



HAL
open science

Microparticules de biopolymères fonctionnalisées comme support injectable de cellules souches mésenchymateuses pour la régénération du cartilage

Jérémy Salvador

► To cite this version:

Jérémy Salvador. Microparticules de biopolymères fonctionnalisées comme support injectable de cellules souches mésenchymateuses pour la régénération du cartilage. Médecine humaine et pathologie. Université de Montpellier, 2022. Français. NNT : 2022UMONT018 . tel-03881787

HAL Id: tel-03881787

<https://theses.hal.science/tel-03881787v1>

Submitted on 2 Dec 2022

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

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

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

En Biologie-Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche Inserm U1183 Institut de Médecine Régénératrice et de Biothérapies
Institut Charles Gerhardt Montpellier UMR 5253

Microparticules de biopolymères fonctionnalisées comme support injectable de cellules souches mésenchymateuses pour la régénération du cartilage

Présentée par Jérémy SALVADOR

Le 1^{er} avril 2022

Sous la direction de Danièle NOËL
et Emmanuel BELAMIE

Devant le jury composé de

Danièle NOËL, DR, INSERM

Emmanuel BELAMIE, PR, Ecole Pratique des Haute Etudes

Marie MORILLE, MC, Université de Montpellier

Tristan MONTIER, PR, Université de Bretagne Occidentale

Christophe HELARY, IR, CNRS

Joelle AMEDEE, DR, INSERM

Xavier GARRIC, PR, Université de Montpellier

Co-directrice de thèse

Co-directeur de thèse

Co-encadrante de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Par ces quelques lignes, je souhaite remercier chaleureusement toutes celles et ceux qui ont contribué, de près ou de loin à l'aboutissement de ces travaux et qui m'ont accompagné tout au long de ces trois années et demie de thèse.

En premier lieu, je tiens à adresser mes remerciements aux membres de mon jury ayant accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie Christophe Helary qui a accepté de juger ce travail en tant que rapporteur, son point de vue de spécialiste des biomatériaux à base de collagène pour l'ingénierie tissulaire est très précieux. Je remercie Tristan Montier, qui a également accepté d'être rapporteur de ce travail et dont l'expertise sur la vectorisation des acides nucléiques était aussi indispensable à l'évaluation de ce travail. Je souhaite aussi remercier Joelle Amédée spécialiste en ingénierie tissulaire et Xavier Garric spécialiste des biomatériaux et des biopolymères d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant qu'examineurs. Je remercie aussi très chaleureusement mon comité de suivi de thèse, composé de Xavier Garric et Frederic Cuisinier, votre bienveillance et vos conseils lors de nos discussions m'ont été précieux pour prendre du recul sur mes recherches et avancer sereinement au fil des années.

Je remercie très sincèrement mon trio d'encadrants, Danièle Noël, Emmanuel Belamie et Marie Morille qui m'ont accueilli en 2018 pour ce projet à l'interface entre la biologie et la chimie. Travailler à la convergence de trois spécialités a été très enrichissant professionnellement pour moi. Cela m'a permis de me confronter à des mondes scientifiques différents mais aussi complémentaires et je vous remercie encore une fois de m'avoir laissé l'opportunité de travailler sur cette thématique. Aussi, vos trois expertises sur la médecine régénératrice, les biopolymères et la vectorisation ont été d'une richesse exceptionnelle. J'ai énormément apprécié de travailler avec vous, pour toutes les qualités humaines qui vous définissent. Vous avez su m'écouter, me conseiller, et 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 aujourd'hui je souhaite découvrir d'autres horizons de la recherche, j'espère que nous aurons l'opportunité de collaborer à l'avenir.

Je remercie maintenant les membres des différents groupes que j'ai côtoyés, à l'IRMB. Je remercie en premier lieu tous les membres des groupes DN et FD, Merci à Gautier, co-équipier pour les matchs de Handball (et surtout pour la troisième mi-temps^^), voisin de

bureau, mais aussi voisin d'appart, sans qui je serais tombé à court de bières pendant le confinement, merci à Audrey pour ta gentillesse et ta bonne humeur, c'était un plaisir de travailler à tes côtés et j'espère qu'on aura l'occasion de se faire encore quelques apéros ensemble ! Merci à Farida pour ta gentillesse et ta « positive attitude ». Merci à Yoan pour ta bonne humeur et ton sens de l'humour hors du commun, dommage que tu sois arrivé au labo si tard, mais j'espère qu'on aura l'occasion de travailler dans la même équipe un de ces jours. Merci à Marie et Claire B pour leurs conseils avisés. Merci à Claire L, pour ta gentillesse et nos rigolades à la paillasse, merci à Emeline pour ta bonne humeur et pour tous tes conseils, merci à Rafa, Claudia, Dora et les nouveaux stagiaires, Mathilde, Vincent, Ophélie et Bérénice. Et enfin, un grand merci à mes compagnons de thèse et collègues de bureau, Candice, Jérémy, Marjo, Lohann, Jholy, Alex, Damien et Soledad pour tous les bons moments passés ensemble, nos rigolades, les pauses café, les apéros (toujours avec modération), mais aussi les soirées (et nuits) passées à travailler dans notre bureau (il faudrait peut-être penser à investir dans un lit de camp !!!).

Je tiens également à remercier Sabine et Martine, avec qui j'ai effectué un super stage de Master et qui depuis m'ont toujours soutenu et encouragé, Merci à Philou pour toutes nos pauses café et ton pastis maison, merci à Saïd toujours de bonne humeur, merci aussi à Jean Marc B pour tes conseils. Merci à tous les membres de l'IRMB avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger et de partager pendant ces trois années et demie de thèse.

Je souhaite maintenant remercier les membres des différents groupes que j'ai côtoyés à l'ENSCM. Je remercie tout d'abord Jade pour sa grande gentillesse, ses précieux conseils et son humour. Je remercie aussi Marie Noel pour ses bons conseils et toutes nos discussions. Je remercie Laurianne pour sa spontanéité, sa bonne humeur. Je remercie aussi, mes collègues thésards et post-doc, Maxime, Alexis et plus récemment Baptiste avec qui j'ai passé de bons moments au labo de pharma, bonne chance à Baptiste pour la suite du projet ! Je remercie Anne Aubert pour sa gentillesse et sa bonne humeur, Christophe Dorandeu pour ses conseils et merci à Philippe Legrand pour le travail en horaires décalés. Je remercie également toutes les équipes des labos de Pharma et de la Galéra.

Je tiens également à remercier tous les anciens thésards, Jojo alias le roi du petit pont, Nadège, Yassin, Mathieu, Koceïla, Jean, Engie, Yasamine, Noemie, Sarah, Béryll, Pauline et tous les anciens stagiaires, Brice, Anne, Lisa, Khaled, avec qui j'ai pu partager des supers moments au laboratoire ou encore pendant les futsals et happy hour du jeudi soir !

Bien sûr je n'oublie pas l'équipe de choc du Master BS, Tony, Jaques, Max, Lucile, Mathou, Charlene, les Mamènes (Manon et Jérémy) et mon gars sûr Paul, alias Polo, toujours présent depuis la maternelle jusqu'à la Thèse, j'espère qu'on aura l'occasion de poursuivre en post doc dans la même ville !

Enfin, un très grand merci à mes deux meilleurs amis et camarades de thèse, les Dr. Candice et Jérémy, cette thèse n'aurait pas été la même sans vous et tous les bons moments qu'on a passés ensemble, tous nos weekends et longues soirées passées à travailler au labo, mais aussi toutes nos soirées, nos apéros et nos rigolades. Merci aussi pour toutes nos aventures et vacances inoubliables qu'on a passées ensemble, que ce soit en campings sauvages au bord de la rivière, ou sur les plages paradisiaques de Guadeloupe et de la Réunion !

Notre trio va me manquer mais je suis persuadé qu'on restera en contact, et J'espère qu'on aura à nouveau l'occasion de travailler ensemble.

Je conclurai en remerciant ma famille. Merci à mon petit frère Charlie et ma petite sœur Lorine, merci à mes parents Rosine et Michel, merci à ma grand-mère Line, vous m'avez toujours soutenu et encouragé pendant mes études et sans vous rien n'aurait été possible. J'ai aussi une pensée émue pour mon grand-père Claude qui nous a quittés récemment, c'est toi qui m'as fait découvrir le monde de la science et donné envie de poursuivre dans cette voie. J'aurai tant aimé te compter parmi nous jusqu'à la fin de cette aventure. Un grand merci également à tous les autres membres de ma famille, et à tous les cousins et cousines, pour tout votre soutien et vos encouragements.

Et enfin un énorme merci à Elsa qui partage ma vie depuis bientôt 8 ans. Merci de m'avoir soutenu et aussi supporté, pendant ces trois années et demie de thèse. Merci pour tout ce chemin parcouru ensemble.

Table des matières

LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES ABREVIATIONS	13
AVANT-PROPOS	17
ETAT DE L'ART	20
I L'INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE ARTICULAIRE	20
<i>I.1 Le cartilage articulaire</i>	20
I.1.1 La composition et l'organisation du tissu	20
I.1.1.1 L'Organisation	20
I.1.1.2 Les chondrocytes	22
I.1.1.3 Matrice extracellulaire	23
I.1.2 La chondrogenèse	27
I.1.2.1 Les cellules stromales mésenchymateuses	27
I.1.2.2 La différenciation chondrocytaire	28
<i>I.2 Pathologies articulaires et traitements actuels</i>	29
I.2.1 Techniques chirurgicales	30
I.2.1.1 Le débridement	30
I.2.1.2 Les microfractures	30
I.2.1.3 La Mosaïcplastie	31
I.2.1.4 Greffe de chondrocytes autologues	31
I.2.2 Les thérapies cellulaires paracrines	32
I.2.3 L'ingénierie tissulaire du cartilage	33
I.2.3.1 Compréhension des mécanismes moléculaires associées à la thérapie du cartilage	33
I.2.3.1.1 L'induction de la chondrogenèse	33
I.2.3.1.2 Le problème de l'hypertrophie chondrocytaire	35
I.2.3.2 La composante cellulaire	38
I.2.3.2.1 Les chondrocytes	38
I.2.3.2.2 Les CSM	39
I.2.3.3 Les matrices pour l'ingénierie du cartilage	39
I.2.3.3.1 Les critères de sélection d'une matrice	39
I.2.3.3.2 Les matériaux synthétiques	41
I.2.3.3.3 Les matériaux naturels	42
I.2.3.3.4 Morphologie et architecture des matrices	45
I.2.4 Les biomolécules impliquées dans l'IT du cartilage	48
II THERAPIE GENIQUE DU CARTILAGE	49
<i>II.1 Les stratégies de thérapie génique des CSM appliquées à l'ingénierie du cartilage</i>	49
II.1.1 Transgènes thérapeutiques	50
II.1.2 Les micro-ARN (miARN)	51

II.1.3	Les petits ARNs interférents.....	52
II.2	La vectorisation des acides nucléiques.....	54
II.2.1	Vecteurs viraux.....	54
II.2.2	Vecteurs non viraux.....	56
II.2.2.1	Vecteurs polymériques.....	58
II.2.2.2	Les vecteurs lipidiques.....	60
II.2.2.2.1	La composition des vecteurs lipidiques.....	61
II.2.2.2.2	Assemblages moléculaires des complexes Lipides-Acides nucléiques.....	64
II.2.2.3	Vecteur lipidique naturel : les vésicules extracellulaires.....	69
II.3	Les matrices génétiquement activées (MAG).....	71
III	LES INTERACTIONS MATRICES-BIOMOLECULE APPLIQUEES A L'INGENIERIE DU CARTILAGE.....	73
	CONTEXTE DES TRAVAUX DE THESES.....	114
	CHAPITRE 1 : SELECTION D'UN VECTEUR D'ACIDE NUCLEIQUE EFFICACE POUR LA TRANSFECTION DES CSM ET COMPATIBLE AVEC LA FORMATION D'UNE MGA.....	118
I	INTRODUCTION.....	118
II	MATERIELS ET METHODES.....	121
III	RESULTATS ET DISCUSSION.....	128
III.1	Les vecteurs polymériques.....	128
III.2	Les vésicules extracellulaires (EV).....	133
III.3	Les lipides cationiques.....	141
IV	CONCLUSION.....	148
	CHAPITRE 2 : ELABORATION D'UNE MATRICE GENETIQUEMENT ACTIVEE POUR LA REPARATION DU CARTILAGE.....	150
I	MODIFICATION DU VECTEUR ET ELABORATION DE LA MGA.....	150
II	ETUDE DE LA MGA SUR LA DIFFERENCIATION DES CSM.....	185
II.1	MATERIELS ET METHODES.....	185
II.2	RESULTATS ET DISCUSSION.....	187
II.3	CONCLUSION.....	193
	CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	194
	REFERENCES.....	202
	ANNEXES.....	236
I	ANNEXE 1 : PROTOCOLE DE FORMULATION DES SELF.....	236
II	ANNEXE 2 : PROTOCOLE DE FORMATION DES MGA.....	237
III	ANNEXE 3 : MATERIELS ET METHODES DES EXPERIENCES PRELIMINAIRES.....	238
IV	ANNEXE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION EXPERIENCES PRELIMINAIRES.....	241
	RESUME.....	248

ABSTRACT 249

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : ORGANISATION STRUCTURELLE DU CARTILAGE ARTICULAIRE MATURE (SELON NG, HOOI YEE <i>ET AL.</i> [10]).....	21
FIGURE 2 : LES DIFFERENTS CONSTITUANTS DU CARTILAGE HYALIN (SELON EHAB KHEIR AND DAVID SHAW) [12].	23
FIGURE 3 : DIFFERENTS TYPES DE COLLAGENE TROUVES DANS LA MATRICE DU CARTILAGE ARTICULAIRE (SELON JC GOEBEL).	24
FIGURE 4: ORGANISATION MACROMOLECULAIRE DU CARTILAGE ARTICULAIRE (SELON GAHUNIA, H.K., <i>ET AL.</i>) [28].....	26
FIGURE 5 : LES ETAPES DE LA DIFFERENCIATION DES CSM EN CHONDROCYTES (D'APRES MICHAEL J. ZUSCIK <i>ET AL.</i>) [58].	29
FIGURE 6 : ROLE DES SIGNAUX TGF β ET BMP AU COURS DE LA CHONDROGENESE (SELON WANG, W., D. RIGUEUR <i>ET AL.</i>) [104]. .	34
FIGURE 7 : LES VOIES DE SIGNALISATION DE L'HYPERTROPHIE DES CHONDROCYTES (SELON SONG CHEN <i>ET AL.</i>) [112].....	37
FIGURE 8 : ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DES PRINCIPALES FORMES D'ECHAFAUDAGES POUR L'INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE (SELON MONIKA WASYLECZKO <i>ET AL.</i>) [179].....	45
FIGURE 9 : PROTOCOLE DE SYNTHESE DE MICROSPHERES DE COLLAGENE (SELON DAVID AZRIA <i>ET AL.</i>) [229].	48
FIGURE 10 : APERÇU MECANISTIQUE DE LA REPRESSION GENIQUE INDUITE PAR MIARN ET SIARN (SELON HEEYOUNG SEOK <i>ET AL.</i> [255]).....	52
FIGURE 11: LES QUATRE PRINCIPAUX VECTEURS VIRAUX (SELON D. BOUARD <i>ET AL.</i>) [280].....	55
FIGURE 12 : ETAPES CLES DE LA TRANSFECTION PAR VECTEURS NON VIRAUX	57
FIGURE 13 : LES TROIS GENERATIONS DE VECTEURS LIPIDIQUES	57
FIGURE 14 : SCHEMA DES MICELLES PIC (SELON SOPHIE RAISIN <i>ET AL.</i>) [299].	60
FIGURE 15 : PRINCIPAUX LIPIDES CATIONIQUES UTILISE POUR L'IT DE L'OS ET DU CARTILAGE (SELON QADIR <i>ET AL.</i>) [311].	62
FIGURE 16 : STRUCTURE DES LIPOSOMES EN FONCTION DES PARAMETRES DE PACKING (SELON DANIEL A BALAZS <i>ET AL.</i> [339].....	66
FIGURE 17 : LES DIFFERENTES STRUCTURES DES LIPOPLEXES (SELON RICARDO GASPAS <i>ET AL.</i>) [286].....	67
FIGURE 18 : DIFFERENCIATION DE CSM SUR DES MICROSPHERES DE COLLAGENE DE TYPE I CHARGES EN TGF- β 3 (D'APRES MATHIEU <i>ET AL.</i> [226])	114
FIGURE 19 : ANALYSE IMMUNOHISTOCHIMIQUE DU NEOTISSU FORME APRES INJECTION DES CSM AVEC LES MICROSPHERES CHARGES EN TGF- β 3 EN SOUS-CUTANE CHEZ LA SOURIS SCID (M. MATHIEU <i>ET AL.</i> EUROPEAN CELLS AND MATERIAL).....	115
FIGURE 20 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA MGA.	116
FIGURE 21 : STRUCTURE CHIMIQUE DES LIPIDES KLN47, DOTAP ET DOPE.	120
FIGURE 22 : EFFICACITE DE TRANSFECTION DES VECTEURS POLYMERIQUES.	130
FIGURE 23 : ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DES EV ET EFFET DES DIFFERENTS TRAITEMENTS UTILISES.	135
FIGURE 24 : EFFICACITE DE TRANSFECTION DES EV.	139
FIGURE 25 : ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DES VECTEURS LIPIDIQUES KLN47 ET DOTAP-DOPE.	143
FIGURE 26 : EFFICACITE DE TRANSFECTION DES VECTEURS LIPIDIQUES KLN47 ET DOTAP-DOPE.....	146
FIGURE 27 : IMPACT DE LA MGA ET DE L'INHIBITION DE <i>RUNX2</i> SUR LA DIFFERENCIATION CHONDROCYTAIRE DES CSM.	189
FIGURE 28 : SCHEMA DES INTERACTIONS DU PEPTIDE DE LIAISON AVEC LES SELF ET MSCOLL.	197
FIGURE 29 : STRATEGIE POTENTIEL DE MICROFLUIDIQUES POUR LA FORMATION DE MGA.....	200
FIGURE 30 : POST MODIFICATION DES SELF AVEC UN DSPE-PEG2000-MALEMIDE	242
FIGURE 31 : INTERACTIONS MSCOLL-PEPTIDE ET PEPTIDE-SELF.....	243
FIGURE 32 LA CONFORMATION EN BROUSSE ET EN CHAMPIGNON DU PEG SUR LES NP SPHERIQUES.	245

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : COMPOSITION ET FORMULATION DES MICELLES M1, M2 ET M3.	122
TABLEAU 2 : EVALUATION DE LA COMPATIBILITE DES VECTEURS TESTES POUR LA REALISATION D'UNE MGA AVEC LES MICROSPHERES DE COLLAGENE.	148
TABLEAU 3 : GENES MARQUEURS CONSIDERES ET AMORCES UTILISEES	187

LISTE DES ABREVIATIONS

3D : 3 dimensions

ACI : Implantation de chondrocytes autologues

ALC159 : (2-hexyldecanoate),2-[(polyethylene glycol)-2000]-N,N-ditetradecylacetamide

AP : Alkaline phosphatase

bFGF : Basic FGF

BMP : Bone morphogenetic proteins

CBF α 1 : core-binding factor subunit alpha-1

CH : Cholestérol

CMP : Cartilage matrix protein

Col10a1 : Collagen Type X Alpha 1 Chain

COMP : Cartilage oligomeric matrix protein

CR : Ratio de charge

CSM : Cellules stromales mésenchymateuses

CTAB : Bromure de cetyltriméthylammonium

DBCO : Dibenzocyclooctyne

DDAB : Dimethyldioctadecylammonium

DEX : Dexaméthasone

Dh : Diamètre hydrodynamique

DHBC : Co-polymère à bloc double hydrophile

DLin-DMA : 1,2-dilinoleyloxy-N,N-dimethyl-3-aminopropane

D-Lin-MC3-DMA : 6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(diméthylamino) butanoate

DLS : Dynamic light scattering

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

DMG – PEG 2000 : 1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000

DMG-PEG : 1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000

DODAP : 1,2 dioleoyl-3-diméthylammonium-propane

DOPC : Dioléoylphosphatidylcholine

DOPE : Dioléoylphosphatidyléthanolamine

DOTAP : 1,2-dioléoyl-3-triméthylammoniumpropane)

DDAB : (Didodécyl diméthylammonium bromure)

DOTMA : N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride
DSPC : Distearoylphosphatidylcholine
DSPC : Distearoylphosphatidylcholine
DSPE-PEG2000-maléimide : 1,2-istearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000]
EV : Vésicules extracellulaires
FDA : Food and drugs administration
FGF : Fibroblast growth factor
FTC : Cycles de congélation/décongélation
GAG : Glycosaminoglycanes
HDAC4 : Histone Deacetylase 4
HIC : Hexagonale
HIIC : Hexagonale inversée
HLA : Human leukocyte antigen
ICGM : Institut Charles Gerhardt Montpellier
ICRS : Clinical cartilage injury evaluation system
IGF : Insulin-like growth factor
Ihh : Indian hedgehog signaling molecule
IL : Interleukine
IRAP : Interleukin receptor antagonist protein
IRMB : Institut de Médecine Régénératrice et Biothérapies
ISCT : Société internationale de thérapie cellulaire
ISH : Imidazole sulfonyl azide hydrochloride
IT : Ingénierie tissulaire
KGN : Kartogénine
LNP : Lipid nanoparticle
Lyoph : Lyophilisation
L α C : Lamellaire
MEC : Matrice extracellulaire du cartilage
MEF2C : Myocyte enhancer factor-2C
MGA : Matrice génétiquement activée
miARN : Micro-ARN
MMP13 : Matrix metallopeptidase 13
MPG : Matrix gla protein

Mscoll : Microsphère de collagène
MVE : Multivesicular endosomes
NFκB : Nuclear factor-kappa B
NTA : Nanoparticle tracking analysis
OC : ostéocalcine
OPN : ostéopontine
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PEG : Polyethylene glycol
PEG-b-PCL-COOH : Poly-éthylène-glycol- poly(ε-caprolactone)
PEG-CerC14 : 1-O-(2P-(w-methoxypolyethyleneglycol)succinoyl)-2-N-myristoylsphingosine
PEI : Polyéthylèneimine
PEO : Poly(ethylene oxide)
PEO-b-PMAA : Poly (oxyde d'éthylène) -acide b-polyméthacrylique
PEU : Poly(ester)urethane
PG : Protéoglycane
PGA : Poly(acide glycolique)
PIC : Polyionic complex micelles
PKCδ : Protein kinase C delta
PLA : Poly(acide lactique)
PLGA : poly(acide lactique-co-glycolique)
PLL : Polylysine
PLLA : Poly(acide L-lactique)
PMDA : Pharmaceuticals and medical devices agency
PMMA : Poly(méthacrylate de méthyle)
PTHrP : Parathyroïdes protéine liée aux hormones
RISC : RNA-induced silencing complex
Runx2 : Runt-related transcription factor
SALP : Stabilized antisense-lipid particles
SCID : Syndrome d'immunodéficience combinée grave
SCPL : Solvent casting particulate-leaching
SELF : Solvent exchange lipoplexe formulation
shARN : Short hairpin RNA
SHH : Sonic hedgehog
siARN : Petits ARN-interférents

SCSM : CSM issues de la membrane synoviale

SVF : Sérum fœtal de veau

TGF β : Transforming growth factor β

TMS : N,N,N-trimethyl chitosan chloride

VEGF : Vascular endothelial growth factor

AVANT-PROPOS

Le cartilage articulaire est un cartilage hyalin lisse, résistant à l'usure et hautement spécialisé. Ce tissu que l'on retrouve aux extrémités des os dans les articulations synoviales a pour principale fonction de réduire la friction pour permettre le mouvement de l'articulation [1]. Cependant, le cartilage articulaire peut subir de nombreux dommages, suite à un traumatisme physique ou bien à des conditions pathologiques telles que l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde. Or, contrairement à l'os qui possède des propriétés de cicatrisation importante, le cartilage n'est ni innervé, ni vascularisé et donc présente une capacité d'auto-régénération limitée. Avec l'âge et la progression de ces maladies, de plus en plus de lésions sévères du cartilage apparaissent et finissent par devenir un réel handicap pour le patient. Avec plus de 350 millions de personnes dans le monde souffrant d'arthrose en 2021, remédier à ce problème présente un enjeu majeur de santé publique, notamment dans le cadre du vieillissement des populations [2, 3]. Les traitements actuels du cartilage articulaire sont principalement des médicaments contre la douleur et la physiothérapie, avec une intervention chirurgicale dans les cas les plus graves. La chirurgie est largement appliquée cliniquement, cependant il existe des limitations et des complications associées telles que la morbidité du site donneur, l'hypertrophie du greffon et les tissus de réparation incohérents [4]. En fin de compte, une arthroplastie totale est nécessaire pour la maladie en phase terminale. Ainsi, le développement de nouvelles approches capables de régénérer efficacement le cartilage endommagé est impératif.

L'ingénierie tissulaire est un domaine interdisciplinaire qui combine des biomatériaux, des cellules et des biomolécules pour développer des substituts biologiques capables de restaurer, maintenir, ou améliorer la fonction tissulaire [5]. Ainsi, l'association de biomatériaux, de cellules souches et de vecteurs de biomolécules actives apporte des solutions innovantes aux problématiques actuelles du domaine de l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire adulte.

Ce projet de thèse, issu de la collaboration entre deux laboratoires de recherche, l'Institut de Médecine Régénératrice et Biothérapies (IRMB) et l'Institut Charles Gerhardt Montpellier (ICGM) se situe dans ce contexte.

L'IRMB est un institut dont les thématiques de recherche touchent majoritairement l'étude des cellules souches, leur biologie et leurs applications thérapeutiques. Au sein de cet institut, le groupe de recherche « Organoïdes, cellules souches mésenchymateuses (CSM) et vésicules extracellulaires pour la thérapie des maladies ostéoarticulaires » dirigé par le Dr.

Danièle Noël, s'intéresse depuis plusieurs années au potentiel thérapeutique des CSM dans ces maladies.

L'ICGM est un institut dont les thématiques s'intéressent à l'élaboration, la caractérisation et la mise en forme de matériaux fonctionnels à différentes échelles, de la molécule au dispositif en passant par les nanomatériaux. Au sein du département C3M "Chimie et Matériaux MacroMoléculaires", le Pr. Emmanuel Belamie et le Dr. Marie Morille s'intéressent respectivement à la conception de matériaux (bio-) fonctionnels et à la formulation de vecteurs synthétiques.

Les domaines de compétence de ces deux équipes se rencontrent pour le développement d'un support biomimétique actif capable d'orienter la différenciation de cellules souches. Dans le cadre de cette thèse, nous visons à terme une application de régénération du cartilage, mais le concept pourrait être transposé à d'autres tissus en adaptant les acteurs cellulaires et moléculaires. Notre stratégie est d'élaborer une matrice génétiquement activée (MGA), composée de microsphères de collagène bioactivées par des acides nucléiques, servant de support adapté à la survie et l'intégration des CSM, tout en permettant une libération contrôlée de molécules capables d'induire la différenciation contrôlée des CSM.

Ce manuscrit est organisé autour de deux parties principales. La première partie présente l'état de l'art en matière de régénération du cartilage et de tous les constituants nous permettant d'élaborer notre système, appelé de matrice génétiquement activée. Une revue focalisée sur les interactions entre les biomolécules et les matrices de biomatériaux, appliqués à l'ingénierie du cartilage, viendra compléter cette partie introductive. Les vecteurs synthétiques utilisés pour la transfection des CSM et l'intérêt de leur association à des biomatériaux supports seront illustrés par une description des systèmes les plus récemment développés dans ce domaine. Une courte section fera le lien entre les travaux précédents réalisés au laboratoire et ceux réalisés au cours de cette thèse.

La deuxième partie, intitulée travaux de thèse, est articulée autour de deux chapitres. Un premier chapitre consacré à l'étude des différents vecteurs d'acides nucléiques potentiellement applicables à notre projet afin d'identifier le plus pertinent. Le deuxième chapitre est consacré à l'étude et l'amélioration des vecteurs d'acides nucléiques choisis pour permettre leur association avec les microsphères poreuses afin d'élaborer la MGA.

Enfin, la discussion générale reprendra les résultats les plus significatifs de la thèse afin de conclure, au regard de la bibliographie et de la pertinence de cette matrice génétiquement activée quant à son utilisation pour des applications de régénération tissulaire et en particulier du cartilage.

ETAT DE L'ART

I L'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire

I.1 Le cartilage articulaire

Chez l'Homme, le cartilage hyalin articulaire est un tissu conjonctif que l'on retrouve à la surface des articulations mobiles possédant une capsule synoviale. C'est un tissu hautement spécialisé doté d'un faible coefficient de frottement et capable de résister à un environnement biomécanique difficile. Sa fonction première est d'absorber les chocs mécaniques et de faciliter la transmission de charges lors des mouvements articulaires grâce à la structure et la composition de sa matrice extracellulaire (MEC).

I.1.1 La composition et l'organisation du tissu

I.1.1.1 L'Organisation

Le cartilage articulaire de l'adulte s'étend de la surface articulaire jusqu'à l'os sous-chondral. Il est constitué de plusieurs zones qui présentent une hétérogénéité dans la composition macromoléculaire de la MEC et l'organisation des fibres de collagène, dans la taille et la forme des chondrocytes et leur activité métabolique (Figure 1) [6-9].

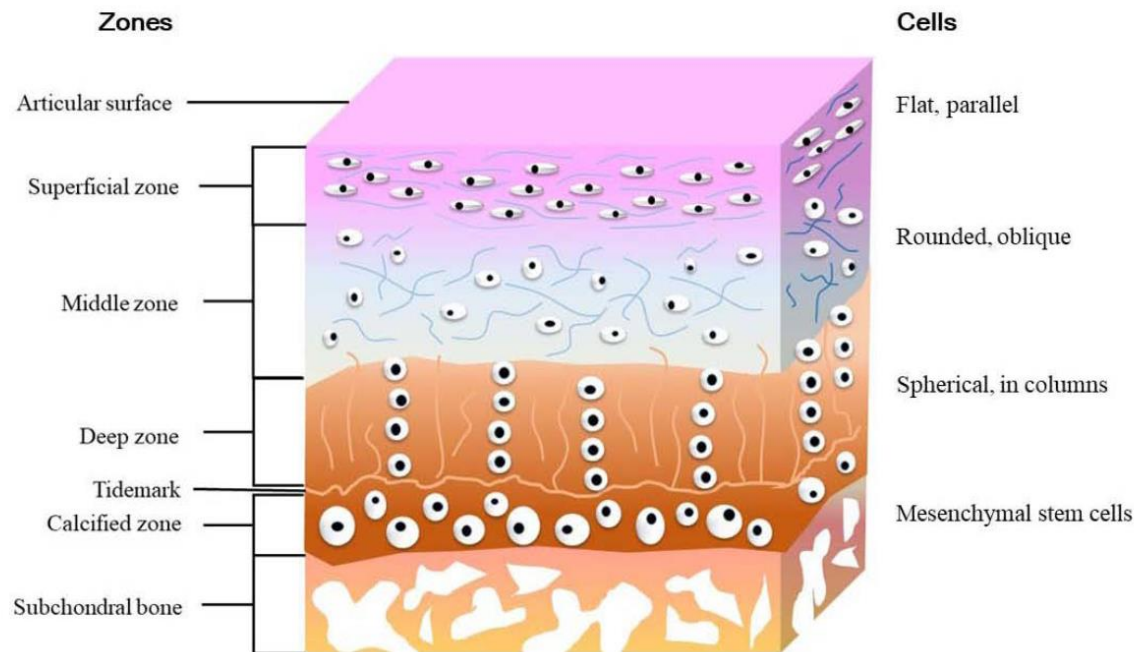


Figure 1 : Organisation structurelle du cartilage articulaire mature (Selon Ng, Hooi Yee *et al.* [10]).

- La **zone superficielle** représente 10 à 20 % de l'épaisseur et contient la densité la plus importante de chondrocytes. Dans cette zone, les chondrocytes ont une forme aplatie et sécrètent majoritairement des collagènes de type II et IX organisés en fibres fines et compactes, parallèles à la surface articulaire. Cette organisation permet une résistance accrue aux forces de cisaillement et permet une meilleure répartition des forces de compression. A la surface articulaire, la couche superficielle est recouverte d'une fine couche protectrice acellulaire dénommée « lamina splendia » permettant l'accroche des macromolécules telles que l'acide hyaluronique présent dans le liquide synovial [11].
- La **zone intermédiaire** représente 40 à 60 % du cartilage articulaire. Dans cette zone, les chondrocytes sont moins nombreux et de forme sphérique ; ils sécrètent du collagène de type II dont les fibres ont une orientation oblique, assurant une résistance importante aux forces de compression.
- La **zone profonde** représente 30 % de l'épaisseur. Les chondrocytes sont organisés en colonnes et sécrètent du collagène de type II formant des fibres épaisses (70 à 120 nm de diamètre) avec une orientation perpendiculaire à la surface permettant là aussi d'absorber efficacement les chocs et forces de compression. C'est aussi la partie du cartilage la plus riche en protéoglycanes qui participent également aux propriétés mécaniques du cartilage.

- La **zone calcifiée** représente 5 à 10 % de l'épaisseur totale du cartilage. Elle est composée de chondrocytes hypertrophiques caractérisés par une faible activité métabolique et la sécrétion de collagène de type X formant un réseau de fibres perpendiculaires à la surface de l'articulation.

L'interface entre la zone calcifiée et la zone profonde ou « Tide mark » permet de limiter l'invasion des vaisseaux sanguins dans la couche profonde du cartilage articulaire tout en laissant passer les nutriments essentiels au développement des chondrocytes. La zone calcifiée est en contact direct avec l'os sous-chondral.

I.1.1.2 Les chondrocytes

Les chondrocytes sont l'unique composant cellulaire mature du cartilage, qui dérive des cellules stromales mésenchymateuses (CSMs). Ces cellules de forme arrondie mesurant entre 20 et 40 micromètres de diamètre, constituent environ 2 % du volume total du cartilage articulaire (Figure 2). Le chondrocyte établit un microenvironnement spécialisé par la sécrétion de la MEC. Ce microenvironnement isole le chondrocyte dans sa propre matrice et empêche ainsi toute migration vers les zones adjacentes du cartilage. Le chondrocyte assure l'homéostasie du cartilage en contribuant à la fois à la synthèse et la dégradation des composants de la MEC. Chez l'homme, on distingue trois types de cartilage, selon la nature de la matrice extracellulaire. Le cartilage hyalin, le plus abondant, il est constitué d'une MEC riche en collagènes et protéoglycane, ce qui lui confère la capacité d'amortir les chocs au niveau des surfaces articulaires. Le fibrocartilage, c'est un intermédiaire entre un tissu conjonctif et un cartilage hyalin. Il est riche en fibres de collagène qui lui confèrent une très grande résistance aux forces de tractions et compressions. Le cartilage élastique, il est caractérisé par la présence de fibres élastiques et constitue, par exemple, le pavillon de l'oreille.

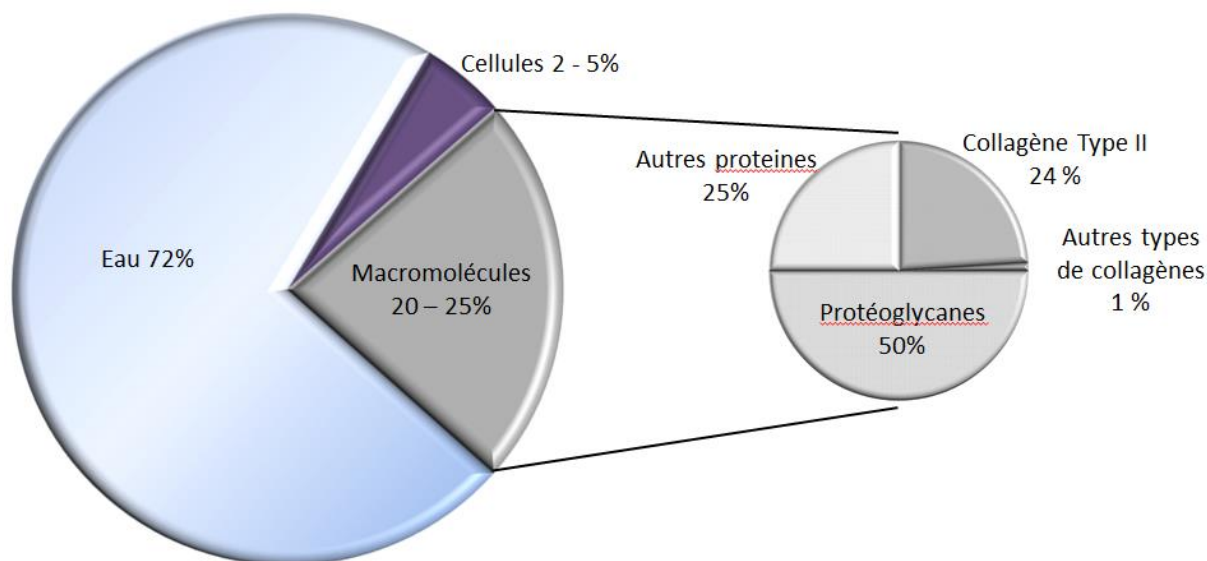


Figure 2 : Les différents constituants du cartilage hyalin (selon Ehab Kheir and David Shaw) [12].

