets after 21 days of differentiation compared to day 1 ( $n = 13$ ). (D) Expression of *SOX9*, *AGG* and *COL IIB* genes in micropellets after stimulation with different durations (upper panel), frequencies (middle panel) and amplitudes (lower panel) compared to non-stimulated control (NS), at day 22 ( $n=4-5$ ). (E) Expression of chondrocyte genes (*SOX9*, *AGG*, *COL IIB*, *Link*, type I collagen (*COL I*), matrix metalloproteinase 13 (*MMP13*), a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (*ADAMTS5*), type X collagen (*COL X*), osteonectin (*SPARC*), alkaline phosphatase (*AP*), *RUNX2*) for stimulation parameters of 7 kPa, 1 Hz and 30 min compared to NS control ( $n = 13$ ). Statistical analysis used Wilcoxon signed rank test and results are expressed as \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ .

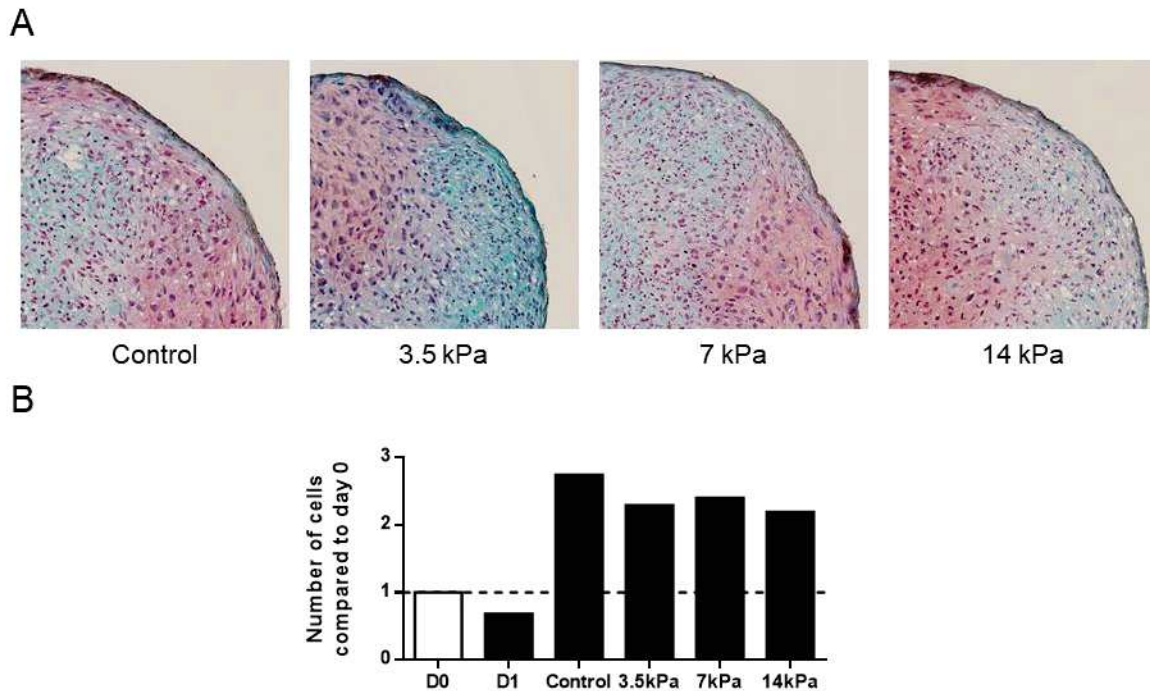


Fig. 3 – Structure and DNA content of micropellets after mechanical stimulation. (A) Histological staining of proteoglycans by Safranin O/fast green in 21-day micropellets depending on pressure amplitude. (B) DNA content in MSCs ( $2.5 \times 10^6$ ; D0) or in micropellets on day 1 (D1) and day 22 (Control) or, after mechanical stimulation at different amplitudes (3.5, 7 or 14 kPa).

### 3.4 . Repeated mechanical stimulations increased the production of COL II

We then wanted to evaluate the impact of multiple stimulations on chondrocyte gene expression in micropellets exposed to repeated stimulations either for a day or a week. For the one-day experiments, micropellets were stimulated once, twice or three times on day 21 using a square-wave pressure signal at 7 kPa, 1 Hz during 30 min (Fig. 4A). As previously observed, one stimulation tended to increase the expression of *SOX9*, *AGG* and *COL IIB* in micropellets. By contrast, a decreased expression of *SOX9* and *AGG* was observed when micropellets were stimulated 3 times per day compared to one stimulation and non-stimulated control micropellets. The expression of *COL IIB* tended to increase after one or two stimulations, but results were very heterogenous.

For the one-week experiment, micropellets were stimulated once a day with a square-wave pressure signal at 3.5 or 7 kPa, 1 Hz for 30 min, which was applied one, three or five days from day 21 (Fig. 4B). Analysis of gene expression was performed on day 26. While *SOX9* expression did not seem to be highly modulated, the expression of *AGG* and *COL IIB* was

dramatically decreased by one or three stimulation cycles at 3.5 kPa (Fig. 4C). Five stimulation cycles greatly enhanced the expression of *COL IIB*. When micropellets were stimulated at 7 kPa, expression of *AGG* did not change after three stimulation cycles but was down-regulated after one and five stimulation cycles. Interestingly, *COL IIB* expression was highly upregulated after three and five stimulations cycles. The data suggested that repeated stimulations could increase chondrocyte markers.

### **3.5 . Mechanical characterization of micropellets**

Mechanical characterization of micropellets was performed using a multi-creep test at day 21 or day 26 after one week and three repeated mechanical stimulations, respectively. The displacement of micropellets was measurable for all samples (Fig. 5A-B). However, a better fit between simulated and experimental data was obtained for the 21-day micropellets compared to the 26-day micropellets. Assuming an increase in the non-linearity of the elastic behavior of cartilage micropellets between 21 and 26 days, we used only the first step of pressure to analyze the mechanical properties of the 26-day micropellets. Surprisingly, a significant decrease in the Young's modulus of stimulated 26-day micropellets was observed compared to the 21-day micropellets (Fig. 5C). No significant difference was observed between the control and stimulated groups at day 26. In accordance, a significant decrease in the Poisson ratio of 26-day micropellets was observed compared to the 21-day micropellets but no significant difference was observed between the control and stimulated groups at day 26 (Fig. 5D).

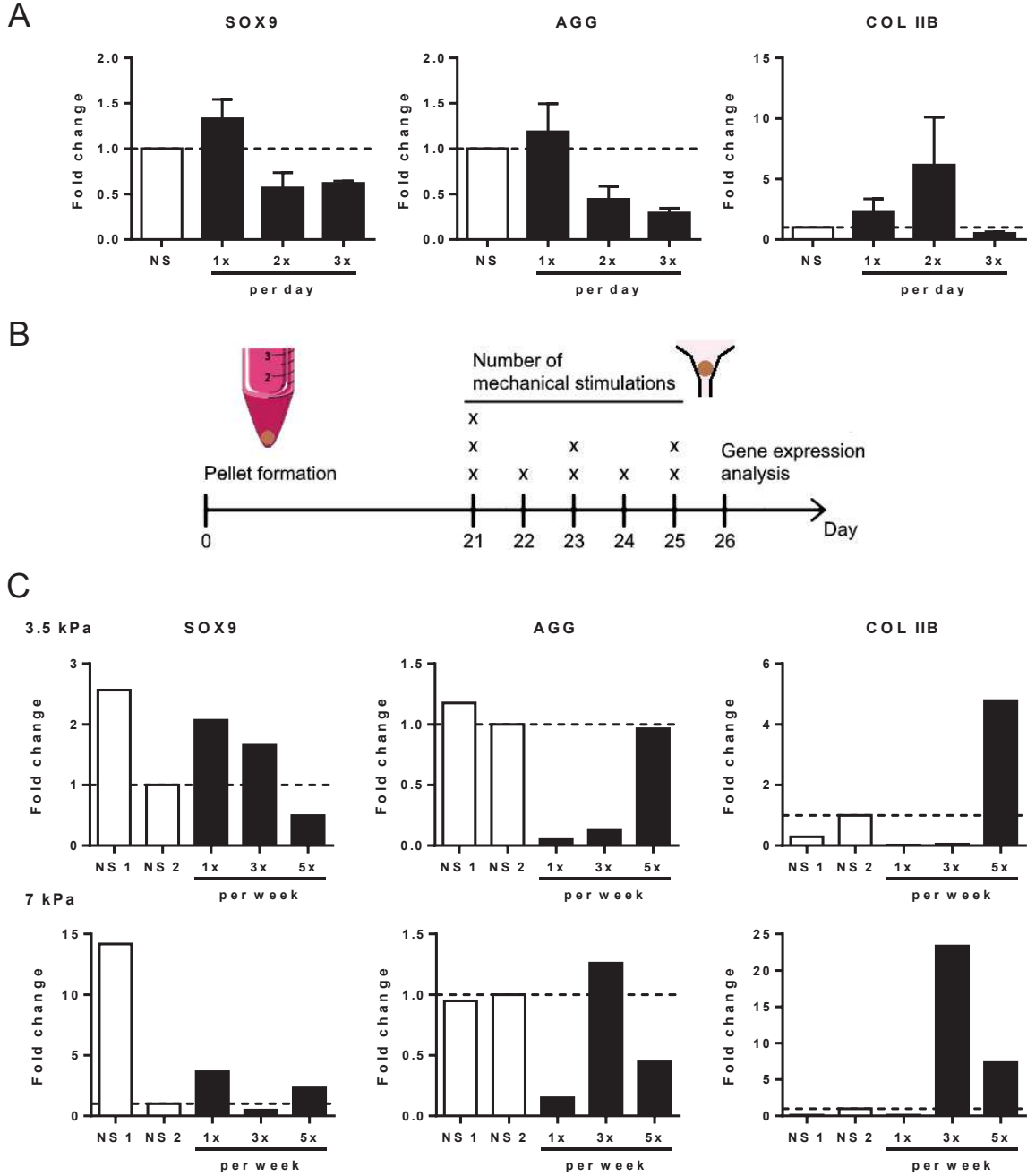


Fig. 4 – Repeated mechanical stimulations modulate the expression of chondrocyte genes in cartilage micropellets. (A) Expression of *SOX9*, aggrecan (*AGG*) and type IIB collagen (*COL IIB*) in micropellets after one, two or three mechanical stimulation at 7 kPa, 1 Hz during 30 min on the day 21 compared to the non-stimulated control (NS) (n = 4). (B) Design of one-week experiment with repeated stimulations of cartilage micropellets from day 21 to day 26 with a square-wave pressure signal at 7 kPa, 1 Hz during 30 min. (C) Expression of *SOX9*, *AGG* and *COL IIB* on day 26 in NS micropellets let in tube (NS 1) or NS micropellets let in the device during 30 min or in micropellets stimulated once, three or five times a week (NS 2) (n=1).

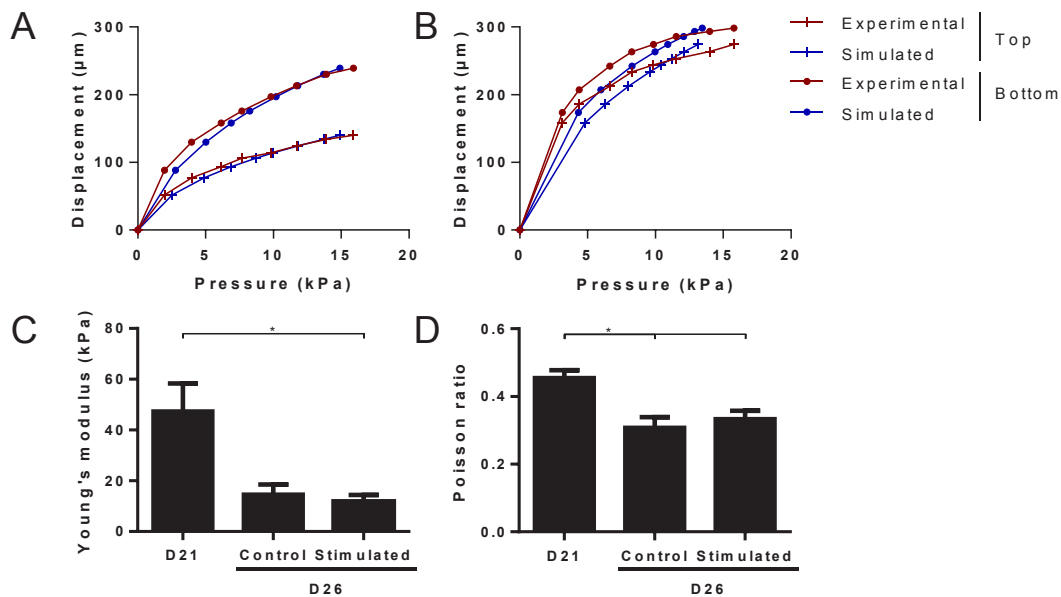


Fig. 5 – Mechanical characterization of micropellets using the multi-creep test in the fluidic system. (A) Representative fits of displacements in relation to experimental (red) and simulated (blue) pressures for micropellets at day 21. (B) Representative fits of displacements in relation to experimental (red) and simulated (blue) pressures for micropellets at day 26. (C) Young’s modulus of micropellets at day 21 (non-stimulated micropellets) and day 26 (stimulated and non-stimulated control micropellets). (D) Poisson ratio of micropellets at day 21 and day 26. Statistical analysis used Kruskal-Wallis test and results are expressed as \*:  $p < 0.05$ .

## 4 .Discussion

We previously validated the interest of a new device dedicated to the mechanical stimulation and characterization of microspheres, in the range of 900-1500 μm (Petitjean et al., 2020). Here, we used the device to explore for the first time the response of human MSC-derived cartilage micropellets to a defined mechanical loading regime.

Mechanical stimulation inducing moderate deformation of cartilage micropellets was performed for the first time with a fluidic system. A parametric study was conducted to evaluate the impact of different mechanical stimulation parameters on the expression of main chondrocyte genes. In a first step, deformation of micropellets was quantified by analyzing the images of micropellets taken by the camera during stimulations. They showed “static” deformations rather than dynamic deformations, contrary to the deformations applied in compression or shear studies (Gardner et al., 2017; Huang et al., 2010; Pelaez et al., 2008; Schätti et al., 2011). Although the global sinking of micropellets was higher with higher pressure amplitudes, oscillations of micropellets did not significantly change.

Similar deformations were observed with a MSC-based cartilage hydrogel, where dynamic compressive stress led to a compression range of 1-10% of strains after 1 min of stimulation and 9-13% of strains after 118 min (Elder et al., 2000). To summarize, deformations of micropellets using the amplitudes of 3.5 and 7 kPa were similar, and lower than when we used the 14 kPa amplitude. However, Oscillations of micropellets were found similar.

The 6.49% average deformation of micropellets measured in our study is difficult to compare with the data from the literature (Elder et al., 2000; Haudenschild et al., 2009; Huang et al., 2010; Kearney et al., 2010; Li et al., 2009; Meinert et al., 2017; Pelaez et al., 2008; Schätti et al., 2011; Steward and Kelly, 2015). In our conditions, the micropellets are constrained in all directions except in the longitudinal direction while other studies used constraints applied in one or two directions. The amplitude of deformations in the upper part was similar to those applied on MSC-based cartilage constructs (Elder et al., 2000; Huang et al., 2010; Pelaez et al., 2008). By contrast, complex and higher deformations occurred in the lower central part of micropellets with maximal deformations exceeding 15% in all directions, which is in line with other studies. Depending on the studies, up to 50% of deformation in one direction or 30% in compression combined with 50% in shear resulted in increased chondrocyte gene expression and matrix accumulation (Li et al., 2009; Meinert et al., 2017; Schätti et al., 2011). Compression and shear are a well-studied association of mechanical stimulations, which synergically increase the expression of *SOX9*, *AGG*, *COL II*, *COMP*, *PG4* (Gardner et al., 2017; Huang et al., 2012; Schätti et al., 2011). Although mechanical stimulation in tension seems to favor osteogenesis, this is a natural resulting deformation of compression in articular cartilage, which could be of interest in our settings. Moreover, deformations of micropellets at different amplitudes did not seem to be deleterious for their structure although we noticed an upregulation of MMP13. Further analyses are needed to confirm these results, but the levels of deformations obtained in our study might be useful for stimulating mechanotransduction pathways and ECM production.

Our preliminary results on the mechanical stimulation of micropellets indicate trends towards the upregulation of most chondrocyte genes with almost all tested combinations of parameters and are in line with the literature. Although at least one hour of stimulation was generally applied for MSC-based scaffolds, upregulation of *SOX9*, *AGG* and *COL IIB* was already observed after 15 min or 30 min of stimulation (Finger et al., 2007; Miyanishi et al.,

2006b; Mouw et al., 2007; Schätti et al., 2011). In our study, expression of *SOX9*, *AGG* and *COL IIB* tended to be higher using the 1 Hz frequency. The 1 Hz frequency generally lead the highest expression of chondrocyte genes and frequencies above 1 Hz are rarely used, except for microwave techniques like ultrasounds or electromagnetic fields. Only one report showed better *AGG* gene expression by chondrocytes in agarose gel after stimulation at 3 Hz (Mauck et al., 2007). Finally, the pressure level used in hydrostatic pressure stimulation is around one thousand times higher than the level used in our study (3.5 to 14 kPa), which is comparable to stress applied in unconfined compression stimulation (Angele et al., 2003; Miyanishi et al., 2006b; Safshekan et al., 2012; Angele et al., 2004; Elder et al., 2000, 2001). Nevertheless, the pressure level used seems appropriate for upregulating the expression of chondrocyte genes, even though the three amplitudes chosen may not be sufficient to observe significant differences in gene expression one day after stimulation. In accordance with the results concerning the deformation of micropellets, analyzing the impact of a smaller amplitude of pressure could be interesting.

Repeated stimulations of cartilage micropellets over one day seemed to negatively impact the expression of chondrocyte genes while repeated stimulations over one week upregulated *AGG* and *COLII* markers. A previous study has shown that mechanical stimulation of MSC-based micropellets significantly increased the production of collagens and proteoglycans on day 14 and 28 after a daily stimulation for a week whereas one stimulation at day 1 or day 3 did not (Angele et al., 2003). Similarly, repeated stimulations of MSC-based scaffolds for 5 or 7 days a week was shown to increase gene expression or matrix secretion (Gardner et al., 2017; Horner et al., 2016; Huang et al., 2010; Miyanishi et al., 2006b; Ogawa et al., 2009; Schätti et al., 2011; Ye et al., 2014). To our knowledge, only one study reported absence of impact following repeated stimulations of MSCs in hydrogel, in presence of TGF $\beta$ 3 using 4 cycles of 1h30 of stimulation and 4h30 of break for several days (Campbell et al., 2006). However, our preliminary results need to be confirmed to decipher the impact of repeated stimulations on the expression of chondrocyte markers in the short and long term.

Of note, using our device, we can both stimulate and characterize biochemically and biomechanically cartilage micropellets. Reliable mechanical characterization was made on the 21<sup>st</sup> day micropellets and Young's moduli were consistent with previous results obtained with conventional analysis (Dusfour et al., 2020). Similar Young's moduli were calculated for

stimulated and non-stimulated micropellets, suggesting that the impact of stimulations on the mechanical properties of micropellets could not be observed after one week. However, the 26<sup>th</sup> day micropellets showed a non-linear elasticity, which renders difficult to rely on the numerical model using the Neo-Hookean law. The numerical model could be improved using a Fung law as previously reported (Dusfour et al., 2020). Again, these experiments are preliminary and further investigations are needed.