I.1.1.3 Matrice extracellulaire

Les collagènes sont les principaux constituants protéiques du cartilage articulaire (Figure 2 et 3). Ils sont sécrétés par les chondrocytes sous forme de pro-collagènes, qui sont ensuite clivés dans la MEC en pro-peptides C et N sous l'action des enzymes pro-collagène-C et protéinase-N [13] [14]. Par la suite, les molécules co-polymérisent pour former une structure fibrillaire qui est stabilisée par des réticulations covalentes entre les chaînes de collagène adjacentes [15]. Ce réseau de fibrilles dont la taille peut varier entre 20 nm et 120 nm en fonction de la zone permet une résistance importante aux forces de traction et de compression [11, 16]. Il existe plusieurs types de collagènes dans le cartilage articulaire, ces collagènes peuvent être fibrillaires, microfibrillaires ou non fibrillaires. La forme majoritaire du collagène dans ce cartilage est le collagène fibrillaire de type II qui représente environ 90% des fibrilles totales. On peut différencier le **collagène de type IIA** exprimé par les CSMs et les pré-chondrocytes du **collagène de type IIB** exprimé par les chondrocytes matures. Ce collagène IIB est la principale molécule responsable de la structure du cartilage impliquée dans le maintien de son intégrité [17, 18]. Le **collagène de type XI**, qui constitue 1 à 2% du collagène total, est associé aux fibres de collagène II et pourrait être impliqué dans la régulation de leurs tailles et les interactions physiques avec les protéoglycanes [19, 20]. Les fibrilles de collagène II et XI sont reliées entre elles de manière covalente par des fibres de **collagène de type IX** qui

représentent environ 1% du collagène total [21, 22]. Les deux collagènes articulaires non fibrillaires sont les collagènes IV et X. Le collagène de type IV se retrouve dans la matrice péri-cellulaire et joue un rôle important dans le maintien du phénotype chondrocytaire [23]. Le **collagène de type X** quant à lui représente 1% de tous les collagènes du cartilage et il est majoritairement présent dans la zone de calcification du cartilage articulaire et au niveau de la plaque de croissance entourant les chondrocytes hypertrophiques. Ce collagène est synthétisé par les chondrocytes hypertrophiques et est donc un marqueur important du stade terminal de la différenciation chondrocytaire hypertrophique. Il joue un rôle primordial dans le processus de l'ossification ostéochondrale [24-26].

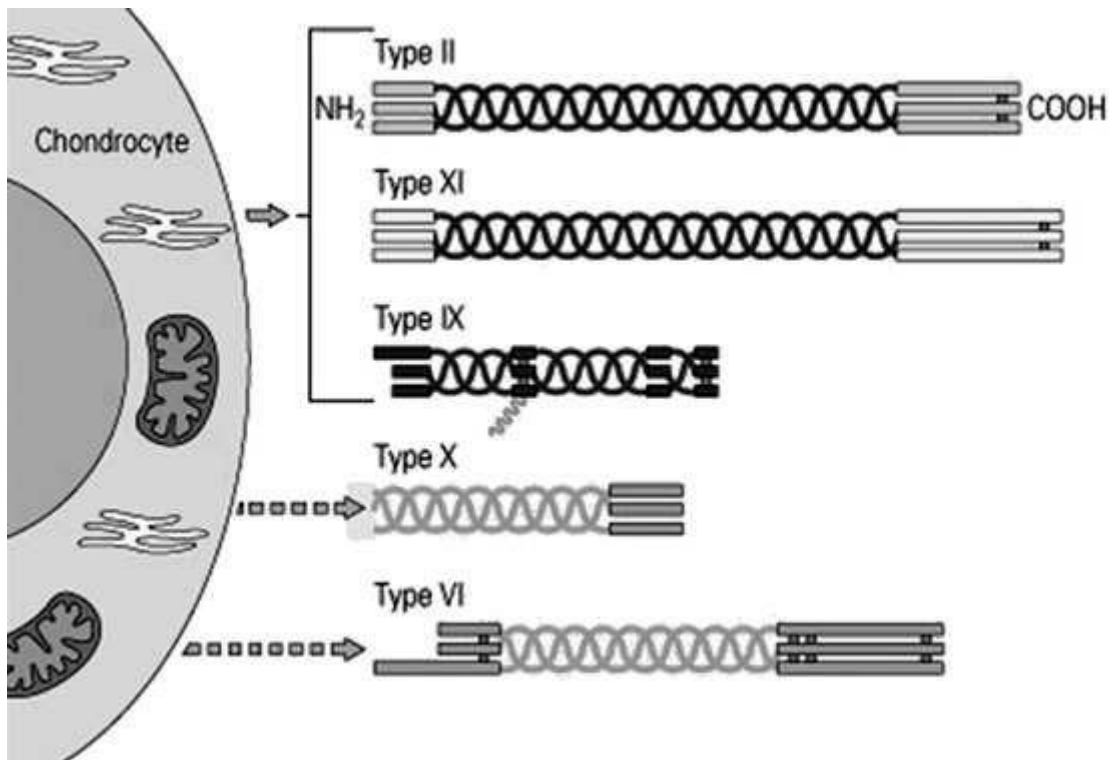


Figure 3 : Différents types de collagène trouvés dans la matrice du cartilage articulaire (Selon Jc Goebel).

Les protéoglycanes (PG) qui représentent environ 50% du poids sec de la MEC, sont une famille diversifiée de molécules fortement hydrophiles sécrétées par les chondrocytes. L'**aggrécane** est le PG majeur du cartilage. Il est constitué d'une protéine centrale sur laquelle sont liés de manière covalente des glycosaminoglycanes (GAGs). Cette glycomolécule possède

des groupements carboxyles ou sulfates qui lui confèrent une charge négative, lui permettant de capter les ions positifs de la matrice tels que Ca^{2+} et Na^{+} et d'attirer par osmolarité les molécules d'eau [11]. Les PG sont présentes sous la forme de monomères solubles (40% des PG totaux) ou sous forme d'agrégats associés aux fibres de collagène (50 à 58 % du total des PG) [27, 28]. Les PG sous forme d'agrégats, tels que l'aggrécane et le versican, sont des supramolécules contenant jusqu'à 50 monomères reliés de manière non covalente au squelette d'acide hyaluronique (AH) (Figure 4) qui est lui-même relié aux chondrocytes par l'intermédiaire des récepteurs membranaires CD44 [29]. C'est cette structure combinée qui permet l'importante hydratation de l'aggrécane (qui retient 30% de l'eau totale du cartilage). L'aggrécane représente la majorité des molécules de PG du cartilage articulaire, ce qui explique son rôle important dans la résistance du cartilage articulaire aux forces de compression. Bien que minoritaires, il existe d'autres PG dans le cartilage articulaire. Le principal est le **versican** ; il participe à l'organisation de la matrice au cours de la chondrogénèse et à la résistance du cartilage articulaire aux forces de compression, mais dans une moindre mesure que l'aggrécane, étant donné qu'il est très peu présent [30]. Le **Perlecan** est un PG majoritairement situé autour des chondrocytes ; il favorise leur attachement à la matrice. Il agit également comme modulateur de l'activité de certains facteurs de croissance [31]. Le **Biglycan**, la **Decorine**, la **Fibromoduline** et le **Luminican** font partie de la famille des petites protéines répétées riches en leucine et protéoglycanes. Ces molécules jouent un rôle important dans l'assemblage et la stabilisation de la matrice et la régulation métabolique du cartilage articulaire, comme la fibrillogenèse du collagène et la liaison des molécules sur la matrice du cartilage [27, 32-34].

Knee Articular Cartilage Macromolecular Organization

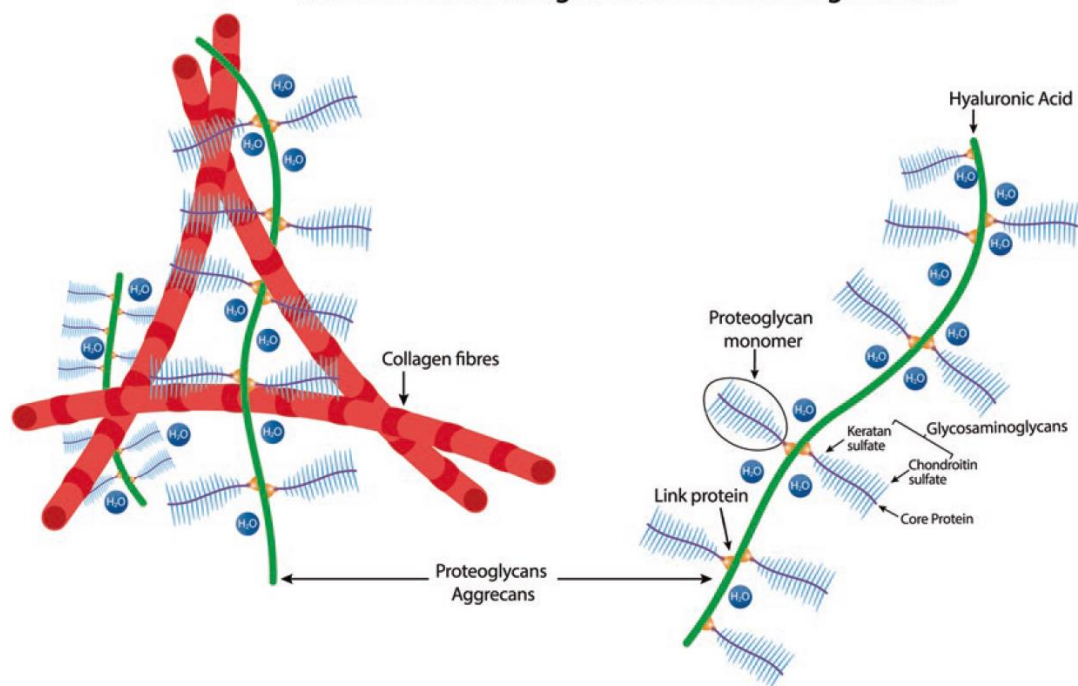


Figure 4: Organisation macromoléculaire du cartilage articulaire (Selon Gahunia, H.K., *et al.*) [28].

Plusieurs autres **protéines** et **glycoprotéines** telles que la protéine **CMP**, la protéine **Gla** matricielle ou l'**annexine V** sont également identifiées pour médier l'attachement des collagènes aux chondrocytes ou à l'aggrécane et ainsi stabiliser la matrice du cartilage.

La protéine CMP (« Cartilage Matrix Protein »), également appelée matriline-1, est une protéine de 148 kDa spécifique du cartilage. La CMP est distribuée dans le cartilage articulaire et joue un rôle dans la structure de la MEC ; elle se lie aux fibrilles de collagène de type II et interagit avec l'aggrécane [35, 36]. **La MGP** (« Matrix Gla protein ») est une protéine de 10 à 14 kDa. Dans le cartilage adulte, cette protéine est retrouvée dans les chondrocytes ou au niveau de la zone péri-cellulaire [37]. La MGP se lie à la surface des chondrocytes principalement par l'intermédiaire du récepteur de surface intégrine $\beta 1$ (ITG $\beta 1$) et joue un rôle important en tant qu'inhibiteur de la calcification du cartilage [38]. **L'annexine V** est une protéine de 31kDa présente à la surface des chondrocytes. Cette protéine est impliquée dans l'association du collagène II aux chondrocytes via son interaction avec le télépeptide N du collagène II [39, 40].

Les glycoprotéines qui représentent entre 2 et 5% de la MEC sont également impliquées dans la régulation et le métabolisme de la MEC. En particulier la protéine COMP (« Cartilage Oligomeric Matrix Protein ») qui peut interagir avec plusieurs molécules de la MEC ainsi

qu'avec certains récepteurs de surface des chondrocytes. Elle est impliquée dans l'ancrage des chondrocytes et participe également à la formation de la MEC au cours de la chondrogenèse [41]. A l'âge adulte, cette glycoprotéine joue aussi un rôle sur la prévention de la vascularisation du cartilage [42].

I.1.2 La chondrogenèse

La chondrogenèse correspond au cycle de formation du cartilage à partir des cellules souches du mésenchyme qui se différencient en chondrocytes. Ce processus est médié par des interactions entre les récepteurs cellulaires, les facteurs de croissance et les protéines de la matrice environnante.

I.1.2.1 Les cellules stromales mésenchymateuses

D'après la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ISCT), les CSM sont définies par leur capacité d'adhérence au plastique, l'expression des marqueurs phénotypiques CD73, CD90, CD105 et l'absence d'expression des marqueurs hématopoïétiques CD34, CD45, CD19, CD11b, « Human leukocyte antigen » -DR (HLA-DR) et par leur potentiel de différenciation dans les trois lignages mésenchymateux : ostéoblastique, adipocytaire et chondrocytaire. [43, 44]. Ces cellules sont présentes dans l'organisme adulte et participent au renouvellement des tissus tout au long de la vie. Elles peuvent être isolées à partir de nombreux tissus : la moelle osseuse, le tissu adipeux, le liquide amniotique, le sang de cordon, les tissus fœtaux, le muscle squelettique et la pulpe dentaire. Elles résident dans des compartiments spécialisés appelés « niches », qui permettent de maintenir leur état indifférencié [45-51].

L'intérêt des CSM en tant que cellules à potentiel thérapeutique repose sur la facilité d'accès pour l'isolement (notamment pour les CSM du tissu adipeux ou du cordon ombilical), leur potentiel d'expansion en culture, leur plasticité, leurs propriétés paracrines incluant des fonctions immunosuppressives, anti-fibrotiques, anti-apoptotiques, pro-angiogéniques, leur capacité de « homing » vers les sites de lésions tissulaires [45]. Dans le domaine de l'ingénierie du cartilage, ces cellules sont largement utilisées pour leur capacité de différenciation dans le lignage chondrocytaire [52].

I.1.2.2 La différenciation chondrocytaire

Chaque stade de la chondrogenèse est caractérisé par des modifications de la prolifération et de la morphologie cellulaire mais aussi par la nature et la quantité des composants de la MEC sécrétés. Brièvement, la chondrogenèse commence par l'engagement des CSM en cellules chondroprogénitrices et l'expression de *Sox9*, le facteur de transcription clé qui gouverne le processus (Figure 5) [53]. La deuxième phase de la chondrogenèse est la condensation de ces cellules qui va favoriser les interactions cellules-cellules et induire un changement de leur morphologie. Les cellules chondroprogénitrices vont ensuite acquérir une forme sphérique, se différencier en chondroblastes qui sont encore capables de proliférer et vont sécréter une matrice spécifique [54]. Viens ensuite l'étape de maturation, pendant laquelle les cellules alors devenues des chondrocytes, sont encastrées dans leur matrice et expriment les facteurs *Sox9*, *Sox5* et *Sox6* essentiels à la sécrétion des collagènes de type II, IX, XI et d'aggrécans [55, 56]. A ce stade, une partie des chondrocytes vont entrer dans une phase de quiescence permettant de maintenir et renouveler la MEC, tandis qu'une autre partie des chondrocytes vont entrer dans un cycle de maturation pour atteindre le stade de chondrocytes hypertrophiques.

La dernière phase de la chondrogenèse est l'hypertrophie chondrocytaire, une étape nécessaire pour l'ossification enchondrale. L'hypertrophie des chondrocytes est principalement déclenchée par la sur-expression du facteur de transcription *Runx2* [57]. Ces chondrocytes sont caractérisés par une taille importante et la sécrétion de collagènes de type I, X, de la phosphatase alcaline, du facteur VEGF (« Vascular Endothelial Growth Factor ») et des métalloprotéases telles que MMP-13 qui sont responsables du remodelage et de la vascularisation de la MEC. C'est l'expression de ces gènes spécifiques qui gouverne le processus de différenciation des CSMs jusqu'au stade terminal du chondrocyte hypertrophique (Figure 5) [58]. Au cours du développement des os longs, les chondrocytes hypertrophiques situés dans la plaque de croissance entrent en apoptose et laissent place aux ostéoblastes qui vont minéraliser la matrice cartilagineuse sécrétée par les chondrocytes hypertrophiques et aux ostéoclastes qui vont remodeler la MEC pour former l'os.

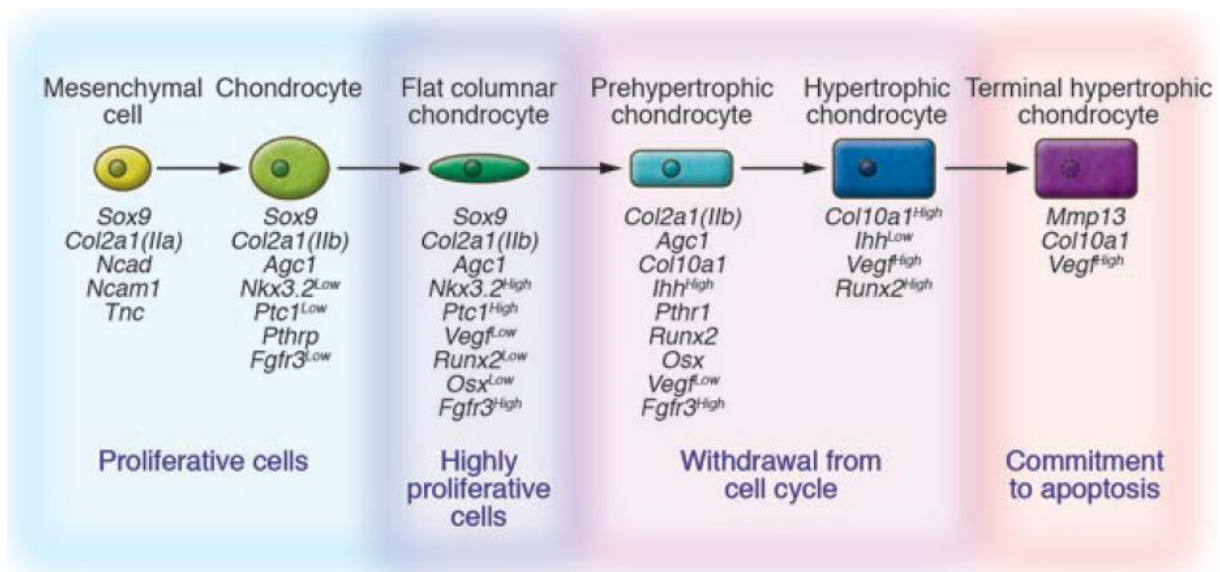


Figure 5 : Les étapes de la différenciation des CSM en chondrocytes (D'après Michael J. Zuscik *et al.*) [58].

I.2 Pathologies articulaires et traitements actuels

Le cartilage articulaire a pour fonction principale de diminuer les forces de friction induites par le mouvement articulaire. Il permet également d'absorber les chocs et d'assurer la répartition des charges soutenues par les os. En conditions normales, il existe un équilibre entre la synthèse et la dégradation de la MEC par les chondrocytes. Cependant, diverses causes peuvent perturber cet équilibre et entraîner une érosion de la MEC plus importante que la synthèse. C'est le cas des lésions post-traumatiques qui déstabilisent la structure du collagène ou provoquent un mauvais positionnement de l'articulation. Il existe aussi diverses maladies ostéo-articulaires telles que l'arthrose ou la polyarthrite rhumatoïde qui sont également responsables de la dégradation du cartilage articulaire. Chez l'adulte, la capacité du cartilage hyalin à se réparer est fortement limitée par le faible rapport chondrocytes/MEC et par l'absence de vascularisation qui restreint l'accès aux cellules stromales mésenchymateuses et aux facteurs humoraux pro-régénératifs. Une dégradation importante de cartilage conduit généralement à un dysfonctionnement de l'articulation accompagné de douleurs chroniques qui affectent considérablement le statut psychosocial des patients [59]. Actuellement, il existe des traitements symptomatiques, tels que l'injection d'acide hyaluronique pour lubrifier l'articulation et favoriser le mouvement ou des anti-inflammatoires pour limiter l'inflammation

et une dégradation de la matrice, mais ces traitements ne permettent pas la régénération du tissu [60]. D'un autre côté, plusieurs stratégies chirurgicales et thérapies cellulaires, visant la réparation du cartilage sont développées ou en cours de développement avec des résultats prometteurs et parfois une amélioration de la qualité de vie des patients [61-66].

I.2.1 Techniques chirurgicales

Dans l'objectif de réparer le cartilage chez l'adulte, plusieurs techniques chirurgicales ont été développées. Ces méthodes reposent principalement sur l'amplification des mécanismes de réparations naturels ou sur l'apport de chondrocytes autologues afin d'augmenter la sécrétion de la MEC sur le site de la lésion.

I.2.1.1 Le débridement

La technique du débridement consiste à retirer chirurgicalement le cartilage endommagé et le tissu inflammatoire potentiellement délétère pour le cartilage sain [67]. Cependant, les résultats obtenus avec cette technique sont variés et dépendent du type de lésion. Le débridement pratiqué sur des lésions focales de petite taille semble efficace et permet une amélioration des symptômes sur plus de 5 ans, alors que cette méthode ne semble pas améliorer la condition des patients atteints de lésions plus étendues du cartilage, telles que celles observées dans l'arthrose [61, 68-70].

I.2.1.2 Les microfractures

La technique des microfractures vise à percer la plaque sous-chondrale afin de permettre le recrutement sur le site de la lésion, des cellules chondroprogénitrices présentes dans la moelle osseuse dans l'objectif de réparer le cartilage [71]. Cependant, ces procédures aboutissent généralement à la formation d'un fibrocartilage composé principalement de collagènes de type I qui ne possèdent pas les mêmes propriétés biophysiques que le cartilage hyalin [72, 73]. Cela entraîne une dégradation accélérée de la néo-matrice généralement responsable d'un mauvais pronostic sur les résultats à long terme [62, 74].

I.2.1.3 La Mosaïcplastie

La mosaïcplastie est une technique qui consiste à prélever des petites « carottes » de cartilage articulaire avec l'os sous-chondral sous-jacent, à des endroits peu sollicités de l'articulation pour ensuite les greffer sur le site de la lésion. Cette méthode a montré des résultats intéressants et permet d'améliorer les scores ICRS (Clinical Cartilage Injury Evaluation System) et Lysholm des patients sur au moins 10 ans [75-78]. Cependant, les sites donneurs peuvent être source de morbidité et la taille des lésions traitées est limitée à une aire comprise entre 1 et 4cm². De plus, l'épaisseur de cartilage des greffons n'est parfois pas suffisante pour reconstituer celui de la lésion [64, 79].

I.2.1.4 Greffe de chondrocytes autologues

L'implantation de chondrocytes autologues (ACI) nécessite trois étapes importantes. Dans un premier temps, une biopsie de cartilage est réalisée sur une zone non porteuse de l'articulation afin de prélever et d'isoler les chondrocytes. Une fois isolés, les chondrocytes sont amplifiés pendant une étape de culture *in vitro*. Après plusieurs jours d'amplification cellulaire, une chirurgie est réalisée afin de retirer le cartilage abimé ou calcifié, nettoyer la lésion avant d'y placer les chondrocytes et de les recouvrir par une membrane de périoste prélevée chez le même patient et de la suturer aux bords du cartilage encore intacts. Dans certains cas, la suture d'une membrane de collagène d'origine porcine permet de retenir la suspension de chondrocytes injectée directement entre la lésion et la membrane est utilisée [65, 80]. Cependant, les chondrocytes ont tendance à se différencier pendant l'étape de culture *in vitro* et ne récupèrent pas totalement le phénotype de chondrocytes matures une fois injectés ce qui peut aboutir à la formation d'un fibrocartilage ou d'un cartilage hypertrophique [65, 66]. De plus c'est une méthode longue et coûteuse qui nécessite plusieurs étapes dont la chirurgie.

I.2.2 Les thérapies cellulaires paracrines

L'administration de CSM *in vivo* a montré des résultats prometteurs dans la stimulation de la régénération du cartilage articulaire et dans le traitement de l'arthrose [81-83]. Bien que les CSM aient la capacité de se différencier en chondrocytes, ce qui représente une grande promesse dans le domaine de la médecine régénérative du cartilage, il est également proposé qu'elles possèdent un effet thérapeutique obtenu grâce à un mécanisme paracrine, connu sous le nom d'activité trophique [84]. En effet, il existe de plus en plus de preuves que les CSM injectés *in vivo* exercent un effet paracrine via un sécrétome contenant un éventail de médiateurs de réparation, de facteurs de croissance, de cytokines et d'autres molécules qui stimulent une réponse du tissu hôte [85]. De plus ces facteurs présentent des propriétés immuno-régulatrices et pro-régénératives potentiellement bénéfiques pour les pathologies ostéoarticulaires [86-89]. L'injection des CSM dans l'articulation font déjà l'objet de plusieurs essais cliniques en phase I et II pour le traitement de pathologies ostéoarticulaire et en particulier de l'arthrose [90-92]. Ces études cliniques ont déjà montré une évolution positive des scores VAS et WOMAC chez les patients, après l'injection de différentes sources de CSM et les propriétés immunomodulatrices des CSM, expliqueraient probablement certaines des données [90, 93, 94]. Dans l'objectif de bénéficier des effets paracrines des CSM et de s'affranchir des risques de réactions immunitaires liés à l'injection des cellules, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont également obtenus des résultats prometteurs en utilisant le sécrétome des CSM contenu dans les vésicules extracellulaires (EV) [95-97]. Cependant plusieurs paramètres restent encore à étudier et optimiser pour définir une stratégie efficace de réparation du cartilage en clinique basé sur l'utilisation de EV [95].

Des études *in vitro* ont également montré que les facteurs paracrines libérés par les chondrocytes ont un effet positif sur la différenciation chondrogénique des CSM et permettraient le remodelage et la synthèse de la MEC et la prolifération cellulaire [98, 99]. De plus, les chondrocytes articulaires sécrètent des parathyroïdes protéine liée aux hormones (PTHrP) qui inhibent l'hypertrophie des CSM et des chondrocytes et par conséquent favorise la réparation du cartilage [100, 101]

Cependant ces stratégies ne permettent pas pour l'instant, une réparation totale et durable du cartilage articulaire. Dans la partie suivante, nous allons nous focaliser sur les approches d'ingénierie tissulaire (IT) du cartilage. Dans un premier temps, nous allons décrire

les principaux mécanismes moléculaires impliqués dans l'ingénierie tissulaire (IT) du cartilage et les principales stratégies de réparation de ce tissu, ainsi que leurs limites.

I.2.3 L'ingénierie tissulaire du cartilage

L'IT combine les principes de l'ingénierie et de la biologie pour la régénération fonctionnelle, le maintien et l'amélioration du tissu endommagé. Généralement, un système d'IT se compose de trois éléments : une matrice, des cellules et des facteurs biologiques [102].

I.2.3.1 Compréhension des mécanismes moléculaires associées à la thérapie du cartilage

I.2.3.1.1 L'induction de la chondrogenèse

Comme on l'a vu précédemment, les CSM ont la capacité de se différencier en chondrocytes suite à l'activation de diverses cascades de signalisation conduisant à une augmentation de l'expression du facteur de transcription *Sox9* initiateur de la chondrogenèse. La majorité des stratégies d'IT du cartilage sont basées sur l'utilisation des CSM avec l'objectif de reproduire la cascade signalétique capable d'induire la chondrogenèse afin d'obtenir un tissu cartilagineux reproduisant les caractéristiques structurelles, moléculaires et biomécaniques du cartilage natif. Dans la littérature, plusieurs facteurs biologiques spécifiques ont été décrits comme capables d'induire et de contrôler la différenciation chondrocytaire des CMS. Parmi les plus efficaces et les plus largement utilisés dans la formation du cartilage, on peut citer les membres de la superfamille « Transforming Growth Factor β » (TGF β). Cette superfamille TGF β comprend 33 facteurs de croissance structurellement apparentés et utilisant des mécanismes similaires de transduction de signaux intervenant au cours de l'embryogenèse et le maintien de l'homéostasie chez l'adulte [103]. Cette superfamille est divisée en quatre sous-familles et parmi elles, les isoformes du TGF β et les BMP sont en capacité d'induire la chondrogenèse des CSM. Au cours du processus d'ossification endochondrale, les signaux **BMP** favorisent également l'activité catabolique et la différenciation hypertrophique alors que

les signaux **TGF β** préviennent cette différenciation et contribuent au maintien du stade quiescent des chondrocytes (Figure 6) [104]. Il existe 3 isoformes TGF β 1, 2 et 3 qui sont toutes les 3 capables d'induire la chondrogénèse. Cependant, **TGF β 2 et 3** semblent plus efficaces que **TGF β 1** selon une étude de Barry *et al.* [105]. De manière intéressante, il a été démontré que l'induction de la chondrogénèse par le TGF β 3 est potentialisée par l'ajout de **BMP 2, 4 et 6** [106, 107]. Cependant, l'utilisation d'un seul facteur de croissance ou une combinaison de facteurs n'est pas suffisante pour contrôler la chondrogénèse et permettre de maintenir les chondrocytes au stade mature caractéristique du cartilage articulaire.

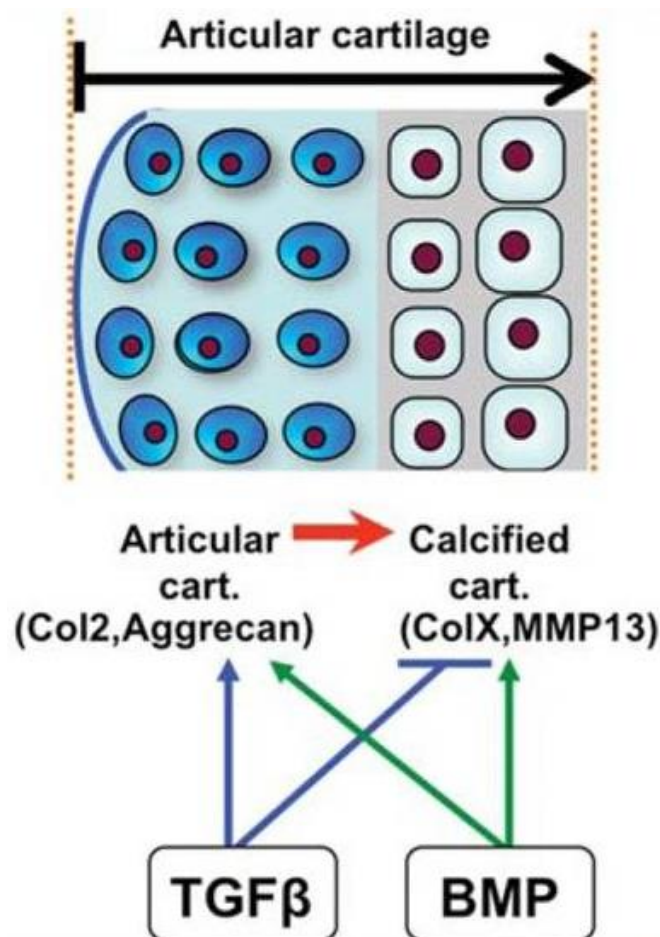


Figure 6 : Rôle des signaux TGF β et BMP au cours de la chondrogénèse (selon Wang, W., D. Rigueur *et al.*) [104].

I.2.3.1.2 Le problème de l'hypertrophie chondrocytaire

Bien qu'on soit en mesure d'induire une différenciation efficace des CSM en chondrocytes matures capables de sécréter les protéines de la MEC du cartilage, les études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les chondrocytes évoluent rapidement vers le stade hypertrophique non souhaité pour l'IT du cartilage [107, 108]. Il faut noter qu'une hypertrophie du périoste est aussi observée dans 36 % des greffes de chondrocytes autologues [109, 110]. La différenciation hypertrophique des chondrocytes est marquée par une augmentation de plus de dix fois du volume cellulaire et un remodelage structurel de la MEC qui indique une différenciation plus poussée vers la minéralisation du cartilage et la formation osseuse endochondrale. De plus, les chondrocytes hypertrophiques sécrètent une matrice cartilagineuse calcifiée qui ne possède pas les mêmes propriétés mécaniques que le cartilage hyalin et la même résistance aux forces de compression et de cisaillement subies par ce tissu. C'est actuellement une des principales limitations des thérapies de régénération du cartilage. Les principaux facteurs de transcription régulant l'hypertrophie chondrocytaire sont les facteurs **Runx2** (« Runt-related transcription factor ») et **Mef2c** (« Myocyte Enhancer Factor-2C ») qui régulent l'expression des marqueurs de la différenciation terminale, **ColXa1** (« Collagen Type X Alpha 1 Chain »), **Ihh** (« Indian Hedgehog Signaling Molecule »), **Mmp13** (Matrix Metallopeptidase 13), **Vegf** (« Vascular Endothelial Growth Factor » A), **Ap** (« Alkaline Phosphatase »), **Oc** (ostéocalcine) et **Opn** (ostéopontine) [111, 112] (Figure 7). Le facteur **Sox9** est responsable de la régulation négative du facteur de transcription **Runx2** [113]. **Mef2c** est un facteur de transcription principalement connu pour réguler le développement musculaire et cardiovasculaire mais il a été également démontré qu'il intervient dans le contrôle du développement osseux [114]. Il est en capacité de réguler l'expression des gènes hypertrophiques des chondrocytes de manière directe, ou indirectement par l'intermédiaire du facteur de transcription **Runx2**. **Runx2** ou **Cbfa1** (« core-binding factor subunit alpha-1 ») fait partie de la famille des facteurs de transcription RUNX et possède un domaine de liaison à l'ADN Runt. **Runx2** joue un rôle essentiel dans la différenciation et le développement de plusieurs tissus et organes. C'est aussi le principal régulateur de l'ostéogenèse ; il est requis à la fois pour l'engagement des progéniteurs squelettiques et pour la différenciation ultérieure des ostéoprogéniteurs [112, 115-119]. En effet, les MMP13 dégradent plusieurs composants de la MEC tels que le collagène II qui va être remplacé par le collagène X qui sert de support pour la

minéralisation. L'AP participe à la minéralisation du tissu en augmentant la concentration locale de phosphate inorganique, un promoteur de la minéralisation et en réduisant la concentration de pyrophosphate extracellulaire, un inhibiteur de la formation minérale [26, 120-122]. Chez les chondrocytes, *Runx2* est donc principalement impliqué dans la maturation hypertrophique ce qui en fait la principale cible des stratégies anti-hypertrophiques. Différentes études ont déjà montré l'effet anti-hypertrophique de plusieurs protéines capables de réguler directement ou indirectement *Runx2*. La *PTHrP*, (Parathyroid Hormone-related Protein) appartenant à la famille des hormones parathyroïdiennes (PTH), permet d'inhiber la différenciation terminale des chondrocytes par différentes voies. Elle agit principalement par l'activation de *Sox9* et l'activation des facteurs *Nkx3.2* et *HDAC4* (Histone Deacetylase 4) [112, 123, 124]. Le $TGF\beta$, via la voie de signalisation *Smad3* joue un rôle clé dans l'activation transcriptionnelle de *Sox9* et la déphosphorylation de *HDAC4* avec pour conséquence, l'inhibition de *Runx2* [125]. Mello et Tuan ont montré que le $TGF-\beta 1$ inhibe le stade hypertrophique de chondrocytes induits à se différencier à partir de cellules dérivées d'embryons de poulet, tandis que l'hormone thyroïdienne triiodothyronine (T3) stimule l'hypertrophie et l'apoptose [126]. Les BMP 4, 7 et 13 sont également en capacité de réguler négativement l'hypertrophie chondrocytaire [127-129]. Cet effet anti-hypertrophique de ces BMP pourrait provenir d'une boucle de régulation positive entre *Sox9* et *Nkx3.2* induite par les signaux des protéines BMP et SHH (« Sonic hedgehog ») et par conséquent l'inhibition de *Runx2* [112, 130]. Cependant, d'autres BMPs, telles que la BMP-2 sont pro-hypertrophiques, notamment par la phosphorylation du complexe *Smad 1/5/8* qui active l'expression du facteur *Runx2* [112, 128].

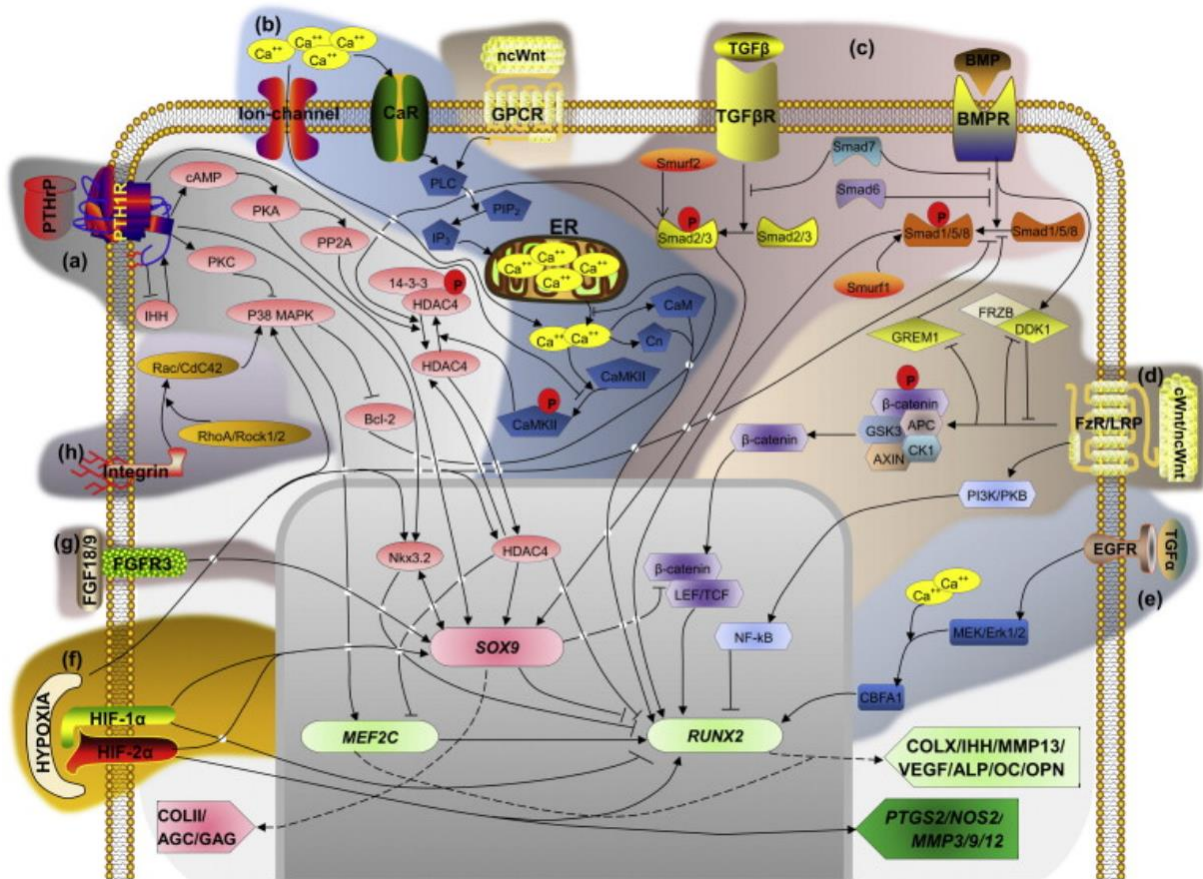


Figure 7 : Les voies de signalisation de l'hypertrophie des chondrocytes (Selon Song Chen *et al.*) [112].