## **5 .Conclusion**

The present study demonstrates the proof-of-concept that a single fluidic custom-made device can be used to both mechanically stimulate human MSC-derived cartilage micropellets and characterized their biomechanical properties from day 21, when cartilage ECM has been produced. Modulation of gene expression was demonstrated by stimulating micropellets with different parameters of square-wave pressure signals for one day. The impact of repeated stimulations has still to be investigated and the numerical model needs to be improved so as to better analyze the non-linear behavior of micropellets. However, the study paves the way for long-term experiments using cartilage micropellets maintained in their tank where mechanical stimulation can be applied at different time points.

## **Acknowledgements**

We thank Yvan Duhamel from Pro3D platform (Univ Montpellier) for Isterolithography-3D-impress of the fluidic device tank and Stephan Devic, Gille Camp and Quentin Chapelier from COMPEX platform (LMGC) for the fabrication of some parts of the device.

## **Funding**

We gratefully acknowledge funding support from the University of Montpellier, Inserm, Cartigen platform and Occitanie region. This work benefitted from a French State grant managed by the French National Research Agency under the Investments for the Future programme (reference n°ANR-10-LABX-20). This work has received financial support from CNRS through the MITI interdisciplinary programs (AAP "Osez l'interdisciplinarité 2018", MoTiV Project).

## Declarations of interest

The authors disclose any financial or personal conflict of interest.

## Authors contributions

**N. Petitjean:** methodology, investigation, writing-original draft preparation. **P. Canadas:** conceptualization. **M. Maumus:** investigation. **P. Royer:** methodology. **C. Jorgensen:** review-editing. **D. Noël:** conceptualization, writing-review and editing, supervision. **S. Le Floc'h:** conceptualization, methodology, writing-review and editing, supervision.

## References

- Angele, P., Schumann, D., Angele, M., Kinner, B., Englert, C., Hente, R., Füchtmeier, B., Nerlich, M., Neumann, C., Kujat, R., 2004. Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds. *Biorheology* 41, 335–346.
- Angele, P., Yoo, J.U., Smith, C., Mansour, J., Jepsen, K.J., Nerlich, M., Johnstone, B., 2003. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J. Orthop. Res.* 21, 451–457. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00230-9](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00230-9)
- Campbell, J.J., Lee, D.A., Bader, D.L., 2006. Dynamic compressive strain influences chondrogenic gene expression in human mesenchymal stem cells. *Biorheology* 43, 455–470.
- Chan, D.D., Cai, L., Butz, K.D., Trippel, S.B., Nauman, E.A., Neu, C.P., 2016. In vivo articular cartilage deformation: noninvasive quantification of intratissue strain during joint contact in the human knee. *Scientific Reports* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep19220>
- Coveney, C.R., Zhu, L., Miotla-Zarebska, J., Stott, B., Parisi, I., Batchelor, V., Duarte, C., Chang, E., McSorley, E., Vincent, T.L., Wann, A.K.T., 2020. The ciliary protein IFT88 controls post-natal cartilage thickness and influences development of osteoarthritis. *bioRxiv* 2020.07.29.225599. <https://doi.org/10.1101/2020.07.29.225599>
- Diekman, B.O., Christoforou, N., Willard, V.P., Sun, H., Sanchez-Adams, J., Leong, K.W., Guilak, F., 2012. Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 19172–19177. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210422109>
- Dubois, F., Mozul, R., 2017. LMGC90. Presented at the 13e colloque national en calcul des structures.
- Dusfour, G., Maumus, M., Cañadas, P., Ambard, D., Jorgensen, C., Noël, D., Le Floc'h, S., 2020. Mesenchymal stem cells-derived cartilage micropellets: A relevant in vitro model for biomechanical and mechanobiological studies of cartilage growth. *Materials Science and Engineering: C* 112, 110808. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110808>
- Elder, S.H., Goldstein, S.A., Kimura, J.H., Soslowsky, L.J., Spengler, D.M., 2001. Chondrocyte differentiation is modulated by frequency and duration of cyclic compressive loading. *Ann Biomed Eng* 29, 476–482.

- Elder, S.H., Kimura, J.H., Soslowsky, L.J., Lavagnino, M., Goldstein, S.A., 2000. Effect of compressive loading on chondrocyte differentiation in agarose cultures of chick limb-bud cells. *J. Orthop. Res.* 18, 78–86. <https://doi.org/10.1002/jor.1100180112>
- Finger, A.R., Sargent, C.Y., Dulaney, K.O., Bernacki, S.H., Lobo, E.G., 2007. 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.* 13, 1151–1158. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0290>
- Fischer, J., Aulmann, A., Dexheimer, V., Grossner, T., Richter, W., 2014. Intermittent PTHrP(1–34) Exposure Augments Chondrogenesis and Reduces Hypertrophy of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells and Development* 23, 2513–2523. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0101>
- Gardner, O.F.W., Musumeci, G., Neumann, A.J., Eglin, D., Archer, C.W., Alini, M., Stoddart, M.J., 2017. Asymmetrical seeding of MSCs into fibrin–poly(ester-urethane) scaffolds and its effect on mechanically induced chondrogenesis. *J Tissue Eng Regen Med* 11, 2912–2921. <https://doi.org/10.1002/term.2194>
- Geuzaine, C., Remacle, J.-F., 2009. Gmsh: A 3-D Finite Element Mesh Generator with Built-in Pre- and Post-Processing Facilities. *International Journal for Numerical Methods in Engineering* 79, 1309–1331. <https://doi.org/10.1002/nme.2579>
- Goldberg, A., Mitchell, K., Soans, J., Kim, L., Zaidi, R., 2017. The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: a systematic review. *J Orthop Surg Res* 12, 39. <https://doi.org/10.1186/s13018-017-0534-y>
- Handorf, A.M., Li, W.-J., 2014. Induction of Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis Through Sequential Administration of Growth Factors Within Specific Temporal Windows. *Journal of Cellular Physiology* 229, 162–171. <https://doi.org/10.1002/jcp.24428>
- Haudenschild, A.K., Hsieh, A.H., Kapila, S., Lotz, J.C., 2009. Pressure and Distortion Regulate Human Mesenchymal Stem Cell Gene Expression. *Annals of biomedical engineering.*
- Horner, C.B., Hirota, K., Liu, J., Maldonado, M., Hyle Park, B., Nam, J., 2016. Magnitude-dependent and inversely-related osteogenic/chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells under dynamic compressive strain. *J Tissue Eng Regen Med.* <https://doi.org/10.1002/term.2332>
- Huang, A.H., Baker, B.M., Ateshian, G.A., Mauck, R.L., 2012. Sliding contact loading enhances the tensile properties of mesenchymal stem cell-seeded hydrogels. *Eur Cell Mater* 24, 29–45.
- Huang, A.H., Farrell, M.J., Kim, M., Mauck, R.L., 2010. Long-term dynamic loading improves the mechanical properties of chondrogenic mesenchymal stem cell-laden hydrogel. *Eur Cell Mater* 19, 72–85.
- Indrawattana, N., Chen, G., Tadokoro, M., Shann, L.H., Ohgushi, H., Tateishi, T., Tanaka, J., Bunyaratvej, A., 2004. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320, 914–919. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.029>
- Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., Yoo, J.U., 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research* 238, 265–272. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3858>
- Jones, G., Bennell, K., Cicuttini, F.M., 2003. Effect of physical activity on cartilage development in healthy kids. *British Journal of Sports Medicine* 37, 382–383. <https://doi.org/10.1136/bjism.37.5.382>

- Karlsson, C., Brantsing, C., Svensson, T., Brisby, H., Asp, J., Tallheden, T., Lindahl, A., 2007. Differentiation of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes: Analysis of chondrogenic potential and expression pattern of differentiation-related transcription factors. *Journal of Orthopaedic Research* 25, 152–163. <https://doi.org/10.1002/jor.20287>
- Kearney, E., Farrell, E., Prendergast, P., Campbell, V., 2010. Tensile Strain as a Regulator of Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis. *Annals of Biomedical Engineering* 38, 1767–1779. <https://doi.org/10.1007/s10439-010-9979-4>
- Li, Z., Yao, S.-J., Alini, M., Stoddart, M.J., 2009. 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 Engineering Part A* 16, 575–584. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0262>
- Liu, Y., Zhou, G., Cao, Y., 2017. Recent Progress in Cartilage Tissue Engineering—Our Experience and Future Directions. *Engineering* 3, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2017.01.010>
- Maria, A.T.J., Toupet, K., Maumus, M., Fonteneau, G., Le Quellec, A., Jorgensen, C., Guilpain, P., Noël, D., 2016. Human adipose mesenchymal stem cells as potent anti-fibrosis therapy for systemic sclerosis. *Journal of Autoimmunity* 70, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.03.013>
- Mauck, R.L., Byers, B.A., Yuan, X., Tuan, R.S., 2007. Regulation of cartilaginous ECM gene transcription by chondrocytes and MSCs in 3D culture in response to dynamic loading. *Biomech Model Mechanobiol* 6, 113–125. <https://doi.org/10.1007/s10237-006-0042-1>
- Meinert, C., Schrobback, K., Hutmacher, D.W., Klein, T.J., 2017. A novel bioreactor system for biaxial mechanical loading enhances the properties of tissue-engineered human cartilage. *Sci Rep* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16523-x>
- Miyayoshi, K., Trindade, M.C.D., Lindsey, D.P., Beaupré, G.S., Carter, D.R., Goodman, S.B., Schurman, D.J., Smith, R.L., 2006a. Effects of hydrostatic pressure and transforming growth factor-beta 3 on adult human mesenchymal stem cell chondrogenesis in vitro. *Tissue Eng.* 12, 1419–1428. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1419>
- Miyayoshi, K., Trindade, M.C.D., Lindsey, D.P., Beaupré, G.S., Carter, D.R., Goodman, S.B., Schurman, D.J., Smith, R.L., 2006b. Dose- and time-dependent effects of cyclic hydrostatic pressure on transforming growth factor-beta3-induced chondrogenesis by adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Tissue Eng.* 12, 2253–2262. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2253>
- Mouw, J.K., Connelly, J.T., Wilson, C.G., Michael, K.E., Levenston, M.E., 2007. Dynamic Compression Regulates the Expression and Synthesis of Chondrocyte-Specific Matrix Molecules in Bone Marrow Stromal Cells. *STEM CELLS* 25, 655–663. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0435>
- Mwale, F., Stachura, D., Roughley, P., Antoniou, J., 2006. Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. *Journal of Orthopaedic Research* 24, 1791–1798. <https://doi.org/10.1002/jor.20200>
- Niemeyer, P., Salzmann, G., Feucht, M., Pestka, J., Porichis, S., Ogon, P., Südkamp, N., Schmal, H., 2014. First-generation versus second-generation autologous chondrocyte implantation for treatment of cartilage defects of the knee: a matched-pair analysis

- on long-term clinical outcome. *International Orthopaedics (SICOT)* 38, 2065–2070. <https://doi.org/10.1007/s00264-014-2368-0>
- Ogawa, R., Mizuno, S., Murphy, G.F., Orgill, D.P., 2009. The Effect of Hydrostatic Pressure on Three-Dimensional Chondroinduction of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Engineering Part A* 15, 2937–2945. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0672>
- Parate, D., Franco-Obregón, A., Fröhlich, J., Beyer, C., Abbas, A.A., Kamarul, T., Hui, J.H.P., Yang, Z., 2017. Enhancement of mesenchymal stem cell chondrogenesis with short-term low intensity pulsed electromagnetic fields. *Sci Rep* 7, 9421. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09892-w>
- Pelaez, D., Charles Huang, C.-Y., Cheung, H.S., 2008. Cyclic Compression Maintains Viability and Induces Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells in Fibrin Gel Scaffolds. *Stem Cells and Development* 18, 93–102. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0030>
- Pelttari, K., Winter, A., Steck, E., Goetzke, K., Hennig, T., Ochs, B.G., Aigner, T., Richter, W., 2006. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum.* 54, 3254–3266. <https://doi.org/10.1002/art.22136>
- Peñuela, L., Wolf, F., Raiteri, R., Wendt, D., Martin, I., Barbero, A., 2014. Atomic force microscopy to investigate spatial patterns of response to interleukin-1beta in engineered cartilage tissue elasticity. *J Biomech* 47, 2157–2164. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.10.056>
- Petitjean, N., Dufour, G., Cañadas, P., Maumus, M., Valorge, P., Devic, S., Berthelot, J., Belamie, E., Royer, P., Jorgensen, C., Noël, D., Le Floc'h, S., 2020. Validation of a new fluidic device for mechanical stimulation and characterization of microspheres: A first step towards cartilage characterization. *Materials Science and Engineering: C* 111800. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111800>
- Ringe, J., Burmester, G.R., Sittinger, M., 2012. Regenerative medicine in rheumatic disease—progress in tissue engineering. *Nature Reviews Rheumatology* 8, 493–498. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.98>
- Safshekan, F., Tafazzoli-Shadpour, M., Shokrgozar, M.A., Haghhighipour, N., Mahdian, R., Hemmati, A., 2012. Intermittent hydrostatic pressure enhances growth factor-induced chondroinduction of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Artif Organs* 36, 1065–1071. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2012.01507.x>
- Schätti, O., Grad, S., Goldhahn, J., Salzmann, G., Li, Z., Alini, M., Stoddart, M.J., 2011. A combination of shear and dynamic compression leads to mechanically induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 22, 214–225. <https://doi.org/10.22203/ecm.v022a17>
- Shea, C.A., Rolfe, R.A., Murphy, P., 2015. The importance of foetal movement for coordinated cartilage and bone development in utero: clinical consequences and potential for therapy. *Bone Joint Res* 4, 105–116. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.47.2000387>
- Steward, A.J., Kelly, D.J., 2015. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J. Anat.* 227, 717–731. <https://doi.org/10.1111/joa.12243>
- Ye, R., Hao, J., Song, J., Zhao, Z., Fang, S., Wang, Y., Li, J., 2014. Microenvironment is involved in cellular response to hydrostatic pressures during chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 115, 1089–1096. <https://doi.org/10.1002/jcb.24743>

## VII. Conclusions et perspectives

L'étude bibliographique réalisée au cours de ce travail de thèse a mis en évidence les besoins concernant la réparation du cartilage articulaire. Le CA est un tissu conjonctif dont la composition et la structure complexe sont à l'origine de ses propriétés mécaniques. Or, la fonction principale du CA est la transmission d'actions mécaniques entre les membres du corps. C'est pourquoi, dans le cadre de la réparation du CA par l'implantation de néo-tissus issus de l'ingénierie tissulaire, il est important de favoriser la sécrétion et l'organisation d'une matrice extra-cellulaire aux propriétés mécaniques se rapprochant au plus près de celles du CA natif. Pour ce faire, il apparaît nécessaire de comprendre le développement du cartilage articulaire sous contraintes mécaniques.

De nos jours, différents facteurs de croissance biochimiques sont utilisés pour favoriser le phénotype chondrocytaire des cellules et la sécrétion de la matrice extra-cellulaire mais les propriétés mécaniques de ces néo-tissus restent souvent trop faibles. Une manière d'améliorer la qualité de ces néo-tissus est d'ajouter des stimuli mécaniques qui font partie de l'environnement du CA et qui sont essentiels à son développement embryonnaire et post-natal ainsi qu'au maintien de son homéostasie. Alors que les néo-tissus peuvent être conçus à partir de chondrocytes ou de cellules souches mésenchymateuses, nous avons choisi d'utiliser ces dernières qui peuvent être isolées plus facilement et ont un bon potentiel chondrogénique. Le micropellet de cartilage est un modèle de croissance de cartilage que nous avons choisi parce qu'il ne comporte pas de support matriciel qui pourrait influencer le comportement des cellules. Le micropellet de cartilage est un néo-tissu qui a été très étudié d'un point de vue biochimique mais très peu d'un point de vue biomécanique, probablement du fait de sa petite taille et de sa forme irrégulière. C'est pourquoi il est nécessaire d'évaluer la croissance du micropellet de cartilage, selon des critères biochimiques et biomécaniques, lors de l'ajout dans son environnement d'un facteur de croissance mécanique. Des stimuli mécaniques pourraient agir comme un facteur de maturation d'un micropellet, lequel ressemble plus à un cartilage de nouveau-né après 21 à 29 jours de culture qu'à un cartilage adulte (Dusfour et al., 2020).

Ceci a conduit à la mise en place d'un système de stimulation et caractérisation mécaniques de microsphères souples. Ce système fluide permet d'appliquer une même contrainte de pression à tous les échantillons quels que soient leur taille, leur forme et leur rigidité. En plaçant 6 micropellets dans 6 puits coniques, ils peuvent être stimulés simultanément afin d'obtenir suffisamment de matériel biologique et d'analyser l'expression des gènes. La validation de ce dispositif a été conduite en utilisant des microsphères d'alginate, de collagène ou de collagène réticulé dont la taille était similaire aux micropellets de cartilage et dont les propriétés mécaniques étaient variables. Ces microsphères, plus homogènes, étaient plus faciles à utiliser pour cette validation qu'un matériel biologique non seulement irrégulier dans sa forme mais aussi très précieux. Les propriétés mécaniques de microsphères de collagène réticulé obtenues avec ce nouveau dispositif fluide ou avec un dispositif de caractérisation conventionnel utilisant deux surfaces planes ont été comparées et ont permis de valider les capacités du système à effectuer des caractérisations mécaniques. La qualité de signaux de pression permettant la stimulation des micropellets mais aussi leur caractérisation a été analysée. La forme, l'amplitude et la fréquence de signaux constants, sinusoïdaux ou carrés étaient conformes à ce qui était souhaité. La

répétition de ces stimulations durant 30 minutes et avec trois échantillons différents a permis de confirmer la répétabilité et la reproductibilité de ces signaux. Ainsi, la fiabilité des signaux de pression générés par le système approuve leur utilisation pour l'application de stimuli mécaniques répétables et reproductibles sur des micropellets de cartilage.

Une fois le dispositif validé, l'impact de stimuli mécaniques délivrés par le système fluide a été évalué sur les micropellets de cartilage. Après 21 jours de culture, la stimulation mécanique des micropellets par un signal de pression carré a créé des déformations modérées qui ne semblent pas altérer la structure des micropellets. La stimulation mécanique a modulé l'expression des gènes chondrocytaires et a augmenté leur expression pour les paramètres de stimulations les plus favorables. Étant donné le court laps de temps entre la stimulation des micropellets et l'analyse de l'expression des gènes, on peut supposer que l'activation de voies de mécanotransduction est à l'origine de cette régulation d'expression génique. D'autre part, les déformations locales dans les micropellets estimées via un modèle éléments finis suggèrent la possibilité de flux au sein des micropellets lors des stimulations mécaniques puisque certaines zones voient leur volume augmenté tandis que d'autres le voient diminuer. Ainsi, en plus de modifier la synthèse de MEC par le biais des voies de mécanotransduction, les stimulations mécaniques à long terme pourraient améliorer cette synthèse par un meilleur apport de nutriments au centre des micropellets, bien que cela soit encore difficile à démontrer. La caractérisation mécanique de micropellets de 21 et 26 jours a montré que cette évaluation était possible mais que le modèle numérique doit être amélioré afin de prendre en compte la non-linéarité et la poro-élasticité des micropellets.

Ainsi, le système fluide développé au cours de ce projet peut être utilisé pour stimuler et caractériser mécaniquement des micropellets de cartilage lors d'études à long terme afin d'établir les stimulations mécaniques favorisant le phénotype chondrocytaire, la sécrétion de MEC ainsi que l'augmentation des propriétés mécaniques des micropellets et de suivre la croissance de ces micropellets d'un point de vue biomécanique.