(a) : signalisation PTHrP/IHH, (b) : signalisation des canaux ioniques calciques, (c) : signalisation TGF-β/BMP, (d) : signalisation Wnt, (e) : signalisation MAPK (TGF-α), (f) : signalisation HIF, (g) signalisation FGF et (h) : signalisation intégrine. « P » représente la phosphorylation/déphosphorylation. « → » signifie « augmenter », « T » signifie « inhiber ».

Ces études nous montrent que l'expression des facteurs de transcription *Runx2* et *MEF2C* est essentielle pour l'induction de l'hypertrophie chondrocytaire. Dans le contexte de l'IT du cartilage, l'utilisation de la thérapie génique pour inhiber spécifiquement un de ces facteurs de transcription pourrait être une solution à la différenciation hypertrophique observée dans les approches basées sur la différenciation des CSMs. Etant donné que l'induction de l'hypertrophie par *MEF2C* est en partie due à sa capacité à **réguler l'expression de *Runx2***, cibler directement *Runx2* semble être une stratégie plus adaptée [114]. De plus il a déjà été montré que la maturation hypertrophique des chondrocytes est fortement perturbée et retardée

chez les souris déficientes pour le gène *Runx2* [131, 132]. Dans une stratégie d'IT, l'inhibition totale du gène *Runx2* peut aussi perturber la différenciation chondrocytaire des CSMs. Plusieurs études ont souligné un rôle important de *Runx2* dans les premières phases de la chondrogenèse et dans le développement du cartilage [133-136]. En revanche, la chondrogenèse des CSM n'est pas perturbée par l'inhibition transitoire de l'expression de *Runx2* [137]. Plus récemment, il a été démontré qu'une inhibition partielle de *Runx2* par l'utilisation de siRNA spécifiques pouvait diminuer l'expression des marqueurs hypertrophiques *in vitro* et diminuer la calcification *in vivo* [138]. Ces résultats suggèrent qu'une régulation de *Runx2* par une méthode de thérapie génique transitoire, après l'induction de la différenciation chondrocytaire de CSMs, pourrait réduire leur différenciation hypertrophique. Une telle stratégie pourrait améliorer les approches d'ingénierie de cartilage en favorisant le maintien des chondrocytes au stade mature, caractéristique du cartilage articulaire hyalin non calcifié.

I.2.3.2 La composante cellulaire

I.2.3.2.1 Les chondrocytes

En tant que principal type cellulaire résidant dans le cartilage articulaire et responsable de son maintien structurel et fonctionnel, les chondrocytes sont l'un des types cellulaires les plus largement utilisés pour les thérapies du cartilage. Plusieurs produits de thérapie du cartilage tels que Bioseed[®]-C, NeoCart[®] ou CaReS[®] sont déjà commercialisés ou en essais clinique de phase III [139-144]. Ces produits ont montré une amélioration générale des scores cliniques observés chez les patients, néanmoins les résultats sont souvent très différents entre les patients et certains traitements ne montrent pas d'améliorations significatives comparées aux techniques chirurgicales sans approche d'IT [139, 145]. On peut citer le cas du produit thérapeutique Hyalograft[®] qui a été retiré du marché en 2013 car la balance bénéfico-risque de ce produit n'était pas favorable au patient [146, 147]. De plus, l'utilisation des chondrocytes est confrontée à plusieurs défis notables tels qu'une faible efficacité d'isolement, un potentiel de prolifération limité et un phénomène de dédifférenciation rapide dans les cultures de chondrocytes en monocouche [148-150].

I.2.3.2.2 Les CSM

Afin d'éviter les inconvénients liés aux chondrocytes articulaires, plusieurs études se sont intéressées à l'utilisation de cellules souches. Parmi les différents types de cellules souches, les CSM, en particulier celles dérivées de la moelle osseuse, sont les plus étudiées en IT ostéocondrale en raison de leurs avantages tels qu'une relative facilité d'isolement et de prolifération, leur capacité à se différencier en cellules à la fois chondrogéniques et ostéogéniques, leur faible immunogénicité et l'absence de préoccupation éthique [150-153]. Les thérapies émergentes à base de CSM représentent une approche prometteuse pour la réparation du cartilage grâce à leur remarquable capacité de différenciation chondrogénique et pour contourner les limites des traitements cliniques actuels, en termes d'accessibilité et de minimisation de la morbidité des sites donneurs de chondrocytes. Cependant, cette stratégie thérapeutique est confrontée à la différenciation hypertrophique des CSM et la formation de fibrocartilage, ce qui limite pour l'instant les essais cliniques [153].

I.2.3.3 **Les matrices pour l'ingénierie du cartilage**

Il a été décrit que l'élaboration d'un système d'IT nécessite l'utilisation d'une matrice capable de fournir un environnement artificiel aux cellules. Cette matrice a pour principales fonctions d'assurer la survie et l'intégration des cellules au niveau des tissus hôtes, de fournir un environnement 3D requis pour la stabilité phénotypique des chondrocytes et dans certains cas, de favoriser la différenciation chondrogénique des CSM et la sécrétion de la MEC.

I.2.3.3.1 Les critères de sélection d'une matrice

Pour être efficace, une matrice adaptée à l'IT du cartilage doit respecter différents critères. Premièrement, la matrice doit permettre l'adhérence des cellules afin d'assurer leur **maintien** et leur **intégration dans les tissus hôtes** sur le site de la lésion. Comme María Satué

et al. l'ont montré, les CSM injectées directement dans l'articulation de rat restent majoritairement dans la cavité synoviale et peu de cellules sont présentes au niveau de la lésion. Elles peuvent même migrer dans les poumons d'un animal [154]. Ensuite, la matrice doit procurer une **structure en 3 dimensions (3D)** aux chondrocytes pour maintenir leur stabilité phénotypique, car les chondrocytes cultivés en monocouche se différencient et cessent de sécréter les éléments de la MEC [74, 155, 156]. L'**architecture de la matrice** et certains paramètres structuraux tels que la taille des pores ou l'alignement des fibres doivent également être finement contrôlés pour permettre d'une part, la circulation des éléments nutritifs et les échanges gazeux essentiels à la survie de cellules et d'autre part, la sécrétion des protéines de la MEC par les chondrocytes [157, 158]. Par exemple, Michele M. Nava *et al.* ont montré que la quantité de MEC sécrétée par des chondrocytes bovins était inversement corrélée à la taille des pores de la matrice particulière utilisée [157]. D'autre part, S. Camarero-Espinosa *et al.* ont montré qu'un alignement des fibres de poly(ester)urethane (PEU) de 60° induit une augmentation de l'expression du collagène II après différenciation chondrogénique de CSM de moelle osseuse humaines, comparé à un alignement des fibres de 90° [158]. Certains **paramètres mécaniques** tels que, la résistance à la traction ou la rigidité des fibres, sont également importants pour augmenter la chondrogenèse des CSM [159-161]. On sait aussi que les forces mécaniques exercées sur les CSM peuvent impacter leur différenciation chondrocytaire et modifier les profils d'expression des protéines de la MEC. C'est pourquoi, la matrice utilisée doit posséder des propriétés mécaniques similaires à celles du tissu natif afin de résister aux forces de compression dans l'articulation et d'exercer des contraintes physiques sur les chondrocytes similaires à celles exercés par le tissu natif [162-165]. Pour finir, les matériaux utilisés doivent être biocompatibles et biodégradables afin d'être remplacés graduellement par le nouveau tissu.

Dans ce sens, de nombreuses études se sont intéressées à l'utilisation et au développement de biomatériaux. D'après la Société Européenne des Biomateriaux, la définition des biomatériaux est la suivante : « Matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques ». Dans le domaine de l'IT du cartilage, une multitude de biomatériaux dont les polymères biodégradables naturels et synthétiques ont été utilisés.

I.2.3.3.2 Les matériaux synthétiques

Les polymères synthétiques ont l'avantage d'être non toxiques, biodégradables et de permettre un contrôle précis des propriétés physico-chimiques telles que la rigidité, la vitesse de dégradation et la structure architecturale de la matrice, ce qui les rend plus spécifiques de leurs applications. Parmi les biomatériaux les plus utilisés pour des approches d'IT du cartilage, on peut citer :

Les acides polyhydroxylés tels que PLA [poly(acide lactique)], PGA [poly(acide glycolique)] et leurs copolymères sont les matériaux synthétiques les plus utilisés. Ces polymères biocompatibles ont un potentiel considérable de personnalisation et d'adaptabilité via la modification des paramètres de conception (moulage, extrusion ou traitement par solvant), permettant de contrôler l'architecture et la biodégradabilité de la matrice synthétisée. Le contrôle précis de la dégradation de ces matériaux est un de leurs principaux avantages. Par exemple, les matrices de PGA et de PLLA [poly(acide L-lactique)] n'ont pas les mêmes cinétiques de dégradation ; le PGA est rapidement dégradé en quelques semaines alors que le PLLA peut rester présent *in vivo* pendant au moins 3 ans. La co-polymérisation du PLA et du PGA permet de créer le poly(acide lactique-co-glycolique (PLGA) qui est largement utilisé dans l'IT du cartilage [166-170]. De manière intéressante, on peut contrôler la cinétique de dégradation de ce polymère en faisant varier le ratio PLA/PGA. Par exemple pour un ratio de 50/50, le PLGA se dégrade en 1 à 2 mois, pour un ratio de 75/25, en 4 à 5 mois et pour un ratio de 85/15, en 5 à 6 mois [167]. De plus ces matériaux sont déjà utilisés pour la culture de chondrocytes avec la formation d'un cartilage *in vitro* [171, 172]. Cependant, les produits de dégradation de ces matériaux doivent être finement contrôlés, car ils peuvent provoquer une acidification du milieu, néfaste pour la survie des cellules [172, 173].

Les élastomères de polyuréthanes sont aussi largement utilisés dans l'IT car il est possible de contrôler leurs propriétés d'élasticité. Plusieurs études ont déjà décrit la synthèse de différentes matrices d'élastomères de polyuréthanes, avec différentes propriétés architecturales. Ces différentes matrices permettent l'adhésion des chondrocytes articulaires avec la sécrétion des protéines de la MEC [174-176]. Une étude a montré que les matrices d'élastomères de polyuréthanes permettent d'augmenter l'expression des marqueurs chondrocytaires de CSM de moelle osseuse après induction de la différenciation, comparé à des cultures réalisées en micromasse ou « pellet ». Les auteurs ont également remarqué que l'architecture des pores de

la matrice influence la différenciation et le phénotype final des cellules [158]. Un autre avantage des élastomères de polyuréthanes est qu'ils peuvent se biodégrader *in vivo* sans libérer de métabolites cytotoxiques et sans modifier le pH environnemental [177].

Le Polyethylene glycol (PEG) est largement utilisé dans la synthèse d'hydrogels capables de favoriser la chondrogenèse [177-179]. Le PEG est un matériau biocompatible et largement utilisé dans le domaine biomédical, depuis qu'il est approuvé par la FDA (Food and Drugs Administration). Les hydrogels de PEG sont intéressants pour leurs propriétés physico-chimiques facilement ajustables par différents mécanismes de réticulation qui aboutissent à des structures bien différentes. De plus l'élasticité du di-acrylate de polyéthylène glycol entièrement hydraté est proche de la valeur du cartilage articulaire bovin, mesuré par compression, c'est donc un matériau aux propriétés mécaniques intéressantes pour la culture des chondrocytes et la sécrétion de la MEC [163, 164, 180].

I.2.3.3.3 Les matériaux naturels

En comparaison avec les polymères synthétiques, les polymères naturels sont moins chers et imitent les composants de la MEC produits par les cellules, ce qui leur confère une meilleure biocompatibilité et offre un environnement favorable à l'adhérence et la croissance des cellules. Les biomatériaux les plus utilisés en IT du cartilage sont les suivants :

L'alginate et l'agarose sont des polysaccharides dérivés d'algues marines. Ils sont largement utilisés pour la synthèse d'hydrogel. L'alginate gélifie en présence de cations divalents tels que le Ca^{2+} , générant un hydrogel semblable à une matrice extracellulaire. Contrairement à la plupart des matériaux naturels, les caractéristiques chimiques et physiques de l'alginate sont intéressantes pour la synthèse de matrice. En particulier pour l'utilisation de méthodes particulièrement attractives telles que les méthodes dites « couche par couche » ou la bioimpression 3D [181-183]. Ainsi, l'hydrogel d'alginate combiné aux CSMs issues de la pulpe dentaire a récemment été utilisé avec succès pour la régénération *in vivo* du cartilage articulaire chez le lapin [184]. En revanche, l'alginate n'étant pas facilement dégradé par le métabolisme des mammifères, il a une cinétique de biodégradation lente *in vivo*, ce qui peut être un inconvénient pour les stratégies de régénération [185]. De plus, les cellules adhèrent peu à l'alginate, c'est pourquoi il est souvent utilisé en combinaison avec un autre matériau [185, 186].

L'agarose est un polysaccharide linéaire constitué d'unités répétées d'un disaccharide d'agarobiose. Il est dérivé d'algues et, comme l'alginate, peut encapsuler des cellules sous sa forme d'hydrogel et soutenir le phénotype chondrogénique [187]. L'agarose est un matériau non immunogène qui a été largement utilisé dans les applications biomédicales en raison de ses propriétés d'auto-gélicification contrôlée et d'hydro-solubilité [188]. Contrairement à l'alginate, il possède des groupements fonctionnels qui permettent de favoriser l'adhésion, la prolifération et l'activité cellulaire. De plus, il est possible d'ajuster la capacité d'absorption de l'eau afin de fournir un microenvironnement approprié à l'activité cellulaire [189]. Plusieurs études ont montré des propriétés chondrogéniques et chondroinductrices des hydrogels d'agarose pour la différenciation des CSMs [190, 191].

L'acide hyaluronique est un GAG non sulfaté, qui constitue une grande partie de la MEC cartilagineuse. Il joue un rôle essentiel dans la formation du microenvironnement biophysique nécessaire à la croissance et la prolifération des chondrocytes. Ainsi, l'acide hyaluronique est largement utilisé dans de nombreuses approches d'IT en raison de ses propriétés de biocompatibilité, biodégradabilité et de sa faible immunogénicité. Au regard de ses faibles propriétés mécaniques et de sa cinétique rapide de dégradation *in vivo*, il est généralement réticulé afin de diminuer sa cinétique de dégradation [192, 193]. Cependant, les hydrogels à base d'acide hyaluronique permettent une adhérence cellulaire limitée et au même titre que l'alginate, ils sont souvent associés à d'autres matériaux capables de compenser ce problème [194, 195].

Le collagène est une protéine fibreuse présente dans tous les tissus conjonctifs ; elle représente environ 25% du poids sec des mammifères [196]. Les molécules de collagène sont organisées sous la forme d'une triple hélice composée de trois chaînes α qui s'assemblent en raison de leur structure moléculaire. Chaque chaîne α est composée de plusieurs acides aminés basés sur la séquence Gly-X-Y où X et Y sont principalement la proline et la 4-hydroxyproline. En plus d'être le support naturel de nombreuses cellules, le collagène a les principaux avantages d'être biodégradable, biocompatible et facilement accessible, ce qui en fait un biomatériau particulièrement adapté à l'IT. Actuellement, 29 types de collagènes ont été répertoriés mais seuls les collagènes I, II, III, V et XI sont connus pour former les fibres essentielles au support des cellules et à l'élaboration de matrice [41, 197]. Les collagènes de type I et II sont tous deux

de bons supports extracellulaires et permettent l'attachement, la prolifération et la différenciation chondrogénique des CSMs [198-200]. Cependant, le collagène de type II qui est le composant majoritaire de la matrice cartilagineuse est peu accessible pour l'extraction. Par contre, le collagène de type I est le plus abondant dans les tissus conjonctifs tels que le derme, les tendons ou les os à partir desquels il peut être extrait de nombreuses sources animales (murine, porcine, bovine). De plus, grâce à son excellente biocompatibilité et sa facilité d'accès, son utilisation pour des applications cliniques est déjà approuvée par plusieurs agences réglementaires telles que la FDA (Food and Drug Agency) et la PMDA (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency) [201]. Le choix du collagène de type I paraît donc adapté à l'élaboration d'une matrice extracellulaire en vue d'une application clinique pour la différenciation chondrocytaire des CSMs.

La gélatine est un biopolymère naturel dérivé de l'hydrolyse du collagène. La gélatine présente une hétérogénéité physique et chimique due aux différentes sources de collagène (peau, tendon, os) mais elle reste largement utilisée dans de nombreux domaines tels que l'industrie alimentaire, la cosmétique et la biologie médicale. La gélatine a de nombreux avantages pour l'IT. En plus de son faible coût et de sa facilité d'accès, la gélatine est biodégradable et biocompatible, faiblement immunogène, elle présente un nombre élevé de groupes fonctionnels accessibles pour d'éventuelles modifications et elle contient des séquences d'arginine-glycine-acide aspartique qui permettent une bonne adhésion cellulaire [202]. De plus, la gélatine peut être réticulée par de nombreuses méthodes, ce qui permet l'utilisation de différentes techniques pour la production de matrices telles que l'électrofilage, la lyophilisation ou encore l'impression 3D [202]. L'élaboration de matrices à base de gélatine permet donc un large choix de structures avec des caractéristiques physiques et mécaniques adaptées [203, 204].

Le chitosan est un polyoside produit par la désacétylation de la chitine, qui est le composant de l'exosquelette des arthropodes ou de l'endosquelette des céphalopodes. C'est un biomatériau biocompatible, biodégradable qui possède également des propriétés antimicrobiennes et hémostatiques [205-208]. La structure moléculaire du chitosan est similaire à celle de l'acide hyaluronique et des glycosaminoglycanes présents dans la MEC. Il a été montré que le chitosan et ses produits de dégradation favorisent l'expression des composants de la MEC tels que le collagène de type II [209-212]. De plus, le chitosan possède une charge globale positive, ce qui peut faciliter son interaction avec la MEC du cartilage qui elle est chargée négativement [211]. Un autre avantage du chitosan est la présence d'une grande quantité de

groupes fonctionnels qui permettent la fonctionnalisation de la matrice [211, 213]. Le chitosan est un biomatériau naturel prometteur pour la régénération du cartilage qui peut être utilisé seul ou combiné à d'autres matériaux pour améliorer l'adhésion cellulaire par exemple [211, 213].

I.2.3.3.4 Morphologie et architecture des matrices

Bien que les biomatériaux soient en grande partie responsables des propriétés physico-chimiques des matrices, l'architecture souhaitée, les paramètres mécaniques et les formes d'un échafaudage peuvent être adaptés par l'intermédiaire de différentes méthodes de production des matrices. Parmi les méthodes les plus courantes, on peut citer, l'échange de solvant, l'électrofilage, la lyophilisation, ou plus récemment l'impression 3D [177, 179]. L'utilisation de ces différentes techniques de fabrication permet la formation de trois grandes structures de matrices : les éponges 3D, les hydrogels et les nanofibres (non tissées) (Figure 8)

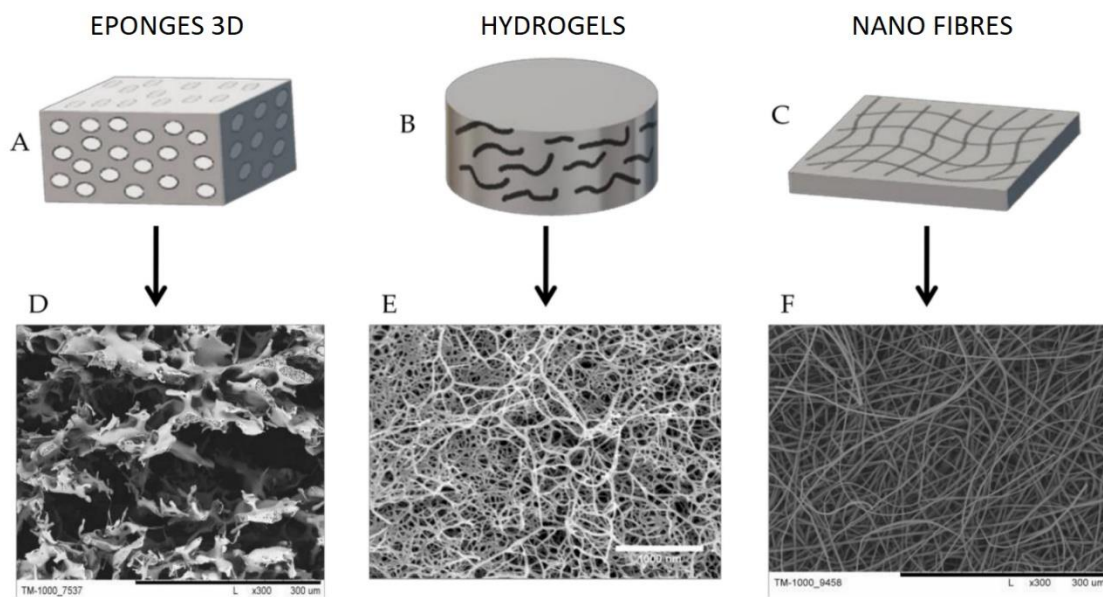


Figure 8 : Illustration schématique des principales formes d'échafaudages pour l'ingénierie tissulaire du cartilage (Selon Monika Wasyleczko *et al.*) [179].

(A, D) éponges 3D ; (B, E) hydrogels ; (C, F) nano fibres. Barres d'échelle : D—300 µm ; E-1000 nm ; F—300 µm.

Les structures en éponges 3D sont des structures poreuses dont les propriétés dépendent de la taille des pores, de la porosité et de l'interconnectivité. Ces paramètres vont définir les paramètres d'infiltration et de migration cellulaires ainsi que la surface d'adhésion, le dépôt de la MEC, l'échange de nutriments et les propriétés mécaniques de la matrice [214]. Il existe différentes méthodes pour former ces matrices et la structure dépendra de la méthode utilisée. On peut citer par exemple la formation d'éponges de chitosan par lyophilisation [215]. On peut également citer les éponges en fibres de soie, formées par coulée de solvant / lixiviation de particules (SCPL) qui permettent la culture des CSM et des chondrocytes [216, 217].

Les hydrogels sont des réseaux de polymères réticulés en trois dimensions qui absorbent et retiennent de grandes quantités d'eau. Ces matériaux répondent aux stimuli environnementaux (température, pH, force ionique, champ électrique, présence d'enzyme, etc.) et gonflent ou rétrécissent en conséquence [218]. Lorsque les réseaux de polymères sont maintenus ensemble par des forces non covalentes telles que des forces ioniques, ou hydrophobes, les hydrogels sont dits « réversibles » ou « physiques ». D'un autre côté, les hydrogels sont appelés hydrogels « permanents » ou « chimiques » lorsqu'ils sont réticulés entre eux de manière covalente [219]. Les hydrogels sont particulièrement intéressants en raison de leur nature hautement hydratée qui ressemble à la MEC [220]. De plus, les hydrogels permettent généralement une bonne répartition des cellules ainsi que le transport de l'oxygène, des nutriments et des métabolites nécessaires à leur survie mais aussi un transport facilité des potentiels biofacteurs utilisés dans l'IT du cartilage [214]. Les hydrogels ont également l'avantage d'être injectables ce qui permet de les déposer au niveau de la lésion sans intervention chirurgicale [218].

Les structures en nanofibres sont généralement fabriquées par électrofilage ou par impression 3D, ce qui permet un contrôle précis de plusieurs facteurs tels que la porosité des nanofibres, l'alignement des fibres et l'infiltration cellulaire. Les nanofibres sont définies comme des fibres avec un diamètre inférieur à 1000 nm [221]. Ces fibres peuvent former des mailles tissées ou non tissées. Les mailles non tissées présentent des volumes de vide élevés et des surfaces bien adaptées à la régénération tissulaire, tandis que les mailles tissées présentent une plus grande résistance et peuvent être fabriquées dans une large gamme de porosités [214]. Les structures en nanofibres sont largement utilisées et plusieurs études ont décrit des matrices capables de mimer l'architecture des fibres de collagène de la MEC du cartilage [222, 223]. Cependant, ces structures sont généralement de grande taille ; cela peut être un avantage sur

certaines lésions importantes mais c'est aussi problématique pour combler des lésions irrégulières sans impacter le cartilage environnant [214].

Les systèmes microparticulaires utilisés dans l'IT du cartilage, sont généralement de forme sphérique avec un diamètre de 1 à 1000 μm . L'utilisation d'un système microparticulaire a de nombreux avantages. Premièrement, la taille micrométrique de ces particules permet de les injecter directement sur le site de la lésion en évitant une étape de chirurgie. Ensuite, contrairement aux matrices de type éponge ou hydrogel, la forme des microparticules permet de favoriser les interactions cellules-cellules nécessaires à la différenciation chondrocytaire [224]. Enfin, les microsphères sont largement reconnues pour leurs capacités à retenir et libérer de manière prolongée différentes drogues ou biomolécules potentiellement utiles à la réparation du cartilage [166, 170, 225-227]. À l'origine, les microsphères étaient principalement fabriquées à partir de matériaux polymères mais récemment, plusieurs polymères naturels tels que le collagène de type I ont été utilisés avec succès [226, 228]. Ainsi, au sein de notre laboratoire, nous avons élaboré des microsphères de collagène de type I à l'aide d'un système de microfluidique [229]. Brièvement, le collagène de type I a été extrait de tendons de queue de rat et dissous dans de l'acide acétique. Le collagène est insoluble à pH neutre, mais il est soluble dans les milieux aqueux acides. Les microsphères sont obtenues par formation initiale d'une émulsion avec le collagène en phase aqueuse à pH acide et de l'huile perfluorée (3M™ Novec™ 7500 Engineered Fluid). Les gouttelettes d'émulsion sont ensuite collectées et placées dans une atmosphère d'ammoniac pour augmenter le pH et induire la fibrillation du collagène et par conséquent la formation des microsphères de taille injectable (Figure 9).

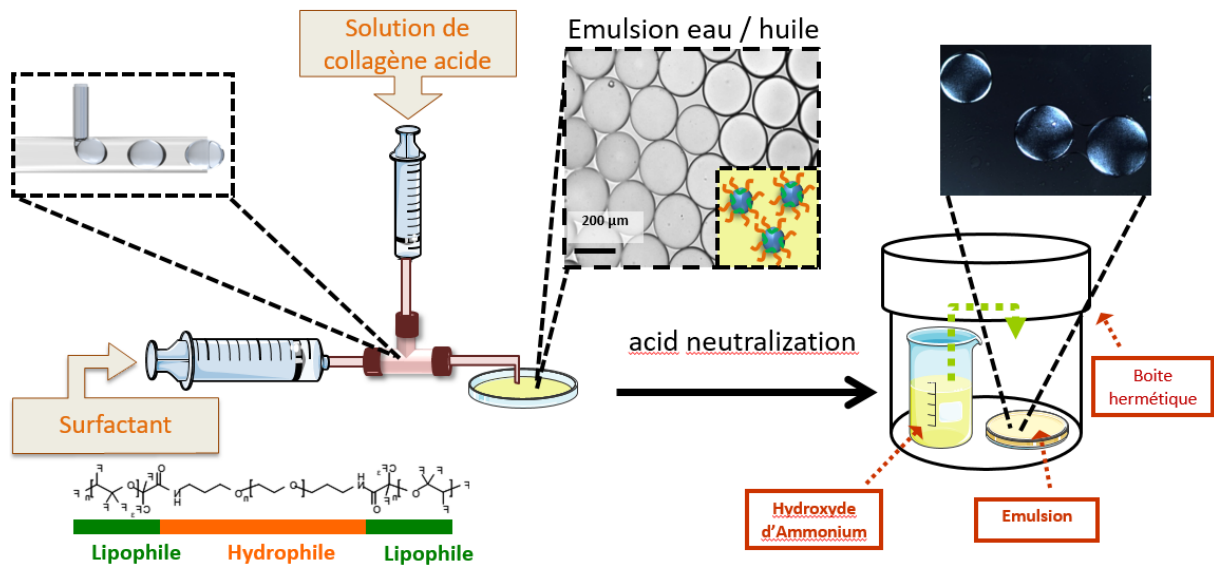


Figure 9 : Protocole de synthèse de microsphères de collagène (selon David Azria *et al.*) [229].

I.2.4 Les biomolécules impliquées dans l'IT du cartilage

Comme on l'a vu précédemment, plusieurs signaux moléculaires sont utilisés pour l'IT du cartilage, tels que les facteurs de croissance naturellement présents dans le tissu ou de petits composés moléculaires synthétiques. Ces facteurs sont capables de médier la croissance, la prolifération et la différenciation en activant des voies spécifiques et en stimulant l'expression de protéines pertinentes. Ils sont donc essentiels pour gouverner le processus de régénération du cartilage à partir des CSM. Outre les TGF- β et les BMP, déjà cités, le facteur de croissance de l'insuline (IGF) et le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) sont parmi les facteurs de croissance les plus utilisés pour l'IT du cartilage, tandis que la dexaméthasone (DEX) et la kartogénine (KGN) sont les molécules synthétiques les plus populaires [230-233]. L'utilisation de ces différentes molécules biologiques dans les thérapies du cartilage sera détaillée dans la revue du chapitre 2 « Scaffold-biomolécules interactions applied to cartilage engineering »

II Thérapie génique du cartilage

La thérapie génique consiste à introduire du matériel génétique dans des cellules pour traiter ou guérir une maladie. Initialement conçue pour suppléer un gène défectueux en cas de maladie monogénique, la thérapie génique a rapidement évolué et son champ d'action s'est élargi [234]. L'application de la thérapie génique aux tissus articulaires a été décrite pour la première fois chez l'homme par l'équipe de Christopher Evans, dans le traitement de l'arthrite avec un plasmide codant pour l'IRAP (interleukin-1 receptor antagonist protein), un antagoniste du récepteur à l'IL1 [235, 236]. Depuis, plusieurs études ont montré des résultats encourageants dans ce domaine et la thérapie génique est maintenant proposée comme méthode alternative pour une administration ciblée et soutenue d'agents thérapeutiques, de gènes de facteurs de croissance et de petits composants régulateurs tels que les siARN ou les microARNs [237, 238]. Par exemple, la thérapie Invossa™, également connue sous le nom de TissueGene-C, est actuellement en phase 3 d'essai clinique (NCT03203330). Cette thérapie, basée sur l'injection de chondrocytes allogéniques irradiés transduits avec un rétrovirus pour sécréter du TGF- β 1, a permis d'obtenir une amélioration des scores moteurs et une réduction de la douleur chez les patients [239-242].

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux différentes stratégies de régulation génique des CSM appliquées à la réparation du cartilage. Puis dans un second temps, nous aborderons les différentes méthodes de vectorisation et leurs applications respectives.

II.1 Les stratégies de thérapie génique des CSM appliquées à l'ingénierie du cartilage

Dans l'IT du cartilage, la thérapie génique offre la possibilité de reprogrammer ou de contrôler l'expression génique des cellules articulaires afin de favoriser le processus de régénération. Communément, il existe deux grandes approches. Une approche *in vivo* avec la délivrance des transgènes directement dans l'articulation et une approche *ex vivo* avec la modification de cellules thérapeutiques, pendant une étape de culture *in vitro* avant de les injecter dans l'articulation [237, 243-246]. Ces deux approches visent généralement à modifier génétiquement les chondrocytes ou les CSMs pour la réparation ou la régénération du cartilage dans le traitement de pathologies ostéoarticulaires. Dans cette partie bibliographique, nous nous sommes principalement intéressés à **l'induction et la régulation de la différenciation chondrocytaire des CSM** par l'expression de gènes codant pour des facteurs de croissance,

des facteurs de transcription ou d'autres composants régulateurs tels que les petits ARN-interférents (siRNA) et les micro-ARN (miRNA) [237].

II.1.1 Transgènes thérapeutiques

Les différents transgènes thérapeutiques appliqués aux CSM dans la régénération du cartilage ont pour principal objectif de contrôler la différenciation chondrocytaire des CSM via la **production de facteurs de croissance**, tels que les membres de la superfamille des TGF β , l'IGF1 ou encore le FGF, mais aussi d'autres facteurs de transcription de la famille SOX dont le gène SOX-9, principal gène régulateur de la chondrogenèse [53, 245, 247-249]. Par exemple, Stephanie Morscheid *et al.* ont utilisé avec succès un AAV (« Adenovirus-Associated Virus ») recombinant afin de surexprimer TGF- β et IGF-I dans des CSM et réparer des lésions créées sur des explants de cartilage humain. Les auteurs n'ont pas observé une intégration totale des CSM déposées au niveau du site de lésion, mais ils ont tout de même obtenu des résultats encourageants et montré une synergie des facteurs TGF- β et IGF-I permettant d'induire une augmentation de l'expression des marqueurs chondrocytaires et une inhibition de l'expression des marqueurs hypertrophiques [245]. Plus récemment, M. Weissenberger *et al.* ont montré que le transfert des gène *Sox9* et TGF β -1 par adénovirus induit la différenciation chondrogénique des CSM primaires humaines cultivées en « pellets » [247]. De plus, cette étude a montré que le transgène *Sox9* permet d'induire l'expression des marqueurs chondrocytaires, sans induire l'expression des marqueurs hypertrophiques par comparaison au transgène TGF β -1 qui induit l'expression des deux types de marqueurs. D'autres études s'intéressent aux CSM transgéniques dans l'objectif d'induire la sécrétion de facteurs thérapeutiques spécifiques [250]. Par exemple, plusieurs études se sont inspirées des travaux de l'équipe de Christopher Evans et ont modifié des CSM avec un transgène inductible de l'IRAP (interleukin-1 receptor antagonist protein) avec pour objectif de bloquer l'inflammation médiée par les signaux IL-1 dans des pathologies telles que l'arthrose [251-253]. Cependant, l'expression constitutive, prolongée ou inappropriée de certains facteurs peut entraîner des effets néfastes pour la réparation du cartilage. C'est le cas, par exemple, du TGF β 1 qui peut entraîner une hypertrophie des chondrocytes issus de la différenciation des CSM de moelle osseuse [254]. Ainsi, une solution intéressante qui permet de contourner ce problème est l'utilisation de stratégies de thérapie génique transitoires basées sur l'inhibition d'ARNm pour réguler l'expression des gènes.

II.1.2 Les micro-ARN (miARN)

Les micro-ARN (miARN) sont une catégorie de petits ARN endogènes, double brin et non codants d'une longueur moyenne de 22 nucléotides. Les miARN forment des duplex reconnus par un complexe protéique nommé RISC (« *RNA-induced silencing complex* »). Ce complexe se lie à l'ARNm cible par complémentarité des bases nucléiques. Seule une région restreinte appelée « seed » s'étendant des nucléotides 2 à 7 est utilisée pour l'hybridation, ce qui permet aux miARNs de s'hybrider à plusieurs ARNm différents avec une séquence de reconnaissance similaire [255]. La liaison du complexe à l'ARNm cible, induit une répression traductionnelle réalisée par un clivage endonucléolytique de l'ARNm par la protéine argonaute dans le cas d'une complémentarité parfaite avec le miARN. Dans le cas d'une complémentarité imparfaite, il n'y a pas de clivage de l'ARNm, mais l'hybridation suffit à la répression traductionnelle [256-258] (Figure 10). Les découvertes récentes des miARNs et de leur capacité à réguler l'expression des gènes impliqués dans la synthèse et la régulation du cartilage articulaire, offrent de nouvelles opportunités pour l'IT du cartilage [259]. L'utilisation de la thérapie génique par expression de miARNs par des cellules souches peut apporter des progrès considérables sur leur capacité à se différencier et à réguler la MEC pour réparer ou régénérer le tissu cartilagineux endommagé [260]. Actuellement, plus de trente miARNs sont déjà décrits pour être impliqués dans l'homéostasie du cartilage [261]. Parmi eux, le **mir-140** retient particulièrement l'attention pour ses fonctions régulatrices de l'homéostasie du cartilage et son rôle important dans les maladies associées à la destruction du cartilage [262, 263]. Mir-140 semble également jouer un rôle important sur la chondrogenèse des CSMs durant laquelle l'expression de mir-140 augmente en parallèle de l'expression des marqueurs chondrocytaires *Sox9* et *COL2A1* [263, 264]. De plus, une étude a récemment montré qu'un prétraitement des CSM avec miR-140 permet d'augmenter significativement l'expression des marqueurs chondrocytaires et de réduire l'expression du marqueur de l'hypertrophie *ColX* en condition de différenciation chondrogénique *in vitro* [265]. Des résultats intéressants ont également été obtenus *in vivo*. L'injection de CSM modifiées pour surexprimer miR-140-5p a permis de réparer le cartilage dans un modèle chirurgical d'arthrose chez le rat, avec une augmentation de l'expression de collagène II et d'agrécane, comparé aux CSM non modifiées [266].