Le travail présent a permis de mettre en place un système capable de stimuler et caractériser mécaniquement des micropellets de cartilage et a apporté la preuve de concept que l'évaluation de l'impact des contraintes mécaniques peut être réalisée sur des micropellets de cartilage. Cependant, les résultats sont préliminaires et de nombreuses perspectives sont envisageables. Ces perspectives concernent (1) l'amélioration de ce système de stimulation et de la méthode de caractérisation mécanique, et (2) la poursuite des stimulations mécaniques des micropellets de cartilage.

À l'issue de la validation du dispositif fluïdique avec les microsphères d'alginate, de collagène et de collagène réticulé, nous nous sommes confrontés à l'utilisation du dispositif avec des micropellets de cartilage dont la forme est beaucoup plus irrégulière. Des axes d'amélioration concernent à la fois le dispositif fluïdique et le modèle numérique qui analyse leurs propriétés mécaniques ou leurs déformations au cours des stimulations.

Le dispositif fluïdique est capable de générer des signaux de pression constants et carrés de grande qualité du fait d'un contrôle actif et permanent de la pression. A contrario, les signaux sinusoïdaux sont issus d'un mouvement du galet de la pompe mono-galet, défini à partir d'une initialisation des stimulations sinusoïdales. Cela génère au cours des stimulations mécaniques des variations de l'amplitude des sinusoïdes en fonction de l'enfoncement progressif des micropellets. Il est donc nécessaire d'incrémenter la gestion du signal sinusoïdal d'une boucle de rétrocontrôle. Afin de conserver la forme du signal sinusoïdal, il conviendra de faire un choix de la fréquence de vérification de l'amplitude des sinusoïdes, de l'erreur d'amplitude tolérée ainsi que de la méthode de réajustement de l'amplitude du signal. Enfin, la conception d'une interface graphique permettant la programmation des tâches que doit réaliser le système est nécessaire afin d'améliorer l'expérience d'utilisation du dispositif, actuellement contrôlé uniquement via les scripts python et un terminal de commandes.

Le modèle numérique en éléments finis doit être amélioré puisqu'il a montré ses limites lors de la caractérisation de micropellets de cartilage dont la forme est irrégulière et le comportement mécanique complexe. Le modèle numérique actuellement utilisé est relativement simple. Il apparaît tout d'abord nécessaire d'introduire une loi non linéaire de type Fung, déjà utilisée par l'équipe lors d'une précédente étude avec des micropellets de cartilage (Dusfour et al., 2020), afin d'analyser plus finement leurs propriétés élastiques. Étant donné que les propriétés mécaniques des micropellets ont été évaluées au cours d'un test de multi-fluage où nous n'avons traité uniquement les données à l'équilibre, nous nous sommes contentés d'une loi matériau ne prenant en compte que le comportement mécanique élastique, c'est à dire sans prendre en compte la visco-poro-élasticité des micropellets. En effet, comme le CA, le micropellet de cartilage possède un comportement dépendant du temps puisque un comportement hystérétique a été observé lors de cycles de charge-décharge (Dusfour et al., 2020). Ainsi, l'enrichissement du modèle numérique par la prise en compte de la perméabilité et/ou la viscosité des micropellets pourrait être envisageable en utilisant l'ensemble des données des paliers du test de multi-fluage.

La forme plus ou moins irrégulière des micropellets de cartilage est une limite importante à l'analyse de leurs propriétés mécaniques et des déformations locales lors des stimulations mécaniques. En effet, leur forme parfois ovoïde peut accentuer leur enfoncement dans le cône par comparaison avec un micropellet plus rond mais ayant les mêmes propriétés mécaniques. Ainsi leurs déformations peuvent être surestimées et leurs propriétés mécaniques sous-estimées. La méthode d'analyse utilisée pour évaluer l'enfoncement des micropellets dans le cône permet d'obtenir l'ensemble du contour des micropellets. Ainsi la forme initiale du micropellet pourrait être plus finement évaluée et la géométrie de la microsphère déformable du modèle éléments finis mieux adaptée. Cela implique l'utilisation d'un

modèle numérique en 3 dimensions (3D) dont la géométrie sera construite à l'aide des images obtenues selon l'unique angle d'observation des micropellets.

L'ensemble de ces améliorations permettrait de mieux décrire le comportement mécanique des micropellets de cartilage. Cependant, l'augmentation de la complexité du modèle numérique (3D, loi matériau) impliquera nécessairement des calculs numériques plus lourds donc une augmentation considérable du temps de calcul. En particulier, il est peu probable qu'une table de données et une relation mathématique permettant une analyse rapide de l'élasticité des micropellets puissent être établies avec une loi matériau plus complexe. Une méthode d'analyse inverse plus classique et beaucoup plus gourmande en temps sera nécessaire.

Le développement d'un premier dispositif de stimulation et caractérisation mécanique des micropellets de cartilage, dont la preuve de concept a été établie au cours de ce travail de thèse, ouvre nécessairement les portes à de nombreuses perspectives. Les perspectives d'évaluation de l'impact des stimulations mécaniques sur la croissance des micropellets de cartilage peuvent être déclinées en deux objectifs. Il s'agit, dans un premier temps, de déterminer les meilleurs paramètres de stimulations mécaniques à court terme et mettre en évidence l'implication de voies de mécanotransduction. Dans un second temps, il s'agira d'évaluer l'impact des stimulations mécaniques à long terme sur les propriétés biochimiques et biomécaniques de la MEC des micropellets de cartilage.

Les premiers résultats obtenus ont montré une réponse des micropellets aux stimuli mécaniques dans le système fluide. Il est nécessaire de compléter ces résultats concernant l'évaluation de l'impact de divers paramètres du signal de pression sur l'expression des gènes chondrocytaires, afin d'obtenir l'augmentation significative de l'expression des gènes pour les paramètres qui seront les plus favorables à la croissance des micropellets de cartilage. Alors que la répétition des stimulations au cours d'une journée est défavorable, il est nécessaire de répéter les expérimentations de stimulation mécanique au cours de la semaine puisqu'il semble, cette fois-ci qu'elles puissent être favorables à l'expression des marqueurs chondrocytaires par comparaison à une seule stimulation qui, 5 jours après, a diminué l'expression des gènes *AGG* et *COL IIB*. Au cours de ces expérimentations, il sera également nécessaire de poursuivre l'évaluation de l'intégrité structurelle des micropellets à l'issue des stimulations. Enfin, au regard des capacités du dispositif à générer différents signaux de stimulation, de l'utilisation massive de signaux de stimulations mécaniques sinusoïdaux dans la littérature et des résultats de l'enfoncement des micropellets proches d'une stimulation statique, il semble nécessaire de comparer l'impact de stimulations avec un signal de pression constant, sinusoïdal et carré. Le premier est un signal de pression statique quand les suivants sont des signaux de stimulations dynamiques mais avec des niveaux d'énergie impliqués différents. L'expression des gènes chondrocytaires pourrait donc être comparée avec des micropellets stimulés avec un signal constant, carré ou sinusoïdal, en utilisant les paramètres optimaux déterminés avec le signal carré.

La modulation de l'expression des gènes chondrocytaires en 24 heures et pour seulement 15 à 60 minutes de stimulation mécanique semble ne pouvoir être expliquée que par l'activation des voies de mécanotransduction. De nombreuses voies de signalisation ont d'ailleurs été mises en évidence au cours ou pendant les heures qui suivent des stimulations mécaniques variées et avec différents néotissus. Afin de confirmer cette hypothèse, l'implication de voies de mécanotransduction classiques peut être évaluée par la quantification des protéines SMAD2/3, ERK1/2, p38 MAPK phosphorylées, par Western blot ou ELISA ou encore la production de TGF $\beta$  endogène par l'expression des gènes associés.

Une fois les paramètres de stimulation favorables à la croissance des microsphères déterminés, ces derniers pourront être appliqués à la stimulation des micropellets durant plusieurs semaines. Il sera alors possible d'évaluer la production de MEC en quantifiant les collagènes (I, II et X, majoritairement) et les PG. Des analyses en immunohistochimie permettront d'observer l'impact des stimulations sur la répartition de l'accumulation de la MEC. D'un point de vue biomécanique, des études longitudinales pourront être réalisées en analysant les propriétés mécaniques des micropellets chaque semaine. A l'arrêt des expérimentations, les données biomécaniques globales pourront être complétées par des données biomécaniques locales grâce à des tests mécaniques à l'échelle microscopique en utilisant un microscope à force atomique (AFM). Des résultats ont déjà été obtenus en collaboration avec l'équipe Biophotonique du laboratoire Charles Coulomb à Montpellier qui montrent l'hétérogénéité des propriétés mécaniques locales du micropellet de cartilage et la faisabilité de cette étude. A cette occasion, les coupes utilisées pour l'AFM pourront aussi être utilisées en microscopie biphotonique pour évaluer l'organisation de la MEC et par spectroscopie RAMAN, du nom de son inventeur, pour évaluer la composition locale de la MEC. Ainsi, lors et à l'issue de stimulations mécaniques durant plusieurs semaines dans le système fluide, de nombreuses analyses sont envisagées afin d'évaluer l'impact des stimuli mécaniques sur la croissance des micropellets d'un point de vue biochimique, biomécanique et aux deux échelles qui semblent pertinentes (cellulaire et tissulaire).

## VIII. Bibliographie

- Adams, M.A., 2006. The mechanical environment of chondrocytes in articular cartilage. *Biorheology* 43, 537–545.
- Afoke, N., Byers, P., Hutton, W., 1987. Contact pressures in the human hip joint. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume* 69–B, 536–541. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.69B4.3611154>
- Aigner, T., Stöve, J., 2003. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 1569–1593.
- Akizuki, S., Mow, V.C., Müller, F., Pita, J.C., Howell, D.S., Manicourt, D.H., 1986. Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus. *Journal of Orthopaedic Research* 4, 379–392. <https://doi.org/10.1002/jor.1100040401>
- Allen, J.L., Cooke, M.E., Alliston, T., 2012. ECM stiffness primes the TGF $\beta$  pathway to promote chondrocyte differentiation. *Mol. Biol. Cell* 23, 3731–3742. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-03-0172>
- Almeida, H.V., Liu, Y., Cunniffe, G.M., Mulhall, K.J., Matsiko, A., Buckley, C.T., O'Brien, F.J., Kelly, D.J., 2014. Controlled release of transforming growth factor- $\beta$ 3 from cartilage-extra-cellular-matrix-derived scaffolds to promote chondrogenesis of human-joint-tissue-derived stem cells. *Acta Biomaterialia* 10, 4400–4409. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.030>
- Alsalameh, S., Amin, R., Gemba, T., Lotz, M., 2004. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis & Rheumatism* 50, 1522–1532. <https://doi.org/10.1002/art.20269>
- Ameye, L., Young, M.F., 2002. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* 12, 107R–116R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwf065>
- Anderson, D.E., Markway, B.D., Weekes, K.J., McCarthy, H.E., Johnstone, B., 2017. Physioxia Promotes the Articular Chondrocyte-Like Phenotype in Human Chondroprogenitor-Derived Self-Organized Tissue. *Tissue Engineering Part A* 24, 264–274. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0510>
- Ando, W., Tateishi, K., Hart, D.A., Katakai, D., Tanaka, Y., Nakata, K., Hashimoto, J., Fujie, H., Shino, K., Yoshikawa, H., Nakamura, N., 2007. Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 28, 5462–5470. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.030>
- Angele, P., Schumann, D., Angele, M., Kinner, B., Englert, C., Hente, R., Füchtmeier, B., Nerlich, M., Neumann, C., Kujat, R., 2004. Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds. *Biorheology* 41, 335–346.
- Angele, P., Yoo, J.U., Smith, C., Mansour, J., Jepsen, K.J., Nerlich, M., Johnstone, B., 2003. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J. Orthop. Res.* 21, 451–457. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00230-9](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00230-9)
- Antons, J., Marascio, M.G.M., Nohava, J., Martin, R., Applegate, L.A., Bourban, P.E., Pioletti, D.P., 2018. Zone-dependent mechanical properties of human articular cartilage obtained by indentation measurements. *J Mater Sci Mater Med* 29, 57. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6066-0>
- Armiento, A.R., Alini, M., Stoddart, M.J., 2019. Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair? *Advanced Drug Delivery Reviews, Wound healing and fibrosis – State of play* 146, 289–305. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.015>
- Armstrong, C.G., Mow, V.C., 1982. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. *JBSJ* 64, 88.
- Bader, D.L., Salter, D.M., Chowdhury, T.T., 2011. Biomechanical Influence of Cartilage Homeostasis in Health and Disease. *Arthritis* 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/979032>
- Barry, F., Boynton, R.E., Liu, B., Murphy, J.M., 2001. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components. *Experimental Cell Research* 268, 189–200. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5278>
- Beier, F., Loeser, R.F., 2010. Biology and pathology of Rho GTPase, PI-3 kinase-Akt, and MAP kinase signaling pathways in chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* 110, 573–580. <https://doi.org/10.1002/jcb.22604>
- Benders, K.E.M., Boot, W., Cokelaere, S.M., Weeren, P.R. van, Gawlitta, D., Bergman, H.J., Saris, D.B.F., Dhert, W.J.A., Malda, J., 2014. Multipotent Stromal Cells Outperform Chondrocytes on Cartilage-Derived Matrix Scaffolds. *Cartilage* 5, 221–230. <https://doi.org/10.1177/1947603514535245>
- Benninghoff, A., 1925. Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. *Z.Zellforsch* 2, 783–862. <https://doi.org/10.1007/BF00583443>

- Bentley, G., Biant, L.C., Vijayan, S., Macmull, S., Skinner, J.A., Carrington, R.W.J., 2012. Minimum ten-year results of a prospective randomised study of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for symptomatic articular cartilage lesions of the knee. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. British volume 94–B, 504–509. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.94B4.27495>
- Bertolo, A., Arcolino, F., Capossela, S., Taddei, A.R., Baur, M., Pötzel, T., Stoyanov, J., 2015. Growth Factors Cross-Linked to Collagen Microcarriers Promote Expansion and Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering Part A* 21, 2618–2628. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2015.0029>
- Bhumiratana, S., Eton, R.E., Oungoulian, S.R., Wan, L.Q., Ateshian, G.A., Vunjak-Novakovic, G., 2014. Large, stratified, and mechanically functional human cartilage grown in vitro by mesenchymal condensation. *PNAS* 111, 6940–6945. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324050111>
- Bingham, J.T., Papannagari, R., Van de Velde, S.K., Gross, C., Gill, T.J., Felson, D.T., Rubash, H.E., Li, G., 2008. In vivo cartilage contact deformation in the healthy human tibiofemoral joint. *Rheumatology (Oxford)* 47, 1622–1627. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken345>
- Bosetti, M., Boccafoschi, F., Leigheb, M., Bianchi, A.E., Cannas, M., 2012. Chondrogenic induction of human mesenchymal stem cells using combined growth factors for cartilage tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 6, 205–213. <https://doi.org/10.1002/term.416>
- Bougault, C., Aubert-Foucher, E., Paumier, A., Perrier-Groult, E., Huot, L., Hot, D., Duterque-Coquillaud, M., Mallein-Gerin, F., 2012. Dynamic Compression of Chondrocyte-Agarose Constructs Reveals New Candidate Mechanosensitive Genes. *PloS one* 7, e36964. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036964>
- Bougault, C., Paumier, A., Aubert-Foucher, E., Mallein-Gerin, F., 2008. Molecular analysis of chondrocytes cultured in agarose in response to dynamic compression. *BMC Biotechnology* 8, 71. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-71>
- Boushell, M.K., Mosher, C.Z., Suri, G.K., Doty, S.B., Strauss, E.J., Hunziker, E.B., Lu, H.H., 2019. Polymeric mesh and insulin-like growth factor 1 delivery enhance cell homing and graft–cartilage integration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1442, 138–152. <https://doi.org/10.1111/nyas.14054>
- Cals, F.L.J., Hellingman, C.A., Koevoet, W., Jong, R.J.B. de, Osch, G.J.V.M. van, 2012. Effects of transforming growth factor- $\beta$  subtypes on in vitro cartilage production and mineralization of human bone marrow stromal-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 6, 68–76. <https://doi.org/10.1002/term.399>
- Campbell, J.J., Lee, D.A., Bader, D.L., 2006. Dynamic compressive strain influences chondrogenic gene expression in human mesenchymal stem cells. *Biorheology* 43, 455–470.
- Caplan, A.I., Elyaderani, M., Mochizuki, Y., Wakitani, S., Goldberg, V.M., 1997. Overview: Principles of Cartilage Repair and Regeneration. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)* 342, 254.
- Carney, S.L., Muir, H., 1988. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Physiological Reviews* 68, 858–910. <https://doi.org/10.1152/physrev.1988.68.3.858>
- Carroll, S.F., Buckley, C.T., Kelly, D.J., 2014. Cyclic hydrostatic pressure promotes a stable cartilage phenotype and enhances the functional development of cartilaginous grafts engineered using multipotent stromal cells isolated from bone marrow and infrapatellar fat pad. *J Biomech* 47, 2115–2121. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.12.006>
- Carry, M.R., Morita, M., Nornes, H.O., 1983. Morphogenesis of motor endplates along the proximodistal axis of the mouse hindlimb. *The Anatomical Record* 207, 473–485. <https://doi.org/10.1002/ar.1092070309>
- Carver, S.E., Heath, C.A., 1999. Increasing extracellular matrix production in regenerating cartilage with intermittent physiological pressure. *Biotechnology and Bioengineering* 62, 166–174. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990120\)62:2<166::AID-BIT6>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990120)62:2<166::AID-BIT6>3.0.CO;2-K)
- Chan, D.D., Cai, L., Butz, K.D., Trippel, S.B., Nauman, E.A., Neu, C.P., 2016. In vivo articular cartilage deformation: noninvasive quantification of intratissue strain during joint contact in the human knee. *Scientific Reports* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep19220>
- Chang, C.-F., Ramaswamy, G., Serra, R., 2012. Depletion of primary cilia in articular chondrocytes results in reduced Gli3 repressor to activator ratio, increased Hedgehog signaling, and symptoms of early osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 20, 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.11.009>
- Chen, G., Sato, T., Ushida, T., Ochiai, N., Tateishi, T., 2004. Tissue Engineering of Cartilage Using a Hybrid Scaffold of Synthetic Polymer and Collagen. *Tissue Engineering* 10, 323–330. <https://doi.org/10.1089/107632704323061681>

- Chen, S., Zhang, Q., Nakamoto, T., Kawazoe, N., Chen, G., 2015. Gelatin Scaffolds with Controlled Pore Structure and Mechanical Property for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part C: Methods* 22, 189–198. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0281>
- Chen, T., Buckley, M., Cohen, I., Bonassar, L., Awad, H.A., 2012. Insights into interstitial flow, shear stress, and mass transport effects on ECM heterogeneity in bioreactor-cultivated engineered cartilage hydrogels. *Biomech Model Mechanobiol* 11, 689–702. <https://doi.org/10.1007/s10237-011-0343-x>
- Chen, Y., Cossman, J., Jayasuriya, C.T., Li, X., Guan, Y., Fonseca, V., Yang, K., Charbonneau, C., Yu, H., Kanbe, K., Ma, P., Darling, E., Chen, Q., 2016. Deficient Mechanical Activation of Anabolic Transcripts and Post-Traumatic Cartilage Degeneration in Matrilin-1 Knockout Mice. *PLOS ONE* 11, e0156676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156676>
- Chiang, H., Jiang, C.-C., 2009. Repair of Articular Cartilage Defects: Review and Perspectives. *Journal of the Formosan Medical Association* 108, 87–101. [https://doi.org/10.1016/S0929-6646\(09\)60039-5](https://doi.org/10.1016/S0929-6646(09)60039-5)
- Chijimatsu, R., Saito, T., 2019. Mechanisms of synovial joint and articular cartilage development. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 3939–3952. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03191-5>
- Choi, J.B., Youn, I., Cao, L., Leddy, H.A., Gilchrist, C.L., Setton, L.A., Guilak, F., 2007. Zonal changes in the three-dimensional morphology of the chondron under compression: The relationship among cellular, pericellular, and extracellular deformation in articular cartilage. *J Biomech* 40, 2596–2603. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2007.01.009>
- Choi, J.R., Yong, K.W., Choi, J.Y., 2018. Effects of mechanical loading on human mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering. *Journal of Cellular Physiology* 233, 1913–1928. <https://doi.org/10.1002/jcp.26018>
- Choi, J.W., Choi, B.H., Park, S.-H., Pai, K.S., Li, T.Z., Min, B.-H., Park, S.R., 2013. Mechanical Stimulation by Ultrasound Enhances Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in a Fibrin-Hyaluronic Acid Hydrogel. *Artificial Organs* 37, 648–655. <https://doi.org/10.1111/aor.12041>
- Chowdhury, T.T., Bader, D.L., Shelton, J.C., Lee, D.A., 2003. Temporal regulation of chondrocyte metabolism in agarose constructs subjected to dynamic compression. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 417, 105–111. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00340-0](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00340-0)
- Chowdhury, T.T., Salter, D.M., Bader, D.L., Lee, D.A., 2004. Integrin-mediated mechanotransduction processes in TGF $\beta$ -stimulated monolayer-expanded chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318, 873–881. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.107>
- Clark, M.F., Lister, R.M., Bar-Joseph, M., 1986. ELISA techniques, in: *Methods in Enzymology, Plant Molecular Biology*. Academic Press, pp. 742–766. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)18114-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)18114-6)
- Connelly, J.T., Vanderploeg, E.J., Levenston, M.E., 2004. The influence of cyclic tension amplitude on chondrocyte matrix synthesis: Experimental and finite element analyses. *Biorheology* 41, 377–387.
- Coveney, C.R., Zhu, L., Miotla-Zarebska, J., Stott, B., Parisi, I., Batchelor, V., Duarte, C., Chang, E., McSorley, E., Vincent, T.L., Wann, A.K.T., 2020. The ciliary protein IFT88 controls post-natal cartilage thickness and influences development of osteoarthritis. *bioRxiv* 2020.07.29.225599. <https://doi.org/10.1101/2020.07.29.225599>
- Darling, E.M., Athanasiou, K.A., 2005. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *Journal of Orthopaedic Research* 23, 425–432. <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2004.08.008>
- Darling, E.M., Wilusz, R.E., Bolognesi, M.P., Zauscher, S., Guilak, F., 2010. Spatial mapping of the biomechanical properties of the pericellular matrix of articular cartilage measured in situ via atomic force microscopy. *Biophys. J.* 98, 2848–2856. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.03.037>
- Decker, R.S., 2017. Articular cartilage and joint development from embryogenesis to adulthood. *Semin Cell Dev Biol* 62, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.10.005>
- Decker, R.S., Um, H.-B., Dymont, N.A., Cottingham, N., Usami, Y., Enomoto-Iwamoto, M., Kronenberg, M.S., Maye, P., Rowe, D.W., Koyama, E., Pacifici, M., 2017. Cell origin, volume and arrangement are drivers of articular cartilage formation, morphogenesis and response to injury in mouse limbs. *Developmental Biology* 426, 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.04.006>
- Delaine-Smith, R.M., Reilly, G.C., 2011. The effects of mechanical loading on mesenchymal stem cell differentiation and matrix production. *Vitam. Horm.* 87, 417–480. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386015-6.00039-1>
- DeLise, A.M., Fischer, L., Tuan, R.S., 2000. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthr. Cartil.* 8, 309–334. <https://doi.org/10.1053/joca.1999.0306>
- Demange, M., Gomoll, A.H., 2012. The use of osteochondral allografts in the management of cartilage defects. *Curr Rev Musculoskelet Med* 5, 229–235. <https://doi.org/10.1007/s12178-012-9132-0>

- Di Martino, A., Kon, E., Perdisa, F., Sessa, A., Filardo, G., Neri, M.P., Bragonzoni, L., Marcacci, M., 2015. Surgical treatment of early knee osteoarthritis with a cell-free osteochondral scaffold: results at 24 months of follow-up. *Injury, Current trends in bone repair* 46, S33–S38. [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(15\)30052-8](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(15)30052-8)
- Dikina, A.D., Lai, B.P., Cao, M., Zborowski, M., Alsberg, E., 2017. Magnetic field application or mechanical stimulation via magnetic microparticles does not enhance chondrogenesis in mesenchymal stem cell sheets. *Biomater Sci* 5, 1241–1245. <https://doi.org/10.1039/c7bm00061h>
- Djouad, F., Bouffi, C., Ghannam, S., Noël, D., Jorgensen, C., 2009. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology* 5, 392–399. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.104>
- Docheva, D., Popov, C., Alberton, P., Aszodi, A., 2014. Integrin signaling in skeletal development and function. *Birth Defect Res C* 102, 13–36. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21059>
- Doostmohammadi, M., Forootanfar, H., Ramakrishna, S., 2020. Regenerative medicine and drug delivery: Progress via electrospun biomaterials. *Materials Science and Engineering: C* 109, 110521. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110521>
- Douglas, T., Heinemann, S., Bierbaum, S., Scharnweber, D., Worch, H., 2006. Fibrillogenesis of Collagen Types I, II, and III with Small Leucine-Rich Proteoglycans Decorin and Biglycan. *Biomacromolecules* 7, 2388–2393. <https://doi.org/10.1021/bm0603746>
- Du, D., Hsu, P., Zhu, Z., Zhang, C., 2020. Current surgical options and innovation for repairing articular cartilage defects in the femoral head. *Journal of Orthopaedic Translation* 21, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2019.06.002>
- Du, G., Li, L., Zhang, X., Liu, J., Hao, J., Zhu, J., Wu, H., Chen, W., Zhang, Q., 2020. Roles of TRPV4 and piezo channels in stretch-evoked Ca<sup>2+</sup> response in chondrocytes. *Exp Biol Med (Maywood)* 245, 180–189. <https://doi.org/10.1177/1535370219892601>
- Du, J., Zu, Y., Li, J., Du, S., Xu, Y., Zhang, L., Jiang, L., Wang, Z., Chien, S., Yang, C., 2016. Extracellular matrix stiffness dictates Wnt expression through integrin pathway. *Sci Rep* 6. <https://doi.org/10.1038/srep20395>
- Dubois, F., Mozul, R., 2017. LMG90. Presented at the 13e colloque national en calcul des structures.
- DuRaine, G.D., Brown, W.E., Hu, J.C., Athanasiou, K.A., 2015. Emergence of Scaffold-Free Approaches for Tissue Engineering Musculoskeletal Cartilages. *Ann Biomed Eng* 43, 543–554. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1161-y>
- Dusfour, G., 2018. Contribution à l'étude de la croissance du disque intervertébral et de cartilage de synthèse (thesis). Montpellier.
- Dusfour, G., Maumus, M., Cañadas, P., Ambard, D., Jorgensen, C., Noël, D., Le Floc'h, S., 2020. Mesenchymal stem cells-derived cartilage micropellets: A relevant in vitro model for biomechanical and mechanobiological studies of cartilage growth. *Materials Science and Engineering: C* 112, 110808. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110808>
- Eckstein, F., Hudelmaier, M., Putz, R., 2006. The effects of exercise on human articular cartilage. *J. Anat.* 208, 491–512. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2006.00546.x>
- Edwards, J.C., Wilkinson, L.S., Jones, H.M., Soothill, P., Henderson, K.J., Worrall, J.G., Pitsillides, A.A., 1994. The formation of human synovial joint cavities: a possible role for hyaluronan and CD44 in altered interzone cohesion. *J Anat* 185, 355–367.
- Efficacy and Safety Study of co.Don Chondrosphere to Treat Cartilage Defects - Full Text View - ClinicalTrials.gov [WWW Document], n.d. URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01222559> (accessed 6.15.20).
- Elder, B.D., Athanasiou, K.A., 2009. Hydrostatic Pressure in Articular Cartilage Tissue Engineering: From Chondrocytes to Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 15, 43–53. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0435>
- Elder, B.D., Athanasiou, K.A., 2008. Synergistic and Additive Effects of Hydrostatic Pressure and Growth Factors on Tissue Formation. *PLoS One* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002341>
- Elder, S.H., Kimura, J.H., Soslowky, L.J., Lavagnino, M., Goldstein, S.A., 2000. Effect of compressive loading on chondrocyte differentiation in agarose cultures of chick limb-bud cells. *J. Orthop. Res.* 18, 78–86. <https://doi.org/10.1002/jor.1100180112>
- Erggelet, C., Endres, M., Neumann, K., Morawietz, L., Ringe, J., Haberstroh, K., Sittlinger, M., Kaps, C., 2009. Formation of cartilage repair tissue in articular cartilage defects pretreated with microfracture and covered with cell-free polymer-based implants. *Journal of Orthopaedic Research* 27, 1353–1360. <https://doi.org/10.1002/jor.20879>

- Erickson, I.E., van Veen, S.C., Sengupta, S., Kestle, S.R., Mauck, R.L., 2011. Cartilage Matrix Formation by Bovine Mesenchymal Stem Cells in Three-dimensional Culture Is Age-dependent. *Clin Orthop Relat Res* 469, 2744–2753. <https://doi.org/10.1007/s11999-011-1869-z>
- Eskelinen, A.P., Visuri, T., Larni, H.M., Ritsilä, V., 2004. Primary Cartilage Lesions of the Knee Joint in Young Male Adults. Overweight as a Predisposing Factor. An Arthroscopic Study. *Scand J Surg* 93, 229–233. <https://doi.org/10.1177/145749690409300311>
- Eslaminejad, M.B., Nikmahzar, A., Yazdi, P.E., Piryaei, A., 2006. The structure of Human Mesenchymal Stem Cells Differentiated into Cartilage in Micromass Culture System. *Cell Journal* 8, 162–171.
- Fabre, H., Ducret, M., Degoul, O., Rodriguez, J., Perrier-Groult, E., Aubert-Foucher, E., Atzeni, G., Damour, O., Mcguckin, C., Forraz, N., Mallein-Gerin, F., 2016. IIB or not IIB: development of a screening method by flow cytometry to evaluate correct chondrogenic conversion of human mesenchymal stem cells in hydrogel. *Osteoarthritis and Cartilage* 24, S507–S508. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.01.927>
- Fabre, H., Ducret, M., Degoul, O., Rodriguez, J., Perrier-Groult, E., Aubert-Foucher, E., Padeloup, M., Auxenfans, C., Mcguckin, C., Forraz, N., Mallein-Gerin, F., 2019. Characterization of Different Sources of Human MSCs Expanded in Serum-Free Conditions with Quantification of Chondrogenic Induction in 3D. *Stem Cells International* 2019, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2019/2186728>
- Fang, J., Xiao, L., Chen, R., Zhao, Z., 2017. Conditional removal of the canonical TGF- $\beta$ 1 signaling delays condylar cartilage degeneration induced by a partial discectomy in mice. *PLOS ONE* 12, e0177826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177826>
- Farnum, C.E., Wilsman, N.J., 2011. Orientation of Primary Cilia of Articular Chondrocytes in Three-Dimensional Space. *Anat Rec* 294, 533–549. <https://doi.org/10.1002/ar.21330>
- Farrell, M.J., Fisher, M.B., Huang, A.H., Shin, J.I., Farrell, K.M., Mauck, R.L., 2014. Functional Properties of MSC-Based Engineered Cartilage are Unstable with Very Long Term In Vitro Culture. *J Biomech* 47, 2173–2182. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.10.030>
- Ferreira, R.R., Fukui, H., Chow, R., Vilfan, A., Vermot, J., 2019. The cilium as a force sensor—myth versus reality. *J Cell Sci* 132. <https://doi.org/10.1242/jcs.213496>
- Finger, A.R., Sargent, C.Y., Dulaney, K.O., Bernacki, S.H., Lobo, E.G., 2007. 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* 13, 1151–1158. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0290>
- Firner, S., Zaucke, F., Michael, J., Dargel, J., Schiwy-Bochat, K.-H., Heilig, J., Rothschild, M.A., Eysel, P., Brüggemann, G.-P., Niehoff, A., 2017. Extracellular Distribution of Collagen II and Perifibrillar Adapter Proteins in Healthy and Osteoarthritic Human Knee Joint Cartilage. *J Histochem Cytochem* 65, 593–606. <https://doi.org/10.1369/0022155417729154>
- Fischer, J., Aulmann, A., Dexheimer, V., Grossner, T., Richter, W., 2014. Intermittent PTHrP(1–34) Exposure Augments Chondrogenesis and Reduces Hypertrophy of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells and Development* 23, 2513–2523. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0101>
- Franceschi, L.D., Grigolo, B., Roseti, L., Facchini, A., Fini, M., Giavaresi, G., Tschon, M., Giardino, R., 2005. Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage defects in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 75A, 612–622. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30471>
- Freyria, A.-M., Mallein-Gerin, F., 2012. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: The indisputable role of growth factors. *Injury* 43, 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.05.035>
- Fuhrer, R., Hofmann, S., Hild, N., Vetsch, J.R., Herrmann, I.K., Grass, R.N., Stark, W.J., 2013. Pressureless Mechanical Induction of Stem Cell Differentiation Is Dose and Frequency Dependent. *PLOS ONE* 8, e81362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081362>
- Fujie, H., Nakamura, N., 2013. Frictional properties of articular cartilage-like tissues repaired with a mesenchymal stem cell-based tissue engineered construct, in: 2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). Presented at the 2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), pp. 401–404. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2013.6609521>
- Gannon, A.R., Nagel, T., Bell, A.P., Avery, N.C., Kelly, D.J., 2015. Postnatal changes to the mechanical properties of articular cartilage are driven by the evolution of its collagen network. *Eur Cell Mater* 29, 105–121; discussion 121–123. <https://doi.org/10.22203/ecm.v029a09>
- Garcia, M., Knight, M.M., 2010. Cyclic loading opens hemichannels to release ATP as part of a chondrocyte mechanotransduction pathway. *Journal of Orthopaedic Research* 28, 510–515. <https://doi.org/10.1002/jor.21025>

- Gardner, O.F.W., Musumeci, G., Neumann, A.J., Eglin, D., Archer, C.W., Alini, M., Stoddart, M.J., 2017. Asymmetrical seeding of MSCs into fibrin–poly(ester-urethane) scaffolds and its effect on mechanically induced chondrogenesis. *J Tissue Eng Regen Med* 11, 2912–2921. <https://doi.org/10.1002/term.2194>
- Gentili, C., Cancedda, R., 2009. Cartilage and bone extracellular matrix. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1334–1348.
- Gersing, A.S., Schwaiger, B.J., Nevitt, M.C., Joseph, G.B., Chanchek, N., Guimaraes, J.B., Mbapte Wamba, J., Facchetti, L., McCulloch, C.E., Link, T.M., 2017. Is Weight Loss Associated with Less Progression of Changes in Knee Articular Cartilage among Obese and Overweight Patients as Assessed with MR Imaging over 48 Months? Data from the Osteoarthritis Initiative. *Radiology* 284, 508–520. <https://doi.org/10.1148/radiol.2017161005>
- Geuzaine, C., Remacle, J.-F., 2009. Gmsh: A 3-D Finite Element Mesh Generator with Built-in Pre- and Post-Processing Facilities. *International Journal for Numerical Methods in Engineering* 79, 1309–1331. <https://doi.org/10.1002/nme.2579>
- Gouttenoire, J., Bougault, C., Aubert-Foucher, E., Perrier-Groult, E., Ronzière, M.-C., Sandell, L., Lundgren-Akerlund, E., Mallein-Gerin, F., 2010. BMP-2 and TGF- $\beta$ 1 differentially control expression of type II procollagen and  $\alpha$ 10 and  $\alpha$ 11 integrins in mouse chondrocytes. *European journal of cell biology* 89, 307–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.10.018>
- Grad, S., Loparic, M., Peter, R., Stolz, M., Aebi, U., Alini, M., 2012. Sliding motion modulates stiffness and friction coefficient at the surface of tissue engineered cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* 20, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.12.010>
- Gross, A.E., Kim, W., Las Heras, F., Backstein, D., Safir, O., Pritzker, K.P.H., 2008. Fresh Osteochondral Allografts for Posttraumatic Knee Defects: Long-term Followup. *Clin Orthop Relat Res* 466, 1863–1870. <https://doi.org/10.1007/s11999-008-0282-8>
- Gruber, B.L., Mienaltowski, M.J., MacLeod, J.N., Schittny, J., Kasper, S., Flück, M., 2020. Tenascin-C expression controls the maturation of articular cartilage in mice. *BMC Res Notes* 13, 78. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4906-8>
- Guilak, F., 2011. Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology, Musculoskeletal Science* 25, 815–823. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2011.11.013>
- Guilak, F., Jones, W.R., Ting-Beall, H.P., Lee, G.M., 1999. The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* 7, 59–70. <https://doi.org/10.1053/joca.1998.0162>
- Guilak, F., Ratcliffe, A., Mow, V.C., 1995. Chondrocyte deformation and local tissue strain in articular cartilage: a confocal microscopy study. *J. Orthop. Res.* 13, 410–421. <https://doi.org/10.1002/jor.1100130315>
- Gullotta, F., Izzo, D., Scalera, F., Palazzo, B., Martin, I., Sannino, A., Gervaso, F., 2018. Biomechanical evaluation of hMSCs-based engineered cartilage for chondral tissue regeneration. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 86, 294–304. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.06.040>
- Hall, A.C., Urban, J.P., Gehl, K.A., 1991. The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage. *J. Orthop. Res.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090102>
- Halonon, K.S., Mononen, M.E., Jurvelin, J.S., Töyräs, J., Korhonen, R.K., 2013. Importance of depth-wise distribution of collagen and proteoglycans in articular cartilage—A 3D finite element study of stresses and strains in human knee joint. *Journal of Biomechanics* 46, 1184–1192. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.12.025>
- Handorf, A.M., Li, W.-J., 2014. Induction of Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis Through Sequential Administration of Growth Factors Within Specific Temporal Windows. *Journal of Cellular Physiology* 229, 162–171. <https://doi.org/10.1002/jcp.24428>
- Haudenschild, A.K., Hsieh, A.H., Kapila, S., Lotz, J.C., 2009. Pressure and Distortion Regulate Human Mesenchymal Stem Cell Gene Expression. *Annals of biomedical engineering.*
- Haudenschild, D.R., Chen, J., Pang, N., Lotz, M.K., D’Lima, D.D., 2010. Rho Kinase-Dependent SOX9 Activation in Chondrocytes. *Arthritis Rheum* 62, 191–200. <https://doi.org/10.1002/art.25051>
- Heinemeier, K.M., Schjerling, P., Heinemeier, J., Møller, M.B., Krogsgaard, M.R., Grum-Schwensen, T., Petersen, M.M., Kjaer, M., 2016. Radiocarbon dating reveals minimal collagen turnover in both healthy and osteoarthritic human cartilage. *Science Translational Medicine* 8, 346ra90-346ra90. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad8335>
- Henak, C.R., Ross, K.A., Bonnevie, E.D., Fortier, L.A., Cohen, I., Kennedy, J.G., Bonassar, L.J., 2016. Human talar and femoral cartilage have distinct mechanical properties near the articular surface. *Journal of Biomechanics* 49, 3320–3327. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2016.08.016>
- Henrionnet, C., Wang, Y., Roeder, E., Gambier, N., Galois, L., Mainard, D., Bensoussan, D., Gillet, P., Pinzano, A., 2012. Effect of dynamic loading on MSCs chondrogenic differentiation in 3-D alginate culture. *Bio-Medical Materials and Engineering* 22, 209–218. <https://doi.org/10.3233/BME-2012-0710>