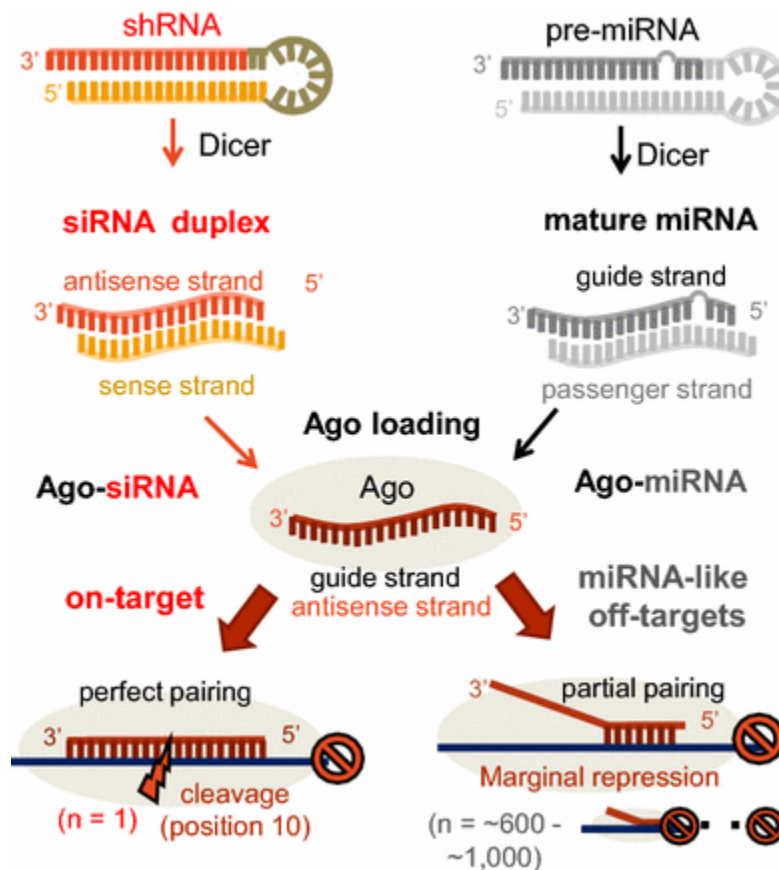


Figure 10 : Aperçu mécanistique de la répression génique induite par miARN et siARN (Selon Heeyoung Seok *et al.* [255]).

Les siRNA et shRNA exogènes sont indiqués en rouge et les miARN transcrits de manière endogène sont indiqués en gris.

II.1.3 Les petits ARNs interférents

Les petits ARNs interférents ou siARN sont de petits ARNs exogènes, double brin, de 21 à 24 nucléotides. De manière similaire aux miARN, ils sont reconnus dans le cytoplasme de la cellule par le complexe protéique RISC. Cependant ce complexe activé reconnaît les ARNm par complémentarité avec la séquence entière du siARN et assure une meilleure spécificité de ce mécanisme, comparé aux miARN. Une fois lié à l'ARNm, le complexe RISC induit son clivage par l'endonucléase argonaute empêchant ainsi toute nouvelle traduction de la protéine codée par cet ARNm. Le principal avantage des siARN est leur spécificité d'action, qui permet la destruction et par conséquent la répression traductionnelle d'un seul ARNm spécifique. Cependant les siARN peuvent entrer en compétition avec les miARN pour la protéine argonaute

et donc modifier de manière non contrôlée, la régulation génique exercée par le miARN endogène (Figure 10) [255].

Les siARN permettent de modifier l'expression génique, mais ne modifient pas directement le génome ; de ce fait, ils ont une action transitoire directement dépendante de la quantité de siARN présents dans le cytoplasme de la cellule. L'action transitoire des siARN peut être un avantage pour réguler spécifiquement une étape de la réparation, sans perturber la suite du processus. Mais il est également possible de contrôler l'expression génique de manière prolongée si on utilise un plasmide qui code pour un shRNA (Figure 10).

Dans le contexte de la thérapie du cartilage, plusieurs études ont démontré l'intérêt des siARN pour contrôler la réaction inflammatoire et favoriser la réparation du cartilage [267]. Par exemple, shaowei Wang *et al.* ont réussi à diminuer la dégénérescence du cartilage sur un modèle d'arthrose induit par chirurgie chez le rat avec des injections intra-articulaires de siARN dirigés contre le gène Indian Hedgehog (Ihh) [268]. Des résultats prometteurs ont déjà montré que l'utilisation de siARN dirigés contre le gène *Runx2* induit une inhibition des marqueurs de l'hypertrophie des chondrocytes générés par différenciation de CSM humaines, malgré un faible niveau d'inhibition après 14 jours de culture [138].

Bien que prometteur pour l'IT du cartilage, le contrôle de l'expression génique des CSM par l'utilisation d'ARN interférant ou par transgénése reste totalement dépendant de notre capacité à faire pénétrer les acides nucléiques thérapeutiques dans le cytoplasme ou le noyau des cellules. En condition *in vivo*, cette étape clé, appelée transfection, nécessite l'utilisation de vecteurs spécifiques capables de transporter et délivrer le matériel génétique dans les cellules. Les principaux vecteurs d'acides nucléiques utilisés dans la thérapie du cartilage seront décrits dans la partie suivante.

II.2 La vectorisation des acides nucléiques

Il existe différentes méthodes physiques efficaces pour transfecter des cellules avec du matériel génétique, telles que l'électroporation, la sonoporation, ou encore la micro-injection, mais ces méthodes sont généralement peu adaptées pour des applications *in vivo* [269, 270]. De plus, les acides nucléiques ont pour principales limitations d'être rapidement dégradés *in vivo*. L'utilisation de ces produits de thérapie génique nécessite donc l'élaboration de vecteurs capables de les protéger mais également de permettre leur libération dans les cellules. En effet, les acides nucléiques non vectorisés sont très peu internalisés par les cellules, principalement à cause des interactions électrostatiques entre les acides nucléiques et la membrane des cellules qui sont tous deux chargés négativement.

Les vecteurs d'acides nucléiques sont généralement regroupés en deux grandes catégories : les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux.

II.2.1 Vecteurs viraux

Les vecteurs viraux, visent à utiliser les mécanismes spécifiques et particulièrement efficaces développés par les virus pour incorporer leurs génomes à l'intérieur des cellules qu'ils infectent. La principale stratégie utilisée est de modifier un virus en remplaçant son matériel génétique par des acides nucléiques thérapeutiques, tout en conservant ses propriétés de transduction. A ce jour, toutes applications confondues, les vecteurs viraux sont impliqués dans plus de 75% des essais cliniques de thérapie génique [234] dont certains essais dans le domaine des pathologies ostéo-articulaires [271]. Le principal avantage de ces vecteurs est leur efficacité de transfection comparée aux vecteurs non viraux. Par exemple, J.M. MCMAHON *et al.* ont montré que la transduction de CSMs de rat avec des vecteurs adénoviraux et lentiviraux peut atteindre des efficacités allant jusqu'à 70 et 95 %, respectivement, contre seulement 25 % avec un vecteur commercial non viral [272]. Cependant, il a été démontré que ces systèmes induisent une réponse inflammatoire dans les articulations, ce qui peut provoquer différents effets secondaires délétères pour le cartilage [273-275]. Bien que les vecteurs viraux soient largement utilisés en raison de leur grande efficacité, l'utilisation de ces vecteurs est controversée pour les applications cliniques à cause d'un manque de spécificité cellulaire et d'un risque de

mutagénèse, de pathogénicité et d'immunogénicité pouvant être rencontré avec certains vecteurs viraux [276-278]. Un autre facteur limitant est la taille limitée du transgène pouvant être vectorisé (Figure 11). Dès lors, des efforts importants ont été déployés pour améliorer l'efficacité des vecteurs non viraux. [274, 279].

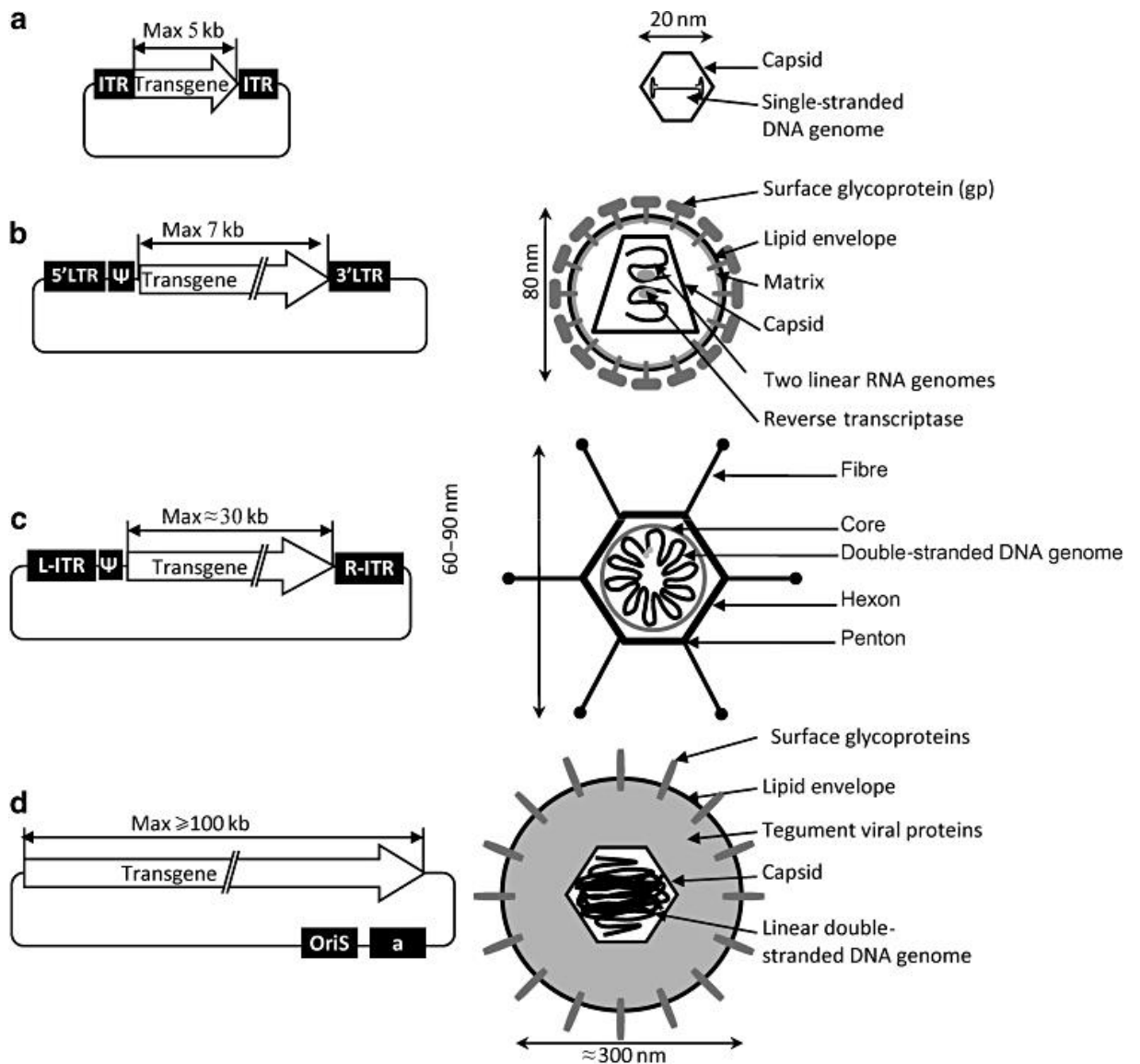


Figure 11: Les quatre principaux vecteurs viraux (Selon D. Bouard et al.) [280].

(a) Vecteur AAV recombinant. (b) Vecteur rétroviral. (c) Adénovirus Gutless vecteur. (d) Vecteur amplicon dérivé du HSV-1. ITR, répétition terminale inversée ; L : gauche ; R : droite ; y, a, signal d'encapsidation ; oriS, origine de réplication.

II.2.2 Vecteurs non viraux

Bien qu'initialement moins efficaces que leurs homologues naturels viraux, les vecteurs non viraux suscitent un grand intérêt pour la thérapie génique. La raison principale est que les vecteurs non viraux présentent des risques sanitaires moins importants, mais aussi qu'ils sont faciles à manipuler, faciles à synthétiser et moins coûteux à développer que les vecteurs viraux [274, 279]. Les vecteurs synthétiques sont intéressants pour leur faible immunogénicité et leur biocompatibilité [281-284]. Ces vecteurs sont donc particulièrement attractifs pour une utilisation *in vivo*. Dans le domaine de l'IT du cartilage, de nombreuses études ont montré l'intérêt des vecteurs non viraux pour le transfert de matériel génétique impliqué dans la chondrogenèse des CSM [249] [265]. Les vecteurs non viraux sont majoritairement de nature cationique, ce qui permet un auto-assemblage moléculaire médié par les interactions électrostatiques entre les charges positives des vecteurs et les groupements phosphates des acides nucléiques à véhiculer. Le rôle d'un vecteur de manière générale, est d'encapsuler la molécule thérapeutique afin d'éviter les interactions non souhaitées avec les fluides biologiques pour la conduire jusqu'à son lieu d'activité thérapeutique. Ceci implique le passage de différentes barrières extra- (dépendantes de la voie d'administration) et intracellulaire. Au niveau cellulaire le vecteur doit permettre (i) le passage de la membrane plasmique (internalisation), (ii) l'échappement endosomal afin d'éviter la dégradation au niveau des lysosomes, (iii) le trafic au niveau du cytoplasme, environnement très concentré en biomolécules exposant des conditions réductrices (fortes concentrations en glutathion), (iv) l'interaction avec les organites / les complexes protéiques ciblés selon la molécule transportée (complexe RISC dans le cytoplasme, noyau,...) (Figure : 12). Il est important de souligner que la cinétique de dissociation du vecteur et des acides nucléiques qu'il transporte est un facteur important influençant l'efficacité de transfection du système. En effet, afin d'exercer leur activité biologique, les acides nucléiques ne doivent plus être associés à leur système de vectorisation, cela pouvant gêner leur association avec les molécules biologiques médiant cette activité biologique (ex : complexes protéiques impliqués dans l'ARN interférence, la machinerie transcriptionnelle, ...).

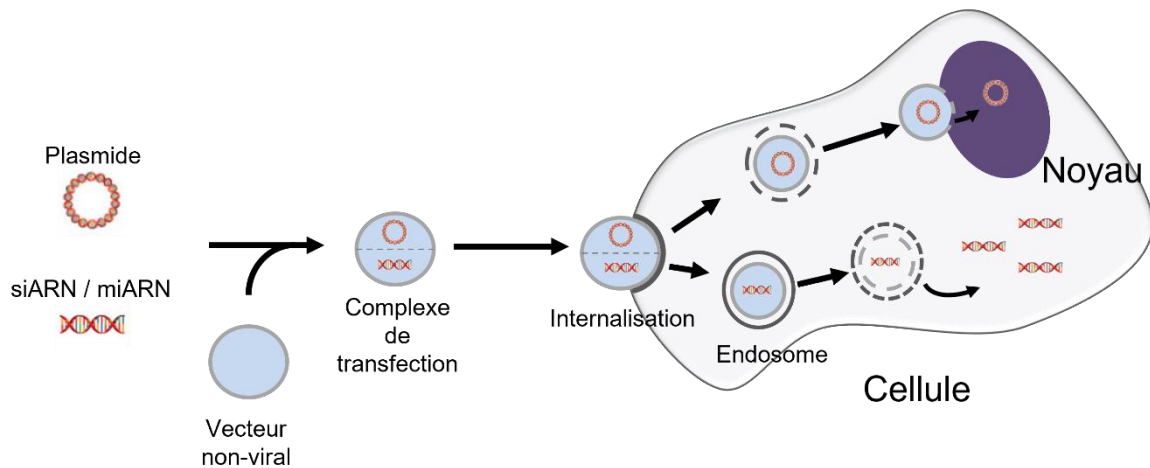


Figure 12 : Etapes clés de la transfection par vecteurs non viraux

Actuellement, il existe trois générations de vecteurs d'acides nucléiques non viraux. Les vecteurs de première génération sont plutôt réservés aux études *in vitro*, car ils sont instables et immunogènes en condition *in vivo*. En effet, ils peuvent activer le système du complément ou interagir avec les protéines du sérum pour former des agrégats qui peuvent s'avérer toxiques [285, 286]. Pour améliorer la furtivité et la stabilité des vecteurs de 1^{ère} génération, des polymères hydrophiles, majoritairement à base de PEG, ont été utilisés pour modifier la surface des vésicules et former des systèmes dits de 2^{ème} génération. Par la suite, des motifs de ciblage ont été greffés aboutissant à ce que l'on appelle la 3^{ème} génération de vecteurs capables d'interagir spécifiquement avec un biomatériau ou une cible cellulaire (Figure 13).

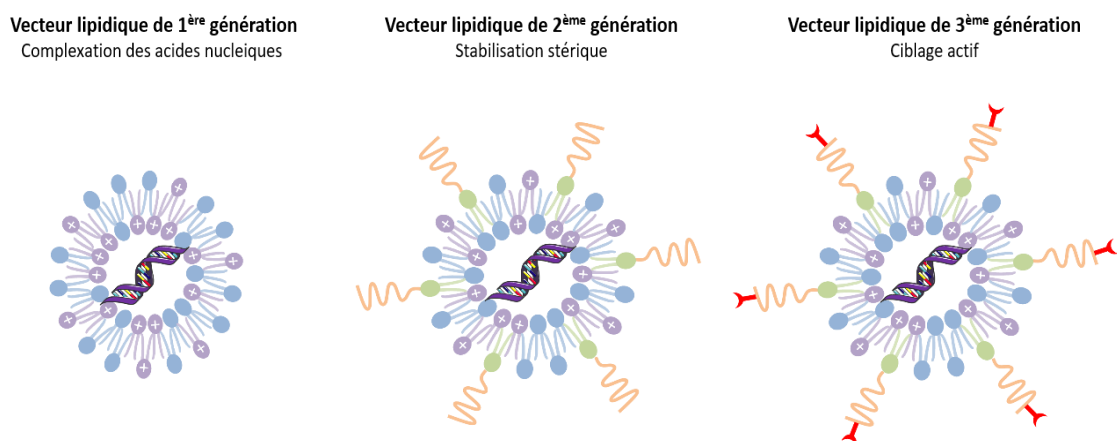


Figure 13 : Les trois générations de vecteurs lipidiques

Parmi les vecteurs non viraux, on s'intéressera dans un premier temps aux systèmes polymériques qui se sont avérés efficaces pour le transfert d'acides nucléiques, puis une deuxième partie sera consacrée aux vecteurs lipidiques qui ont connu un essor important ces dernières années [287].

Il existe également une autre catégorie de vecteurs non viraux, reposant sur des vecteurs inorganiques, tels que les nanoparticules d'or, d'oxyde de fer, de silice ou encore les nanotubes de carbone [288-290]. Cependant, cette catégorie de vecteurs est encore relativement peu explorée pour les applications d'IT du cartilage et ne sera donc pas développée ici [269].

De manière générale, les vecteurs synthétiques ont l'avantage d'avoir des propriétés ajustables et une grande flexibilité moléculaire, ce qui permet une fonctionnalisation plus facile de ces vecteurs. La fonctionnalisation des vecteurs peut avoir divers objectifs et permet souvent de favoriser l'endocytose par les cellules ou un ciblage cellulaire spécifique. Dans le domaine de l'IT, la fonctionnalisation des vecteurs est essentielle aussi pour contrôler les interactions avec les biomatériaux ou la MEC afin de conserver la biodisponibilité du vecteur.

II.2.2.1 Vecteurs polymériques

Comme déjà évoqué, la formation de ces vecteurs repose généralement sur l'utilisation de molécules cationiques telles que la polylysine (PLL) ou le polyéthylèneimine (PEI), dont la charge positive leur permet de condenser les acides nucléiques. La condensation du matériel génétique permet d'une part de réduire considérablement sa taille mais aussi de masquer les charges négatives afin de faciliter la pénétration cellulaire [284, 291].

Actuellement, les vecteurs de polymères synthétiques sont largement étudiés et de nombreux progrès ont permis l'élaboration de vecteurs biocompatibles, avec toutefois une efficacité de transfection modérée [291, 292]. En IT du cartilage, les polymères tels que le PEI, la PLL et le TMS (N,N,N-triméthyl chitosan chloride), sont couramment utilisés pour des approches *in vitro* et *in vivo* [293-296]. Par exemple, Su Yeon Jeon *et al*, ont utilisé avec succès le PEI combiné à des nanoparticules de PLGA pour vectoriser à la fois de l'ADN complémentaire codant pour le gène *Sox9* et des siARN dirigés contre le gène *Runx2*. Les auteurs ont montré une transfection efficace de CSM humaines, avec une augmentation de l'expression du gène *Sox9* et une inhibition de l'expression du gène *Runx2* mais également une

sur-expression des marqueurs chondrocytaires AGG et COLII. De plus, les analyses ont montré des résultats similaires sur les cultures cellulaires *in vitro* puis *in vivo*, après encapsulation dans un hydrogel de fibrine injecté en sous-cutané chez la souris nude [295].

Un autre exemple intéressant de vecteur polymérique, concerne les micelles de polymères, qui sont classiquement définies comme des nanostructures auto-assemblées constituées par des molécules amphiphiles, c'est-à-dire présentant deux blocs : le premier hydrophile et le second hydrophobe. Ces micelles sont particulièrement adaptées pour des applications *in vivo*. Ils permettent une meilleure stabilité du complexe de transfection et dans certains cas, la couronne extérieure de polymères hydrophiles permet de prévenir une réponse inflammatoire provoquée par l'immunogénicité du matériel génétique thérapeutique [291, 296-298]. C'est pourquoi ces micelles sont déjà utilisées *in vitro* et *in vivo* dans différentes stratégies de réparation du cartilage [296, 297, 299]. Raisin *et al.* ont récemment montré une inhibition de 43 % de l'expression du gène *Runx2* chez des CSM murines, par des micelles polyioniques tripartites chargées en siRunx2 complexé à la PLL et stabilisé par un co-polymère à bloc double hydrophile (DHBC) (Micelles PIC). Ces micelles sont formées par une première étape de complexation des siARN avec un polycation, la PLL, avant de complexer ces polyplexes au co-polymère DHBC via sa partie polyanionique (acide polyméthacrylate (PMMA)) alors que la partie polyethylene oxide-PEO, correspondant au bloc neutre du DHBC, va former une couronne hydrophile venant stabiliser le système (Figure 14). En raison de son bloc ionique de PMAA possédant un pKa légèrement supérieur au pH endosomal, les micelles formées à pH neutre se désassemblent au pH acide de l'endosome et libèrent les siARN. De plus, au même pH, les groupements de PMMA subissent un changement de conformation qui leur confère la propriété de déstabiliser la membrane de l'endosome et par conséquent favorise la libération des siARN dans le cytoplasme [299-302].

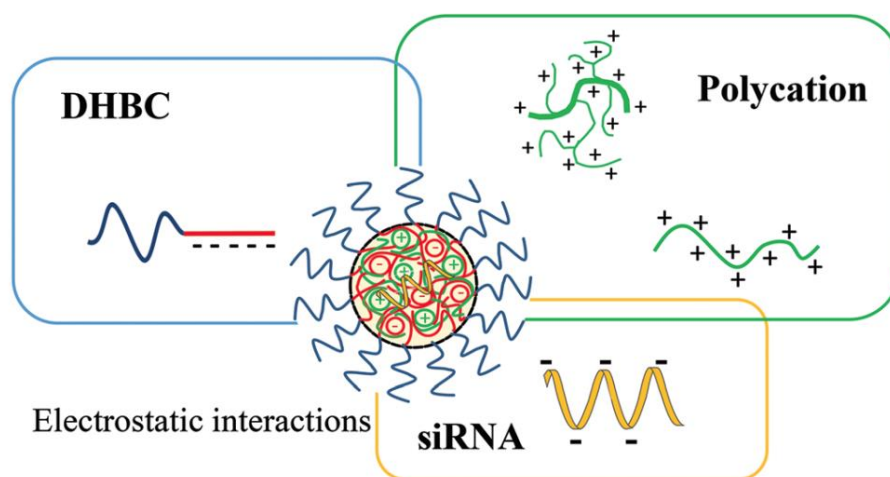


Figure 14 : Schéma des micelles PIC (Selon Sophie Raisin *et al.*)[299].

Composition et association spontanée. DHBC : copolymères séquencés hydrophiles doubles, PEO-b-PMAA : poly (oxyde d'éthylène) -acide b-polyméthacrylique, PLL : poly-L-lysine et siRNA : petit ARN interférent. Des interactions électrostatiques apparaissent entre les charges négatives (bloc anionique du PMAA et groupements phosphate des siARN) et les charges positives du polycation (amines primaires et secondaires).

II.2.2.2 Les vecteurs lipidiques

Les vecteurs lipidiques d'acides nucléiques font référence à la lipofection, une méthode de transfection découverte à la fin des années 1980 qui utilise des lipides cationiques afin de transférer du matériel génétique dans le cytoplasme ou le noyau des cellules. En 1987, P L Felgner *et al.* on décrit le premier lipide cationique efficace pour la transfection d'ADN, le N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride (DOTMA) [303]. Concernant la formulation de ces vecteurs lipidiques, le principe est similaire à celui des polymères cationiques. En raison de leur charge positive, les lipides cationiques peuvent complexer les acides nucléiques chargés négativement pour former des lipoplexes. En fonction de la méthode de formulation, des types et concentrations de lipides utilisés, diverses structures de lipoplexes peuvent être obtenues (Figure 16) [115, 304-307]. Ce sont ces différentes structures ainsi que la nature des lipides utilisés qui vont déterminer les propriétés physico-chimiques du vecteur et son efficacité de transfection [306]. Depuis sa découverte en 1987, de

nombreuses études ont repris et amélioré la lipofection, avec l'élaboration de systèmes lipidiques stables et peu immunogènes, capables de transférer efficacement des cellules en condition *in vivo*. Les systèmes les plus avancés aujourd'hui, tels que les LNP (Lipid nanoparticle) formulés avec des lipides ionisables, sont utilisés en clinique [308, 309].

L'efficacité, la simplicité et le faible coût des vecteurs lipidiques, ont largement contribué à leur développement et c'est aujourd'hui le type de vecteur non viral le plus utilisé et le plus répandu dans le monde pour la transfection de matériel génétique. Plus particulièrement, dans le domaine de la thérapie génique du cartilage où les lipoplexes sont historiquement utilisés car leur forte charge positive est un avantage pour interagir avec la matrice du cartilage qui est plutôt chargée négativement [310].

II.2.2.2.1 La composition des vecteurs lipidiques

Les vecteurs lipidiques d'acides nucléiques sont généralement composés de **lipides cationiques** pour complexer les acides nucléiques et de lipides neutres qui ont pour objectif de réguler les propriétés physico-chimiques du vecteur et d'améliorer l'efficacité de transfection. Les principaux lipides cationiques utilisés sont le DOTMA, le DOTAP (1,2-dioléoyl-3-triméthylammoniumpropane), le DDAB (Didodécyltriméthylammoniumbromure) et le CTAB (bromure de cetyltriméthylammonium) [311] (Figure 15).

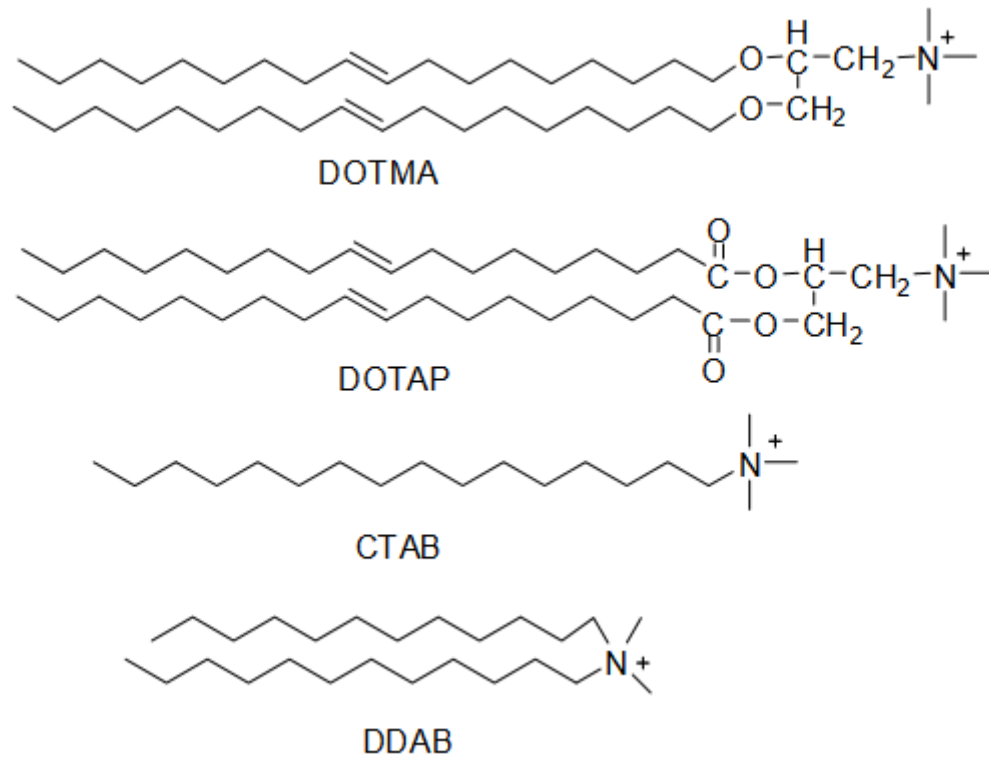


Figure 15 : Principaux lipides cationiques utilisé pour l'IT de l'os et du cartilage (Selon Qadir et al.) [311].

Ces lipides cationiques permettent une complexation efficace du matériel génétique mais ils sont souvent insuffisants pour la transfection des cellules et sont en particulier responsable de cytotoxicité importante liée à leur forte charge positive. Dans l'objectif d'améliorer l'efficacité de ces lipides, les équipes du Pr PA Jaffres et du Pr T. Montier ont développé un nouveau type de vecteur lipidique cationique à base de lipophosphoramidates. Comparés à la tête polaire d'ammonium classiquement retrouvée chez les lipides cationiques, ces vecteurs sont composés d'une fonction phosphore qui relie deux chaînes lipidiques et une tête polaire de phosphonium ou un arsonium. Cela permet une efficacité accrue (jusqu'à 7 fois selon les lignées cellulaires testées) et une cytotoxicité diminuée (Figure 15) [312-314]. Parmi eux, un lipophosphoramidate triméthyl-arsonium, le KLN47 est particulièrement efficace en conditions *in vivo* et pourrait révéler un vecteur intéressant pour la thérapie génique du cartilage [314-316].

Parallèlement à l'amélioration des lipides cationiques, d'autres méthodes sont également développées pour augmenter l'efficacité des vecteurs lipidiques. En particulier,

l'utilisation de **lipides auxiliaires** (« *helper* »), tels que le dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE) ou la dioléoylphosphatidylcholine (DOPC), sont très utilisés dans la conception de vecteurs lipidiques [317]. Ces deux lipides sont deux formes spécifiques de phospholipides membranaires qui vont permettre d'améliorer l'entrée du vecteur dans les cellules et l'échappement endosomal [317, 318].

Comme évoqué précédemment, la plupart des systèmes lipides-acides nucléiques ne conviennent pas pour des applications systémiques notamment à cause de leur importante charge positive qui participe à l'agrégation des complexes formés, aux interactions avec les protéines du sérum et possiblement au déclenchement d'une réponse immunitaire [285, 286, 319-322]. La première solution envisagée pour palier à ce problème est l'incorporation d'un polymère hydrophile pour modifier la surface des vecteurs et dissimuler ces charges positives, tel que le polyéthylène-glycol (PEG) qui permet d'accroître considérablement le temps de circulation des liposomes dans le sang [323-326]. La PEGylation des vecteurs lipidiques se fait généralement par l'intermédiaire d'une ancre lipidique, ordinairement du DSPE (1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine) sur laquelle la molécule de PEG est greffée et qui, par des interactions hydrophobes, va pouvoir s'insérer dans la membrane du vecteur lipidique [327]. La PEGylation des lipoplexes peut se faire directement pendant la formulation ou par post-insertion, sur des vecteurs déjà formulés. Bien que les deux méthodes soient possibles, la post-insertion est généralement utilisée pour s'assurer que la chaîne hydrophobe du DSPE s'insère dans la membrane lipidique externe du vecteur afin que la molécule de PEG soit positionnée à la surface du vecteur (Figure 13) [327, 328]. Cependant la PEGylation des vecteurs est connue pour diminuer significativement la capacité des lipoplexes à fusionner avec la membrane des cellules et par conséquent, à diminuer l'efficacité de transfection du liposome [329, 330]. Il est donc essentiel d'ajuster la proportion de PEG, ou d'utiliser des ancre qui permettent une dissociation aisée avec le vecteur [ex : 1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000 (DMG – PEG 2000) ; (2-hexyldecanoate),2-[(polyethylene glycol)-2000]-N,N-ditetradecylacetamide (ALC159)] afin de maintenir un niveau de transfection suffisant tout en conservant la stabilité nécessaire à l'application désirée.

Parmi les stratégies visant à formuler des vecteurs neutres ou avec une faible charge positive, de nombreuses études se sont intéressées aux **lipides ionisables**. Ces lipides sont protonés à pH acide, ce qui induit une charge positive, mais ils restent neutres à pH physiologique [308, 320, 331-333]. Ils sont donc formulés en milieu acide pour complexer efficacement les acides nucléiques. Après ajustement du pH, les lipides présentent une charge

neutre et interagissent moins avec les membranes anioniques des cellules ; ce qui améliore la biocompatibilité des nanoparticules lipidiques [308, 320, 333]. De plus, une fois piégés dans les endosomes, dans lesquels le pH est plus faible que dans le milieu extracellulaire, les lipides ionisables sont protonés et donc chargés positivement, ce qui peut favoriser la déstabilisation membranaire et faciliter la fuite endosomale des nanoparticules [308].

Le concept de lipides ionisable a été développé dans l'équipe de Pieter Cullis à travers l'utilisation du DODAP (1,2 dioleoyl-3-diméthylammonium-propane) [332]. Depuis, plusieurs lipides ionisables ont été synthétisés [334]. Le DLin-DMA (1,2-dilinoleyloxy-N,N-diméthyl-3-aminopropane) a été un des premiers lipides ionisables synthétisés pour l'administration de siARN. Puis une amélioration de ce lipide, via la modification de son linker, a permis d'augmenter son efficacité d'administration. Ainsi il a été obtenu le D-Lin-MC3-DMA ((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(diméthylamino) butanoate), composant majeur de la formulation de l'Onpattro, premier médicament de thérapie génique (à base de siRNA) à avoir été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) [334]. Le D-Lin-MC3-DMA rentre également dans la formulation des LNP encapsulant des ARNm développés par Moderna.

Des lipides zwitterioniques ionisables ont également été développés et utilisés pour la vectorisation d'ARN messenger [335-337].

Bien que l'efficacité de transfection des vecteurs lipidiques dépende majoritairement des différents types de lipides utilisés, la taille et la structure qu'ils vont adopter sont aussi des paramètres décisifs pour la conception de vecteurs efficaces et applicables *in vivo*.

II.2.2.2.2 Assemblages moléculaires des complexes Lipides-Acides nucléiques

De manière générale, les lipoplexes sont formulés par une simple co-incubation des acides nucléiques avec une solution de liposomes cationiques. Les lipides utilisés pour la formulation des liposomes, sont généralement constitués de deux chaînes alkyles hydrophobes reliées à une tête polaire hydrophile par l'intermédiaire d'un espaceur. La tête polaire, du fait de sa charge positive, va interagir avec les acides nucléiques. L'espaceur est impliqué dans la stabilité et la biodégradation du lipide cationique. Il joue donc un rôle dans la cytotoxicité potentielle de ces vecteurs synthétiques [338]. Le domaine hydrophobe intervient quant à lui

dans la structuration du vecteur et dans les propriétés fusionnelles du vecteur avec les membranes plasmiques et intracellulaires. En solution aqueuse, ces lipides vont adopter différents types de structures et influencer la structure finale des lipoplexes. La structure initiale des liposomes est majoritairement déterminée par les paramètres de Packing (P) de chaque lipide qui détermine si les liposomes vont adopter une configuration micellaire, en bicouche lipidique ou micellaire inversée (Figure 16). Il est possible de déterminer les paramètres de Packing de chaque lipide avec la formule suivante : $P=v/alc$; où v = le volume de la chaîne hydrophobe, a = la surface effective du groupe de tête et lc = la longueur des queues lipidiques (Figure 16).