- Hodge, W.A., Fijan, R.S., Carlson, K.L., Burgess, R.G., Harris, W.H., Mann, R.W., 1986. Contact pressures in the human hip joint measured in vivo. *PNAS* 83, 2879–2883.
- Hoenig, E., Winkler, T., Mielke, G., Paetzold, H., Schuettler, D., Goepfert, C., Machens, H.-G., Morlock, M.M., Schilling, A.F., 2011. High Amplitude Direct Compressive Strain Enhances Mechanical Properties of Scaffold-Free Tissue-Engineered Cartilage. *Tissue Engineering Part A* 17, 1401–1411. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0395>
- Horner, C.B., Hirota, K., Liu, J., Maldonado, M., Hyle Park, B., Nam, J., 2016. Magnitude-dependent and inversely-related osteogenic/chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells under dynamic compressive strain. *J Tissue Eng Regen Med*. <https://doi.org/10.1002/term.2332>
- Hosseini, A., Van de Velde, S.K., Kozanek, M., Gill, T.J., Grodzinsky, A.J., Rubash, H.E., Li, G., 2010. In-vivo time-dependent articular cartilage contact behavior of the tibiofemoral joint. *Osteoarthritis and Cartilage* 18, 909–916. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2010.04.011>
- Hosseini, M.-S., Tafazzoli-Shadpour, M., Haghighipour, N., Aghdami, N., Goodarzi, A., 2015. The Synergistic Effects of Shear Stress and Cyclic Hydrostatic Pressure Modulate Chondrogenic Induction of Human Mesenchymal Stem Cells. *Int J Artif Organs* 38, 557–564. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000433>
- Hu, J.C., Athanasiou, K.A., 2006. The Effects of Intermittent Hydrostatic Pressure on Self-Assembled Articular Cartilage Constructs. *Tissue Engineering* 12, 1337–1344. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1337>
- Hu, J.C.Y., Athanasiou, K.A., 2003. Structure and Function of Articular Cartilage, in: An, Y.H., Martin, K.L. (Eds.), *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 73–95. [https://doi.org/10.1007/978-1-59259-417-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-417-7_4)
- Hu, M.-Y., Nukavarapu, S., 2019. 11 - Scaffolds for cartilage tissue engineering, in: Mozafari, M., Sefat, F., Atala, A. (Eds.), *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One*, Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Woodhead Publishing, pp. 211–244. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102563-5.00011-3>
- Huang, A.H., Baker, B.M., Ateshian, G.A., Mauck, R.L., 2012. Sliding contact loading enhances the tensile properties of mesenchymal stem cell-seeded hydrogels. *Eur Cell Mater* 24, 29–45.
- Huang, A.H., Farrell, M.J., Kim, M., Mauck, R.L., 2010a. Long-term dynamic loading improves the mechanical properties of chondrogenic mesenchymal stem cell-laden hydrogel. *Eur Cell Mater* 19, 72–85.
- Huang, A.H., Farrell, M.J., Mauck, R.L., 2010b. Mechanics and Mechanobiology of Mesenchymal Stem Cell-Based Engineered Cartilage. *J Biomech* 43, 128. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.018>
- Huang, B.J., Hu, J.C., Athanasiou, K.A., 2016. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. *Biomaterials* 98, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.04.018>
- Huang, C.-Y.C., Hagar, K.L., Frost, L.E., Sun, Y., Cheung, H.S., 2004. Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22, 313–323. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-3-313>
- Huang, C.-Y.C., Reuben, P.M., Cheung, H.S., 2005. Temporal Expression Patterns and Corresponding Protein Inductions of Early Responsive Genes in Rabbit Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Under Cyclic Compressive Loading. *STEM CELLS* 23, 1113–1121. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0202>
- Hudelmaier, M., Glaser, C., Hohe, J., Englmeier, K.-H., Reiser, M., Putz, R., Eckstein, F., 2001. Age-related changes in the morphology and deformational behavior of knee joint cartilage. *Arthritis & Rheumatism* 44, 2556–2561. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200111\)44:11<2556::AID-ART436>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200111)44:11<2556::AID-ART436>3.0.CO;2-U)
- Hui, T.Y., Cheung, K.M.C., Cheung, W.L., Chan, D., Chan, B.P., 2008. In vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen microspheres: Influence of cell seeding density and collagen concentration. *Biomaterials* 29, 3201–3212. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.001>
- Hunziker, E.B., Michel, M., Studer, D., 1997. Ultrastructure of adult human articular cartilage matrix after cryotechnical processing. *Microscopy Research and Technique* 37, 271–284. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19970515\)37:4<271::AID-JEMT3>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19970515)37:4<271::AID-JEMT3>3.0.CO;2-O)
- Huurne, M. ter, Schelbergen, R., Blattes, R., Blom, A., Munter, W. de, Grevers, L.C., Jeanson, J., Noël, D., Casteilla, L., Jorgensen, C., Berg, W. van den, Lent, P.L.E.M. van, 2012. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 64, 3604–3613. <https://doi.org/10.1002/art.34626>
- Ikegawa, N., Sasho, T., Yamaguchi, S., Saito, M., Akagi, R., Muramatsu, Y., Akatsu, Y., Fukawa, T., Nakagawa, K., Nakajima, A., Suzuki, T., Takahashi, K., 2016. Identification of genes required for the spontaneous repair of partial-thickness cartilage defects in immature rats. *Connective Tissue Research* 57, 190–199. <https://doi.org/10.3109/03008207.2015.1121250>
- Ikenoue, T., Trindade, M.C.D., Lee, M.S., Lin, E.Y., Schurman, D.J., Goodman, S.B., Smith, R.L., 2003. Mechanoregulation of human articular chondrocyte AGGrecan and type II collagen expression by

- intermittent hydrostatic pressure in vitro. *J. Orthop. Res.* 21, 110–116. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00091-8](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00091-8)
- Irianto, J., Ramaswamy, G., Serra, R., Knight, M.M., 2014. Depletion of chondrocyte primary cilia reduces the compressive modulus of articular cartilage. *Journal of Biomechanics* 47, 579–582. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.11.040>
- Ito, M.M., Kida, M.Y., 2000. Morphological and biochemical re-evaluation of the process of cavitation in the rat knee joint: cellular and cell strata alterations in the interzone. *Journal of Anatomy* 197, 659–679. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19740659.x>
- Jakobsen, R.B., Shahdadfar, A., Reinholt, F.P., Brinchmann, J.E., 2010. Chondrogenesis in a hyaluronic acid scaffold: comparison between chondrocytes and MSC from bone marrow and adipose tissue. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18, 1407–1416. <https://doi.org/10.1007/s00167-009-1017-4>
- Jensen, C.G., Poole, C.A., McGlashan, S.R., Marko, M., Issa, Z.I., Vujcich, K.V., Bowser, S.S., 2004. Ultrastructural, tomographic and confocal imaging of the chondrocyte primary cilium in situ. *Cell Biology International* 28, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2003.11.007>
- Jin, M., Emkey, G.R., Siparsky, P., Trippel, S.B., Grodzinsky, A.J., 2003. Combined effects of dynamic tissue shear deformation and insulin-like growth factor I on chondrocyte biosynthesis in cartilage explants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414, 223–231. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00195-4](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00195-4)
- Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., Yoo, J.U., 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research* 238, 265–272. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3858>
- Jones, G., Ding, C., Glisson, M., Hynes, K., Ma, D., Cicuttini, F., 2003. Knee Articular Cartilage Development in Children: A Longitudinal Study of the Effect of Sex, Growth, Body Composition, and Physical Activity. *Pediatr Res* 54, 230–236. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000072781.93856.E6>
- Jortikka, M.O., Inkinen, R.I., Tammi, M.I., Parkkinen, J.J., Haapala, J., Kiviranta, I., Helminen, H.J., Lammi, M.J., 1997. Immobilisation causes longlasting matrix changes both in the immobilised and contralateral joint cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* 56, 255–261.
- Julkunen, P., Harjula, T., Iivarinen, J., Marjanen, J., Seppänen, K., Närhi, T., Arokoski, J., Lammi, M.J., Brama, P.A., Jurvelin, J.S., Helminen, H.J., 2009. Biomechanical, biochemical and structural correlations in immature and mature rabbit articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 17, 1628–1638. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.07.002>
- Kadler, K., 2004. Matrix loading: assembly of extracellular matrix collagen fibrils during embryogenesis. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 72, 1–11. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20002>
- Kahn, J., Shwartz, Y., Blitz, E., Krief, S., Sharir, A., Breitel, D.A., Rattenbach, R., Relaix, F., Maire, P., Rountree, R.B., Kingsley, D.M., Zelzer, E., 2009. Muscle Contraction Is Necessary to Maintain Joint Progenitor Cell Fate. *Developmental Cell* 16, 734–743. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.04.013>
- Kanbe, K., Yang, X., Wei, L., Sun, C., Chen, Q., 2007. Pericellular Matrilins Regulate Activation of Chondrocytes by Cyclic Load-Induced Matrix Deformation. *Journal of Bone and Mineral Research* 22, 318–328. <https://doi.org/10.1359/jbmr.061104>
- Karlsson, C., Brantsing, C., Svensson, T., Brisby, H., Asp, J., Tallheden, T., Lindahl, A., 2007. Differentiation of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes: Analysis of chondrogenic potential and expression pattern of differentiation-related transcription factors. *Journal of Orthopaedic Research* 25, 152–163. <https://doi.org/10.1002/jor.20287>
- Ke, Y.-N., Yang, W.-X., 2014. Primary cilium: an elaborate structure that blocks cell division? *Gene* 547, 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.050>
- Kearney, E., Farrell, E., Prendergast, P., Campbell, V., 2010. Tensile Strain as a Regulator of Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis. *Annals of Biomedical Engineering* 38, 1767–1779. <https://doi.org/10.1007/s10439-010-9979-4>
- Kempson, G.E., Muir, H., Pollard, C., Tuke, M., 1973. The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 297, 456–472. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(73\)90093-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(73)90093-7)
- Khan, I.M., Redman, S.N., Williams, R., Dowthwaite, G.P., Oldfield, S.F., Archer, C.W., 2007. The Development of Synovial Joints, in: *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press, pp. 1–36. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(06\)79001-9](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)79001-9)
- Kim, M., Erickson, I.E., Huang, A.H., Garrity, S.T., Mauck, R.L., Steinberg, D.R., 2018. Donor Variation and Optimization of Human Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis in Hyaluronic Acid. *Tissue Engineering Part A* 24, 1693–1703. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2017.0520>

- Kimura, S., Shiota, K., 1996. Sequential changes of programmed cell death in developing fetal mouse limbs and its possible roles in limb morphogenesis. *Journal of Morphology* 229, 337–346. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4687\(199609\)229:3<337::AID-JMOR8>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4687(199609)229:3<337::AID-JMOR8>3.0.CO;2-V)
- Kirsch, T., von der Mark, K., 1990. Isolation of bovine type X collagen and immunolocalization in growth-plate cartilage. *Biochem. J.* 265, 453–459. <https://doi.org/10.1042/bj2650453>
- Klatt, A.R., Becker, A.-K.A., Neacsu, C.D., Paulsson, M., Wagener, R., 2011. The matrilins: Modulators of extracellular matrix assembly. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43, 320–330. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.12.010>
- Klein, T.J., Chaudhry, M., Bae, W.C., Sah, R.L., 2007. Depth-dependent biomechanical and biochemical properties of fetal, newborn, and tissue-engineered articular cartilage. *Journal of Biomechanics* 40, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2005.11.002>
- Knight, M.M., McGlashan, S.R., Garcia, M., Jensen, C.G., Poole, C.A., 2009. Articular chondrocytes express connexin 43 hemichannels and P2 receptors – a putative mechanoreceptor complex involving the primary cilium? *Journal of Anatomy* 214, 275–283. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.01021.x>
- Knight, M.M., Toyoda, T., Lee, D.A., Bader, D.L., 2006. Mechanical compression and hydrostatic pressure induce reversible changes in actin cytoskeletal organisation in chondrocytes in agarose. *Journal of Biomechanics* 39, 1547–1551. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2005.04.006>
- Kock, L.M., Malda, J., Dhert, W.J.A., Ito, K., Gawlitta, D., 2014. Flow-perfusion interferes with chondrogenic and hypertrophic matrix production by mesenchymal stem cells. *Journal of Biomechanics, Functional Tissue Engineering* 47, 2122–2129. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.11.006>
- Kock, L.M., Schulz, R.M., van Donkelaar, C.C., Thümmler, C.B., Bader, A., Ito, K., 2009. RGD-dependent integrins are mechanotransducers in dynamically compressed tissue-engineered cartilage constructs. *Journal of Biomechanics* 42, 2177–2182. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.05.039>
- Kon, E., Filardo, G., Roffi, A., Andriolo, L., Marcacci, M., 2012. New trends for knee cartilage regeneration: from cell-free scaffolds to mesenchymal stem cells. *Curr Rev Musculoskelet Med* 5, 236–243. <https://doi.org/10.1007/s12178-012-9135-x>
- Kon, E., Perdisa, F., Filardo, G., Andriolo, L., Tentoni, F., Marcacci, M., 2014. Biomaterials for osteochondral reconstruction. *Developing Insights in Cartilage Repair* 99–108. [https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5385-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5385-6_6)
- Koyama, E., Shibukawa, Y., Nagayama, M., Sugito, H., Young, B., Yuasa, T., Okabe, T., Ochiai, T., Kamiya, N., Rountree, R.B., Kingsley, D.M., Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M., Pacifici, M., 2008. A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis. *Developmental Biology* 316, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.01.012>
- Kreuz, P.C., Steinwachs, M.R., Erggelet, C., Krause, S.J., Konrad, G., Uhl, M., Südkamp, N., 2006. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis and Cartilage* 14, 1119–1125. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.05.003>
- Laasanen, M.S., Töyräs, J., Korhonen, R.K., Rieppo, J., Saarakkala, S., Nieminen, M.T., Hirvonen, J., Jurvelin, J.S., 2003. Biomechanical properties of knee articular cartilage. *Biorheology* 40, 133–140.
- Lane, J.M., Weiss, C., 1975. Review of articular cartilage collagen research. *Arthritis Rheum.* 18, 553–562.
- Larson, C.M., Kelley, S.S., Blackwood, A.D., Banes, A.J., Lee, G.M., 2002. Retention of the native chondrocyte pericellular matrix results in significantly improved matrix production. *Matrix Biol.* 21, 349–359.
- Larsson, T., Sommarin, Y., Paulsson, M., Antonsson, P., Hedbom, E., Wendel, M., Heinegård, D., 1991. Cartilage matrix proteins. A basic 36-kDa protein with a restricted distribution to cartilage and bone. *J. Biol. Chem.* 266, 20428–20433.
- Layman, D.L., Ross, R., 1973. The production and secretion of procollagen peptidase by human fibroblasts in culture. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 157, 451–456. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(73\)90661-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(73)90661-9)
- Lee, H.S., Millward-Sadler, S.J., Wright, M.O., Nuki, G., Salter, D.M., 2000. Integrin and Mechanosensitive Ion Channel-Dependent Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Proteins and  $\beta$ -Catenin in Human Articular Chondrocytes After Mechanical Stimulation. *Journal of Bone and Mineral Research* 15, 1501–1509. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.8.1501>
- Lee, J.K., Huwe, L.W., Paschos, N., Aryaei, A., Gegg, C.A., Hu, J.C., Athanasiou, K.A., 2017. Tension stimulation drives tissue formation in scaffold-free systems. *Nature Mater* 16, 864–873. <https://doi.org/10.1038/nmat4917>
- Lefebvre, V., Dvir-Ginzberg, M., 2017. SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage. *Connective Tissue Research* 58, 2–14. <https://doi.org/10.1080/03008207.2016.1183667>

- Lekanne Deprez, R.H., Fijnvandraat, A.C., Ruijter, J.M., Moorman, A.F.M., 2002. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analytical Biochemistry* 307, 63–69. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00021-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00021-0)
- Li, C., Wu, X., Tong, J., Yang, X., Zhao, J., Zheng, Q., Zhao, G., Ma, Z., 2015. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther* 6. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0066-5>
- Li, G., Wan, L., Kozanek, M., 2008. Determination of real-time in-vivo cartilage contact deformation in the ankle joint. *Journal of Biomechanics* 41, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2007.07.006>
- Li, Y.Y., Cheng, H.W., Cheung, K.M.C., Chan, D., Chan, B.P., 2014. Mesenchymal stem cell-collagen microspheres for articular cartilage repair: Cell density and differentiation status. *Acta Biomaterialia* 10, 1919–1929. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.01.002>
- Li, Z., Kupcsik, L., Yao, S.-J., Alini, M., Stoddart, M.J., 2010. Mechanical load modulates chondrogenesis of human mesenchymal stem cells through the TGF- $\beta$  pathway. *J Cell Mol Med* 14, 1338–1346. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00780.x>
- Li, Z., Yao, S.-J., Alini, M., Stoddart, M.J., 2009. 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 Engineering Part A* 16, 575–584. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0262>
- Likhitpanichkul, M., Guo, X.E., Mow, V., 2005. The effect of matrix tension-compression nonlinearity and fixed negative charges on chondrocyte responses in cartilage. *Molecular & cellular biomechanics : MCB* 2, 191–204. <https://doi.org/10.3970/MCB.2005.002.191>
- Lin, A.C., Seeto, B.L., Bartoszko, J.M., Khoury, M.A., Whetstone, H., Ho, L., Hsu, C., Ali, S.A., Alman, B.A., 2009. Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nature Medicine* 15, 1421–1425. <https://doi.org/10.1038/nm.2055>
- Liu, Q., Hu, X., Zhang, X., Duan, X., Yang, P., Zhao, F., Ao, Y., 2016. Effects of mechanical stress on chondrocyte phenotype and chondrocyte extracellular matrix expression. *Sci Rep* 6. <https://doi.org/10.1038/srep37268>
- Liu, Y., Buckley, C.T., Mulhall, K.J., Kelly, D.J., 2013. Combining BMP-6, TGF- $\beta$ 3 and hydrostatic pressure stimulation enhances the functional development of cartilage tissues engineered using human infrapatellar fat pad derived stem cells. *Biomater. Sci.* 1, 745–752. <https://doi.org/10.1039/C3BM60056D>
- Liu, Y.W., Tran, M.D., Skalski, M.R., Patel, D.B., White, E.A., Tomasian, A., Gross, J.S., Vangsness, C.T., Matcuk, G.R., 2019. MR imaging of cartilage repair surgery of the knee. *Clinical Imaging* 58, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.clinimag.2019.07.004>
- Loeser, R.F., 2014. Integrins and chondrocyte–matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biology* 39, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.08.007>
- Loeser, R.F., Jr., 2004. Aging Cartilage and Osteoarthritis--What's the Link? *Sci. Aging Knowl. Environ.* 2004, pe31. <https://doi.org/10.1126/sageke.2004.29.pe31>
- Louw, T.M., Budhiraja, G., Viljoen, H.J., Subramanian, A., 2013. Mechanotransduction of Ultrasound is Frequency Dependent Below the Cavitation Threshold. *Ultrasound Med Biol* 39, 1303–1319. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2013.01.015>
- Lu, J., Fan, Y., Gong, X., Zhou, X., Yi, C., Zhang, Y., Pan, J., 2016. The Lineage Specification of Mesenchymal Stem Cells Is Directed by the Rate of Fluid Shear Stress. *J. Cell. Physiol.* 231, 1752–1760. <https://doi.org/10.1002/jcp.25278>
- Luo, L., Eswaramoorthy, R., Mulhall, K.J., Kelly, D.J., 2016. Decellularization of porcine articular cartilage explants and their subsequent repopulation with human chondroprogenitor cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 55, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.10.002>
- Mackay, A.M., Beck, S.C., Murphy, J.M., Barry, F.P., Chichester, C.O., Pittenger, M.F., 1998. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 4, 415–428. <https://doi.org/10.1089/ten.1998.4.415>
- Maeda, S., Fujitomo, T., Okabe, T., Wakitani, S., Takagi, M., 2011. Shrinkage-free preparation of scaffold-free cartilage-like disk-shaped cell sheet using human bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111, 489–492. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.11.022>
- Maehara, H., Sotome, S., Yoshii, T., Torigoe, I., Kawasaki, Y., Sugata, Y., Yuasa, M., Hirano, M., Mochizuki, N., Kikuchi, M., Shinomiya, K., Okawa, A., 2010. Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *Journal of Orthopaedic Research* 28, 677–686. <https://doi.org/10.1002/jor.21032>

- Magne, D., Vinatier, C., Julien, M., Weiss, P., Guicheux, J., 2005. Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. *Trends in Molecular Medicine* 11, 519–526. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.09.002>
- Mahmood, T., Yang, P.-C., 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci* 4, 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Mahmoodian, R., Leasure, J., Philip, P., Pleshko, N., Capaldi, F., Siegler, S., 2011. Changes in mechanics and composition of human talar cartilage anlagen during fetal development. *Osteoarthritis and Cartilage* 19, 1199–1209. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.07.013>
- Mainil-Varlet, P., Van Damme, B., Nestic, D., Knutsen, G., Kandel, R., Roberts, S., 2010. A New Histology Scoring System for the Assessment of the Quality of Human Cartilage Repair: ICRS II. *Am J Sports Med* 38, 880–890. <https://doi.org/10.1177/0363546509359068>
- Makihira, S., Yan, W., Ohno, S., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Okimura, A., Yoshida, E., Noshiro, M., Hamada, T., Kato, Y., 1999. Enhancement of Cell Adhesion and Spreading by a Cartilage-specific Noncollagenous Protein, Cartilage Matrix Protein (CMP/Matrilin-1), via Integrin  $\alpha 1\beta 1$ . *J. Biol. Chem.* 274, 11417–11423. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.16.11417>
- Mallick, S.P., Singh, B.N., Rastogi, A., Srivastava, P., 2018. Design and evaluation of chitosan/poly(l-lactide)/pectin based composite scaffolds for cartilage tissue regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules* 112, 909–920. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.049>
- Markway, B.D., Tan, G.-K., Brooke, G., Hudson, J.E., Cooper-White, J.J., Doran, M.R., 2010. Enhanced Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Low Oxygen Environment Micropellet Cultures. *Cell Transplant* 19, 29–42. <https://doi.org/10.3727/096368909X478560>
- Maroudas, A., Bayliss, M.T., Uchitel-Kaushansky, N., Schneiderman, R., Gilav, E., 1998. AGGrecan Turnover in Human Articular Cartilage: Use of Aspartic Acid Racemization as a Marker of Molecular Age. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 350, 61–71. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0492>
- Marsano, A., Wendt, D., Raiteri, R., Gottardi, R., Stolz, M., Wirz, D., Daniels, A.U., Salter, D., Jakob, M., Quinn, T.M., Martin, I., 2006. Use of hydrodynamic forces to engineer cartilaginous tissues resembling the non-uniform structure and function of meniscus. *Biomaterials* 27, 5927–5934. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.020>
- Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J.-P., Roughley, P.J., 2008. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22, 351–384. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2008.02.001>
- Martínez-Moreno, D., Jiménez, G., Gálvez-Martín, P., Rus, G., Marchal, J.A., 2019. Cartilage biomechanics: A key factor for osteoarthritis regenerative medicine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1865, 1067–1075. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.03.011>
- Martins, R.P., Finan, J.D., Farshid, G., Lee, D.A., 2012. Mechanical Regulation of Nuclear Structure and Function. *Annual Review of Biomedical Engineering* 14, 431–455. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124638>
- Matsuoka, M., Onodera, T., Sasazawa, F., Momma, D., Baba, R., Hontani, K., Iwasaki, N., 2015. An Articular Cartilage Repair Model in Common C57Bl/6 Mice. *Tissue Engineering Part C: Methods* 21, 767–772. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2014.0440>
- Mauck, R.L., Byers, B.A., Yuan, X., Tuan, R.S., 2007. Regulation of cartilaginous ECM gene transcription by chondrocytes and MSCs in 3D culture in response to dynamic loading. *Biomech Model Mechanobiol* 6, 113–125. <https://doi.org/10.1007/s10237-006-0042-1>
- Mauck, R.L., Nicoll, S.B., Seyhan, S.L., Ateshian, G.A., Hung, C.T., 2003. Synergistic Action of Growth Factors and Dynamic Loading for Articular Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering* 9, 597–611. <https://doi.org/10.1089/107632703768247304>
- Mauck, R.L., Soltz, M.A., Wang, C.C.B., Wong, D.D., Chao, P.-H.G., Valhmu, W.B., Hung, C.T., Ateshian, G.A., 2000. Functional Tissue Engineering of Articular Cartilage Through Dynamic Loading of Chondrocyte-Seeded Agarose Gels. *J Biomech Eng* 122, 252–260. <https://doi.org/10.1115/1.429656>
- Mauck, R.L., Yuan, X., Tuan, R.S., 2006. Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture. *Osteoarthritis and Cartilage* 14, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.09.002>
- Maumus, M., Guérit, D., Toupet, K., Jorgensen, C., Noël, D., 2011. Mesenchymal stem cell-based therapies in regenerative medicine: applications in rheumatology. *Stem Cell Res Ther* 2, 14. <https://doi.org/10.1186/scrt55>
- McAlinden, A., 2014. Alternative Splicing of Type II Procollagen: IIB or not IIB? *Connect Tissue Res* 55, 165–176. <https://doi.org/10.3109/03008207.2014.908860>

- McGlashan, S.R., Cluett, E.C., Jensen, C.G., Poole, C.A., 2008. Primary cilia in osteoarthritic chondrocytes: From chondrons to clusters. *Developmental Dynamics* 237, 2013–2020. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21501>
- McGlashan, S.R., Jensen, C.G., Poole, C.A., 2006. Localization of Extracellular Matrix Receptors on the Chondrocyte Primary Cilium. *J Histochem Cytochem.* 54, 1005–1014. <https://doi.org/10.1369/jhc.5A6866.2006>
- McGlashan, S.R., Knight, M.M., Chowdhury, T.T., Joshi, P., Jensen, C.G., Kennedy, S., Poole, C.A., 2010. Mechanical loading modulates chondrocyte primary cilia incidence and length. *Cell Biology International* 34, 441–446. <https://doi.org/10.1042/CBI20090094>
- McLeod, M.A., Wilusz, R.E., Guilak, F., 2013. Depth-Dependent Anisotropy of the Micromechanical Properties of the Extracellular and Pericellular Matrices of Articular Cartilage Evaluated via Atomic Force Microscopy. *J Biomech* 46, 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.09.003>
- McMahon, L., Reid, A., Campbell, V., Prendergast, P., 2008. Regulatory Effects of Mechanical Strain on the Chondrogenic Differentiation of MSCs in a Collagen-GAG Scaffold: Experimental and Computational Analysis. *Annals of Biomedical Engineering* 36, 185–194. <https://doi.org/10.1007/s10439-007-9416-5>
- McMahon, L.A., Campbell, V.A., Prendergast, P.J., 2008. Involvement of stretch-activated ion channels in strain-regulated glycosaminoglycan synthesis in mesenchymal stem cell-seeded 3D scaffolds. *Journal of Biomechanics* 41, 2055–2059. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.03.027>
- McMurray, R.J., Wann, A.K.T., Thompson, C.L., Connelly, J.T., Knight, M.M., 2013. Surface topography regulates wnt signaling through control of primary cilia structure in mesenchymal stem cells. *Scientific Reports* 3, 3545. <https://doi.org/10.1038/srep03545>
- Meinert, C., Schrobback, K., Hutmacher, D.W., Klein, T.J., 2017. A novel bioreactor system for biaxial mechanical loading enhances the properties of tissue-engineered human cartilage. *Sci Rep* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16523-x>
- Meyer, E.G., Buckley, C.T., Steward, A.J., Kelly, D.J., 2011. The effect of cyclic hydrostatic pressure on the functional development of cartilaginous tissues engineered using bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 4, 1257–1265. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.04.012>
- Michalopoulos, E., Knight, R.L., Korossis, S., Kearney, J.N., Fisher, J., Ingham, E., 2012. Development of methods for studying the differentiation of human mesenchymal stem cells under cyclic compressive strain. *Tissue Eng Part C Methods* 18, 252–262. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2011.0347>
- Mienaltowski, M.J., Huang, L., Frisbie, D.D., McIlwraith, C.W., Stromberg, A.J., Bathke, A.C., MacLeod, J.N., 2009. Transcriptional profiling differences for articular cartilage and repair tissue in equine joint surface lesions. *BMC Medical Genomics* 2, 60. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-2-60>
- Millward-Sadler, S.J., Salter, D.M., 2004. Integrin-Dependent Signal Cascades in Chondrocyte Mechanotransduction. *Annals of Biomedical Engineering* 32, 435–446. <https://doi.org/10.1023/B:ABME.0000017538.72511.48>
- Millward-Sadler, S.J., Wright, M.O., Lee, H.-S., Nishida, K., Caldwell, H., Nuki, G., Salter, D.M., 1999. Integrin-regulated Secretion of Interleukin 4: A Novel Pathway of Mechanotransduction in Human Articular Chondrocytes. *J Cell Biol* 145, 183–189. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.1.183>
- Miramini, S., Fegan, K.L., Green, N.C., Espino, D.M., Zhang, L., Thomas-Seale, L.E.J., 2020. The status and challenges of replicating the mechanical properties of connective tissues using additive manufacturing. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 103, 103544. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.103544>
- Mishima, Y., Lotz, M., 2008. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* 26, 1407–1412. <https://doi.org/10.1002/jor.20668>
- Miyamishi, K., Trindade, M.C.D., Lindsey, D.P., Beaupré, G.S., Carter, D.R., Goodman, S.B., Schurman, D.J., Smith, R.L., 2006a. Effects of hydrostatic pressure and transforming growth factor-beta 3 on adult human mesenchymal stem cell chondrogenesis in vitro. *Tissue Eng.* 12, 1419–1428. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1419>
- Miyamishi, K., Trindade, M.C.D., Lindsey, D.P., Beaupré, G.S., Carter, D.R., Goodman, S.B., Schurman, D.J., Smith, R.L., 2006b. Dose- and time-dependent effects of cyclic hydrostatic pressure on transforming growth factor-beta3-induced chondrogenesis by adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Tissue Eng.* 12, 2253–2262. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2253>
- Mizuno, S., Tateishi, T., Ushida, T., Glowacki, J., 2002. Hydrostatic fluid pressure enhances matrix synthesis and accumulation by bovine chondrocytes in three-dimensional culture. *Journal of Cellular Physiology* 193, 319–327. <https://doi.org/10.1002/jcp.10180>

- Mobasheri, A., Lewis, R., Maxwell, J.E.J., Hill, C., Womack, M., Barrett-Jolley, R., 2010. Characterization of a stretch-activated potassium channel in chondrocytes. *Journal of Cellular Physiology* 223, 511–518. <https://doi.org/10.1002/jcp.22075>
- Mollenhauer, J., Bee, J.A., Lizarbe, M.A., von der Mark, K., 1984. Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. *J Cell Biol* 98, 1572–1579. <https://doi.org/10.1083/jcb.98.4.1572>
- Morille, M., Venier-Julienne, M.-C., Montero-Menei, C., 2015. Scaffolds for controlled release of cartilage growth factors. *Methods in Molecular Biology* 1340, 171–180. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2938-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2938-2_12)
- Moseley, J.B., Anderson, A.F., Browne, J.E., Mandelbaum, B.R., Micheli, L.J., Fu, F., Erggelet, C., 2010. Long-Term Durability of Autologous Chondrocyte Implantation: A Multicenter, Observational Study in US Patients. *Am J Sports Med* 38, 238–246. <https://doi.org/10.1177/0363546509348000>
- Mouw, J.K., Connelly, J.T., Wilson, C.G., Michael, K.E., Levenston, M.E., 2007. Dynamic Compression Regulates the Expression and Synthesis of Chondrocyte-Specific Matrix Molecules in Bone Marrow Stromal Cells. *STEM CELLS* 25, 655–663. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0435>
- Mueller, M.B., Fischer, M., Zellner, J., Berner, A., Dienstknecht, T., Prantl, L., Kujat, R., Nerlich, M., Tuan, R.S., Angele, P., 2010. Hypertrophy in Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis: Effect of TGF- $\beta$  Isoforms and Chondrogenic Conditioning. *CTO* 192, 158–166. <https://doi.org/10.1159/000313399>
- Müller, F.J., Setton, L.A., Manicourt, D.H., Mow, V.C., Howell, D.S., Pita, J.C., 1994. Centrifugal and biochemical comparison of proteoglycan AGGREGATES from articular cartilage in experimental joint disuse and joint instability. *J. Orthop. Res.* 12, 498–508. <https://doi.org/10.1002/jor.1100120406>
- Murdoch, A.D., Grady, L.M., Ablett, M.P., Katopodi, T., Meadows, R.S., Hardingham, T.E., 2007. Chondrogenic differentiation of human bone marrow stem cells in transwell cultures: generation of scaffold-free cartilage. *Stem Cells* 25, 2786–2796. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0374>
- Murphy, M.K., Huey, D.J., Hu, J.C., Athanasiou, K.A., 2015. TGF- $\beta$ 1, GDF-5, and BMP-2 Stimulation Induces Chondrogenesis in Expanded Human Articular Chondrocytes and Marrow-Derived Stromal Cells. *STEM CELLS* 33, 762–773. <https://doi.org/10.1002/stem.1890>
- Mwale, F., Stachura, D., Roughley, P., Antoniou, J., 2006. Limitations of using AGGREGAN and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. *Journal of Orthopaedic Research* 24, 1791–1798. <https://doi.org/10.1002/jor.20200>
- Narmoneva, D.A., Wang, J.Y., Setton, L.A., 1999. Nonuniform swelling-induced residual strains in articular cartilage. *Journal of Biomechanics* 32, 401–408. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(98\)00184-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(98)00184-5)
- Navarro-Sarabia, F., Coronel, P., Collantes, E., Navarro, F.J., Serna, A.R. de la, Naranjo, A., Gimeno, M., Herrero-Beaumont, G., 2011. A 40-month multicentre, randomised placebo-controlled study to assess the efficacy and carry-over effect of repeated intra-articular injections of hyaluronic acid in knee osteoarthritis: the AMELIA project. *Annals of the Rheumatic Diseases* 70, 1957–1962. <https://doi.org/10.1136/ard.2011.152017>
- Neumann, A.J., Alini, M., Archer, C.W., Stoddart, M.J., 2013. Chondrogenesis of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Is Modulated by Complex Mechanical Stimulation and Adenoviral-Mediated Overexpression of Bone Morphogenetic Protein 2. *Tissue Engineering Part A* 19, 1285–1294. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0411>
- Neumann, A.J., Gardner, O.F.W., Williams, R., Alini, M., Archer, C.W., Stoddart, M.J., 2015. Human Articular Cartilage Progenitor Cells Are Responsive to Mechanical Stimulation and Adenoviral-Mediated Overexpression of Bone-Morphogenetic Protein 2. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136229>
- Nguyen, L.H., Kudva, A.K., Guckert, N.L., Linse, K.D., Roy, K., 2011. Unique biomaterial compositions direct bone marrow stem cells into specific chondrocytic phenotypes corresponding to the various zones of articular cartilage. *Biomaterials* 32, 1327–1338. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.10.009>
- Niemeyer, P., Salzmann, G., Feucht, M., Pestka, J., Porichis, S., Ogon, P., Südkamp, N., Schmal, H., 2014. First-generation versus second-generation autologous chondrocyte implantation for treatment of cartilage defects of the knee: a matched-pair analysis on long-term clinical outcome. *International Orthopaedics (SICOT)* 38, 2065–2070. <https://doi.org/10.1007/s00264-014-2368-0>
- Nilsson, J., Thorstensson, A., 1987. Adaptability in frequency and amplitude of leg movements during human locomotion at different speeds. *Acta Physiologica Scandinavica* 129, 107–114. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1987.tb08045.x>
- Ning, B., Wang, P., Pei, X., Kang, Y., Song, J., Wang, D., Zhang, W., Ma, R., 2012. Dual function of  $\beta$ -catenin in articular cartilage growth and degeneration at different stages of postnatal cartilage development. *International Orthopaedics (SICOT)* 36, 655–664. <https://doi.org/10.1007/s00264-011-1315-6>

- Niu, Q., Li, F., Zhang, L., Xu, X., Liu, Y., Gao, J., Feng, X., 2016. Role of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in the response of chondrocytes to mechanical loading. *International Journal of Molecular Medicine* 37, 755–762. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2463>
- O’Conor, C.J., Leddy, H.A., Benefield, H.C., Liedtke, W.B., Guilak, F., 2014. TRPV4-mediated mechanotransduction regulates the metabolic response of chondrocytes to dynamic loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 1316–1321. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319569111>
- Ofek, G., Revell, C.M., Hu, J.C., Allison, D.D., Grande-Allen, K.J., Athanasiou, K.A., 2008. Matrix Development in Self-Assembly of Articular Cartilage. *PLOS ONE* 3, e2795. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002795>
- Ogawa, R., Mizuno, S., Murphy, G.F., Orgill, D.P., 2009. The Effect of Hydrostatic Pressure on Three-Dimensional Chondroinduction of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Engineering Part A* 15, 2937–2945. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0672>
- Olivares-Navarrete, R., Lee, E.M., Smith, K., Hyzy, S.L., Doroudi, M., Williams, J.K., Gall, K., Boyan, B.D., Schwartz, Z., 2017. Substrate Stiffness Controls Osteoblastic and Chondrocytic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells without Exogenous Stimuli. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170312>
- Ouwerx, C., Velings, N., Mestdagh, M.M., Axelos, M.A.V., 1998. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks* 6, 393–408. [https://doi.org/10.1016/S0966-7822\(98\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0966-7822(98)00035-5)
- Öztürk, E., Despot-Slade, E., Pichler, M., Zenobi-Wong, M., 2017. RhoA activation and nuclearization marks loss of chondrocyte phenotype in crosstalk with Wnt pathway. *Experimental Cell Research* 360, 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.08.033>
- Pacifici, M., Iwamoto, M., Golden, E.B., Leatherman, J.L., Lee, Y.-S., Chuong, C.-M., 1993. Tenascin is associated with articular cartilage development. *Dev. Dyn.* 198, 123–134. <https://doi.org/10.1002/aja.1001980206>
- Panadero, J.A., Lanceros-Mendez, S., Ribelles, J.L.G., 2016. Differentiation of mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering: Individual and synergetic effects of three-dimensional environment and mechanical loading. *Acta Biomaterialia* 33, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.01.037>
- Parate, D., Franco-Obregón, A., Fröhlich, J., Beyer, C., Abbas, A.A., Kamarul, T., Hui, J.H.P., Yang, Z., 2017. Enhancement of mesenchymal stem cell chondrogenesis with short-term low intensity pulsed electromagnetic fields. *Sci Rep* 7, 9421. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09892-w>
- Park, M.S., Kim, Y.H., Jung, Y., Kim, S.H., Park, J.C., Yoon, D.S., Kim, S.-H., Lee, J.W., 2015. In Situ Recruitment of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Using Chemokines for Articular Cartilage Regeneration. *Cell Transplant* 24, 1067–1083. <https://doi.org/10.3727/096368914X681018>
- Parkkinen, J.J., Ikonen, J., Lammi, M.J., Laakkonen, J., Tammi, M., Helminen, H.J., 1993a. Effects of cyclic hydrostatic pressure on proteoglycan synthesis in cultured chondrocytes and articular cartilage explants. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 458–465. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1062>
- Parkkinen, J.J., Lammi, M.J., Inkinen, R., Jortikka, M., Tammi, M., Virtanen, I., Helminen, H.J., 1995. Influence of short-term hydrostatic pressure on organization of stress fibers in cultured chondrocytes. *J. Orthop. Res.* 13, 495–502. <https://doi.org/10.1002/jor.1100130404>
- Parkkinen, J.J., Lammi, M.J., Pelttari, A., Helminen, H.J., Tammi, M., Virtanen, I., 1993b. Altered Golgi apparatus in hydrostatically loaded articular cartilage chondrocytes. *Ann. Rheum. Dis.* 52, 192–198.
- Pelaez, D., Charles Huang, C.-Y., Cheung, H.S., 2008. Cyclic Compression Maintains Viability and Induces Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells in Fibrin Gel Scaffolds. *Stem Cells and Development* 18, 93–102. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0030>
- Pelttari, K., Winter, A., Steck, E., Goetzke, K., Hennig, T., Ochs, B.G., Aigner, T., Richter, W., 2006. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum.* 54, 3254–3266. <https://doi.org/10.1002/art.22136>
- Phan, M.N., Leddy, H.A., Votta, B.J., Kumar, S., Levy, D.S., Lipshutz, D.B., Lee, S., Liedtke, W., Guilak, F., 2009. Functional Characterization of TRPV4 As an Osmotically Sensitive Ion Channel in Articular Chondrocytes. *Arthritis Rheum* 60, 3028–3037. <https://doi.org/10.1002/art.24799>
- Pitaval, A., Tseng, Q., Bornens, M., Théry, M., 2010. Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells. *The Journal of Cell Biology* 191, 303–312. <https://doi.org/10.1083/jcb.201004003>
- Raimondi, M.T., Boschetti, F., Falcone, L., Migliavacca, F., Remuzzi, A., Dubini, G., 2004. The effect of media perfusion on three-dimensional cultures of human chondrocytes: Integration of experimental and computational approaches. *Biorheology* 41, 401–410.
- Ramachandran, M., Achan, P., Salter, D.M., Bader, D.L., Chowdhury, T.T., 2011. Biomechanical signals and the C-type natriuretic peptide counteract catabolic activities induced by IL-1 $\beta$  in chondrocyte/agarose constructs. *Arthritis Res Ther* 13, R145. <https://doi.org/10.1186/ar3459>