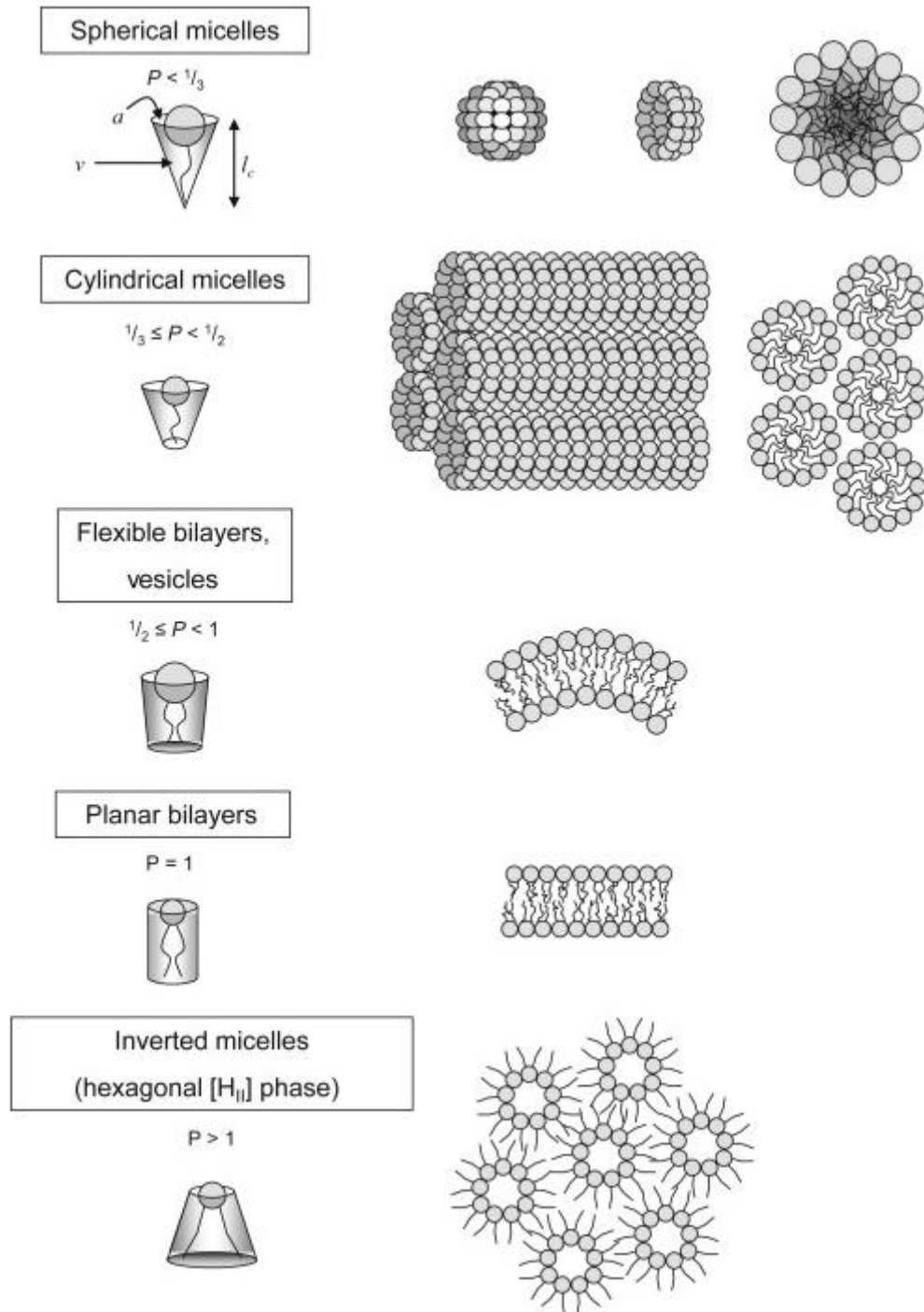


Figure 16 : Structure des liposomes en fonction des paramètres de Packing (Selon Daniel A Balazs *et al.* [339]).

Cependant, les forces électrostatiques impliquées dans la complexation des acides nucléiques ainsi que la taille et la forme des acides nucléiques, vont également influencer la structure des lipoplexes. Au final, c'est la courbure de la membrane lipidique qui définira si le

lipoplexe aura une structure lamellaire ($L_{\alpha}C$), hexagonale ($H_I C$) ou hexagonale inversée ($H_{II} C$) (Figure 17).

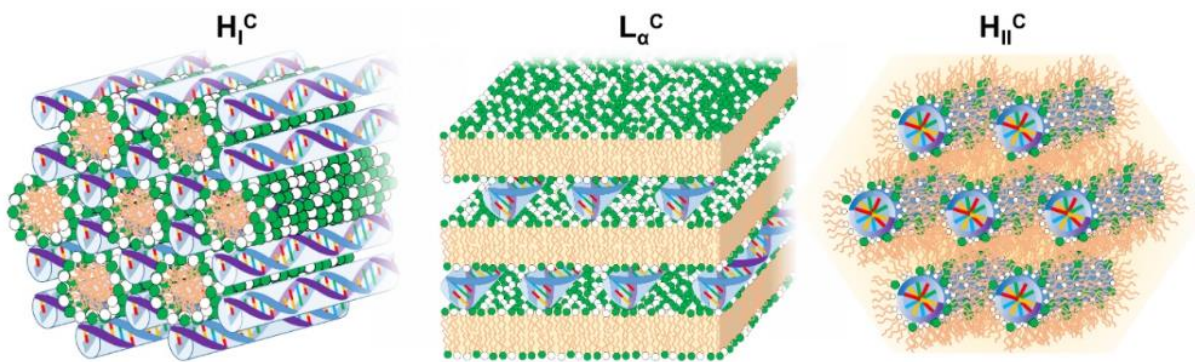


Figure 17 : Les différentes structures des lipoplexes (Selon Ricardo Gaspar *et al.*) [286].

L'étude et la compréhension de ces structurations sont d'une grande importance pour l'avenir de ces vecteurs depuis que de nombreux travaux ont démontré un lien direct entre l'organisation supramoléculaire du vecteur et son efficacité de transfection vis-à-vis d'un type cellulaire donné via différents mécanismes [306, 340-342].

Concernant les stratégies de réparation du cartilage, plusieurs types de lipoplexes sont déjà utilisés *in vitro*. Par exemple, le FUGENE6, un vecteur lipidique cationique avec une structure non liposomale est particulièrement utilisé dans ce domaine pour la transfection de CSM ou de chondrocytes [343-346]. Mais ces lipoplexes restent très faiblement efficaces sur les chondrocytes humains pour la transfection d'ADN plasmidique, avec une efficacité de transfection de seulement 3.9% sur des chondrocytes arthrosiques [347]. De plus, cette première génération de lipoplexes expose de faible taux d'encapsulation (ration acides nucléiques/lipides $\sim 0.001-0.1$, w : w) et est peu stable dans le temps ce qui la rend, par conséquent, relativement peu adaptée pour des applications *in vivo* [348].

Afin de répondre à la demande croissante de vecteurs compatibles pour une application clinique, des particules lipidiques exposant des structures complexes et variables ont été développées. En effet, la méthode de formulation classique pour former des lipoplexes, à savoir la formulation de liposomes cationique par évaporation/rehydratation d'un film mince de lipide suivit d'un mélange avec des acides nucléiques dans un tampon aqueux aboutit généralement à des efficacités d'encapsulation allant de $\approx 30\%$ à 40% [349]. Buyens *et al.* ont raisonné que si le

lipide cationique est distribué de manière égale dans la bicouche, l'efficacité d'encapsulation devrait s'approcher au maximum de 50 % puisque seulement la moitié du lipide cationique complexé avec le siRNA est situé dans le noyau intérieur du liposome, laissant l'autre moitié exposée à la surface du liposome [322]. La présence d'éthanol à 40% lors de l'hydratation du film lipidique avec des oligonucléotides antisens dissous dans un tampon de citrate à 65 °C a permis d'améliorer l'efficacité de l'encapsulation à $\approx 70\%$ [332]. Une simplification de cette méthode a consisté à mélanger des lipides dissous dans de l'éthanol avec une solution d'oligonucléotides antisens dans un tampon citrate (pH 4,0) dans un rapport de 2:3 (v/v, éthanol/aqueux) à 65 °C. Les liposomes résultants étaient de grandes vésicules unilamellaires ou de petites vésicules multilamellaires, selon le rapport oligonucléotide antisens/lipide utilisé [332]. Récemment, un plus grand contrôle a été obtenu sur le processus de mélange à travers l'utilisation de mélangeur à jonction en T [350-352] ou de mélangeurs microfluidique [353, 354]. Des observations en cryoTEM ont alors mis en évidence que la morphologie des particules obtenues n'était pas celle d'un liposome traditionnel caractérisé par une bicouche lipidique entourant un noyau aqueux, mais plutôt une particule caractérisée par un noyau dense en électrons, alors nommé « *Lipid NanoParticle* » (LNP). Ces LNP sont généralement constituées de lipides ionisables décrits dans le chapitre précédent, mais également de lipides structuraux hydrophobes type distearoylphosphatidylcholine (DSPC), cholestérol (CH) et de lipid-PEG (ex : DMG-PEG, DSPE-PEG, ACL159). Au sein de ces structures, il est supposé que presque tous les lipides cationiques ionisables sont situés dans le noyau intérieur de la particule, ce qui permet d'obtenir une grande efficacité d'encapsulation.

Ainsi, ces systèmes, initialement nommés *stabilized antisense-lipid particles* (SALP) se sont rapidement imposés comme une référence dans le domaine [332, 349, 354, 355]. Ces méthodes de formulation permettent de fabriquer des LNP avec une taille nanométrique et une faible polydispersité, ce qui les rend idéales pour des applications cliniques [334]. Récemment Shuai Liu *et al.* ont développé des LNP avec un lipide zwitterionique ionisable possédant trois queues hydrophobes. Dans l'environnement acide endosomal, ce lipide induit une transition hexagonale de la membrane et favorise l'échappement endosomal [356]. Dans la thérapie du cartilage, des LNP cationiques ont déjà été utilisés *in vitro* et *in vivo* afin de vectoriser des siARN dirigés contre le gène IHH (Indian Hedgehog) [268]. L'étude *in vivo* a montré une action spécifique des vecteurs sur le cartilage, probablement due à leur charge positive, ainsi qu'une action chondroprotectrice associée à une diminution de la progression de l'arthrose induite par chirurgie chez le rat.

Bien que peu étudiées dans le domaine de l'IT du cartilage, la faible immunogénicité, l'efficacité, la taille nanométrique et la compatibilité clinique font des LNPs, un vecteur particulièrement prometteur dans ce domaine.

II.2.2.3 Vecteur lipidique naturel : les vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires (EV) présentent un avantage majeur par rapport à leurs homologues synthétique, les liposomes : il a été démontré qu'elles sont beaucoup plus efficaces pour pénétrer dans les cellules cibles, à la fois *in vitro* et *in vivo* [357-360]. Les EV sont généralement classées en trois sous-catégories: (i) les corps apoptotiques (1-5 μm), formés par les cellules qui meurent par apoptose pour excréter les débris ; (ii) les microvésicules (MVs) (100-1000 nm), générées par bourgeonnement de la membrane plasmique des cellules ; (iii) les exosomes (50-150 nm), vésicules intraluminales créées par des replis de la membrane endosomale durant la formation d'endosomes multivésiculaires (MVE, *Multivesicular endosomes* ; intermédiaires dans le système endosomal) et sécrétées lors de la fusion de ces MVE avec la membrane plasmique [361]. Récemment, les EVs ont été décrites comme un moyen de communication de cellule à cellule d'une importance capitale dans divers processus physiologiques et pathologiques [361-363]. Il a également été démontré qu'elles intervenaient dans le transport d'information génétique, généralement sous la forme d'ARNm, de miARN ou d'ADN [364, 365]. La découverte de ce mécanisme endogène de transfert d'acides nucléiques apparaît comme une solution prometteuse de thérapie génique. Cependant, contrairement aux systèmes cationiques, les EV ne complexent pas naturellement les acides nucléiques, ce qui a conduit à l'élaboration de différentes méthodes de chargement. Il existe deux manières différentes de modifier le matériel génétique contenu dans les EV : soit en manipulant les cellules productrices pour permettre la libération de vésicules modifiées (méthodes biologiques ou pre-production), soit en modifiant directement des vésicules purifiées (méthodes physico-chimiques ou post-production).

La première approche vise à induire l'expression ou à transfecter les cellules productrices d'EV avec le matériel génétique d'intérêt afin de produire des EV contenant les molécules désirées [366]. De nombreuses études ont déjà démontré la faisabilité de ces approches [367-369]. Récemment, Shi-Cong Tao *et al* ont sur-exprimé miR-140-5p dans des CSM issues de la membrane synoviale (SCSM) afin de générer des EV chargées en miR-140-

5p (SCSM -140-E) [370]. Cette étude a montré que la stimulation par les SCSM-140-EVs a permis de modifier la synthèse des éléments de la MEC et a également amélioré la capacité des chondrocytes à proliférer et à migrer. Des résultats intéressants ont également été obtenus *in vivo* dans un modèle d'arthrose chez le rat. En effet, les SCSM-140-Exos ont permis de diminuer la progression de l'arthrose ainsi que les lésions du cartilage articulaire [370]. Bien que cette première méthode offre un moyen simple et efficace pour modifier le matériel génétique contenu dans les EV, les taux de chargement restent faibles et la production d'EV de manière normalisée est difficile, ce qui rend la reproductibilité de ces méthodes de pré-production délicates à contrôler [371, 372].

La deuxième approche consiste à charger les EV après leur isolement. Cette méthode est préférée d'un point de vue pharmaceutique, car les conditions de chargement sont mieux contrôlées. Cependant, jusqu'à présent, peu d'études ont réussi à charger efficacement des acides nucléiques dans des EV isolées et les rendements d'encapsulation restent faibles. Néanmoins, plusieurs méthodes ont été ou ont été suggérées comme étant réalisables.

La co-incubation : Cette méthode est particulièrement intéressante pour le chargement de molécules hydrophobes telles que la curcumine ou la doxorubicine, qui vont spontanément interagir avec la bicouche lipidique des EV [373]. Il n'est donc pas intuitif que ce type de méthodes soit efficace pour l'association de molécules d'ARN hydrophile chargée négativement. Elle a pourtant été évaluée via l'utilisation d'acides nucléiques conjugués avec une ancre hydrophobe (cholestérol) [374].

L'Électroporation : L'électroporation a été l'une des premières méthodes étudiées pour charger les acides nucléiques au sein des EV, en particulier à travers la preuve de concept de l'étude d'Alvarez-Erveti *et al.* utilisant des EV pour l'administration *in vivo* de siRNA vers le système nerveux central après injection intraveineuse chez la souris [358]. Cependant, une étude de Kooijmans *et al.* a reporté que dans certaines conditions, l'électroporation peut induire la formation d'agrégats de siARN. En prenant en compte ce phénomène, l'étude a démontré un chargement négligeable des siARN dans les EV pour les conditions d'électroporation testées [371, 375, 376]. L'agrégation des siARN en fonction des conditions d'électroporation doit donc être prise en compte pour déterminer les taux de chargement effectifs des EV. Malgré cela, cette méthode est encore fréquemment utilisée et l'efficacité thérapeutique semble être tout de même probante au regard d'un essai clinique en cours (NCT03608631) [377-380].

L'ultrasonication : L'utilisation d'ondes à hautes fréquences a pour objectif de former transitoirement des pores dans la membrane des EV afin de permettre le chargement des acides nucléiques. Récemment N. Lamichhane *et al.* ont démontré la présence de siARN dans des cellules transfectées par des EV chargées en siARN par une méthode de sonication [381]. Néanmoins, les paramètres expérimentaux tels que la puissance ou le temps de sonication, doivent être finement contrôlés afin de préserver la structure des EV et des ARN.

D'autres méthodes de chargement des EV telles que l'utilisation de détergents (ex : saponine), de cycles de congélation/décongélation et l'extrusion sont également étudiées pour d'autres types de biomolécules [366, 382]. Bien que prometteuses, ces méthodes n'ont pas encore été utilisées pour le chargement d'acides nucléiques. L'ensemble de ces données démontrent la preuve du principe de la modification des EV pour la thérapie génique, mais de nombreuses améliorations sont nécessaires afin d'obtenir des taux de chargement important et un système bien caractérisé pouvant être utilisé en clinique.

II.3 Les matrices génétiquement activées (MAG)

Dans le domaine de la thérapie génique appliquée à l'IT, il existe plusieurs limites :

- (i) Un effet transitoire non contrôlé de l'agent thérapeutique.

Dans le cas des stratégies basées sur l'utilisation des ARNi, l'effet transitoire, dû à la dégradation progressive des ARN dans le cytosol et à la division cellulaire, est généralement recherché. Cependant la durée d'action des ARNi est non contrôlée et souvent trop courte pour des applications d'IT. Concernant les stratégies basées sur la transgénèse, la quantité d'ADN plasmidique transfectée dans les cellules est également diluée dans le temps par le mécanisme de division cellulaire. De plus, comme l'essai thérapeutique InvossaTM l'a déjà montré, il est possible que les cellules transduites entrent en apoptose rapidement, ce qui limite leur effet thérapeutique et nécessite l'injection répétée de ces cellules.

- (ii) Une élimination rapide des acides nucléiques au niveau du site d'injection et une possible dissémination non voulue dans d'autres tissus.

Comme évoqué précédemment, les cellules injectées seules, sans supports ont tendance à migrer vers différents organes ou tissus non ciblés par la thérapie [154]. Il en va de même

pour les vecteurs d'acides nucléiques qui nécessitent une concentration élevée au niveau de leurs cibles cellulaires [383, 384].

Ainsi, une solution intéressante à ces deux problématiques réside dans l'élaboration d'une matrice génétiquement activée (MGA). Comme nous l'avons décrit précédemment, l'utilisation d'une matrice est nécessaire pour la grande majorité des applications d'IT. L'idée ici, est de modifier cette matrice en y incorporant le produit de thérapie génique. Ce qui permet d'une part, de maintenir l'agent thérapeutique spécifiquement au niveau du site de la lésion et donc d'éviter des interactions non souhaitées et d'autre part, de contrôler sa libération dans le temps afin de prolonger la régulation génique et la maintenir au niveau requis pour la régénération du tissu. Les différentes interactions permettant de maintenir les acides nucléiques dans la matrice et de contrôler leur libération seront décrites dans la revue : « Scaffold-biomolecule interactions applied to cartilage engineering »

En IT du cartilage, Rosanne M *et al.* ont récemment mis au point une MGA composée d'une matrice de collagène et d'acide hyaluronique, génétiquement activée par des nanocapsules de chitosan chargées avec de l'ADN plasmidique codant pour les gènes SOX5, SOX6 et *Sox9* [248]. Les auteurs ont montré une différenciation chondrocytaire des CSM humaines cultivées sur la MGA et l'absence de marqueurs hypertrophiques, en conditions *in vitro* et *in vivo* quatre semaines après implantation en sous-cutané chez le rat. L'étude a également montré une induction de la chondrogenèse *in vivo* après implantation de la MGA sans cellules. Les MGA ont l'avantage de délivrer les acides nucléiques thérapeutiques localement et pendant une période prolongée. Elles ont donc une action sur les cellules thérapeutiques implantées dans la matrice mais aussi potentiellement sur les cellules du tissu hôte [248, 249].

Ainsi, l'utilisation d'une MGA, réservoir d'acides nucléiques et support de cellules est une solution intéressante pour permettre à la fois d'améliorer la survie cellulaire et de maintenir une pression de transfection *in situ*, bien sûr à condition de contrôler précisément le chargement et la cinétique de libération de l'agent thérapeutique [249, 385].

III Les interactions Matrices-biomolécule appliquées à l'ingénierie du cartilage.

Comme nous venons de le voir, les thérapies d'ingénierie du cartilage basées sur les CSM nécessitent l'utilisation de bio facteurs, notamment des facteurs de croissance, des peptides ou du matériel génétique, pour aider à contrôler ou à améliorer la différenciation cellulaire, à maintenir l'état mature des chondrocytes. Ces facteurs diffèrent dans leurs mécanismes d'action mais aussi dans leurs fonctions au cours du processus de réparation du cartilage, il est donc important de contrôler précisément la cinétique d'action de ces biomolécules, afin d'éviter des effets indésirables. De plus, la réparation complète du cartilage endommagé nécessite un apport prolongé de bio facteurs qui peuvent varier au cours du processus de différenciation et de réparation tissulaire. Pour ces raisons, un contrôle spatio-temporel de ces molécules est essentiel afin de favoriser la formation d'une matrice cartilagineuse de haute qualité, avec les propriétés biomécaniques requises. Pour éviter l'injection répétée de biomolécules tout au long du processus de régénération du cartilage, de nombreuses recherches ont été menées pour incorporer ces biomolécules dans des matrices permettant de contrôler leurs libérations. D'autre part, la fonctionnalisation de ces matrices avec les biomolécules, doit permettre des taux de chargement et des profils de libération adaptés à la réparation du cartilage, tout en maintenant des propriétés physiques et biochimiques optimales des échafaudages. Pour cela différentes stratégies ont été développées, afin de retenir les biomolécules, de manière covalente ou non covalente dans les matrices tout en permettant une libération prolongée et contrôlée. En fonction des méthodes de fonctionnalisation utilisées, on peut obtenir différentes cinétiques de libération des bio facteurs et également des effets différents sur la chondrogenèse.

Nous avons discuté de ces différents points dans une revue de la littérature intitulée « Scaffold-biomolécule interactions applied to cartilage engineering »

TITLE: Scaffold-biomolecule interactions applied to cartilage engineering

Authors:

- Jérémy Salvador^{1,2,3}, Danièle Noël¹, Marie Morille², Emmanuel Belamie^{2,3}

Affiliations

IRMB, University of Montpellier, INSERM, Montpellier, France

ICGM, Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

EPHE, PSL Research University, 75014 Paris, France

ABSTRACT

Cartilage tissue engineering based on the use of biomaterials, stem cells and bioactive factors is in full development with the use of numerous biomolecules capable of precisely control chondrogenesis. However, it has been shown that the controlled release of these bioactive factors is essential to fully exercise the regenerative potential of Mesenchymal Stromal Cells and to promote efficient chondrogenesis resulting in the regeneration of hyaline cartilage. These problems have motivated the study of biomolecule-scaffold interactions in order to develop delivery systems which allow a sustained release and a controlled presentation of the biological factors essential for cartilage regeneration. This review focuses specifically on biomolecules involved in cartilage engineering and their interactions with biomaterials. We describe approaches to localize biomolecules and control their release from different scaffold using non-covalent method and covalent methods. We also discuss some methods described in the literature allowing the spatio-temporal control of biomolecules and their possible applications in cartilage engineering.

Keywords : cartilage; nucleic acids; grafting; weak interactions; hydrogels

INTRODUCTION

Articular cartilage injuries have many possible origins, including degenerative diseases and traumatic processes, that significantly compromise the quality of life of patients and represent a major cause of disability worldwide. Due to its avascular nature and a low chondrocyte to extracellular matrix (ECM) ratio, damaged cartilage has limited self-healing capability [1, 2]. Surgical techniques such as microfracture, implantation of autologous chondrocytes or mosaicplasty attempt to repair the damaged cartilage. However, current methods do not allow reaching the same biophysical properties as native cartilage, leading to accelerated matrix degradation and generally poor diagnosis on the long-term [3, 4]. Tissue engineering (TE) appears as a promising solution to restore the structure and function of articular cartilage [5]. It relies on the association of at least three different elements, including cells, a scaffold and biological factors [6]. The ultimate objective of cartilage engineering is to generate a fully functional repair tissue, which can ideally be achieved thanks to chondrocytes, the single mature cellular component of cartilage, capable of secreting the ECM specific of hyaline cartilage [7, 8].

Initial TE strategies have used chondrocytes combined with biofactors and a 3-dimensional construct to avoid chondrocytes dedifferentiation during the amplification phase *in vitro* [9, 10]. Besides, mesenchymal stromal cells (MSCs) appear to be of particular interest owing to their ability to differentiate towards chondrocytes under appropriate conditions [11] [12]. MSCs can be obtained from different sources including bone marrow, umbilical cord, adipose tissue, synovial membrane [13] [14]. However, bone marrow-derived MSCs represent the most promising source of MSCs used for cartilage engineering because of their higher chondrogenic potential [15, 16]. MSC-based therapies for cartilage engineering require the use of biofactors including growth factors, peptides, or genetic material to help control or enhance cell differentiation, maintain the mature chondrocyte state, hence promoting cartilage repair. These factors differ in their mechanisms of action but also in their functions during the process of cartilage repair, it is therefore important to precisely control the kinetics of action of these biomolecules, in order to avoid unwanted effects. Complete repair of damaged cartilage requires a prolonged intake of several biofactors that may vary along the differentiation process and tissue repair. For these reasons, controlled quantities and spatio-temporal release of these molecules are essential to promote the formation of high-quality cartilage matrix, with the

required biomechanical properties. To avoid repeated injection of biomolecules along the cartilage regeneration process, numerous investigations have been carried out to incorporate biomolecules into the constructs and control their delivery to resident or implanted cells.

The physical and biochemical properties of scaffolds are critical for the success of cartilage repair. First, they have to be biocompatible, including safety and functionality, to avoid inflammatory responses and to allow cell adhesion as well as integration into the host tissue. Ideally, scaffolds should be biodegradable to be gradually replaced by the neocartilage. Second, the biomechanical properties of scaffold should enable it to resist external forces originating from joint movements. Hence, the architecture of the scaffold plays a key role in maintaining its stability while allowing for cell impregnation, cell-to-cell interactions and the free circulation of nutrients and cell waste. Third, the functionalization of scaffolds with biofactors should be in agreement with the critical role of the biomechanical properties, which can also enhance or direct MSC differentiation [17, 18]. It is therefore essential to functionalize the scaffold allowing biomolecule loading rates and release profiles suitable for cartilage repair, while maintaining optimal physical and biochemical properties of the scaffolds.

In this review, we will first discuss the different biofactors currently in use for cartilage TE and their regulatory role on both the differentiation of MSCs towards chondrocytes and the secretion of cartilage ECM. In a second part, we will report the strategies developed to functionalize scaffolds with these biofactors and discuss the impact of the different functionalization methods on the release kinetics of biofactors and their effects on chondrogenesis (Figure 1).

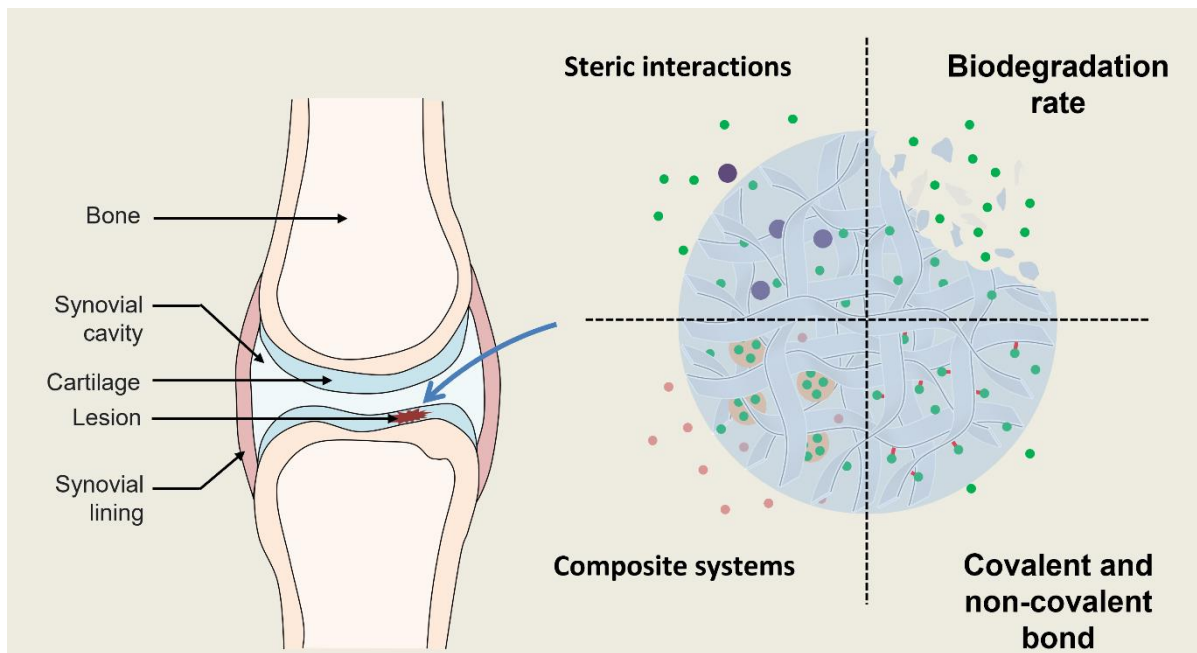


Figure 1: Scaffold-biomolecule interactions

BIOMOLECULES FOR CARTILAGE TISSUE ENGINEERING

Several biomolecules, including but not restricted to, growth factors, peptides, or genetic material, are described for mediate cellular proliferation, migration, and differentiation. These bio-factors can interact with target cells and trigger a series of specific cellular activities. In this first part, we will focus on the main biomolecules involved in the development of cartilage and describe their role in regulating the processes of chondrogenesis and hypertrophy (Table 1).

Table 1: Main biomolecules used for cartilage engineering and their effect on MSC chondrogenic differentiation.

Biomolecules	Type of biomolecule	MSC origin	Observed effect on MSCs	Unwanted effect on chondrogenic differentiation	Ref

TGF- β B	Growth factor	Bm-MSc	Proliferation / Chondrogenesis / Chondrocyte maintenance of articular chondrocytes	Hypertrophic differentiation	[22, 24, 163] [23]
BMP-2	Growth factor	Bm-MSc / Ad-MSc	chondrocyte matrix production	Hypertrophic differentiation / osteogenic differentiation	[173, 174]
BMP-4	Grow factor	Bm-MSc	Chondrogenesis / Maintain chondrocyte phenotype / matrix production / Inhibition of hypertrophic differentiation	/	[28]
BMP-6	Grow factor	Bm-MSc / Ad-MSc	Chondrogenesis (Ad MSc) / Matrix production / Inhibition of hypertrophic differentiation (Ad MSc)	Hypertrophic differentiation (Bm-MSc)	[175, 176]
BMP-7	Grow factor	Bm-MSc / Ad-MSc	Chondrogenesis / Matrix production / Inhibition of hypertrophic differentiation	/	[173, 177] [178]

IGF-1	Grow factor	Ad-MSC	Chondrogenesis	/	[31]
IGF-2	Grow factor	Bm-MSC	Chondrogenic differentiation priming	/	[34]
FGF-2 (bFGF)	Grow factor	Bm-MSC	Maintain chondrogenic potential / Matrix production	Promote fibrocartilage formation	[38, 39] [40, 41] [42, 43]
PDGF	Grow factor	Ad-MSC	Chemotactic effects / Proliferation / Chondrogenesis	/	[179, 180]
PTHrP	Protein	Bm-MSC / Ad-MSC	Inhibition of hypertrophic differentiation	/	[51, 52] [53]
Curcumin	pigment	Ad-MSC	Indirectly induce chondrogenesis	/	[61, 62]
Kartogenin	bioactive molecule	Bm-MSC	Chondrogenesis	/	[63, 64]
Genetic	Nucleic acid	Bm-MSC / Ad-MSC	Potential interest for all cartilage engineering step	/	[75, 76, 78, 142]

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) family includes TGF- β 1, 2, 3, Activins (A and B), Inhibins (A and B), Bone Morphogenetic Proteins (BMP-1 to 20), Growth Differentiation Factors (GDFs) including Nodal, myostatin (GDF-8), and Mullerian-inhibiting substance (MIS). TGF- β members bind serine/threonine kinase types I and II receptors anchored in the cell membrane leading to their phosphorylation and signal transduction through R-Smads 2 and 3 to the nucleus and modulate responsive genes [19, 20]. TGF- β 1, 2, 3 are potent stimulators of proliferation and metabolism of chondrocytes through the secretion of cartilage ECM components including proteoglycans and type II collagen [21]. TGF- β also plays critical roles in regulating MSC differentiation from early to terminal stages, including condensation, proliferation, commitment, maturation and terminal differentiation [22-24].

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are members of the TGF- β superfamily. They can induce the differentiation of MSCs into chondrocytes and promote the synthesis of cartilage ECM. At least 15 different BMPs have been described, of which BMP-2, BMP-4, BMP-6 and BMP-7 have been the most widely studied in the field of cartilage TE [25]. The different BMP isoforms act together or sequentially at all stages of differentiation [25-27]. Different BMPs seem to play different roles during chondrogenesis. For example, BMP-2 and BMP-4 induce the differentiation of MSCs into chondrocytes, but only BMP-4 can inhibit hypertrophic terminal differentiation [27]. Indeed, over-expression of BMP-4 suppress the formation of hypertrophic chondrocytes during the *in vitro* differentiation of murine C3H10T1/2 mesenchymal progenitor cells [28].

Insulin-Like Growth Factor (IGF) exists in two isoforms, IGF-1 and IGF-2. They have been shown to promote the proliferation of chondrocytes and regulate the secretion of cartilage ECM [29-32]. More specifically, IGF-1 was shown to induce the chondrocyte proliferation and chondrogenic differentiation of MSCs through the IGF-1/PI3K/Akt and IGF-1/MAPK/ERK signalling pathways, whereas IGF-2 was described to enhance differentiation by priming MSCs through SOX9 regulation [31, 33, 34]. These results suggest a requirement of both isoforms during the early phases of chondrogenic differentiation. IGF-1 can also be used at a later stage, to enhance the secretion of ECM [35, 36].

Fibroblastic Growth Factors (FGFs) belong to a family of 22 highly homologous polypeptides involved in chondrocyte proliferation, joint development, and homeostasis of cartilage. Among them, FGF-2 or basic FGF (bFGF), which is recognized by its cognate receptor FGFR-1, is the most studied for its effect on chondrocytes and MSCs through multiple downstream signalling cascades, including protein kinase C delta (PKC δ), nuclear factor-kappa B (NF κ B), Ras-Raf-mitogen activated protein kinase (MAPK) and PI3K/Akt pathways [37]. This growth factor is described for its capacity to enhance the proliferation of MSCs and to delay the loss of chondrogenic potential of MSCs as well as maintain the chondrogenic potential of chondrocytes during expansion and the differentiation of MSCs by up-regulating SOX9 [38-40]. However, other studies have shown that bFGF can promote chondrocyte catabolism via FGFR1/Ras/Raf/MEK1-2/ERK1-2 axis and inhibit the anabolic activity of IGF 1 and BMP-7 [41]. bFGF could also promote the formation of fibrocartilage, which is a poor alternative to hyaline cartilage [41-43]. Therefore, based on these studies, the use of bFGF in cartilage engineering is questionable. Nevertheless, improved healing of osteochondral lesions has been demonstrated in rabbits using a highly porous scaffold soaked with FGF-2. However, an inverse dose response was observed, which might partly explain the controversial results reported so far [44]. These results suggest that bFGF concentration might be an essential criterion for efficient cartilage repair and highlight the need for its tight controlled release by an optimized scaffold in order to maintain its beneficial properties.

Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) is a disulphide-linked dimer with a molecular weight of approximately 25 kD. This cytokine is released by platelets at sites of injury to promote mesenchymal cell proliferation [45]. Prolonged exposure to PDGF enhances cartilage ECM production, while suppressing the progression of cells along the endochondral maturation pathway [45]. These observations suggest the possibility to use PDGF at the late stage of MSC differentiation to avoid the hypertrophic state of differentiation. In addition, PDGF has potent chemotactic effects on MSCs and chondrocytes. Some isoforms, such as PDGF-BB, have an interesting chemoattractant property that could be used to retain MSCs and chondrocytes in a scaffold after in vivo implantation, allowing the secretion of ECM at the site of injury [46-48].

Parathyroid Hormone-related protein (PTHrP) is a member of the parathyroid hormone family secreted by MSCs, smooth muscle cells and some cancer cells. It is a 141 amino acid

polypeptide, which acts as an endocrine, autocrine, paracrine, and intracrine hormone. Most of its biological functions are mediated by its amino terminus, including its role on cartilage [49, 50]. PTHrP is largely described to promote chondrogenesis by suppressing the induction of hypertrophy through the transcriptional control of *Runx2* activity by Gsa/cAMP/PKA-dependent signalling pathway [51-54]. However, PTHrP is also described as able to induce osteogenic differentiation of bone marrow-derived MSCs through upregulation of local factors, notably BMPs [55, 56]. In the context of MSCs-based cartilage TE, these results reveal the importance to precisely control the action of PTHrP in order to take advantage of its anti-hypertrophic function without impacting the early steps of the MSC chondrogenesis.

Curcumin is a yellow polyphenol pigment isolated from *Curcuma longa* called turmeric and found in Indian spice. It has been studied for its antioxidant and anti-inflammatory effects [57-59]. Recently, high viability and phenotype maintenance of chondrocytes cultured in curcumin-containing silk scaffolds suggested a great potential for cartilage engineering [60]. Although the role of curcumin in chondrogenic differentiation is not yet fully understood, it might induce indirectly the chondrogenic differentiation of MSCs thanks to its anti-apoptotic capacity via caspase-3 inhibition and its anti-inflammatory function on prostaglandins such as PGE2 [61, 62].

Kartogenin (KGN) is a small molecule reported to promote collagen synthesis and enhance the chondrogenic differentiation of MSCs. KGN is promising in cartilage repair for its chondroinductive and chondroprotective capacities, together with other advantages, such as low immunogenicity [63]. Furthermore, absence of induction of gene products related to hypertrophy and calcification was observed when KGN was applied on MSCs or chondrocytes [63, 64] Although dosage and duration time still remain to be optimized, several studies have reported the beneficial effect of a continuous supply of KGN released by a scaffold on cartilage repair [65-67].

Nucleic acids-based strategies rely on the modulation of transcription factors or regulatory molecules in transfected cells or the endogenous cartilage tissue, in case of ex vivo and in vivo strategies respectively [68-70]. In parallel, the increase in knowledge on MSC

biology has allowed the discovery of numerous nucleic acid molecules capable of influencing the chondrogenic differentiation of MSCs, as a complementary and powerful strategy for cartilage TE [71-75]. Due to their diversity, nucleic acids-based therapies can target the entire differentiation process, from the induction of differentiation to the maintenance of the quiescent stage of chondrocytes and the inhibition of hypertrophy [76-78]. As an example, using RNA interference (RNAi) tools, the specific suppression of anti-chondrogenic factors could represent a promising approach for MSCs-based cartilage repair. Recently, several teams have demonstrated the potential of siRNAs targeting the *Runx2* gene to inhibit the expression of hypertrophy markers after chondrocyte differentiation of MSCs [73, 79]. Besides, other studies have shown the potential of miRNAs to regulate the expression of genes involved in cartilage synthesis and homeostasis [80-83]. Such a diversity of action requires the development of scaffolds and vectors allowing precise spatio-temporal control to finely regulate gene expression and reproduce the natural process of chondrogenesis.

As described above, cartilage TE is regulated by many biomolecules (Table 1). Among these, some enhance the overall anabolic activities of chondrocytes while others positively or negatively regulate a specific stage of chondrogenesis, depending on their function or the time of application. However, most of them have short-term efficacy due to their rapid degradation after injection and require the development of sustained release systems. Scaffold engineering to precisely fine-tune the spatiotemporal release of biomolecules is therefore being investigated to better control cell behaviour and in fine, improve TE cartilage [25].

CHEMICAL INTERACTIONS BETWEEN BIOMOLECULES AND SCAFFOLDS

A wide variety of scaffolds combined with MSCs have been developed to promote cartilage repair. The last generation of such cellular scaffolds also serve as reservoir for biomolecules, allowing their release directly into the tissue ECM at the site of injury. In this section, we will discuss the different strategies aiming at a precise spatio-temporal release control. Both covalent and non-covalent interactions between the scaffolds and biomolecules can be involved and exploited to achieve the desired release sequence, as detailed below in the context of cartilage repair.

NON-COVALENT INTERACTIONS

Many three-dimensional matrices and porous scaffolds designed and evaluated for cartilage tissue engineering act as biomolecule release systems, where non-specific interactions affect their incorporation and release kinetics (Table 2).

Weak, electrostatic, and hydrophobic non-covalent interactions are widely involved in scaffold-growth factor interactions. Several natural macromolecules, abundant in the connective tissues of vertebrates (collagen, heparin, or hyaluronic acid) and largely used to elaborate scaffolds for tissue engineering, exhibit attractive interactions with diffusing active biomolecules. Some GFs, including TGF- β 1, FGF-2 and BMP-2, naturally possess a strong affinity for collagens and can bind to collagen-based scaffolds via ionic interactions. However, the release profile usually features an initial burst, which makes this approach unsuitable for controlled release [84-86]. One possibility explored to enhance their binding to the scaffold and slow down the release is to engineer these recombinant proteins by adding a collagen binding domain (CBD) at one terminal end [87]. The resulting chimeric proteins have been investigated to functionalize collagen-based biomaterials [88]. A CBD-containing PTHrP composed of 7 amino acids displays a higher collagen binding capacity with a dissociation constant more than two times lower, compared to the native PTHrP [89]. Applied to cartilage engineering, this peptide binding could allow sustained release of the biomolecule of interest from a collagen scaffold and prolong its effect, over several days. Conversely, peptides with a strong affinity for specific regions of GFs can be designed to control presentation and activity [90]. The modification of scaffolds with such peptides resulted in higher retention and better controlled release, thus reducing the amount of GFs required, hence a more cost-effective approach for TE applications [91-93]. Several TGF- β 1-binding peptides, including HSNGLPL, have been used to functionalize biopolymer scaffolds, with in vitro and in vivo applications [94-97]. Similarly, the incorporation of heparin in scaffolds is widely used for drug delivery purposes [98-100]. Indeed, positively charged amino acids of GFs can interact with Glycosaminoglycans (GAGs) through electrostatic interactions, particularly with the sulphate groups of heparin sulphate proteoglycans (HSPG) that are widely produced in the ECM of tissues [98, 101-105]. For instance, heparin was trapped as a semi-interpenetrated polymer within a crosslinked network or covalently bound to a polymer backbone by grafting tyramine, methacrylate, thiols or maleimide moieties to the heparin chains [106-110]. Once trapped in the network of polymers or grafted onto the scaffold, heparin retains by electrostatic interactions, and gradually releases several Gfs such as TGFB or bFGF. Recently, heparin covalently conjugated to a hyaluronan hydrogel was shown to achieve sustained release of TGF- β 1: 60% of TGF- β 1 was

released after two weeks, whereas in the absence of heparin, 97% of TGF- β 1 was released over the same period [111]. This system has shown excellent results on chondrogenesis with an initial dose of 5 ng/scaffold [111].

Interestingly, sulphated alginate, which is used in cartilage engineering for its beneficial effect on proliferation and maintenance of the chondrocyte phenotype, can also act as GAG analogue and interact with most of GFs [112-114]. This dual property of alginate was used to form a macro-porous alginate scaffold, where uronic acid units were sulphated to mimic heparin, and successfully loaded with TGF- β 1 to enhance MSC chondrogenesis [115].

Hydrophobic interactions can also increase the retention of biomolecules into a scaffold. As an example, gelatin or gelatin-silk fibroin microspheres have been used for sustained release of curcumin adsorbed into the microspheres for the treatment of OA [116]. Curcumin was released from the two types of microspheres, but the release rate was higher with gelatin microspheres than gelatin-silk fibroin microspheres. The slower release profile of the gelatin-silk fibroin microspheres was attributed to hydrophobic interactions between the curcumin and the hydrophobic domains of the silk fibroin, and to the lower degradation rate compared to pure gelatin microspheres [116].

Steric interactions are involved when biomolecules are loaded or released by diffusion through and out of the matrix. The loading rate and the delivery kinetics depend on the vector size but also the structure of the 3D matrix in which they are encapsulated. Structural features include the morphology, density (concentration, crosslinking rate), porous structure (tortuosity, pore size) of the scaffold. As an example, more than 95% of IGF-1 was released over a 28-day period, with gelatin microparticles cross-linked with 40 nM glutaraldehyde, while similar release values were obtained after only 6 days when using microparticles cross-linked with 10 mM glutaraldehyde [117]. The steric interactions between a biomolecule and a scaffold can influence the kinetics of release, but in certain cases, the biomolecule is encapsulated in a vector, which by its large size promotes steric interactions. Recently, several non-viral vectors have been developed for the application of gene therapy to cartilage engineering [1, 78, 118, 119]. In this case, the modification of nucleic acid release profiles is mainly due to the steric bulk of nanovectors and to the possible electrostatic interactions between the vector and the scaffold matrix as described elsewhere (for review, see [78]). An example of the impact of steric interactions has been described when testing siRNA release after encapsulation in

nanoparticles. siRNA-nanoparticles (si-NPs) were formulated on the basis of a defined charge ratio between the number of positively charged tertiary amines on the DMAEMA block of DMAEMA-b-p polymer, relative to the number of negatively charged phosphate groups on the siRNA backbone. The si-NPs were loaded in a porous biodegradable polyester-polyurethane (PUR) scaffold by diffusion and the release kinetics of encapsulated siRNAs and free siRNAs were compared. The release data demonstrated cumulative release of NPs-encapsulated siRNAs approaching 80 % over 21 days compared to naked siRNAs, which were released rapidly, approaching 100 % delivery of the payload in three days. The release rates of naked and complexed siRNAs scaled in relation with their hydrodynamic diameter and their diffusivity throughout the PUR matrix [120].

Conventional “subtractive” scaffold processing techniques, such as solvent casting, particulate leaching, gas foaming, phase separation, melt moulding or freeze drying provide only partial control over the scaffolds’ structure and porosity. In contrast, “additive manufacturing” technologies bring about unprecedented opportunities for the design, prototyping and manufacturing of well-defined 3D materials adapted for TE applications [51]. Several studies have shown the potential of coaxial electrospinning to obtain a scaffold with a core-shell structure, high surface-to-volume ratio, high porosity, adjustable pore size and morphological similarity to the extra cellular matrix, adapted to cartilage TE [121, 122]. In coaxial electrospinning, the shell solutions should exhibit spinnability properties to form the mainpart of the nanofibers. However, the core solutions have no need for spinnability; thus, drugs, proteins, and some bioactive substances, can be incorporated into the core structure of nanofibers allowing the controlled release of biomolecules [121-123]. Layer by layer assembly (LBL) is also commonly used to construct porous scaffolds with good performance in avoiding growth factors loss of function and sequestering the high concentration of growth factors under mild aqueous conditions allowing for the controlled delivery of GFs [30, 51, 124]. Most importantly, three-dimensional bioprinting appears as a promising process to create biomimetic tissues and to deliver biomolecules encapsulated in the materials. Biomolecules can be inserted at the desired 3D position in order to build a scaffold with spatiotemporal controlled biomolecule release properties [125, 126]. Recently, a method for 3D printing of hydrogel matrices with core-shell capsules sensitive to external stimuli was designed for programmable release of biomolecules (Figure: 2) [127]. These capsules consist of an aqueous core, which can be formulated to maintain the activity of payload biomolecules, and a polylactic-co-glycolic acid shell that sterically holds the molecules in the capsules. The shell is loaded with plasmonic

gold nanorods (AuNR) that selectively disrupt the capsules when irradiated with a laser at a specific wavelength, therefore triggering the release of biomolecules with high spatiotemporal control [127].

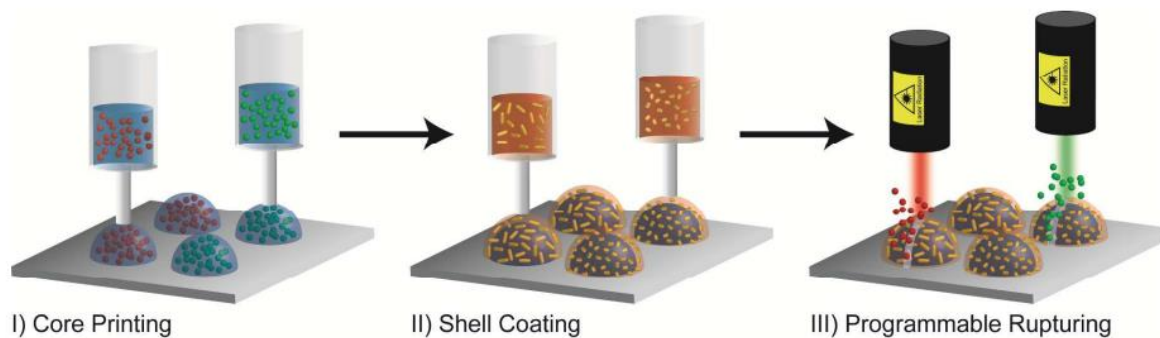


Figure 2: Programmable printing and rupturing of capsules.

I) Multiplexed arrays of aqueous cores containing biomolecular payloads are printed directly on a solid substrate, II) PLGA solutions containing AuNRs of varying lengths are dispensed directly on the aqueous cores, forming a solid stimuli-responsive shell, III) The capsules are selectively ruptured via irradiation with a laser wavelength corresponding to the absorption peak of the nanorods. Reprinted from Gupta, M.K., *et al.*, 3D Printed Programmable Release Capsules. *Nano Letters*, 2015. 15(8): p. 5321-5329.

Such techniques have been applied to cartilage repair. A bioink composed of 10% gelatin methacrylate (GelMA), polyethylene glycol diacrylate (PEGDA), biocompatible photoinitiator and TGF- β 1 embedded nanospheres has been fabricated via a core-shell electrospaying technique [128]. Interesting results were obtained with a sustained release of TGF- β 1 up to 21 days and improvement of the chondrogenic differentiation of encapsulated MSCs [128].

Composite systems comprised of hydrogels loaded with nano- or micro-particles are also interesting to improve the release of drugs or other biofactors. Hydrogels are efficient biomaterials for TE as already widely described but when not modified with affinity peptides, hydrogels lack of strong interactions with biomolecules and are often limited for long term delivery [129-132]. To overcome this limitation, the combination of microparticles (MPs) or NPs with hydrogels is a promising composite system for bioactive cargo delivery in cartilage engineering [133]. MPs and NPs display high surface area to volume ratios, small dimensions, high drug encapsulating efficiencies and the capacity to quickly respond to surrounding environmental stimuli, such as temperature, pH, magnetic fields or ultrasounds [134-136]. In this field, PLGA polymer is widely used due to its controllable degradation profile, ease of manufacture and is FDA-approved for drug delivery and many other clinical applications [137]. A biodegradable PEG-based hydrogel containing TGF- β 1 loaded PLGA microspheres was

shown to allow for the sustained release of TGF- β 1 up to 21 days [138]. More recently, sustained release of TGF- β 3 loaded in PLGA microspheres encapsulated in a methoxy poly(ethylene glycol)-poly(alanine) (mPA) hydrogel was observed for over 8 weeks. It was associated with enhanced chondrogenesis and reduced osteogenesis [139]. Others have investigated the release kinetics of BSA from PLGA microspheres, mPA hydrogel, and hydrogel-encapsulated microspheres. BSA encapsulated in hydrogels reached a release plateau within one week, while a release burst at 24h was observed for BSA encapsulated in PLGA microspheres and a sustained BSA release was observed over 2 months for the composite system [139]. The different release kinetics were due to the instability of microspheres in the aqueous environment. Such composite system was also successfully used for KGN delivery by biodegradable PLGA-based NPs embedded in photocrosslinked acrylated HA hydrogels [67]. The release rate of KGN was nearly linear during the 2 months of the experimental period. Another relevant composite system to control KGN delivery used ultrasound-responsive PLGA MPs embedded in a chitosan-oxidized chondroitin sulfate (CMC-OCS) hydrogel [140]. The composite system reduced the initial burst and provided sustained release up to $44.51 \pm 2.77\%$ of the initial load after 30 days. More interestingly, upon exposure to ultrasounds, a burst of KGN was seen and release of $72.52 \pm 1.75\%$ of initial load was quantified at day 28. Ultrasounds accelerated polymer degradation and KGN release (Figure 3).

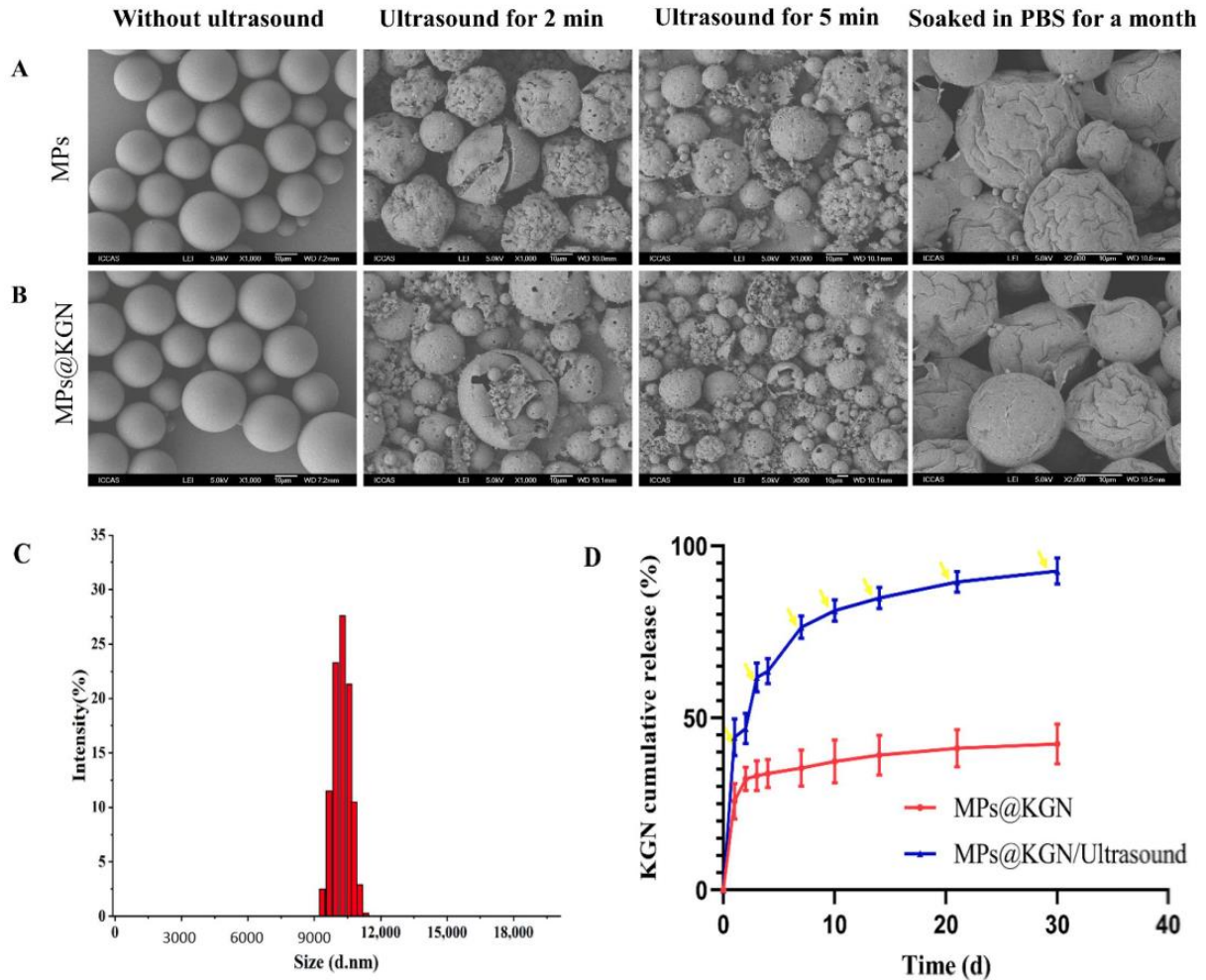


Figure 3: SEM images of MPs with and without KGN: (A) MPs without KGN; (B) MPs with KGN; (C) size distribution; (D) in vitro KGN release profiles of PLGA MPs and the yellow arrow represents ultrasound for 2 min. Reprinted from Yuan, F.Z., *et al.*, Fabrication of Injectable Chitosan-Chondroitin Sulfate Hydrogel Embedding Kartogenin-Loaded Microspheres as an Ultrasound-Triggered Drug Delivery System for Cartilage Tissue Engineering. *Pharmaceutics*, 2021. 13(9) [140].

The main advantage of this strategy is the ability to trigger the release of KGN for optimized temporal control. Another advantage of composite systems using hydrogel and MPs or NPs, is the possible sequential release of various biological factors depending on the size of the particles, MPs or NPs, or to load molecules directly into the hydrogel for rapid release [133]. This system, inducing a sequential release has already been used in cartilage TE using TGF- β 2 loaded in polyionic complex NPs that were encapsulated in an alginate hydrogel loaded with BMP-7. A faster release of BMP-7 and a slower release of TGF- β 2 were described with 80 and 30% of release, respectively, after 21 days of incubation at 37°C under mild shaking [141].

Compared to MPs, NPs exhibit a similar release mechanism but higher versatility as they can release biomolecules outside and inside target cells. This property is particularly useful for gene transfer strategies, since NPs preserve nucleic acid integrity and serve as a vector enabling genetic material to cross the cell membrane [78, 142, 143].

Gene therapy is a promising strategy to deliver genetic material in target cells and support the expression of therapeutic factors over prolonged periods of time, as compared to recombinant molecules that have a short half-life [119, 144]. Gene therapies also offer the opportunity to regulate gene expression through interfering RNAs (RNAi) such as siRNAs or miRNAs in order to control the anabolic/catabolic balance in cartilage disease or during cartilage repair [142, 145]. However, RNAi molecules have a transient effect and *in vivo*, RNAs is prone to degradation by serum nucleases, which prevents transfection from acting over well-defined periods as would be necessary. Therefore, temporarily, and spatially controlled delivery remains a crucial requirement for efficient RNAi therapy. In order to control the release of siRNA, Nalbadis *et al.* have recently demonstrated that siRNA lipoplexes encapsulated in a hydrogel exhibited a prolonged release over 60 days, whereas naked siRNA was released from the hydrogel in 24 hours [146]. More recently, in the field of joint diseases, Bin Li *et al.* have developed Mir-140-containing micelles entrapped in a metalloproteinase (MMP) sensitive microparticles composed of gelatin methacryloyl hydrogel and allowing continuous release over 14 days [147]. Interestingly, the authors showed an increase in release kinetics in the presence of MMP with a release plateau reached on day 5, providing an interesting approach to a sustainable and controllable release of biomolecule [147]. This strategy seems interesting for an application in TE with a triggered release of the therapeutic agent by the hypertrophic chondrocytes which secrete MMPs [148, 149].

COVALENT INTERACTIONS

Covalent binding of biomolecules to scaffolds is commonly used to increase retention rate and significantly reduce the initial burst release often observed with non-covalent methods [150]. Biomolecules can be directly grafted to the materials matrix or attached via a linker. The immobilization strategies may involve existing chemical functions present on the scaffolds and biomolecules or require previous activation. Because biomolecules generally are usually not

soluble or will be denatured in organic solvents, their bioconjugation requires the use of aqueous-based chemistry. To address these needs, various activation strategies are being developed, and the main biocompatible chemical immobilization systems adapted to cartilage TE are presented below (Table2).

Table 2: Main entrapment mechanisms used for the controlled release of biomolecules used for the chondrogenic differentiation of MSCs.

Interactions type	Entrapment mechanism	Biomolecule	Ref
Non covalent interactions	Weak interactions	TGF- β 1-2-3 / PTHrP / bFGF / BMP-2 / Curcumin / Nucleic acids	[78, 84, 85, 89, 111, 115, 116]
	Steric entrapment	TGF β 1-2-3 / IGF / bFGF / PTHrP / BMPs / Kartogenin / Curcumin / Nucleic acid / Nucleic acid	[51, 120]
	Composite system	TGF-b1-2-3 / BMP-7 / kartogenin / Curcumin	[67, 138-141, 181]
Covalent interactions	Crosslinking agents	TGF- β 1-3 / BMP-2 / BMP-4 / Kartogenin	[152, 153, 155, 156]
	Photo-Immobilization	BMP-2 / PDGF	[160, 161]
	Click Chemistry	TGF- β 1	[167-169]

Direct grafting. One of the most common methods for conjugating biomolecules is the formation of an amide bond between a carboxyl group of the biological factor and a primary amine on the scaffold matrix, or vice versa. The zero-length linker EDC (1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl) carbodiimide hydrochloride), a water soluble carbodiimide, is often

used to activate the carboxyl groups [92, 151] and is released after formation of the amide bond, leaving no additional atom between the support and biofactor. EDC has been used to conjugate TGF- β 1, TGF- β 3, BMP-2 and BMP-4 to a variety of biomaterials [152-154]. The release of TGF- β 3 immobilized on PLGA-gelatin-chondroitin sulfate-hyaluronic acid hybrid scaffold at 37°C demonstrated a biphasic pattern characterized by a fast release of 14.5% of initial loading during the first day followed by a plateau by day 7 to reach 29.5% of release at 28 days. The release of TGF- β 3 induced the chondrogenic differentiation of MSCs [153]. To improve biomolecule immobilization, sulfo-N-hydroxysuccinimide (sulfo-NHS) is often combined to EDC to form a more stable amine-reactive sulfo-NHS ester intermediate, with improved reaction efficiency in aqueous media [91, 150, 155]. The combination of EDC and NHS activation was used to conjugate KGN on chitosan-based NPs and MPs, which resulted in higher in vitro chondrogenic differentiation of bone marrow-MSCs compared to control with unconjugated KGN [156]. In vivo, less degenerative changes were observed in rats surgically induced to develop OA when treated with NPs or MPs versus rats treated with unconjugated KGN. Again, a sustained release profile was observed with only 30-50% of total KGN measured at 7 weeks, although a larger amount of KGN was released from MPs than from NPs (Figure 4) [156].

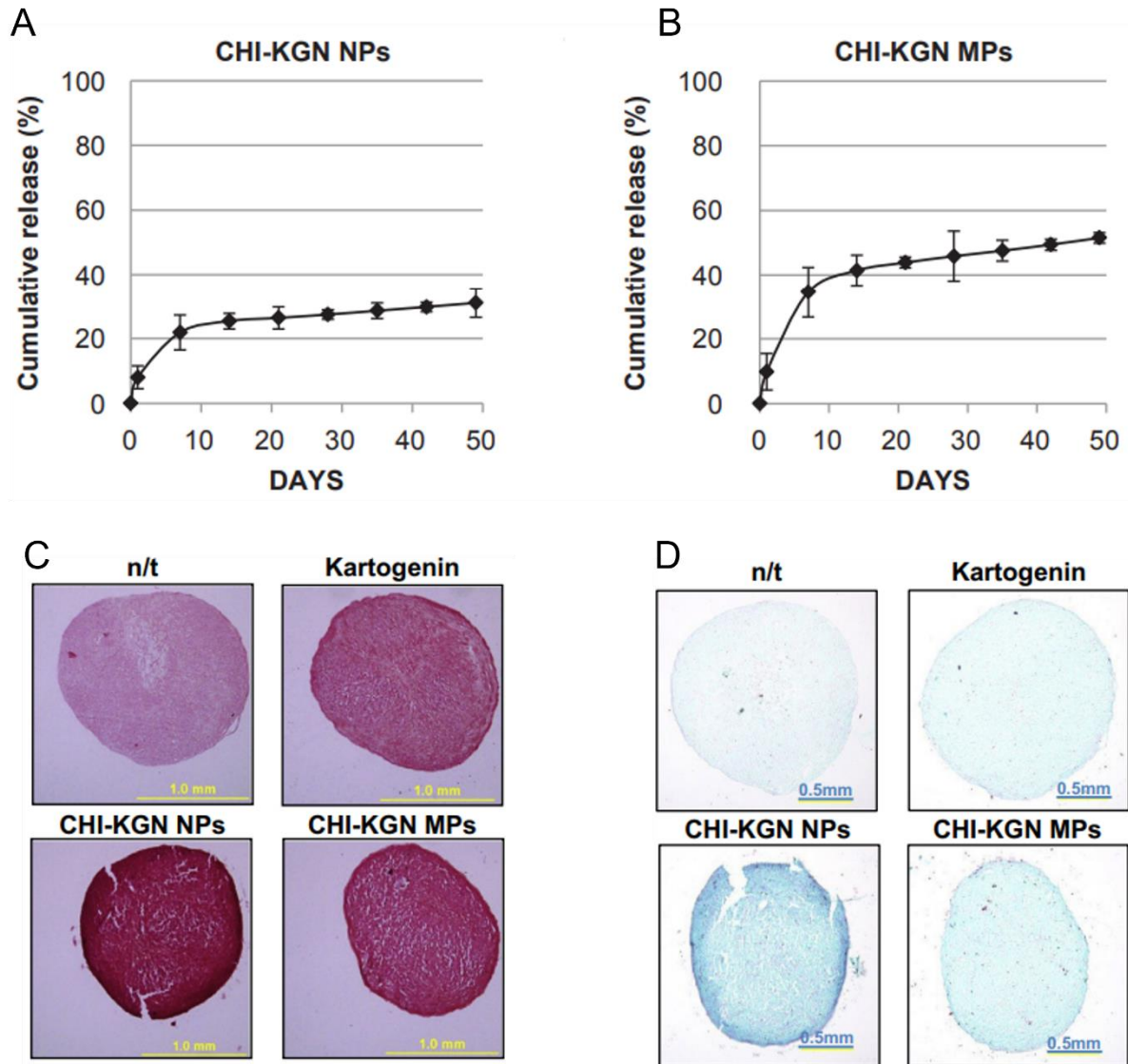


Figure 4: In vitro release of kartogenin from CHI-KGN NPs (A) and CHI-KGN MPs (B) at 37°C (n = 3) and Safranin-O (C) and Alcian-blue (D) staining on day 21 from hBMMSCs that underwent chondrogenic induction in pellets with no treatment (n/t), 100 nM unconjugated kartogenin, CHI-KGN NPs or CHI-KGN MPs which can release kartogenin to 100 nM for 21 days. Reprinted from Kang, M.L., *et al.*, Intra-articular delivery of kartogenin-conjugated chitosan nano/microparticles for cartilage regeneration. *Biomaterials*, 2014. 35(37): p. 9984-9994.

Photo-Immobilization is another common method to immobilize biofactors on biomaterials. Photoinitiated reactions provide additional control over the location of biomolecules grafting sites within a 3D structure thanks to localized application of UV irradiation. Biomolecules must be first functionalized with a photoreactive group such as benzophenone [157] or azidophenyl [158]. Then, the modified biomolecule is bound to the biomaterial upon exposure to light, typically UV [91, 92, 159].

BMP-2 and PDGF were photo-immobilized by to promote osteogenesis [160, 161] and were also investigated for cartilage engineering, along with other pro-chondrogenic factors [162]. As an example, TGF- β 1 was conjugated to acrylated PEG molecules (acryloyl-PEG-NHS) by the reaction of amine groups of the growth factor with succinimidyl groups on PEG. This acrylated PEG-TGF- β 1 conjugate was combined with PEG-diacrylate and the mixture exposed to UV light to initiate the crosslinking reaction and form a hydrogel. Covalently immobilized TGF- β 1 increased matrix production by vascular smooth muscle cells embedded in the PEG hydrogel [163].

Click Chemistry represents a quick, selective, and high yield chemical conjugation [164, 165]. Most click reactions offer the advantage of being nontoxic for cells and to be carried out in water or in complex biological environments [166]. Among them, thiol-based click strategies rely on reactions between free thiols that exist in cysteine residues of native GFs. Alternatively, thiols can be introduced chemically on the primary amines of biomolecules, notably proteins, using 2-iminothiolane, also known as Traut's reagent [167, 168]. This chemical modification was applied for instance to the immobilization of TGF- β 1 onto an acrylated poly(glycidol) (PG-Acr) hydrogel. Acrylate groups on the PG-Acr served both to the hydrogel formation and to the conjugation with the thiolated growth factor via Michael-type addition. Grafting of TGF- β 1 did not compromise hydrogel gelation and chondrogenesis of encapsulated MSCs was significantly improved compared to gels with TGF- β 1 simply impregnated without thiolation. [169]. In another example, hydroxyethyl cellulose (HEC) was modified to make it amenable to biorthogonal click chemistry. This largely available modified natural polymer has been considered for cartilage tissue engineering applications but is lacking reactive functions. Nouri-Felekori *et al.* recently proposed a method based on a first esterification step with citric acid to introduce carboxylic functions (handles), which used to introduce either azide and alkyne (DBCO) moieties. Alkyne- and azide- modified HEC are then mixed and reacted by strain-promoted azide-alkyne cycloaddition method (SPAAC) to form a biocompatible and biorthogonal HEC scaffold [170]. The reactivity thus introduced on HEC could then be exploited to immobilize biomolecules, for instance with N-terminal azide-modified growth factors. However, poorly controlled covalent modifications can negatively affect biomolecule activity. Therefore, the immobilization strategy should be appropriate to the chemistry of biomaterials, the availability of reactive groups in the biomolecule structure and the location of the reactive groups relative to the receptor binding zone [171, 172].

CONCLUSION AND OUTLOOK

Cartilage TE aims to produce a neo-cartilaginous tissue with a physiological function identical to native cartilage. However, current TE protocols generally result in the production of ECM with inferior molecular and biomechanical properties. In order to improve cartilage repair from MSCs- or

chondrocytes-containing scaffolds, different biomolecules have been incorporated in scaffolds. These biofactors are involved in different stages of the differentiation process or cartilage homeostasis and generally require a prolonged release from the scaffolds due to their rapid elimination in vivo. In addition, depending on the biofactor used, different kinetics of action are often necessary. Important progress has been made with the use of scaffolds as a reservoir of biomolecules, which has made it possible to greatly increase the biological activity of biomolecules and avoid repeated injections. Increased knowledge on non-covalent interactions between different scaffolds and free or vectorized biomolecules has allowed the development of systems allowing sustained release of biomolecules over several weeks or even months with promising results for TE cartilage. In addition, progress in the field of biomaterial chemistry has improved the control and retention of biomolecules in the scaffolds while maintaining their bioactivity. Covalent interactions between biomolecules and scaffolds present the advantage to master the prolonged release systems compared to physical absorption method. Cleavable linkers, pH- or protease-sensitive for instance, also hold great potential for the conditional release of active molecules triggered by changes in the local tissue environment. Improvement of scaffold-biomolecule interactions chemistry is still required to allow more precise spatio-temporal control of biological factors able to stimulate an effective signaling cascade to promote cartilage repair.

REFERENCES

1. Saraf, A. and A.G. Mikos, Gene delivery strategies for cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006. 58(4): p. 592-603.
2. Ahmed, T.A. and M.T. Hincke, Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010. 16(3): p. 305-29.
3. Browne, J.E. and T.P. Branch, Surgical alternatives for treatment of articular cartilage lesions. *J Am Acad Orthop Surg*, 2000. 8(3): p. 180-9.
4. Gahunia H.K., P.K.P.H., *Structure and Function of Articular Cartilage*. Springer, New York, NY, 2020.
5. Hunziker, E.B., Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. 10(6): p. 432-63.

6. Costa, J.B., et al., Tissue engineering in orthopaedic sports medicine: current concepts. *Journal of ISAKOS: Joint Disorders & Orthopaedic Sports Medicine*, 2017. 2(2): p. 60-66.
7. Buckwalter, J.A., H.J. Mankin, and A.J. Grodzinsky, Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect*, 2005. 54: p. 465-80.
8. Buckwalter, J.A., et al., Soft-tissue aging and musculoskeletal function. *J Bone Joint Surg Am*, 1993. 75(10): p. 1533-48.
9. Kessler, M.W., et al., Emerging technologies and fourth generation issues in cartilage repair. *Sports Med Arthrosc Rev*, 2008. 16(4): p. 246-54.
10. Perrier-Groult, E., et al., Control of collagen production in mouse chondrocytes by using a combination of bone morphogenetic protein-2 and small interfering RNA targeting *Colla1* for hydrogel-based tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng Part C Methods*, 2013. 19(8): p. 652-64.
11. Rosenbaum, A.J., D.A. Grande, and J.S. Dines, The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment. *Organogenesis*, 2008. 4(1): p. 23-7.
12. Nejadnik, H., et al., Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med*, 2010. 38(6): p. 1110-6.
13. Uzielienė, I., et al., Different phenotypes and chondrogenic responses of human menstrual blood and bone marrow mesenchymal stem cells to activin A and TGF- β 3. *Stem Cell Res Ther*, 2021. 12(1): p. 251.
14. Maumus, M., et al., Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)*, 2011. 35(9): p. 1141-53.
15. Liu, T.M., et al., Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells*, 2007. 25(3): p. 750-60.
16. Hennig, T., et al., Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGF β receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *J Cell Physiol*, 2007. 211(3): p. 682-91.

17. Ge, Z., et al., Functional biomaterials for cartilage regeneration. *J Biomed Mater Res A*, 2012. 100(9): p. 2526-36.
18. Leach, J.K. and J. Whitehead, Materials-Directed Differentiation of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering and Regeneration. *ACS Biomater Sci Eng*, 2018. 4(4): p. 1115-1127.
19. Weiss, A. and L. Attisano, The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2013. 2(1): p. 47-63.
20. Hinck, A.P., Structural studies of the TGF-betas and their receptors - insights into evolution of the TGF-beta superfamily. *FEBS Lett*, 2012. 586(14): p. 1860-70.
21. Horbelt, D., A. Denkis, and P. Knaus, A portrait of Transforming Growth Factor beta superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012. 44(3): p. 469-74.
22. Li, T.F., R.J. O'Keefe, and D. Chen, TGF-beta signaling in chondrocytes. *Front Biosci*, 2005. 10: p. 681-8.
23. Wang, W., D. Rigueur, and K.M. Lyons, TGFbeta signaling in cartilage development and maintenance. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2014. 102(1): p. 37-51.
24. van der Kraan, P.M., et al., TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009. 17(12): p. 1539-45.
25. Deng, Z.H., et al., Bone morphogenetic proteins for articular cartilage regeneration. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018. 26(9): p. 1153-1161.
26. Miljkovic, N.D., G.M. Cooper, and K.G. Marra, Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. 16(10): p. 1121-30.
27. Steinert, A.F., et al., Hypertrophy is induced during the in vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene transfer. *Arthritis Res Ther*, 2009. 11(5): p. R148.

28. Steinert, A., et al., Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. *J Orthop Res*, 2003. 21(6): p. 1090-7.
29. Liebesny, P.H., et al., Enzyme Pretreatment plus Locally Delivered HB-IGF-1 Stimulate Integrative Cartilage Repair In Vitro. *Tissue Eng Part A*, 2019. 25(17-18): p. 1191-1201.
30. Chen, L., et al., Growth Factor and Its Polymer Scaffold-Based Delivery System for Cartilage Tissue Engineering. *Int J Nanomedicine*, 2020. 15: p. 6097-6111.
31. Zhou, Q., et al., IGF-I induces adipose derived mesenchymal cell chondrogenic differentiation in vitro and enhances chondrogenesis in vivo. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2016. 52(3): p. 356-364.
32. Solchaga, L.A., et al., FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*, 2005. 203(2): p. 398-409.
33. Wen, C., et al., Insulin-like growth factor-1 in articular cartilage repair for osteoarthritis treatment. *Arthritis Res Ther*, 2021. 23(1): p. 277.
34. Handorf, A.M. and W.J. Li, Fibroblast growth factor-2 primes human mesenchymal stem cells for enhanced chondrogenesis. *PLoS One*, 2011. 6(7): p. e22887.
35. Morales, T.I., The quantitative and functional relation between insulin-like growth factor-I (IGF) and IGF-binding proteins during human osteoarthritis. *J Orthop Res*, 2008. 26(4): p. 465-74.
36. Fortier, L.A., et al., The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*, 2011. 469(10): p. 2706-15.
37. Ellman, M.B., et al., Biological impact of the fibroblast growth factor family on articular cartilage and intervertebral disc homeostasis. *Gene*, 2008. 420(1): p. 82-9.
38. Martin, I., et al., Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue. *Exp Cell Res*, 1999. 253(2): p. 681-8.