- Ray, A., Singh, P.N.P., Sohaskey, M.L., Harland, R.M., Bandyopadhyay, A., 2015. Precise spatial restriction of BMP signaling is essential for articular cartilage differentiation. *Development* 142, 1169–1179. <https://doi.org/10.1242/dev.110940>
- Ren, X., Wang, F., Chen, C., Gong, X., Yin, L., Yang, L., 2016. Engineering zonal cartilage through bioprinting collagen type II hydrogel constructs with biomimetic chondrocyte density gradient. *BMC Musculoskeletal Disord* 17, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1130-8>
- Rocio Servin-Vences, M., Moroni, M., Lewin, G.R., Poole, K., 2017. Direct measurement of TRPV4 and PIEZO1 activity reveals multiple mechanotransduction pathways in chondrocytes. *eLife* 6, e21074. <https://doi.org/10.7554/eLife.21074>
- Rolfe, R.A., Nowlan, N.C., Kenny, E.M., Cormican, P., Morris, D.W., Prendergast, P.J., Kelly, D., Murphy, P., 2014. Identification of mechanosensitive genes during skeletal development: alteration of genes associated with cytoskeletal rearrangement and cell signalling pathways. *BMC Genomics* 15, 48. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-48>
- Roughley, P.J., 2006. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater* 12, 92–101. <https://doi.org/10.22203/ecm.v012a11>
- Rountree, R.B., Schoor, M., Chen, H., Marks, M.E., Harley, V., Mishina, Y., Kingsley, D.M., 2004. BMP Receptor Signaling Is Required for Postnatal Maintenance of Articular Cartilage. *PLoS Biol* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020355>
- Rowland, C.R., Colucci, L.A., Guilak, F., 2016. Fabrication of anatomically-shaped cartilage constructs using decellularized cartilage-derived matrix scaffolds. *Biomaterials* 91, 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.012>
- Ruhlen, R., Marberry, K., 2014. The chondrocyte primary cilium. *Osteoarthritis and Cartilage* 22, 1071–1076. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.05.011>
- Safshekan, F., Tafazzoli-Shadpour, M., Shokrgozar, M.A., Haghighipour, N., Mahdian, R., Hemmati, A., 2012. Intermittent hydrostatic pressure enhances growth factor-induced chondroinduction of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Artif Organs* 36, 1065–1071. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2012.01507.x>
- Sah, R.L., Kim, Y.J., Doong, J.Y., Grodzinsky, A.J., Plaas, A.H., Sandy, J.D., 1989. Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. *J. Orthop. Res.* 7, 619–636. <https://doi.org/10.1002/jor.1100070502>
- Salter, D.M., Millward-Sadler, S.J., Nuki, G., Wright, M.O., 2001. Integrin-Interleukin-4 Mechanotransduction Pathways in Human Chondrocytes. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 391, S49.
- Sato, M., Yamato, M., Hamahashi, K., Okano, T., Mochida, J., 2014. Articular Cartilage Regeneration Using Cell Sheet Technology. *The Anatomical Record* 297, 36–43. <https://doi.org/10.1002/ar.22829>
- Schätti, O., Grad, S., Goldhahn, J., Salzmann, G., Li, Z., Alini, M., Stoddart, M.J., 2011. A combination of shear and dynamic compression leads to mechanically induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 22, 214–225. <https://doi.org/10.22203/ecm.v022a17>
- Schmid, T.M., Linsenmayer, T.F., 1990. Immunoelectron microscopy of type X collagen: supramolecular forms within embryonic chick cartilage. *Dev. Biol.* 138, 53–62. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(90\)90176-j](https://doi.org/10.1016/0012-1606(90)90176-j)
- Schmidt, M.B., Mow, V.C., Chun, L.E., Eyre, D.R., 1990. Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* 8, 353–363. <https://doi.org/10.1002/jor.1100080307>
- Sekiya, I., Larson, B.L., Vuoristo, J.T., Reger, R.L., Prockop, D.J., 2005. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 320, 269–276. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1075-3>
- Selmi, T. a. S., Verdonk, P., Chambat, P., Dubrana, F., Potel, J.-F., Barnouin, L., Neyret, P., 2008. Autologous chondrocyte implantation in a novel alginate-agarose hydrogel. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume* 90–B, 597–604. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.90B5.20360>
- Shea, C.A., Rolfe, R.A., Murphy, P., 2015. The importance of foetal movement for co-ordinated cartilage and bone development in utero : clinical consequences and potential for therapy. *Bone Joint Res* 4, 105–116. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.47.2000387>
- Shive, M.S., Stanish, W.D., McCormack, R., Forriol, F., Mohtadi, N., Pelet, S., Desnoyers, J., Méthot, S., Vehik, K., Restrepo, A., 2015. BST-CarGel® Treatment Maintains Cartilage Repair Superiority over Microfracture at 5 Years in a Multicenter Randomized Controlled Trial. *Cartilage* 6, 62–72. <https://doi.org/10.1177/1947603514562064>
- Shwartz, Y., Viukov, S., Krief, S., Zelzer, E., 2016. Joint Development Involves a Continuous Influx of GDF5-Positive Cells. *Cell Reports* 15, 2577–2587. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.055>

- Smith, R.L., Lin, J., Trindade, M.C., Shida, J., Kajiyama, G., Vu, T., Hoffman, A.R., van der Meulen, M.C., Goodman, S.B., Schurman, D.J., Carter, D.R., 2000. Time-dependent effects of intermittent hydrostatic pressure on articular chondrocyte type II collagen and AGGrecan mRNA expression. *J Rehabil Res Dev* 37, 153–161.
- Smith, R.L., Rusk, S.F., Ellison, B.E., Wessells, P., Tsuchiya, K., Carter, D.R., Caler, W.E., Sandell, L.J., Schurman, D.J., 1996. In vitro stimulation of articular chondrocyte mRNA and extracellular matrix synthesis by hydrostatic pressure. *J. Orthop. Res.* 14, 53–60. <https://doi.org/10.1002/jor.1100140110>
- Sofu, H., Kockara, N., Oner, A., Camurcu, Y., Issin, A., Sahin, V., 2017. Results of Hyaluronic Acid–Based Cell-Free Scaffold Application in Combination With Microfracture for the Treatment of Osteochondral Lesions of the Knee: 2-Year Comparative Study. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 33, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2016.06.035>
- Sophia Fox, A.J., Bedi, A., Rodeo, S.A., 2009. The Basic Science of Articular Cartilage. *Sports Health* 1, 461–468. <https://doi.org/10.1177/1941738109350438>
- Spasic, M., Jacobs, C.R., 2017. Primary cilia: Cell and molecular mechanosensors directing whole tissue function. *Seminars in Cell & Developmental Biology, Mechanosensing: from molecules to tissues* 71, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.08.036>
- Steward, A.J., Kelly, D.J., 2015. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J. Anat.* 227, 717–731. <https://doi.org/10.1111/joa.12243>
- Steward, A.J., Wagner, D.R., Kelly, D.J., 2014. Exploring the roles of integrin binding and cytoskeletal reorganization during mesenchymal stem cell mechanotransduction in soft and stiff hydrogels subjected to dynamic compression. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 38, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.07.020>
- Steward, A.J., Wagner, D.R., Kelly, D.J., 2013. The pericellular environment regulates cytoskeletal development and the differentiation of mesenchymal stem cells and determines their response to hydrostatic pressure. *Eur Cell Mater* 25, 167–178.
- Stewart, M.C., Saunders, K.M., Burton-Wurster, N., Macleod, J.N., 2000. Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation. *J. Bone Miner. Res.* 15, 166–174. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.1.166>
- Storm, E.E., Kingsley, D.M., 1996. Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* 122, 3969–3979.
- Strzelecka-Kiliszek, A., Mebarek, S., Roszkowska, M., Buchet, R., Magne, D., Pikula, S., 2017. Functions of Rho family of small GTPases and Rho-associated coiled-coil kinases in bone cells during differentiation and mineralization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1861, 1009–1023. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.02.005>
- Sutherland, A.J., Converse, G.L., Hopkins, R.A., Detamore, M.S., 2015. The Bioactivity of Cartilage Extracellular Matrix in Articular Cartilage Regeneration. *Advanced Healthcare Materials* 4, 29–39. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400165>
- Suzue, T., 1996. Movements of mouse fetuses in early stages of neural development studied in vitro. *Neuroscience Letters* 218, 131–134. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(96\)13141-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(96)13141-4)
- Takahashi, I., Nuckolls, G.H., Takahashi, K., Tanaka, O., Semba, I., Dashner, R., Shum, L., Slavkin, H.C., 1998. Compressive force promotes SOX9, type II collagen and AGGrecan and inhibits IL-1 $\beta$  expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells. *J. Cell. Sci.* 111 ( Pt 14), 2067–2076.
- Tanaka, Y., Yamaoka, H., Nishizawa, S., Nagata, S., Ogasawara, T., Asawa, Y., Fujihara, Y., Takato, T., Hoshi, K., 2010. The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte/atelocollagen based tissue-engineered cartilage. *Biomaterials* 31, 4506–4516. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.028>
- Tang, X., Muhammad, H., McLean, C., Miotla-Zarebska, J., Fleming, J., Didangelos, A., Önnarfjord, P., Leask, A., Saklatvala, J., Vincent, T.L., 2018. Connective tissue growth factor contributes to joint homeostasis and osteoarthritis severity by controlling the matrix sequestration and activation of latent TGF $\beta$ . *Annals of the Rheumatic Diseases* 77, 1372–1380. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-212964>
- Tani, G., Usui, N., Kamiyama, M., Oue, T., Fukuzawa, M., 2010. In vitro construction of scaffold-free cylindrical cartilage using cell sheet-based tissue engineering. *Pediatr Surg Int* 26, 179–185. <https://doi.org/10.1007/s00383-009-2543-3>
- Tao, F., Jiang, T., Tao, H., Cao, H., Xiang, W., 2020. Primary cilia: Versatile regulator in cartilage development. *Cell Proliferation* 53, e12765. <https://doi.org/10.1111/cpr.12765>
- Thakurta, S.G., Sahu, N., Miller, A., Budhiraja, G., Akert, L., Viljoen, H., Subramanian, A., 2016. Long-term culture of human mesenchymal stem cell-seeded constructs under ultrasound stimulation: evaluation of

- chondrogenesis. *Biomed. Phys. Eng. Express* 2, 055016. <https://doi.org/10.1088/2057-1976/2/5/055016>
- Thornton, T.M., Pedraza-Alva, G., Deng, B., Wood, C.D., Aronshtam, A., Clements, J.L., Sabio, G., Davis, R.J., Matthews, D.E., Doble, B., Rincon, M., 2008. Phosphorylation by p38 MAPK as an Alternative Pathway for GSK3 $\beta$  Inactivation. *Science* 320, 667–670. <https://doi.org/10.1126/science.1156037>
- Thorpe, S.D., Buckley, C.T., Vinardell, T., O'Brien, F.J., Campbell, V.A., Kelly, D.J., 2010. The response of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to dynamic compression following TGF-beta3 induced chondrogenic differentiation. *Ann Biomed Eng* 38, 2896–2909. <https://doi.org/10.1007/s10439-010-0059-6>
- Toyoda, T., Seedhom, B.B., Kirkham, J., Bonass, W.A., 2003a. Upregulation of AGGrecan and type II collagen mRNA expression in bovine chondrocytes by the application of hydrostatic pressure. *Biorheology* 40, 79–85.
- Toyoda, T., Seedhom, B.B., Yao, J.Q., Kirkham, J., Brookes, S., Bonass, W.A., 2003b. Hydrostatic pressure modulates proteoglycan metabolism in chondrocytes seeded in agarose. *Arthritis & Rheumatism* 48, 2865–2872. <https://doi.org/10.1002/art.11250>
- Tran, S.C., Cooley, A.J., Elder, S.H., 2011. Effect of a mechanical stimulation bioreactor on tissue engineered, scaffold-free cartilage. *Biotechnology and Bioengineering* 108, 1421–1429. <https://doi.org/10.1002/bit.23061>
- van der Kraan, P.M., Blaney Davidson, E.N., Blom, A., van den Berg, W.B., 2009. TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: Modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis and Cartilage* 17, 1539–1545. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.06.008>
- Vanderploeg, E.J., Imler, S.M., Brodtkin, K.R., García, A.J., Levenston, M.E., 2004. Oscillatory tension differentially modulates matrix metabolism and cytoskeletal organization in chondrocytes and fibrochondrocytes. *Journal of Biomechanics* 37, 1941–1952. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.02.048>
- Vasara, A.I., Nieminen, M.T., Jurvelin, J.S., Peterson, L., Lindahl, A., Kiviranta, I., 2005. Indentation Stiffness of Repair Tissue after Autologous Chondrocyte Transplantation. *Clinical Orthopaedics and Related Research*® 433, 233–242. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000150567.00022.2e>
- Verzijl, N., DeGroot, J., Thorpe, S.R., Bank, R.A., Shaw, J.N., Lyons, T.J., Bijlsma, J.W.J., Lafeber, F.P.J.G., Baynes, J.W., TeKoppele, J.M., 2000. Effect of Collagen Turnover on the Accumulation of Advanced Glycation End Products. *J. Biol. Chem.* 275, 39027–39031. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006700200>
- Vikingsson, L., Claessens, B., Gómez-Tejedor, J.A., Gallego Ferrer, G., Gómez Ribelles, J.L., 2015. Relationship between micro-porosity, water permeability and mechanical behavior in scaffolds for cartilage engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 48, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.03.021>
- Villanueva, I., Hauschulz, D.S., Mejjic, D., Bryant, S.J., 2008. Static and dynamic compressive strains influence nitric oxide production and chondrocyte bioactivity when encapsulated in PEG hydrogels of different crosslinking densities. *Osteoarthritis and Cartilage* 16, 909–918. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.12.003>
- Vinardell, T., Rolfe, R.A., Buckley, C.T., Meyer, E.G., Ahearne, M., Murphy, P., Kelly, D.J., 2012. Hydrostatic pressure acts to stabilise a chondrogenic phenotype in porcine joint tissue derived stem cells. *Eur Cell Mater* 23, 121-132; discussion 133-134. <https://doi.org/10.22203/ecm.v023a09>
- Vinardell, T., Thorpe, S.D., Buckley, C.T., Kelly, D.J., 2009. Chondrogenesis and integration of mesenchymal stem cells within an in vitro cartilage defect repair model. *Ann Biomed Eng* 37, 2556–2565. <https://doi.org/10.1007/s10439-009-9791-1>
- Vincent, T.L., Hermansson, M.A., Hansen, U.N., Amis, A.A., Saklatvala, J., 2004. Basic fibroblast growth factor mediates transduction of mechanical signals when articular cartilage is loaded. *Arthritis & Rheumatism* 50, 526–533. <https://doi.org/10.1002/art.20047>
- Vincent, T.L., McLean, C.J., Full, L.E., Peston, D., Saklatvala, J., 2007. FGF-2 is bound to perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage, where it acts as a chondrocyte mechanotransducer. *Osteoarthritis and Cartilage* 15, 752–763. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.01.021>
- Vincourt, J.-B., Etienne, S., Grossin, L., Cottet, J., Bantsimba-Malanda, C., Netter, P., Mainard, D., Libante, V., Gillet, P., Magdalou, J., 2012. Matrilin-3 switches from anti- to pro-anabolic upon integration to the extracellular matrix. *Matrix Biology* 31, 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.03.004>
- Vornehm, S.I., Dudhia, J., von der Mark, K., Aigner, T., 1996. Expression of collagen types IX and XI and other major cartilage matrix components by human fetal chondrocytes in vivo. *Matrix Biology* 15, 91–98. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(96\)90150-X](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(96)90150-X)