39. Correa, D., et al., Sequential exposure to fibroblast growth factors (FGF) 2, 9 and 18 enhances hMSC chondrogenic differentiation. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015. 23(3): p. 443-53.
40. Solchaga, L.A., et al., Fibroblast growth factor-2 enhances proliferation and delays loss of chondrogenic potential in human adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*, 2010. 16(3): p. 1009-19.
41. Loeser, R.F., et al., Basic fibroblast growth factor inhibits the anabolic activity of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 in adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(12): p. 3910-7.
42. Yan, D., D. Chen, and H.J. Im, Fibroblast growth factor-2 promotes catabolism via FGFR1-Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 axis that coordinates with the PKCdelta pathway in human articular chondrocytes. *J Cell Biochem*, 2012. 113(9): p. 2856-65.
43. Stewart, K., et al., The effect of growth factor treatment on meniscal chondrocyte proliferation and differentiation on polyglycolic acid scaffolds. *Tissue Eng*, 2007. 13(2): p. 271-80.
44. Maehara, H., et al., Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Orthop Res*, 2010. 28(5): p. 677-86.
45. Kieswetter, K., et al., Platelet derived growth factor stimulates chondrocyte proliferation but prevents endochondral maturation. *Endocrine*, 1997. 6(3): p. 257-64.
46. Westermarck, B., L. Claesson-Welsh, and C.H. Heldin, Structural and functional aspects of platelet-derived growth factor and its receptors. *Ciba Found Symp*, 1990. 150: p. 6-14; discussion 14-22.
47. Coughlin, S.R., et al., Platelet-dependent stimulation of prostacyclin synthesis by platelet-derived growth factor. *Nature*, 1980. 288(5791): p. 600-2.
48. Fiedler, J., N. Etzel, and R.E. Brenner, To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF. *J Cell Biochem*, 2004. 93(5): p. 990-8.

49. Toribio, R.E., et al., The midregion, nuclear localization sequence, and C terminus of PTHrP regulate skeletal development, hematopoiesis, and survival in mice. *FASEB J*, 2010. 24(6): p. 1947-57.
50. Philbrick, W.M., et al., Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev*, 1996. 76(1): p. 127-73.
51. Szychlińska, M.A., et al., Functional Biomolecule Delivery Systems and Bioengineering in Cartilage Regeneration. *Curr Pharm Biotechnol*, 2019. 20(1): p. 32-46.
52. Zhang, W., et al., Inhibitory function of parathyroid hormone-related protein on chondrocyte hypertrophy: the implication for articular cartilage repair. *Arthritis Research & Therapy*, 2012. 14(4): p. 221.
53. Kim, Y.J., H.J. Kim, and G.I. Im, PTHrP promotes chondrogenesis and suppresses hypertrophy from both bone marrow-derived and adipose tissue-derived MSCs. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 373(1): p. 104-8.
54. Li, T.F., et al., Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) inhibits Runx2 expression through the PKA signaling pathway. *Exp Cell Res*, 2004. 299(1): p. 128-36.
55. Yu, B., et al., Parathyroid hormone induces differentiation of mesenchymal stromal/stem cells by enhancing bone morphogenetic protein signaling. *J Bone Miner Res*, 2012. 27(9): p. 2001-14.
56. Casado-Diaz, A., R. Santiago-Mora, and J.M. Quesada, The N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein affect differently the osteogenic and adipogenic potential of human mesenchymal stem cells. *Exp Mol Med*, 2010. 42(2): p. 87-98.
57. Shishodia, S., T. Singh, and M.M. Chaturvedi, Modulation of transcription factors by curcumin. *Adv Exp Med Biol*, 2007. 595: p. 127-48.
58. Chandran, B. and A. Goel, A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. *Phytother Res*, 2012. 26(11): p. 1719-25.
59. Masuda, T., et al., Chemical studies on antioxidant mechanism of curcuminoid: analysis of radical reaction products from curcumin. *J Agric Food Chem*, 1999. 47(1): p. 71-7.

60. Kim, D.K., et al., Bioengineered porous composite curcumin/silk scaffolds for cartilage regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017. 78: p. 571-578.
61. Buhrmann, C., et al., Curcumin mediated suppression of nuclear factor-kappaB promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a high-density co-culture microenvironment. *Arthritis Res Ther*, 2010. 12(4): p. R127.
62. Gorabi, A.M., et al., The Effect of Curcumin on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Mesodermal Lineage. *Molecules*, 2019. 24(22).
63. Cai, G., et al., Recent advances in kartogenin for cartilage regeneration. *J Drug Target*, 2019. 27(1): p. 28-32.
64. Johnson, K., et al., A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science*, 2012. 336(6082): p. 717-21.
65. Li, X., et al., Kartogenin-Incorporated Thermogel Supports Stem Cells for Significant Cartilage Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016. 8(8): p. 5148-59.
66. Yin, H., et al., Evaluation of the potential of kartogenin encapsulated poly(L-lactic acid-co-caprolactone)/collagen nanofibers for tracheal cartilage regeneration. *J Biomater Appl*, 2017. 32(3): p. 331-341.
67. Shi, D., et al., Photo-Cross-Linked Scaffold with Kartogenin-Encapsulated Nanoparticles for Cartilage Regeneration. *ACS Nano*, 2016. 10(1): p. 1292-9.
68. Guo, X., et al., Repair of full-thickness articular cartilage defects by cultured mesenchymal stem cells transfected with the transforming growth factor beta1 gene. *Biomed Mater*, 2006. 1(4): p. 206-15.
69. Hao, J., et al., Gene transfer and living release of transforming growth factor-beta3 for cartilage tissue engineering applications. *Tissue Eng Part C Methods*, 2008. 14(4): p. 273-80.
70. Kaul, G., et al., Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J Gene Med*, 2006. 8(1): p. 100-11.

71. Bleiziffer, O., et al., Gene transfer strategies in tissue engineering. *J Cell Mol Med*, 2007. 11(2): p. 206-23.
72. Lisignoli, G., et al., Chondrogenic potential of Slug-depleted human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*, 2014. 20(19-20): p. 2795-805.
73. Jeon, S.Y., et al., Co-delivery of Cbfa-1-targeting siRNA and SOX9 protein using PLGA nanoparticles to induce chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 2014. 35(28): p. 8236-48.
74. Guerit, D., et al., FOXO3A regulation by miRNA-29a Controls chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and cartilage formation. *Stem Cells Dev*, 2014. 23(11): p. 1195-205.
75. Ham, O., et al., The role of microRNA-23b in the differentiation of MSC into chondrocyte by targeting protein kinase A signaling. *Biomaterials*, 2012. 33(18): p. 4500-7.
76. Lv, S., et al., MicroRNA-27b targets CBFB to inhibit differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into hypertrophic chondrocytes. *Stem Cell Res Ther*, 2020. 11(1): p. 392.
77. Uzieliene, I., et al., Non-viral Gene Therapy for Osteoarthritis. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020. 8: p. 618399.
78. Raisin, S., E. Belamie, and M. Morille, Non-viral gene activated matrices for mesenchymal stem cells based tissue engineering of bone and cartilage. *Biomaterials*, 2016. 104: p. 223-37.
79. Xu, J., et al., Nanocarrier-Mediated Codelivery of Small Molecular Drugs and siRNA to Enhance Chondrogenic Differentiation and Suppress Hypertrophy of Human Mesenchymal Stem Cells. *Advanced Functional Materials*, 2016. 26(15): p. 2463-2472.
80. Gibson, G. and H. Asahara, microRNAs and cartilage. *J Orthop Res*, 2013. 31(9): p. 1333-44.
81. Hong, E. and A.H. Reddi, MicroRNAs in chondrogenesis, articular cartilage, and osteoarthritis: implications for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 2012. 18(6): p. 445-53.

82. Asahara, H., Current Status and Strategy of microRNA Research for Cartilage Development and Osteoarthritis Pathogenesis. *J Bone Metab*, 2016. 23(3): p. 121-7.
83. Duan, L., et al., Recent progress on the role of miR-140 in cartilage matrix remodelling and its implications for osteoarthritis treatment. *Arthritis Res Ther*, 2020. 22(1): p. 194.
84. King, W.J. and P.H. Krebsbach, Growth factor delivery: how surface interactions modulate release in vitro and in vivo. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012. 64(12): p. 1239-56.
85. Yamamoto, M., Y. Ikada, and Y. Tabata, Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2001. 12(1): p. 77-88.
86. Ikada, Y. and Y. Tabata, Protein release from gelatin matrices. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998. 31(3): p. 287-301.
87. Nishi, N., et al., Collagen-binding growth factors: Production and characterization of functional fusion proteins having a collagen-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. 95(12): p. 7018-7023.
88. Addi, C., F. Murschel, and G. De Crescenzo, Design and Use of Chimeric Proteins Containing a Collagen-Binding Domain for Wound Healing and Bone Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*, 2017. 23(2): p. 163-182.
89. Wu, X.-C., et al., Collagen-targeting parathyroid hormone-related peptide promotes collagen binding and in vitro chondrogenesis in bone marrow-derived MSCs. *International Journal of Molecular Medicine*, 2013. 31(2): p. 430-436.
90. Nakaji-Hirabayashi, T., et al., Oriented immobilization of epidermal growth factor onto culture substrates for the selective expansion of neural stem cells. *Biomaterials*, 2007. 28(24): p. 3517-29.
91. Masters, K.S., Covalent Growth Factor Immobilization Strategies for Tissue Repair and Regeneration. *Macromolecular Bioscience*, 2011. 11(9): p. 1149-1163.
92. Seims, K.B., N.K. Hunt, and L.W. Chow, Strategies to Control or Mimic Growth Factor Activity for Bone, Cartilage, and Osteochondral Tissue Engineering. *Bioconjug Chem*, 2021. 32(5): p. 861-878.

93. Enriquez-Ochoa, D., et al., Immobilization of Growth Factors for Cell Therapy Manufacturing. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020. 8: p. 620.
94. Shah, R.N., et al., Supramolecular design of self-assembling nanofibers for cartilage regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(8): p. 3293-8.
95. Chen, J., et al., TGF-beta1 affinity peptides incorporated within a chitosan sponge scaffold can significantly enhance cartilage regeneration. *J Mater Chem B*, 2018. 6(4): p. 675-687.
96. Lewis, J.A., et al., Transforming Growth Factor β -1 Binding by Peptide Amphiphile Hydrogels. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2020. 6(8): p. 4551-4560.
97. Xiao, M., et al., Anchoring TGF-beta1 on biomaterial surface via affinitive interactions: Effects on spatial structures and bioactivity. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018. 166: p. 254-261.
98. Hachim, D., et al., Glycosaminoglycan-based biomaterials for growth factor and cytokine delivery: Making the right choices. *J Control Release*, 2019. 313: p. 131-147.
99. Liang, Y. and K.L. Kiick, Heparin-functionalized polymeric biomaterials in tissue engineering and drug delivery applications. *Acta Biomaterialia*, 2014. 10(4): p. 1588-1600.
100. Joung, Y.K., J.W. Bae, and K.D. Park, Controlled release of heparin-binding growth factors using heparin-containing particulate systems for tissue regeneration. *Expert Opin Drug Deliv*, 2008. 5(11): p. 1173-84.
101. Ori, A., M.C. Wilkinson, and D.G. Fernig, The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges. *Front Biosci*, 2008. 13: p. 4309-38.
102. Fang, J., et al., DB-PABP: a database of polyanion-binding proteins. *Nucleic Acids Res*, 2008. 36(Database issue): p. D303-6.
103. Bajpayee, A.G. and A.J. Grodzinsky, Cartilage-targeting drug delivery: can electrostatic interactions help? *Nat Rev Rheumatol*, 2017. 13(3): p. 183-193.
104. Adibnia, V., et al., Nonspecific interactions in biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2020. 47: p. 70-83.

105. Ori, A., et al., Identification of heparin-binding sites in proteins by selective labeling. *Mol Cell Proteomics*, 2009. 8(10): p. 2256-65.
106. Sakiyama-Elbert, S.E. and J.A. Hubbell, Development of fibrin derivatives for controlled release of heparin-binding growth factors. *J Control Release*, 2000. 65(3): p. 389-402.
107. Lyon, M., G. Rushton, and J.T. Gallagher, The Interaction of the Transforming Growth Factor- β 's with Heparin/Heparan Sulfate Is Isoform-specific *. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. 272(29): p. 18000-18006.
108. Jin, R., et al., Chondrogenesis in injectable enzymatically crosslinked heparin/dextran hydrogels. *J Control Release*, 2011. 152(1): p. 186-95.
109. Brown, G.C.J., et al., Covalent Incorporation of Heparin Improves Chondrogenesis in Photocurable Gelatin-Methacryloyl Hydrogels. *Macromol Biosci*, 2017. 17(12).
110. Hesse, E., et al., Peptide-functionalized starPEG/heparin hydrogels direct mitogenicity, cell morphology and cartilage matrix distribution in vitro and in vivo. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018. 12(1): p. 229-239.
111. Levinson, C., et al., An injectable heparin-conjugated hyaluronan scaffold for local delivery of transforming growth factor beta1 promotes successful chondrogenesis. *Acta Biomater*, 2019. 99: p. 168-180.
112. Muller, M., et al., Alginate Sulfate-Nanocellulose Bioinks for Cartilage Bioprinting Applications. *Ann Biomed Eng*, 2017. 45(1): p. 210-223.
113. Mhanna, R., et al., Chondrocyte culture in three dimensional alginate sulfate hydrogels promotes proliferation while maintaining expression of chondrogenic markers. *Tissue Eng Part A*, 2014. 20(9-10): p. 1454-64.
114. Arlov, O. and G. Skjak-Braek, Sulfated Alginates as Heparin Analogues: A Review of Chemical and Functional Properties. *Molecules*, 2017. 22(5).
115. Re'em, T., et al., Chondrogenesis of hMSC in affinity-bound TGF-beta scaffolds. *Biomaterials*, 2012. 33(3): p. 751-61.

116. Ratanavaraporn, J., et al., Localized delivery of curcumin from injectable gelatin/Thai silk fibroin microspheres for anti-inflammatory treatment of osteoarthritis in a rat model. *Inflammopharmacology*, 2017. 25(2): p. 211-221.
117. Holland, T.A., Y. Tabata, and A.G. Mikos, Dual growth factor delivery from degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Control Release*, 2005. 101(1-3): p. 111-25.
118. Elsler, S., et al., Effective, safe nonviral gene transfer to preserve the chondrogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *J Gene Med*, 2012. 14(7): p. 501-11.
119. Cucchiarini, M. and H. Madry, Biomaterial-guided delivery of gene vectors for targeted articular cartilage repair. *Nat Rev Rheumatol*, 2019. 15(1): p. 18-29.
120. Nelson, C.E., et al., Sustained local delivery of siRNA from an injectable scaffold. *Biomaterials*, 2012. 33(4): p. 1154-61.
121. Ye, K., et al., Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering with Drug Loading and Release. *Pharmaceutics*, 2019. 11(4).
122. Amler, E., et al., Functionalized nanofibers as drug-delivery systems for osteochondral regeneration. *Nanomedicine (Lond)*, 2014. 9(7): p. 1083-94.
123. Rafiei, M., et al., Construction of 3D fibrous PCL scaffolds by coaxial electrospinning for protein delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 2020. 113: p. 110913.
124. Yu, X., et al., Multilayered Inorganic Microparticles for Tunable Dual Growth Factor Delivery. *Adv Funct Mater*, 2014. 24(20): p. 3082-3093.
125. Gao, G. and X. Cui, Three-dimensional bioprinting in tissue engineering and regenerative medicine. *Biotechnol Lett*, 2016. 38(2): p. 203-11.
126. Bittner, S.M., J.L. Guo, and A.G. Mikos, Spatiotemporal Control of Growth Factors in Three-Dimensional Printed Scaffolds. *Bioprinting*, 2018. 12.
127. Gupta, M.K., et al., 3D Printed Programmable Release Capsules. *Nano Letters*, 2015. 15(8): p. 5321-5329.

128. Zhu, W., et al., 3D bioprinting mesenchymal stem cell-laden construct with core-shell nanospheres for cartilage tissue engineering. *Nanotechnology*, 2018. 29(18): p. 185101.
129. Liu, M., et al., Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Res*, 2017. 5: p. 17014.
130. Wichterle, O. and D. LÍM, Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature*, 1960. 185(4706): p. 117-118.
131. Drury, J.L. and D.J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 2003. 24(24): p. 4337-4351.
132. Li, J., et al., Advances of injectable hydrogel-based scaffolds for cartilage regeneration. *Regen Biomater*, 2019. 6(3): p. 129-140.
133. Carrelo, H., et al., Injectable Composite Systems Based on Microparticles in Hydrogels for Bioactive Cargo Controlled Delivery. *Gels*, 2021. 7(3).
134. Santo, V.E., et al., Controlled release strategies for bone, cartilage, and osteochondral engineering--Part II: challenges on the evolution from single to multiple bioactive factor delivery. *Tissue Eng Part B Rev*, 2013. 19(4): p. 327-52.
135. Horisawa, E., et al., Size-dependency of DL-lactide/glycolide copolymer particulates for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium. *Pharm Res*, 2002. 19(2): p. 132-9.
136. Butoescu, N., et al., Dexamethasone-containing PLGA superparamagnetic microparticles as carriers for the local treatment of arthritis. *Biomaterials*, 2009. 30(9): p. 1772-80.
137. Lu, J.M., et al., Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev Mol Diagn*, 2009. 9(4): p. 325-41.
138. DeFail, A.J., et al., Controlled release of bioactive TGF-beta 1 from microspheres embedded within biodegradable hydrogels. *Biomaterials*, 2006. 27(8): p. 1579-85.

139. Lin, S.J., et al., Growth factor-loaded microspheres in mPEG-polypeptide hydrogel system for articular cartilage repair. *J Biomed Mater Res A*, 2021. 109(12): p. 2516-2526.
140. Yuan, F.Z., et al., Fabrication of Injectable Chitosan-Chondroitin Sulfate Hydrogel Embedding Kartogenin-Loaded Microspheres as an Ultrasound-Triggered Drug Delivery System for Cartilage Tissue Engineering. *Pharmaceutics*, 2021. 13(9).
141. Lim, S.M., et al., Dual growth factor-releasing nanoparticle/hydrogel system for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2010. 21(9): p. 2593-2600.
142. Zhou, L., et al., Short interfering RNA (siRNA)-Based Therapeutics for Cartilage Diseases. *Regen Eng Transl Med*, 2020. 7(3): p. 283-290.
143. Chen, M., et al., Chitosan/siRNA nanoparticles encapsulated in PLGA nanofibers for siRNA delivery. *ACS Nano*, 2012. 6(6): p. 4835-44.
144. Madry, H., P. Orth, and M. Cucchiarini, Gene Therapy for Cartilage Repair. *Cartilage*, 2011. 2(3): p. 201-25.
145. Mueller, M.B. and R.S. Tuan, Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. *PM R*, 2011. 3(6 Suppl 1): p. S3-11.
146. Nalbadis, A., et al., Selection and Incorporation of siRNA Carrying Non-Viral Vector for Sustained Delivery from Gellan Gum Hydrogels. *Pharmaceutics*, 2021. 13(10).
147. Li, B., et al., Injectable “nano-micron” combined gene-hydrogel microspheres for local treatment of osteoarthritis. *NPG Asia Materials*, 2022. 14(1).
148. D'Angelo, M., et al., MMP-13 is induced during chondrocyte hypertrophy. *J Cell Biochem*, 2000. 77(4): p. 678-93.
149. Rashid, H., H. Chen, and A. Javed, Runx2 is required for hypertrophic chondrocyte mediated degradation of cartilage matrix during endochondral ossification. *Matrix Biology Plus*, 2021. 12: p. 100088.

150. Budiraharjo, R., K.G. Neoh, and E.T. Kang, Enhancing bioactivity of chitosan film for osteogenesis and wound healing by covalent immobilization of BMP-2 or FGF-2. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2013. 24(6): p. 645-62.
151. Wang, Z., et al., Novel biomaterial strategies for controlled growth factor delivery for biomedical applications. *NPG Asia Materials*, 2017. 9(10): p. e435-e435.
152. Chou, C.H., et al., TGF-beta1 immobilized tri-co-polymer for articular cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2006. 77(2): p. 338-48.
153. Fan, H., et al., TGF-beta3 immobilized PLGA-gelatin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid hybrid scaffold for cartilage regeneration. *J Biomed Mater Res A*, 2010. 95(4): p. 982-92.
154. Gunnoo, S.B. and A. Madder, Bioconjugation – using selective chemistry to enhance the properties of proteins and peptides as therapeutics and carriers. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2016. 14(34): p. 8002-8013.
155. Motoyama, M., et al., In vitro cartilage formation using TGF-beta-immobilized magnetic beads and mesenchymal stem cell-magnetic bead complexes under magnetic field conditions. *J Biomed Mater Res A*, 2010. 92(1): p. 196-204.
156. Kang, M.L., et al., Intra-articular delivery of kartogenin-conjugated chitosan nano/microparticles for cartilage regeneration. *Biomaterials*, 2014. 35(37): p. 9984-9994.
157. Riga, E.K., et al., On the Limits of Benzophenone as Cross-Linker for Surface-Attached Polymer Hydrogels. *Polymers (Basel)*, 2017. 9(12).
158. Ham, D.W., et al., Photo-immobilization of bone morphogenetic protein-2 using azidophenyl gelatin on a collagen sheet enhances osteogenesis in a rat calvarial defect model. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2016. 40: p. 177-184.
159. Spicer, C.D. and E.T. Pashuck, Achieving Controlled Biomolecule-Biomaterial Conjugation. 2018. 118(16): p. 7702-7743.
160. Jeong, J.-H., et al., BMP-2 immobilization by phosphonated UV-curable low-molecular-weight chitosan derivative on the surface of titanium. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2016. 34: p. 33-40.

161. Banks, J.M., et al., The combined effects of matrix stiffness and growth factor immobilization on the bioactivity and differentiation capabilities of adipose-derived stem cells. *Biomaterials*, 2014. 35(32): p. 8951-8959.
162. Schmidt, M.B., E.H. Chen, and S.E. Lynch, A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. 14(5): p. 403-12.
163. Mann, B.K., R.H. Schmedlen, and J.L. West, Tethered-TGF-beta increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells. *Biomaterials*, 2001. 22(5): p. 439-44.
164. Kolb, H.C., M.G. Finn, and K.B. Sharpless, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2001. 40(11): p. 2004-2021.
165. Barner-Kowollik, C., et al., "Clicking" polymers or just efficient linking: what is the difference? *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011. 50(1): p. 60-2.
166. Azagarsamy, M.A. and K.S. Anseth, Bioorthogonal Click Chemistry: An Indispensable Tool to Create Multifaceted Cell Culture Scaffolds. *ACS Macro Lett*, 2013. 2(1): p. 5-9.
167. Place, E.S., et al., Latent TGF-beta hydrogels for cartilage tissue engineering. *Adv Healthc Mater*, 2012. 1(4): p. 480-4.
168. McCall, J.D., J.E. Luoma, and K.S. Anseth, Covalently tethered transforming growth factor beta in PEG hydrogels promotes chondrogenic differentiation of encapsulated human mesenchymal stem cells. *Drug Deliv Transl Res*, 2012. 2(5): p. 305-12.
169. Bock, T., et al., TGF-beta1-Modified Hyaluronic Acid/Poly(glycidol) Hydrogels for Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Macromol Biosci*, 2018. 18(7): p. e1700390.
170. Nouri-Felekori, M., et al., Bioorthogonal hydroxyethyl cellulose-based scaffold crosslinked via click chemistry for cartilage tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol*, 2021. 183: p. 2030-2043.
171. Patel, J.J., C.L. Flanagan, and S.J. Hollister, Bone Morphogenetic Protein-2 Adsorption onto Poly- ϵ -caprolactone Better Preserves Bioactivity In Vitro and Produces More

Bone In Vivo than Conjugation Under Clinically Relevant Loading Scenarios. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2015. 21(5): p. 489-498.

172. Lee, H., et al., Fabrication of FGF-2 immobilized electrospun gelatin nanofibers for tissue engineering. *Int J Biol Macromol*, 2016. 93(Pt B): p. 1559-1566.

173. Knippenberg, M., et al., Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 342(3): p. 902-8.

174. Claus, S., et al., Chronic exposure of bone morphogenetic protein-2 favors chondrogenic expression in human articular chondrocytes amplified in monolayer cultures. *J Cell Biochem*, 2010. 111(6): p. 1642-51.

175. Sekiya, I., D.C. Colter, and D.J. Prockop, BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 284(2): p. 411-8.

176. Estes, B.T., A.W. Wu, and F. Guilak, Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(4): p. 1222-32.

177. Jiang Y.Z., Q.Y.Y., Zou X.H., Wang LL., Ouyang HW., Comparison the Effects of BMP-4 and BMP-7 on Articular Cartilage Repair with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009.

178. Caron, M.M., et al., Hypertrophic differentiation during chondrogenic differentiation of progenitor cells is stimulated by BMP-2 but suppressed by BMP-7. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013. 21(4): p. 604-13.

179. Betsholtz, C., et al., Structural and functional aspects of platelet-derived growth factor and its role in the pathogenesis of glioblastoma. *Mol Chem Neuropathol*, 1989. 10(1): p. 27-36.

180. Uomizu, M., et al., PDGF-induced proliferation and differentiation of synovial mesenchymal stem cells is mediated by the PI3K-PKB / Akt pathway. *Journal of medical and dental sciences*, 2018. 65: p. 73-82.

181. Asgari, N., et al., Dual functional construct containing kartogenin releasing microtissues and curcumin for cartilage regeneration. *Stem Cell Res Ther*, 2020. 11(1): p. 289.

CONTEXTE DES TRAVAUX DE THESES

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre d'un projet de réparation du cartilage articulaire basé sur le développement d'une matrice génétiquement activée pour contrôler la différenciation chondrocytaire de cellules souches mésenchymateuses primaires.

Les travaux précédemment effectués au laboratoire ont permis de mettre au point un système d'IT du cartilage composé de CSM cultivées sur des microsphères de collagène de type I chargées en TGF- β 3 (Figure 18 A).

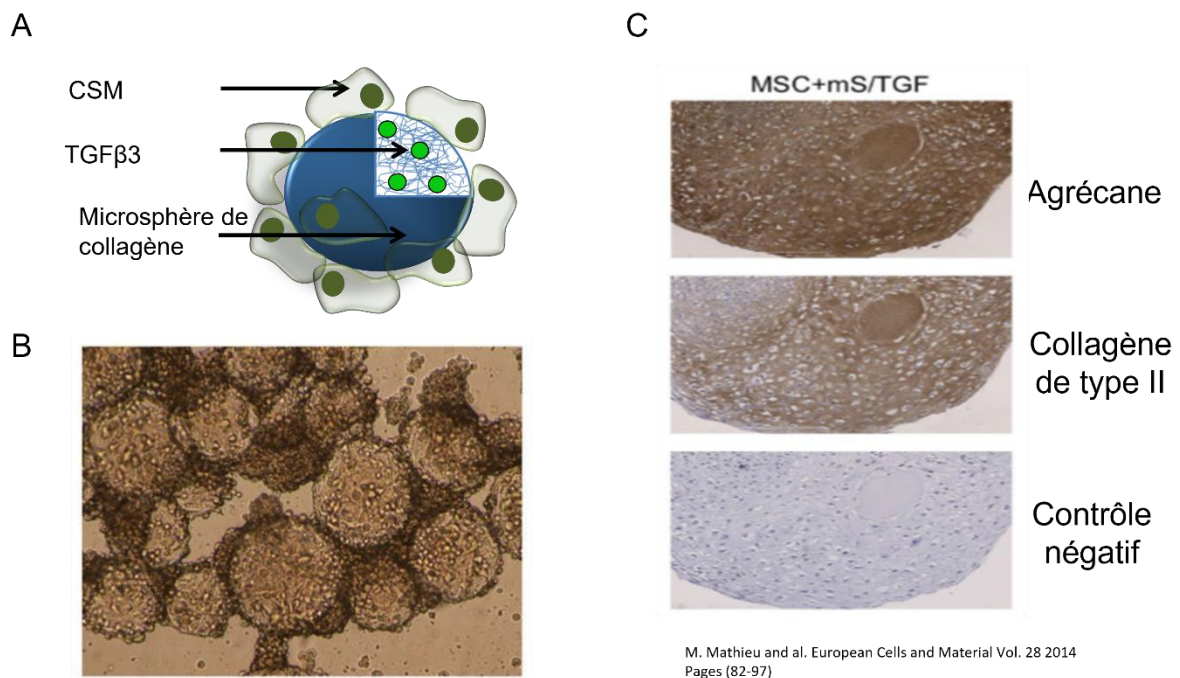


Figure 18 : Différenciation de CSM sur des microsphères de collagène de type I chargées en TGF- β 3 (D'après Mathieu *et al.* [226])

(A) Représentation schématique du système d'ingénierie tissulaire utilisé. (B) Culture de CSM sur des microsphères de collagène chargées en TGF- β 3. (C) Analyse immunohistochimique des agrégats obtenus après 21 jours de culture *in vitro*.

Ce système est capable d'induire *in vitro* la différenciation de CSM en chondrocytes caractérisés par une expression des marqueurs chondrocytaires (notamment le collagène de type II et l'agrécan dans la MEC produite (Figure 18 B) [226]. L'étude a cependant révélé une expression des marqueurs d'hypertrophie *in vitro* et la présence de minéralisation et de

vascularisation après injection en sous cutanée chez la souris immunodéficiente SCID (Figure 19).

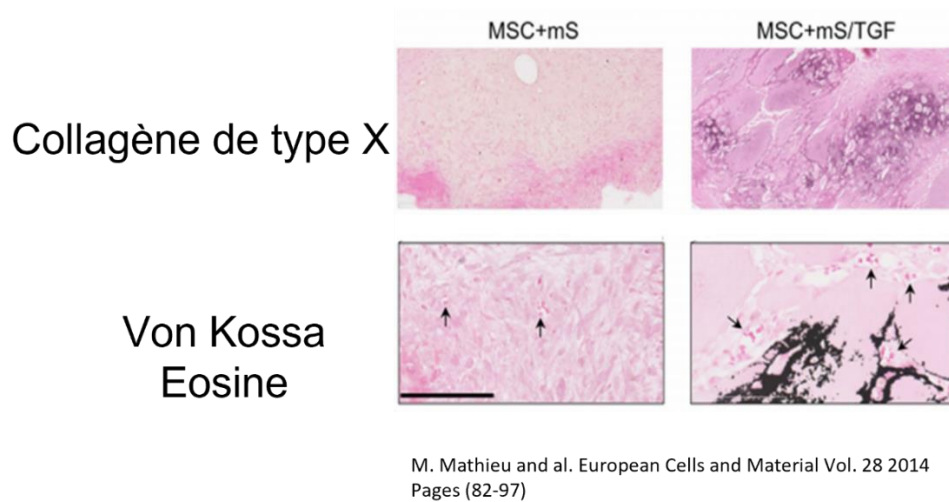


Figure 19 : Analyse immunohistochimique du néotissu formé après injection des CSM avec les microsphères chargées en TGF- β 3 en sous-cutané chez la souris SCID (M. Mathieu *et al.* European Cells and Material).

Comme abordé précédemment, la différenciation hypertrophique des chondrocytes induit un remodelage structurel de la MEC poussée vers la minéralisation du tissu et la formation d'un tissu de type endochondral. Cette matrice cartilagineuse calcifiée ne possède pas les mêmes propriétés mécaniques que le cartilage hyalin ni la même résistance aux forces de compression et de cisaillement subies par ce tissu. L'hypertrophie des chondrocytes est donc l'étape limitante de notre système de régénération du cartilage.

Le principal objectif de mes travaux de thèse est d'améliorer la stratégie de réparation du cartilage mise en place au laboratoire, afin d'éviter l'hypertrophie des chondrocytes en les maintenant au stade mature caractérisé par la sécrétion de la MEC du cartilage hyalin.

La progression des chondrocytes vers le stade hypertrophique étant principalement régulée par le facteur de transcription *Runx2*, nous avons choisi d'utiliser une approche de thérapie génique afin d'inhiber **transitoirement** l'expression de ce gène et maintenir les chondrocytes au stade mature. Pour cela, nous avons étudié l'élaboration d'une MGA injectable, composée de microsphères de collagène activées génétiquement avec des vecteurs de siARN dirigés contre le gène *Runx2* (Figure 20)

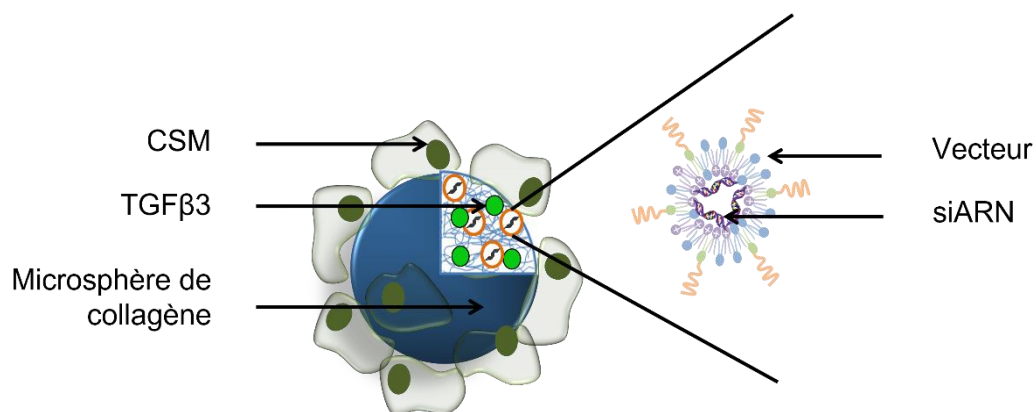


Figure 20 : Représentation schématique de la MGA.

Le premier chapitre de mes travaux de thèse est dédié à la recherche d'un vecteur d'acides nucléiques, possédant d'une part, des propriétés physico-chimiques compatibles avec l'élaboration de la MGA et d'autre part, permettant de transférer efficacement les CSM. Le deuxième chapitre est consacré à la modification du vecteur choisi pour la formation de la MGA et à l'étude de l'effet de la MGA sur des cultures *in vitro* de CSM en condition de différenciation chondrocytaire.

Chapitre 1 : Sélection d'un vecteur d'acide nucléique efficace pour la transfection des CSM et compatible avec la formation d'une MGA

I Introduction

Ce premier chapitre a pour objectif, d'étudier différents vecteurs d'acides nucléiques potentiellement applicables à notre projet afin d'identifier le plus pertinent. Un critère déterminant pour la sélection est leur capacité à promouvoir la transfection de cellules. Néanmoins, d'autres aspects sont importants pour orienter le choix, notamment pour l'association avec la matrice et le contrôle de la libération, tels que les paramètres physico-chimiques (taille, charge, état de surface) et la possibilité ou non d'en adapter la composition et de les modifier en surface.

La MGA que nous souhaitons élaborer en associant des microsphères d'hydrogel injectables, des CSM et des agents de thérapie génique a pour objectif final une application clinique. Ainsi, les vecteurs utilisés doivent être de composition connue, non toxiques et compatibles avec une transfection *in vivo*. Nous avons testé trois types de vecteurs : des vecteurs polymériques (micelles de polyélectrolytes), des vecteurs lipidiques (liposomes cationiques), et enfin des vésicules extracellulaires (EV).