- Vunjak-Novakovic, G., Martin, I., Obradovic, B., Treppo, S., Grodzinsky, A.J., Langer, R., Freed, L.E., 1999. Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* 17, 130–138. <https://doi.org/10.1002/jor.1100170119>
- Wachsmuth, L., Söder, S., Fan, Z., Finger, F., Aigner, T., 2006. Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes. *Histol. Histopathol.* 21, 477–485. <https://doi.org/10.14670/HH-21.477>
- Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S.J., Young, R.G., Mansour, J.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., 1994. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *JBJS* 76, 579–592.
- Waldman, S.D., Spiteri, C.G., Grynepas, M.D., Pilliar, R.M., Kandel, R.A., 2003. Long-term intermittent shear deformation improves the quality of cartilaginous tissue formed in vitro. *Journal of Orthopaedic Research* 21, 590–596. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(03\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(03)00009-3)
- Wang, C., Yuan, X., Yang, S., 2013. IFT80 is essential for chondrocyte differentiation by regulating Hedgehog and Wnt signaling pathways. *Experimental Cell Research* 319, 623–632. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.12.028>
- Wann, A.K.T., Zuo, N., Haycraft, C.J., Jensen, C.G., Poole, C.A., McGlashan, S.R., Knight, M.M., 2012. Primary cilia mediate mechanotransduction through control of ATP-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in compressed chondrocytes. *The FASEB Journal* 26, 1663–1671. <https://doi.org/10.1096/fj.11-193649>
- Whitney, G.A., Jayaraman, K., Dennis, J.E., Mansour, J.M., 2017. Scaffold-free cartilage subjected to frictional shear stress demonstrates damage by cracking and surface peeling. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 11, 412–424. <https://doi.org/10.1002/term.1925>
- Whu, S.W., Hung, K.-C., Hsieh, K.-H., Chen, C.-H., Tsai, C.-L., Hsu, S., 2013. In vitro and in vivo evaluation of chitosan–gelatin scaffolds for cartilage tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* 33, 2855–2863. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.03.003>
- Wiberg, C., Klatt, A.R., Wagener, R., Paulsson, M., Bateman, J.F., Heinegård, D., Mörgelin, M., 2003. Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and AGGrecan. *J. Biol. Chem.* 278, 37698–37704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304638200>
- Wilusz, R.E., DeFrate, L.E., Guilak, F., 2012a. A biomechanical role for perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol.* 31, 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.05.002>
- Wilusz, R.E., DeFrate, L.E., Guilak, F., 2012b. Immunofluorescence-guided atomic force microscopy to measure the micromechanical properties of the pericellular matrix of porcine articular cartilage. *J R Soc Interface* 9, 2997–3007. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0314>
- Wilusz, R.E., Sanchez-Adams, J., Guilak, F., 2014. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol.* 39, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.08.009>
- Winter, A., Breit, S., Parsch, D., Benz, K., Steck, E., Hauner, H., Weber, R.M., Ewerbeck, V., Richter, W., 2003. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum.* 48, 418–429. <https://doi.org/10.1002/art.10767>
- Woodfield, T. b. f., Blitterswijk, C.A.V., Wijn, J.D., Sims, T. j., Hollander, A. p., Riesle, J., 2005. Polymer Scaffolds Fabricated with Pore-Size Gradients as a Model for Studying the Zonal Organization within Tissue-Engineered Cartilage Constructs. *Tissue Engineering* 11, 1297–1311. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.1297>
- Woods, A., Wang, G., Beier, F., 2007. Regulation of chondrocyte differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions. *J. Cell. Physiol.* 213, 1–8. <https://doi.org/10.1002/jcp.21110>
- Xing, L., Sun, J., Tan, H., Yuan, G., Li, J., Jia, Y., Xiong, D., Chen, G., Lai, J., Ling, Z., Chen, Y., Niu, X., 2019. Covalently polysaccharide-based alginate/chitosan hydrogel embedded alginate microspheres for BSA encapsulation and soft tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 127, 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.065>
- Xu, L., Liu, Y., Sun, Y., Wang, B., Xiong, Y., Lin, W., Wei, Q., Wang, H., He, W., Wang, B., Li, G., 2017. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Stem Cell Res Ther* 8. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0716-x>
- Xu, T., Wu, M., Feng, J., Lin, X., Gu, Z., 2012. RhoA/Rho kinase signaling regulates transforming growth factor- $\beta$ 1-induced chondrogenesis and actin organization of synovium-derived mesenchymal stem cells through interaction with the Smad pathway. *Int. J. Mol. Med.* 30, 1119–1125. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1107>

- Yamasaki, S., Mera, H., Itokazu, M., Hashimoto, Y., Wakitani, S., 2014. Cartilage Repair With Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation: Review of Preclinical and Clinical Studies. *CARTILAGE* 5, 196–202. <https://doi.org/10.1177/1947603514534681>
- Yan, D., Chen, D., Cool, S.M., van Wijnen, A.J., Mikecz, K., Murphy, G., Im, H.-J., 2011. Fibroblast growth factor receptor 1 is principally responsible for fibroblast growth factor 2-induced catabolic activities in human articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 13, R130. <https://doi.org/10.1186/ar3441>
- Yang, I.H., Kim, S.H., Lee, J.W., Kim, S.J., Sun, H.J., Kim, Y.H., 2004. Comparison of Phenotypic Characterization between “Alginate Bead” and “Pellet” Culture Systems as Chondrogenic Differentiation Models for Human Mesenchymal Stem Cells. *T200401688.pdf* 45, 891–900.
- Ye, R., Hao, J., Song, J., Zhao, Z., Fang, S., Wang, Y., Li, J., 2014. Microenvironment is involved in cellular response to hydrostatic pressures during chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 115, 1089–1096. <https://doi.org/10.1002/jcb.24743>
- Youn, I., Choi, J.B., Cao, L., Setton, L.A., Guilak, F., 2006. Zonal variations in the three-dimensional morphology of the chondron measured in situ using confocal microscopy. *Osteoarthr. Cartil.* 14, 889–897. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.02.017>
- Yuasa, T., Otani, T., Koike, T., Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M., 2008. Wnt/  $\beta$ -catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration. *Laboratory Investigation* 88, 264–274. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700747>
- Zambrano, N.Z., Montes, G.S., Shigihara, K.M., Sanchez, E.M., Junqueira, L.C.U., 1982. Collagen Arrangement in Cartilages. *CTO* 113, 26–38. <https://doi.org/10.1159/000145534>
- Zhang, S., Hu, B., Liu, W., Wang, P., Lv, X., Chen, S., Liu, H., Shao, Z., 2020. Articular cartilage regeneration: The role of endogenous mesenchymal stem/progenitor cell recruitment and migration. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 50, 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2019.11.001>
- Zhang, T., Wen, F., Wu, Y., Goh, G.S.H., Ge, Z., Tan, L.P., Hui, J.H.P., Yang, Z., 2015. Cross-talk between TGF- $\beta$ /SMAD and integrin signaling pathways in regulating hypertrophy of mesenchymal stem cell chondrogenesis under deferral dynamic compression. *Biomaterials* 38, 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.010>
- Zhang, Y., Pizzute, T., Pei, M., 2014. A review of crosstalk between MAPK and Wnt signals and its impact on cartilage regeneration. *Cell Tissue Res* 358, 633–649. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2010-x>
- Zhang, Y., Zhang, J., Chang, F., Xu, W., Ding, J., 2018. Repair of full-thickness articular cartilage defect using stem cell-encapsulated thermogel. *Materials Science and Engineering: C* 88, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.02.028>
- Zhang, Z., McCaffery, J.M., Spencer, R.G.S., Francomano, C.A., 2004. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *J Anat* 205, 229–237. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8782.2004.00327.x>
- Zhao, Z., Li, Y., Wang, M., Zhao, S., Zhao, Z., Fang, J., 2020. Mechanotransduction pathways in the regulation of cartilage chondrocyte homeostasis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24, 5408–5419. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15204>
- Zhu, G., Mayer-Wagner, S., Schröder, C., Woiczinski, M., Blum, H., Lavagi, I., Krebs, S., Redeker, J.I., Hölzer, A., Jansson, V., Betz, O., Müller, P.E., 2015. Comparing effects of perfusion and hydrostatic pressure on gene profiles of human chondrocyte. *Journal of Biotechnology* 210, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.409>
- Zumwalt, M., Reddy, A.P., 2020. Stem Cells for Treatment of Musculoskeletal Conditions - Orthopaedic/Sports Medicine Applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, Stem Cells and Their Applications to Human Diseases* 1866, 165624. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165624>

## IX. Curriculum Vitae



### Noémie PETITJEAN

3 rue Adolphe Nourrit, bât 4  
34000 Montpellier – France  
noemie.petitjean@umontpellier.fr  
+336 35 49 76 03

## Ingénierie tissulaire et biomécanique

### Formation

- 2017-20 **Doctorat en Biologie-Santé**, Université de Montpellier, Montpellier.
- 2014-17 Double diplôme : **Ingénieur Génie Biologie**, filière **Biomatériaux & Biomécanique & Master 2 Recherche en Ingénierie des Systèmes Complexes**, spécialité **Biomécanique BioIngénierie**, Université de Technologie de Compiègne (UTC), Compiègne.
- 2011-14 **Classe préparatoire BCPST** (Biologie, Chimie, Physique et Science de la Terre), Lycée Assomption Bellevue, Lyon 7ème. Résultat des concours : Admission à l'ENSAT, Toulouse.
- 2011 **Baccalauréat Scientifique**, spécialité Science et Vie de la Terre, Lycée René Descartes, Saint Genis-Laval.

### Expérience professionnelle en recherche

- 2020-21 **Contrat d'ATER**, Université de Montpellier. Laboratoire de Mécanique et Génie Civil (**LMGC**, CNRS - UMR 5508) et Institut de Médecine Régénératrice et Biothérapie (**IRMB**, Inserm U1183), Montpellier.  
**Caractérisation biologique et biomécanique de la croissance de micropellets de cartilage soumis à des stimulations mécaniques.**
- 2017-20 **Contrat doctoral**. Laboratoire de Mécanique et Génie Civil (**LMGC**, CNRS - UMR 5508) et Institut de Médecine Régénératrice et Biothérapies (**IRMB**, Inserm U1183), Montpellier.  
**Nouveau dispositif fluide pour la stimulation et la caractérisation biomécanique de microsphères : preuve de concept et application aux micropellets de cartilage.**
- 2017 Projet de fin d'étude (6 mois). Laboratoire de Biomécanique et Pathologie Locomotrice du Cheval (**BPLC**) - ENVA INRA 957 de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA), Maisons-Alfort.  
**Application d'un procédé ultrasonore (Tensomics) au suivi de la cicatrisation de lésions tendineuses induites chez le cheval.**
- 2016 Stage (4 semaines). Laboratoire Biomécanique et Bioingénierie (**BMBI**, CNRS - UMR 7338), Compiègne.  
**Caractérisation des effets induits par le vémurafénib sur des cellules de mélanome : Mort cellulaire et prolifération.**

- 2015-16 Stage assistant ingénieur (6 mois). Laboratoire de Biomécanique et Mécanique des Chocs (**LBMC**, IFFSTAR - UMR\_T 9406), Bron.  
**Etude du comportement du doigt sous chargement par images IRM.**
- 2015 Stage (64 heures sur 6 mois). Start-up **Equisense**, Compiègne.  
**Détection d'une dissymétrie d'allure au trot (boiterie) à partir de mesures accélérométriques effectuées sur un cheval.**

### Expérience professionnelle en enseignement

- 2020-21 **Contrat d'ATER** à mi-temps (96h) à l'Université de Montpellier au département de Mécanique : biomécanique (L1), simulation par éléments finis (L1), matériaux et structures simples (L2), mécanique des fluides (L3), mécanique du solide déformable (L3).
- 2018-20 **Mission complémentaire d'enseignement** à la faculté des sciences de Montpellier (64 heures/an) : biologie cellulaire (L1), physiologie animale (L1), biologie cellulaire et moléculaire (L2), biomécanique (L1), mécanique des fluides (L3), mécanique du solide déformable (L3).
- 2017-18 **Vacations** à la faculté des sciences de Montpellier (32 heures) : biomécanique, mécanique des fluides, et mécanique du solide déformable.

### Compétences

**Biomécanique** : techniques de caractérisation (test de compression, AFM).

Maîtrise des **logiciels de programmation** (Matlab, Python, Arduino) et **logiciels de maillage et calculs éléments finis** (Hypermesh, Meshlab, Gmsh, Ls Dyna, LMGC90, Patran).

**Biologie cellulaire** : culture de cellules primaires, modèles de différenciation en sphéroïdes, tests de viabilité (Live/Dead, Clik-It Edu), imagerie en microscopie optique et confocale, histologie (cryosections).

**Biologie moléculaire** : extraction d'ARN, RT-qPCR, quantification d'ADN (CyQUANT).

Maîtrise des **logiciels de traitements de données** (Word, Latex, Excel, Visual Basic, Image J, GraphPad Prism),

Langue : **Anglais** niveau B2 (TOEIC : 825 points, 2016).

### Responsabilités

- 2020 **Représentante des doctorants** au conseil du laboratoire du LMGC.
- 2019 **Chairwoman** au congrès de la Société de Biomécanique.
- 2015 Participation au comité d'organisation du **Festival Imaginarium** au pôle restauration.

## Activités extra-professionnelles

Danse classique : compétition nationale amateur

Equitation : travail en éthologie, dressage et CSO des chevaux de l'élevage de Gricou dans les Monts du Lyonnais

Voyages : USA, Cuba, Espagne, Crète ...

## Production scientifique

### Articles dans des revues internationales à comité de lecture

1. **Petitjean N**, Maumus M, Dusfour G, Cañadas P, Jorgensen C, Royer P, Noël D, Le Floc'h S. (2019) Validation of a new technique dedicated to the mechanical characterisation of cartilage micropellets. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 22(sup1), S296-S298).
2. **Petitjean N**, Dusfour G, Cañadas P, Maumus M, Valorge P, Devic S, Berthelot J, Belamie E, Royer P, Jorgensen C, Noël D, Le Floc'h S. Validation of a new fluidic device for mechanical stimulation and characterization of microspheres: a first step towards cartilage characterization. *Materials Science and Engineering C*, in press.
3. **Petitjean N**, Cañadas P, Royer P, Noël D, Le Floc'h S. Biomechanical characterization of articular cartilage: Reminding of basic notions and novel perspectives. *Biomaterials* (en préparation).

### Communications orales

1. **Petitjean N**, Dusfour G, Cañadas P, Maumus M, Valorge P, Devic S, Berthelot J, Belamie E, Royer P, Jorgensen C, Noël D, Le Floc'h S. Mechanical stimulation and mechanobiological characterization of cartilage micropellets with a single and new custom-made device. 1<sup>er</sup> Congrès Français de Médecine Régénératrice et Biothérapies, Octobre 2020, Montpellier, France.
2. **Petitjean N**, Maumus M, Dusfour G, Cañadas P, Jorgensen C, Royer P, Le Floc'h S, Noël D. Mechanical stimulation and biomechanical characterization of cartilage micropellets with a single and new custom-made device. TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society), Mai 2020, Manchester, Angleterre (Annulé pour cause Covid 19).
3. **Petitjean N**, Maumus M, Dusfour G, Cañadas P, Jorgensen C, Royer P, Noël D, Le Floc'h S. Validation of a new technique dedicated to the mechanical characterisation of cartilage micropellets. Communication avec acte. Congrès de la Société de Biomécanique, Octobre 2019, Poitiers, France.
4. **Petitjean N**, Cañadas P, Jorgensen C, Royer P, Noël D, Le Floc'h S. Effet des stimulations mécaniques sur la différenciation et la croissance de cartilage à partir de cellules souches mésenchymateuses : de la conception d'un prototype à la modélisation. GDR Mécabio, Novembre 2018, Montpellier, France.
5. **Petitjean N**, Dallard J, Merlhiot X, Duprey S. Human fingertip finite element models: Towards a set of parameters for a hyperelastic law. ESB, Juillet 2016, Lyon, France.

## Posters

1. **Petitjean N**, Maumus M, Dusfour G, Cañadas P, Jorgensen C, Royer P, Noël D, Le Floc'h S. Validation of a new device dedicated to the mechanical characterisation of cartilage micropellets. Journée de l'école doctorale CBS2, Montpellier, date France.
2. **Petitjean N**, Pourcelot P, Ravary-Plumioen B, Jacquet S, Tallaj A, Munoz-Nates F, Denoix J, Audigié F, Crevier-Denoix N. Utilisation de la vitesse de propagation axiale des ultrasons dans le tendon fléchisseur superficiel du doigt du cheval comme moyen d'évaluation de l'état du tendon. Journée de la recherche de l'école nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, date France.

## Abstracts soumis

1. **Petitjean N**, Dusfour G, Cañadas P, Maumus M, Valorge P, Devic S, Berthelot J, Belamie E, Royer P, Jorgensen C, Noël D, Le Floc'h S. Mechanical stimulation and biomechanical characterization of cartilage micropellets with a single and new custom-made device. TERMIS, Novembre 2021, Maastricht, Pays-bas.
2. **Petitjean N**, Dusfour G, Cañadas P, Maumus M, Valorge P, Devic S, Berthelot J, Belamie E, Royer P, Jorgensen C, Noël D, Le Floc'h S. Stimulation mécanique et caractérisation biomécanique de micropellets de cartilage avec un dispositif fluide dédié. GDR Mécabio, Janvier 2021, virtuel.



Nouveau dispositif fluidique pour la stimulation et la caractérisation biomécanique de microsphères : preuve de concept et application aux micropellets de cartilage.

---

Les pathologies du cartilage articulaire (CA) constituent aujourd'hui un problème de santé publique. L'ingénierie tissulaire, dont l'objectif est la création de nouveaux tissus contenant des cellules, est une solution thérapeutique prometteuse pour la réparation de lésions du CA mais nécessite encore des recherches pour améliorer les propriétés mécaniques des néo-tissus. Ce travail de thèse avait pour objectif l'analyse de l'impact de stimulations mécaniques sur le développement et le maintien du CA. Le micropellet de cartilage, conçu à partir de l'agrégation de cellules souches mésenchymateuses, a été choisi comme modèle biologique d'étude. Pour ce faire, un dispositif fluidique capable de stimuler et caractériser mécaniquement les micropellets de cartilage de petite taille et de forme irrégulière a été développé. Il permet de stimuler et caractériser simultanément 6 micropellets de cartilage par leur compression dans 6 puits coniques, grâce à différents signaux de pression. L'association du dispositif fluidique à un modèle numérique a rendu possible la caractérisation mécanique de diverses microsphères à base d'alginate, de collagène ou de collagène réticulé par comparaison à une méthode de caractérisation conventionnelle par compression entre deux surfaces planes. L'analyse des signaux de pression générés a permis de vérifier la fiabilité du dispositif pour l'application de stimuli mécaniques. La stimulation de micropellets de cartilage de 21 jours par un signal carré avec diverses amplitudes, fréquences et durées a montré que l'expression des gènes chondrocytaires pouvait être modulée par les stimulations mécaniques. Des déformations importantes des micropellets ont été observées sans toutefois les altérer structurellement. La caractérisation mécanique de micropellets de 21 jours a montré des résultats cohérents avec la bibliographie. Cette preuve de concept a montré l'intérêt du dispositif fluidique permettant la stimulation et la caractérisation de micropellets de cartilage, et a mis en évidence des pistes d'amélioration du système et des méthodes d'analyses numériques associées ainsi que des pistes de travail pour améliorer notre compréhension du développement du micropellet de cartilage lors de stimulations mécaniques.

New fluidic device for the biomechanical stimulation and biomechanical characterization of microspheres: proof of concept and application to cartilage micropellets.

---

Articular cartilage (AC) pathologies have emerged as a public health problem. Tissue engineering, whose objective is to create new tissues with cells, is a promising therapeutic solution for the repair of AC lesions but still requires research to improve the mechanical properties of the new tissues. The objective of this PhD thesis work was to analyze the impact of mechanical stimuli in the development and maintenance of AC, based on the model of cartilage micropellet, derived from the aggregation of mesenchymal stem cells. For this purpose, a fluidic device able to mechanically stimulate and characterize small and irregularly shaped cartilage micropellets was developed. Six cartilage micropellets in six conical wells can be simultaneously stimulated by compression and characterized through different pressure signals. Associated to a numerical model, the fluidic device has been shown to allow the characterization of the mechanical properties of various microspheres made of alginate, collagen or cross-linked collagen as compared to a conventional characterization method by compression between two planar surfaces. The reliability of the device for the application of mechanical stimuli have been confirmed by analyzing the pressure signals generated. Stimulation of 21-day cartilage micropellets with a square-wave signal with various amplitudes, frequencies and durations have shown that chondrocyte gene expression could be modulated by mechanical stimuli. Moderate levels of deformation of the micropellets were observed without any obvious damage. The mechanical characterization of 21-day micropellets have shown results consistent with the literature. This proof of concept shows the interest of the fluidic device allowing the stimulation and characterization of cartilage micropellets and highlighted possibilities to improve the system and associated numerical analysis methods as well as directions to improve our understanding of cartilage micropellet development under mechanical stimulations.