Ces différents vecteurs ont été principalement évalués pour leur capacité à complexer des siARN. Leur efficacité de transfection est ensuite comparée à celle d'un vecteur commercial, la Lipofectamine 2000®, décrit comme efficace pour une utilisation *in vitro* sur des cellules cultivées en deux dimensions, mais peu adapté pour une utilisation *in vivo*, principalement à cause de l'agrégation des lipoplexes formés [386]. En plus de ces deux conditions impératives, d'autres critères, plus spécifiques à la formation de la MGA avec les microsphères de collagènes ont été pris en compte pour le choix du vecteur. En effet, pour permettre une association du vecteur avec la matrice par imprégnation, nous recherchons un vecteur avec une taille suffisamment petite pour diffuser au travers des pores des microsphères. Sur la base de précédents travaux du laboratoire, la taille moyenne de ces pores a été estimée autour de 200 nm. Ainsi, on peut s'attendre, d'un point de vue de l'encombrement stérique, que des particules de taille inférieure pourront diffuser relativement librement à travers la matrice,

ce qui permet de définir une gamme de taille cible pour les vecteurs. Nous savons également que le contrôle de la différenciation des CSM par régulation génique nécessite un contrôle temporel précis afin de ne pas perturber le processus de différenciation ou d'autres fonctions cellulaires. Dans la perspective de contrôler la libération du vecteur à partir de la MGA, la sélection d'un vecteur fonctionnalisable avec un ligand permettant un contrôle de l'association et la dissociation à la matrice support (ici les microsphères de collagène) a également été un critère important dans le contexte du développement futur de ce projet.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à des **vecteurs polymériques**, dont les complexes formés avec des acides nucléiques sont fréquemment utilisés pour la transfection cellulaire, certains de ces produits étant commerciaux (X-tremeGENE™, JetPEI, Transporter 5®...). Ces vecteurs sont représentés ici par la poly-L-Lysine (PLL) et le polyéthylèneimine (PEI), deux polymères cationiques capables de complexer les acides nucléiques [299, 387-389]. Dans des études antérieures du laboratoire et celles d'autres groupes, ces polymères cationiques ont été utilisés seuls ou en association avec des copolymères comportant un bloc anionique pouvant se complexer à ces polycations (PEI et PLL) et à un bloc neutre, souvent du PEG, pouvant former une couronne de répulsion stérique en surface des micelles. Typiquement, ces copolymères peuvent être du poly-oxyde-d'éthylène-b-polyacide méthacrylique (PEO-b-PMAA) ou du poly-éthylène-glycol- poly(ϵ -caprolactone) fonctionnalisé avec des fonctions carboxyliques (PEG-b-PCL-COOH). L'intérêt spécifique attendu de ces vecteurs est leur dissociation à pH endosomal. En effet, ces polymères ont été choisis au regard des pKa de la partie anionique, généralement autour de 6, afin de permettre la formation de vecteurs micellaires stables à pH 7 et déstabilisés à pH acide lorsque la partie anionique perd sa charge. L'objectif est que l'acidification des endosomes entraîne le désassemblage des micelles, la déstabilisation de la membrane endosomale et finalement la libération des acides nucléiques dans le cytoplasme [299, 389].

Nous nous sommes également intéressés à des vecteurs lipidiques basés sur l'utilisation de lipides cationiques : le KLN47, un lipophosphoramidate avec une tête d'arsonium [314] et le DOTAP combiné avec le lipide fusiogénique DOPE (Figure 21) [311]. Ces lipides cationiques permettent un taux élevé de complexation des acides nucléiques et forment des complexes de taille nanométrique potentiellement adaptés pour la formation d'une MGA compatible avec les microsphères de collagène. De plus, leur charge positive peut être un avantage pour maintenir le vecteur sur le site de la lésion du cartilage qui est globalement chargé négativement, en raison de la présence à forte concentration de protéoglycanes [310, 390, 391].

Le KLN47 est déjà décrit comme un vecteur efficace pour une application *in vivo*, permettant une importante biodisponibilité et une faible toxicité [312, 391]. D'un autre côté, le vecteur DOTAP-DOPE est également reconnu particulièrement efficace pour la transfection d'acides nucléiques *in vitro* [390]. Ces lipoplexes sont cependant peu adaptés à une utilisation *in vivo* car leur efficacité de transfection, est neutralisée par l'adsorption des protéines du sérum due à leur forte charge positive [317]. Malgré cela, nous avons tout de même décidé d'analyser ce vecteur puisqu'il est possible de réduire les interactions avec les protéines du sérum par des modifications relativement simples, telles que la PEGylation [324-326].

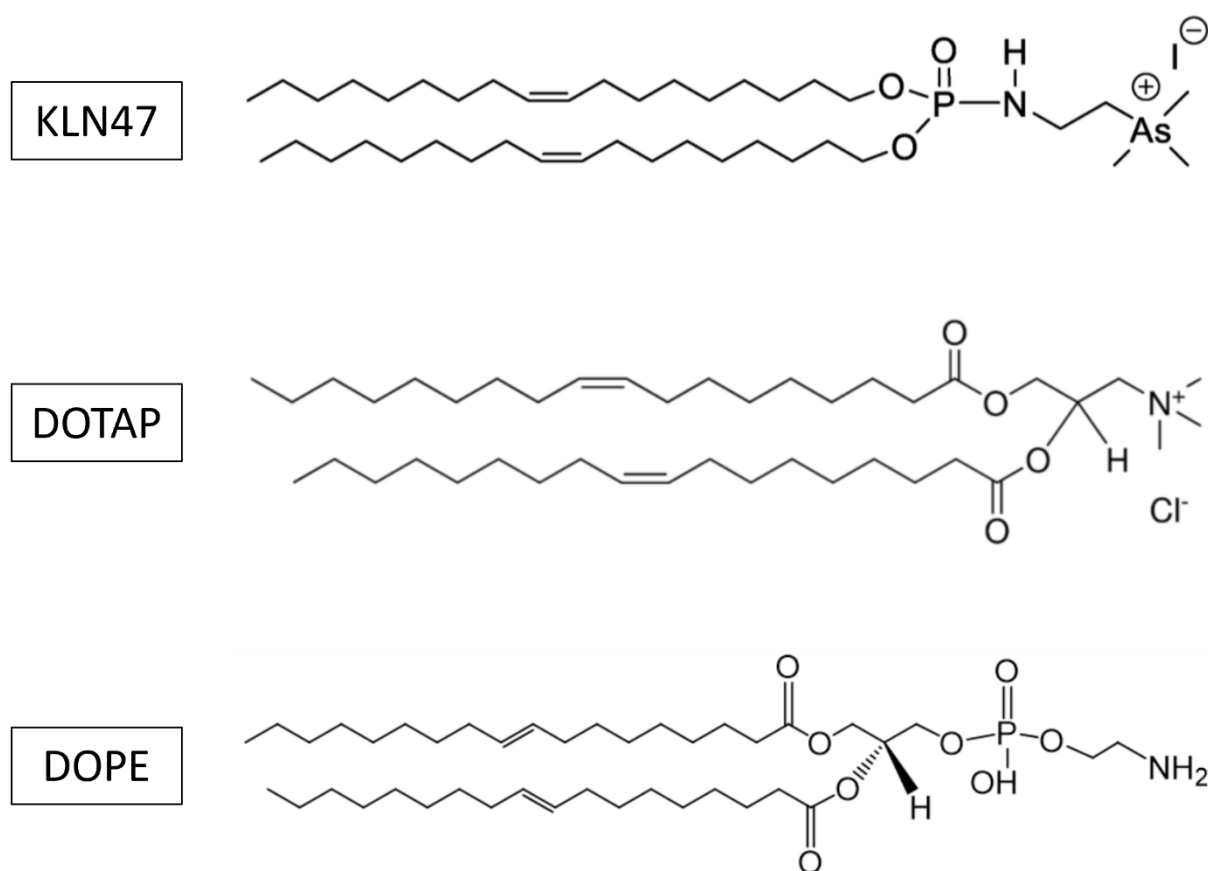


Figure 21 : Structure chimique des lipides KLN47, DOTAP et DOPE.

Pour finir, nous avons exploré l'utilisation des EV en tant que vecteurs pour les siARN. En effet, de par leur rôle naturel de vecteur [361], ces vésicules sont particulièrement attractives dans le domaine de l'administration de principe actifs et d'acides nucléiques. Leur composition protéique membranaire spécifique, notamment le réseau de tétraspanines (protéines comportant 4 domaines transmembranaires), leur permet d'interagir efficacement avec les cellules cibles

[392-395]. L'électroporation a été l'une des premières méthodes étudiées pour charger les acides nucléiques dans les EVs [358]. Malheureusement, il a été prouvé par la suite que l'électroporation induisait l'agrégation des EVs et du siRNA, entraînant une variabilité de l'efficacité [371, 376]. Cependant, nous pensons que l'optimisation du protocole d'électroporation pourrait augmenter le potentiel des EVs pour la vectorisation de siRNA et permettre une utilisation rationnelle en thérapie. Pour cela, nous avons amorcé une collaboration avec le laboratoire de Marie-Pierre Rols (IPBS, Toulouse) qui a une expertise de 30 ans sur l'électroporation [396-399]. Différents protocoles physico-chimique développés au laboratoire [359] pour le chargement de protéines thérapeutiques ont également été évalués afin d'associer les siRNA aux EVs. De plus, la taille moyenne des EVs de petite taille, issues de CSM humaines est comprise entre 30 et 150 nm [361], laissant envisager leur diffusion au travers des pores des microsphères.

Les différentes caractéristiques, physicochimiques et biologiques, de chaque vecteur étudié ont été comparées afin de sélectionner le vecteur d'acides nucléiques le plus adapté à notre projet d'IT du cartilage.

II Matériels et méthodes

Formulation des vecteurs polymériques

Des complexes cationiques de polymère (**polyplexes**) sont formés par une co-incubation des siARN avec différentes polyamines : la poly-L-lysine (PLL) linéaire (Alamanda Polymers), le polyéthylèneimine (PEI) branché et le polyéthylèneimine hydrochloride linéaire (PEI MAX®). Les polyamines et les siARN sont dissous dans du PBS puis mélangés à isovolume (Ratio de Charge PLL / ARN = 1, Ratio Molaire PEI / ARN = 3, Ratio Molaire PEI MAX / ARN = 3) et co-incubés 20 min à température ambiante avant utilisation. Le ratio de charge (CR) PLL / ARN correspond au nombre de charges positives apportées par la polyamine [NH⁺], divisé par le nombre de charges négatives apportées par les siARN [PO₃⁻].

Les **micelles de complexes poly-ioniques** ou micelles « PIC » (*Polyionic complex micelles*), ont été préparées à partir d'un protocole déjà établi au laboratoire [299, 389, 400].

Brièvement, nous préparons un premier mélange « mix » intermédiaire entre une solution aqueuse (H₂O ou PBS) de siARN contrôle (siCT) ou siRunx2 mélangée à isovolume avec une solution de polyamine (PLL) de masse molaire 21 000 g/mol (Alamanda Polymers). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, ce mix intermédiaire est associé avec la solution de copolymères (1,3 mg/ml), toujours à isovolume. Les micelles sont formulées à une concentration finale de 1,5 µM en siARN et un CR égal à 1 ou 0,8. Les micelles ont été formulées avec un seul polycation (PLL) associé à différents copolymères anioniques (PEO₃₀₀₀-PMAA₁₂₀₀, PEO₅₀₀₀-PMAA₁₀₀₀ et PEG₁₉₀₀-*b*-PCL₁₇₀₀) pour formuler respectivement les micelles M1, M2 et M3 (Tableau 1). Le ratio de charge (CR) des micelles M1, M2 et M3 correspond au nombre de charges positives apportées par la polyamine [NH⁺], divisé par le nombre de charges négatives apportées par l'acide méthacrylique [MAA⁻] ou l'acide carboxylique [COO⁻]. L'apport de charges négatives occasionné par l'introduction du siRNA peut être considéré comme relativement négligeable étant donné que la concentration en [MAA⁻] ou [COO⁻] est de l'ordre de 4.10⁻³ M, alors que la concentration en siRNA est de 1,5.10⁻⁶ M, ce qui représente 1,5 % des charges négatives amenées par le bloc PMAA.

Tableau 1 : Composition et formulation des micelles M1, M2 et M3.

	Polyamine	Copolymères	CR	Concentrations après formulation (siARN)	Concentrations utilisées en transfection (siARN)
M1	PLL	PEO ₃₀₀₀ -PMAA ₁₂₀₀	1 / 0,8	3 µM	25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM
M2	PLL	PEO ₅₀₀₀ -PMAA ₁₀₀₀	1 / 0,8	3 µM	50 nM
M3	PLL	PEG ₁₉₀₀ - <i>b</i> -PCL ₁₇₀₀	1	3 µM	50 nM

Formulation des vecteurs lipidiques.

La formulation des liposomes DOTAP-DOPE est réalisée par l'hydratation d'un film lipidique [390, 401]. Les lipides DOTAP et DOPE sont dissous dans un solvant organique (chloroforme). Après dissolution complète, le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif pour former un film lipidique. Ce film lipidique est ensuite réhydraté dans du PBS pendant 24 h à 4 °C afin de former des liposomes à une concentration lipidique finale de 50 mM. La solution est ensuite diluée à 25 mM puis stockée à 4 °C, avant chaque utilisation, la solution est traitée 3 min dans un bain à ultrasons.

Les liposomes de KLN47 ont été fournis dans le cadre d'une collaboration avec les équipes du professeur Tristan Montier (INSERM UMR 1078, Brest) et Paul-Alain Jaffres (CEMCA - UMR CNRS 6521). Les lipoplexes sont formulés par une co-incubation des liposomes avec les siARN pendant 20 minutes à température ambiante. Chaque solution de lipoplexes est utilisée directement après formulation. Ici, le ratio de charge (CR) correspond au nombre de charges positives apportées par le DOTAP ou le KLN47, divisé par le nombre de charges négatives apportées par les siARN [-PO³⁻].

Extraction et modification des vésicules extracellulaires.

Les EV sont isolées à partir de milieu de culture de CSM murines isolées de moelle osseuse et caractérisées comme décrit [170], selon le protocole suivant [402]. Les cellules sont cultivées dans un milieu de prolifération classique (DMEM supplémenté avec 10 % de FBS, 1% de pénicilline-streptomycine et 1 % de L-glutamine) et placées dans un incubateur à 37 °C et 5 % de CO₂ jusqu'à 70 % de la confluence. Les cellules sont ensuite rincées au PBS et incubées dans un milieu de production sans sérum (Opti-MEM) pendant 48h. Le milieu conditionné est ensuite récupéré et centrifugé à 300 g pendant 10 min à 4 °C pour éliminer les cellules mortes. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 2000 g pendant 20 min à 4 °C pour éliminer les débris cellulaires, filtré (à travers une membrane de 0,22 µm) pour éliminer les plus grosses vésicules. Le milieu est ensuite centrifugé à 100,000 g pendant 110 min à 4 °C dans une ultracentrifugeuse Optima XPN-80 (Beckman Coulter). Le surnageant est éliminé et les EV sont lavées avec du PBS puis ultracentrifugées une seconde fois dans les mêmes conditions. Les EV sont finalement mises en suspension dans 1 ml de tampon de congélation : DPBS + tréhalose 25 mM puis stockées à -80 °C jusqu'à leur utilisation. Pour charger les siARN dans les EV, différentes méthodes, physiques et chimiques, ont été testées sur des solutions composées d'un mélange d'EV et de siARN dilués dans 500 µL de PBS à une concentration en

EV de 2×10^9 particules/ml et une concentration de siARN ajustée à $3 \mu\text{M}$. Les différentes méthodes étudiées sont les suivantes :

- Les cycles de congélation/décongélation (FTC pour Freeze Thaw Cycle) : les échantillons sont congelés dans de l'azote liquide (-196°C) pendant 3 minutes puis transférés dans un bain-marie à 37°C pour décongeler pendant 5 minutes. La procédure est répétée 5 fois.
- L'extrusion : l'extrusion a été effectuée à l'aide d'une mini-extrudeuse manuelle à seringue LiposoFast-Basic (Avestin, Canada) à température ambiante. Les solutions EV/siARN sont chargées dans des seringues de $500 \mu\text{L}$ et extrudées 20 fois à travers une membrane en polycarbonate (Avestin, Canada) avec des pores de 100 nm puis 20 fois à travers une autre membrane avec des pores de 50 nm .
- La sonication : les échantillons sont traités à l'aide d'une sonde à ultrasons Digital Sonifier 250 (Branson Ultrasonics Corporation, USA) avec une microsonde 64-247A pendant 6 cycles de 80 secondes (cycle d'utilisation 60%) avec une amplitude de 20 % et 2 min de refroidissement dans la glace entre chaque cycle [403].
- L'électroporation : les solutions EV/siARN ($1,75 \times 10^9$ EV ($\sim 5 \mu\text{g}$) + 342 pmol de siRunx2) sont diluées dans $500 \mu\text{L}$ de PBS puis électroporées selon trois protocoles : EV1 : 1000V pendant 100 $\mu\text{secondes}$. EV2 : 1000V pendant 200 $\mu\text{secondes}$. EV3 : 500V pendant 1000 $\mu\text{secondes}$
- La lyophilisation : les EVs sont lyophilisées à une concentration de 2×10^9 particules/ml dans une solution de DPBS contenant 25 mM de tréhalose. Les EV sont ensuite suspendues avec $200 \mu\text{L}$ solution de siARN à 1500 nM avec ou sans Tween 0,01 %.
- La co-incubation : la solution EV/siARN est incubée 4 heures à température ambiante.

Culture cellulaire

Les essais de transfection avec les différents vecteurs testés dans ce premier chapitre ont été réalisés sur des CSM murines. Les CSM expriment le transgène GFP et ont été isolées à partir de la moelle osseuse de fémurs de souris transgéniques C57BL/6-GFP et caractérisées par phénotypage et par l'évaluation de leur potentiel de différenciation dans les trois lignages mésenchymateux : ostéoblastique, adipocytaire et chondrocytaire [404]. Les cellules ont été cultivées dans un milieu de prolifération constitué de DMEM (« Dulbecco's modified Eagle's medium ») complété avec 10 % v/v de sérum fœtal de veau (SVF), 1 % v/v de glutamine 100X (2 mM) et 1 % v/v d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine 10 000 U/ml). Les cellules ont été incubées à 37 °C avec 5 % de CO₂.

Transfections 2D

L'efficacité de transfection a été évaluée à l'aide d'un pool de siARN ciblant le transcrite du gène *Runx2* (Dharmacon™). La condition contrôle correspond aux transfactions réalisées avec un siARN contrôle (siCT) (Eurogentec).

Les cellules ont été placées dans un milieu de prolifération jusqu'à atteindre 70% de confluence. La transfection des cellules en 2D est réalisée sur des cellules cultivées dans des plaques de 6, 12 ou 24 puits. Après formulation des différents vecteurs, les cellules sont transfectées à la concentration désirée, les concentrations en siARN correspondent à la quantité totale en siARN utilisée, sans prendre en compte son niveau de complexation avec le vecteur. Les transfactions sont réalisées dans du milieu sans SVF (optiMEM) pendant 12h, puis du milieu avec SVF est ajouté pour obtenir une concentration finale de 10% v/v de SVF. Les cultures sont arrêtées 48h après le début de la transfection, pour les EV électroporées, des photos ont été prises avec le microscope EVOS™ FL à un grossissement X1, juste avant l'arrêt des cultures. La Lipofectamine 2000® est utilisée comme vecteur de référence en suivant les recommandations du fournisseur avec le ratio de 5 µL de Lipofectamine 2000® pour 100 pmol de siARN. La PLL a été utilisée avec un CR (PLL/siARN) =1. Le PEI et le PEI MAX ont été utilisés avec un ratio molaire PEI/siARN = 3. Les micelles M1 et M2 sont utilisées à différents ratios de charge ($[NH^+] / [MAA^-]$), CR = 1 ou CR = 0,8 et différentes concentrations en siARN dans le milieu de transfection (25 nM, 50 nM, 100 nM ou 150 nM). Les micelles M3 sont utilisées au ratio de charge $[NH^+] / [COO^-]$, CR = 1.

Transfections 3D

La transfection cellulaire tridimensionnelle (3D), est réalisée dans des plaques 24 puits traitées pour une très faible adhésion cellulaire (Ultra Low Attachment, ULA, Corning) et les cellules sont cultivées avec des microsphères de collagènes (Mscoll), préparées selon le protocole [229]. En condition « OUT », 100 000 cellules sont incubées avec 1 000 Mscoll et les transfections sont réalisées avec l'ajout de micelles M1 dans le milieu de culture pour atteindre la concentration finale de 100 nM en siARN. En condition « IN », 100 000 cellules sont incubées avec 500 Mscoll préalablement incubées pendant 24 h dans une solution de micelles M1. La différence de protocole entre les deux conditions est expliquée par une perte de Mscoll pendant l'étape d'incubation de la condition « IN », une grande partie des Mscoll sont restées collées sur les parois du tube et nous n'avons pas pu les utiliser. Pour cette étape d'incubation, les microsphères sont centrifugées 5 min à 300g, puis le surnageant est récupéré. On ajoute ensuite une solution de micelles M2 chargées en siRNA (3 µM) qui recouvre le culot de microsphères, de manière à obtenir un taux de chargement maximum. Concernant la transfection des cellules, les Mscoll imprégnées dans la solution de micelle M1, sont reprises dans 250 µL de PBS ce qui correspond à une concentration finale de 50 nM en siARN dans chaque puits.

Les cultures cellulaires sont ensuite arrêtées, 24 h ou 48 h après le début de la transfection.

Extraction d'ARN et RT-qPCR.

L'ARN total a été isolé à partir des CSM à l'aide du kit RNeasy selon le protocole du fournisseur (Qiagen, Courtaboeuf). L'ARN total (0,25 ou 0,5 µg) a été rétrotranscrit en utilisant 100 U de transcriptase inverse M-MLV (ThermoFisher Scientific) et les réactions PCR (en utilisant la technologie SYBR Green) ont été réalisées comme décrit précédemment [405]. Les amorces du gène de ménage RPS9(GCTGTTGACGCTAGACGAGA/ATCTTCAGGCCCAGGATGTA) et de *Runx2* (ACAGTCCCAACTTCCTGTGC/ACGGTAACCACAGTCCCATC) ont été utilisées. Les valeurs de PCR ont été normalisées par rapport à RPS9 et exprimées en expression relative ou changement de facteur en utilisant les formules respectives : $2^{-\Delta Ct}$ et $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Mesures du diamètre hydrodynamique et du potentiel zêta.

Les mesures de diffusion dynamique de la lumière (NanoZS, Malvern Instruments, Royaume-Uni) ont été effectuées avec un laser He-Ne (longueur d'onde : 632,8 nm), à 25 °C et un angle de diffusion de 173° pour la détection. La méthode CONTIN a été utilisée pour l'analyse des données. Les diamètres hydrodynamiques (nm) ont été mesurés dans l'eau ou dans des milieux de culture cellulaire. Les potentiels zêta (mV) ont été mesurés uniquement dans l'eau par électrophorèse laser Doppler (NanoZS, Malvern Instruments, Royaume-Uni). Les résultats représentent la moyenne d'au moins 10 analyses par mesure et de trois mesures différentes par échantillon.

Mesure de la taille et de la concentration des particules par analyse du suivi individuel de particules (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA).

Pour déterminer le diamètre hydrodynamique et la concentration des nanoparticules, les échantillons ont été analysés par NTA avec un NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Royaume-Uni). Les mesures ont été effectuées avec un laser de longueur d'onde 405 nm. Les vidéos ont été analysées à l'aide du logiciel NanoSight NTA 3.1 selon un script personnalisé : la température a été fixée à 25 °C, le débit de la pompe à seringue à 40 UA (unité arbitraire) et 3 vidéos de 60 s ont été enregistrées pour chaque échantillon. Les vidéos ont été enregistrées avec un niveau de caméra réglé sur 16 et analysées avec un seuil de détection de 6.

Évaluation qualitative par électrophorèse.

15 µl d'échantillons ont été chargés dans un gel d'agarose à 4 % (p/v) précédemment marqué au bromure d'éthidium (0.005%). L'électrophorèse a été réalisée à tension constante (100 V) pendant 15 min dans du tampon Tris borate EDTA (TBE). Les gels ont ensuite été imagés à l'aide d'une lampe UV et d'une caméra.

Analyse de l'internalisation des acides nucléiques par cytométrie en flux.

Les EV contrôles ou « chargées » avec un siARN fluorescent (siALEXA488), sont incubées pendant 2 h à 37 °C avec les CSM à 70-80 % de confluence dans une plaque 12 puits dans le milieu de prolifération. Les cellules sont ensuite trypsinées, lavées deux fois avec du DPBS, centrifugées (1800 rpm, 5 min) et enfin mises en suspension dans du milieu HBSS sans Ca²⁺, Mg²⁺ avant analyse par cytométrie en flux sur un cytomètre BD Accuri C6 (10 000 événements ont été comptés pour chaque condition). Les valeurs moyennes de fluorescence ont été normalisées par celles des cellules non traitées.

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad 6 Prism. Les différences significatives entre deux groupes ont été évaluées par le test Mann-Whitney et les données sont présentées en moyenne ± SEM. * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001.

III Resultats et discussion

III.1 Les vecteurs polymériques.

L'efficacité de transfection de chaque vecteur polymérique a été évaluée à l'aide d'un siARN spécifique de *Runx2* à différentes concentrations et différents ratios de charges. L'expression relative de *Runx2* est évaluée par RT-qPCR et exprimée par rapport à la condition contrôle (cellules transfectées avec le siARN contrôle).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux polymères cationiques (PLL, PEI et PEI MAX®), déjà décrits dans la littérature, pour former des complexes de taille nanométrique avec les siARN [406, 407]. Ces polymères ont déjà été utilisés avec succès par différentes équipes pour la transfection de siRNA en conditions *in vitro* et *in vivo* [407-410]. Cependant, dans nos conditions, aucun des polymères cationiques testés n'a montré d'inhibition du gène *Runx2* (Fig. 22 A). L'efficacité de transfection de ces polymères est fortement

dépendante du type cellulaire, mais aussi du ratio de charge utilisé. De manière générale, l'efficacité de transfection augmente avec des ratios de charge plus importants, mais c'est aussi le cas de la toxicité cellulaire [411]. Dans notre cas, il serait peut-être possible d'améliorer l'efficacité de transfection de ces vecteurs en utilisant des ratios de charge plus élevés. Nous avons déjà effectué certaines expériences avec des ratios de charges plus importants mais une forte toxicité a été observée et les expériences n'ont pas été poursuivies (données non présentées). Il est donc possible que ces polymères cationiques, utilisés seuls, ne soient pas performants pour transférer les CSM dans nos conditions de culture cellulaire. En effet, certains polymères cationiques sont efficacement internalisés par les cellules, cependant leur efficacité de transfection reste plus faible qu'avec la plupart des autres agents de transfection [412]. Concernant la PLL, ce manque d'efficacité pourrait être expliqué par un manque de groupes amine avec un pKa 5-7 qui sont essentiels pour l'effet « proton sponge » bien connu pour déstabiliser les endosomes et par conséquent libérer les siARN dans le cytoplasme des cellules [412-414].

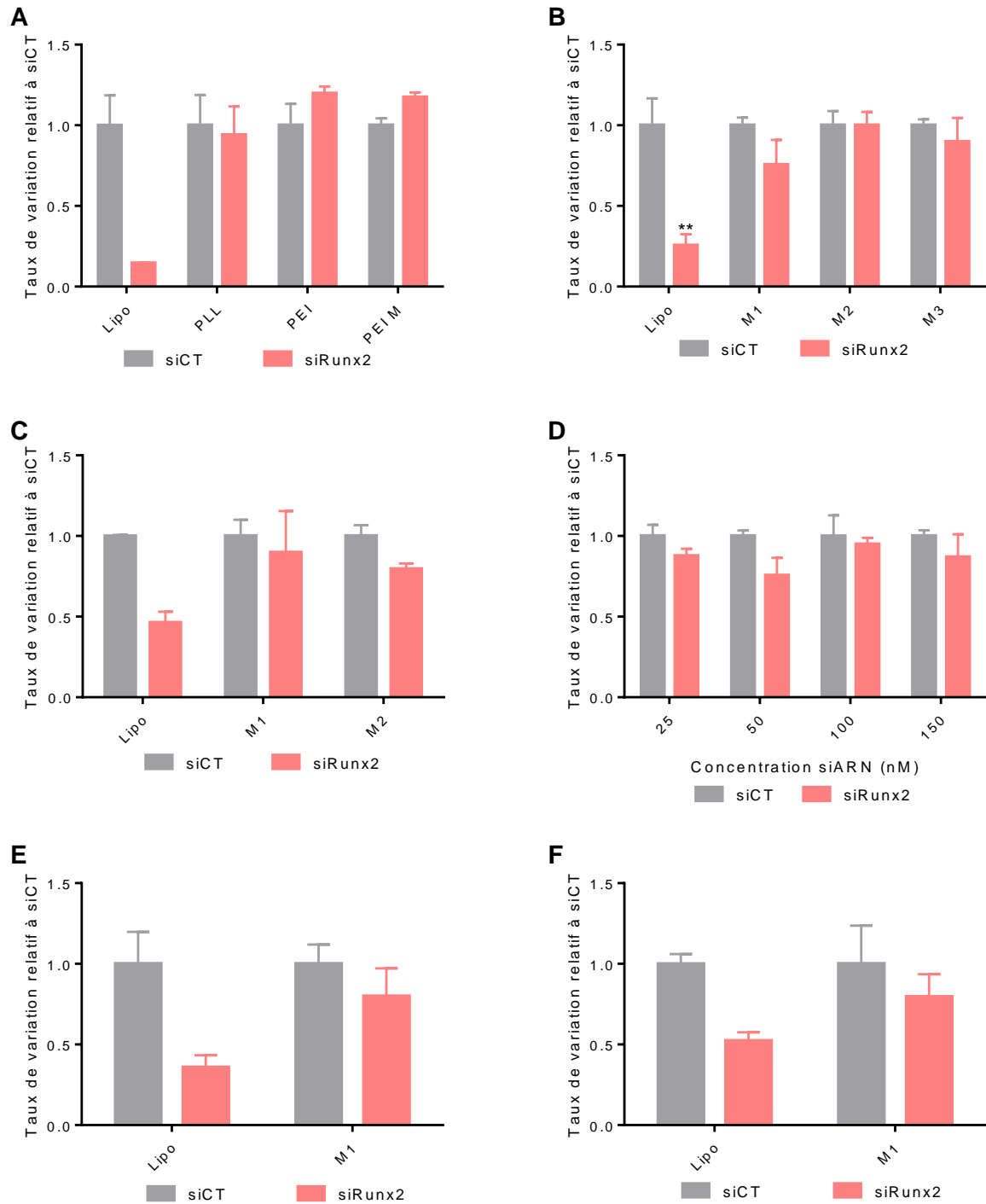


Figure 22 : Efficacité de transfection des vecteurs polymériques.

(A) Expression du gène *Runx2* dans les CSM transfectées avec une concentration finale de 50 nM en siCT ou siRunx2 vectorisés par la Lipofectamine 2000®, la PLL (CR = 1), le PEI (Rapport molaire = 3) et le PEI MAX (Rapport molaire = 3) (n = 2-3). (B) Expression du gène *Runx2* dans les CSM transfectées avec une concentration finale de 50 nM en siCT ou siRunx2 vectorisés par la Lipofectamine 2000® et les micelles M1, M2, M3 formulés avec un CR = 1 (n = 2-5). (C) Expression du gène *Runx2* dans les CSM transfectées avec une concentration finale de 50 nM en siCT ou siRunx2 vectorisés par la

Lipofectamine 2000® et les micelles M1 et M2, formulés avec un **CR = 0,8** (n=2). (D) Expression du gène *Runx2* dans les CSM transfectées avec différentes concentrations de micelles M1, formulées avec des siCT ou siRunx2 à un CR = 1 (n = 2). (E) Expression du gène *Runx2* dans les CSM en culture en trois dimensions et transfectées en condition « OUT » avec les micelles M1 dans le milieu de culture et une concentration finale de 100 nM en siCT ou siRunx2 (n = 2). (F) Expression du gène *Runx2* dans les CSM en culture en trois dimensions et transfectées en condition « IN » avec les micelles M1 imprégnées dans les Mscoll et une concentration finale de 50 nM en siCT ou siRunx2(n = 2). Les résultats sont exprimés en taux de variation de l'expression de *Runx2*, relatif à la condition siCT pour chacun des vecteurs utilisés.

Dans l'objectif d'obtenir une inhibition du gène *Runx2* plus importante et de stabiliser les complexes PLL-siRNA, connus pour s'agréger dans le temps, nous avons étudié l'intérêt des micelles à complexes polyioniques (PIC). Ces micelles possèdent un copolymère à bloc double hydrophile qui permet de stabiliser les complexes siARN-PLL [299, 389, 415]. Des études précédentes conduites au laboratoire avaient déjà déterminé que les caractéristiques physico-chimiques des micelles testées ici (M1, M2 et M3) sont adaptées au projet, avec une faible toxicité cellulaire, une complexation efficace des siARN et une taille permettant une imprégnation optimale des vecteurs dans les microsphères de collagène [299, 389]. L'évaluation de ces vecteurs a été reprise dans le cadre de mes travaux de thèse pour la transfection des CSM en conditions 3D, avec la perspective de les combiner aux microsphères de collagène pour former une MGA.

Dans notre étude, les vecteurs micellaires M1, M2 et M3 avec un ratio de charge de 1 n'ont pas permis, en condition de culture « classique » (2D) de diminuer significativement l'expression de *Runx2* malgré une tendance observée avec les micelles M1 (24%) (Fig. 22. B). La différence observée entre les micelles M1 et M3 peut être expliquée par les groupements de PMAA présents dans les micelles M1. Le PMAA subit un changement de conformation dans le pH acide des endosomes, ce qui lui confère la propriété de déstabiliser la membrane de l'endosome et par conséquent favorise la libération des siARN dans le cytoplasme [299-302]. Concernant la différence observée entre les micelles M1 et M2, une barrière stérique trop importante par les chaînes PEO₅₀₀₀ présentes à la surface des M2 pourrait diminuer leur internalisation dans les cellules. Cela a déjà été démontré sur des micelles de PEI stabilisées par des chaînes de PEG de différentes tailles [416]. D'un autre côté, des travaux précédents du laboratoire ont démontré une internalisation importante des micelles M1 par les CSM ainsi que leur libération dans le cytoplasme [299]. Ce qui suggère que la faible inhibition du gène *Runx2* observée ici, pourrait être due à une mauvaise disponibilité des siARN, peut-être trop

complexés par le polymère cationique. Afin de tester l'hypothèse que les siARN ne seraient pas disponibles, nous avons formulé des micelles M1 avec un ratio de charge (PLL/siARN) plus faible (0,8), ce qui permet une complexation moins importante des siARN une fois libérés dans le cytoplasme des cellules et par conséquent, une inhibition plus importante du gène cible. Dans le même objectif, nous avons également testé ce ratio de charge sur les micelles M2. Cependant, les résultats obtenus ont montré que les micelles M1 et M2 formulées avec un ratio de charge égal à 0,8, ne permettent pas non plus de diminuer l'expression de *Runx2* de manière significative, malgré une légère tendance, observée cette fois, avec les micelles M1 et M2 (Fig. 22 C). Nous n'avons pas constaté d'effet dose sur l'expression de *Runx2* après transfection des CSM avec les micelles M1 formulées avec un CR = 1 et utilisées aux concentrations en siARN de 25 nM, 50 nM, 100 nM et 150 nM (Fig. 22 D). Pour chacune des expériences réalisées, le vecteur commercial contrôle, la Lipofectamine 2000® a conduit à une inhibition de l'expression de *Runx2* comprise entre 85.5 % et 54 % (Fig. 22 A et B). Ces résultats nous orientent également vers l'hypothèse des siARN non disponibles pour exercer leurs activités biologiques. Une solution pourrait être de diminuer davantage le ratio de charge mais des études antérieures du laboratoire ont montré une hétérogénéité de taille des micelles formulées avec un ratio de charge inférieur à 0,8 et notamment la présence de micelles de grandes tailles, non compatibles avec notre projet de MGA.

Bien que l'efficacité de transfection des micelles M1 formulées avec un ratio de charge égale à 1 soit relativement limitée, leur bonne adéquation aux autres critères (dimension, charge, désassemblage pH-sensible, internalisation cellulaire...) a justifié l'étude de leur efficacité en conditions 3D [299].

L'efficacité de transfection du vecteur M1 a donc été évaluée au sein de CSM cultivées sur microsphères de collagène (3D). Le vecteur polymérique a montré une inhibition de l'expression de *Runx2* de l'ordre de 20 %, que le vecteur soit ajouté dans le milieu de culture (condition « OUT ») ou imprégné dans les microsphères de collagène (condition « IN »). Dans les mêmes conditions, l'inhibition à l'aide de la Lipofectamine 2000® est de, respectivement, 64 % et 49 % (Fig. 22 E et F). Cependant, aucun test statistique n'a été effectué sur ces essais de transfection en 3D car le nombre d'échantillons n'est pas assez important (n=2). Ces données sont toutefois intéressantes car les micelles n'ont pas perdu leur efficacité en condition 3D, contrairement à la Lipofectamine 2000® qui s'est révélée moins efficace. La différence de taille entre les deux vecteurs pourrait en partie expliquer cette différence d'efficacité. D'une part, les micelles ont une taille inférieure à 100 nm et elles sont suffisamment petites pour rester en

suspension dans un milieu aqueux, de plus elles sont stabilisées par une couronne de POE. D'autre part, nous avons démontré que la taille des lipoplexes formés entre la Lipofectamine 2000® et les siARN, augmente rapidement en condition de culture cellulaire jusqu'à former des particules de plusieurs microns (Article #2, Fig.2 E). La sédimentation de ces lipoplexes de grande taille pourrait expliquer une efficacité de transfection moins importante dans un système en 3D comparé à un système en 2D [417-419].

Parmi l'ensemble des vecteurs polymériques et micellaires testés, seules les micelles M1 ont permis une diminution très partielle de l'expression du gène *Runx2*. Par ailleurs, les copolymères POE-PMAA utilisés ici pour former les micelles ne présentent pas de fonction facilement modifiable, ni sur l'extrémité libre du POE ni le long de la chaîne. Pour modifier la surface des micelles afin de moduler les interactions avec la matrice de la MGA, il faudrait envisager la synthèse d'autres copolymères similaires mais présentant un ou plusieurs groupements fonctionnels. Le faible niveau d'inhibition mesuré avec les micelles tripartites étudiées ici ne justifiant pas cet effort de synthèse dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi d'écarter cette famille de vecteurs pour la suite du travail.

III.2 Les vésicules extracellulaires (EV).

Les EV, vecteurs naturels utilisés par les cellules, représentent une option intéressante pour notre projet, car ces vecteurs sont particulièrement efficaces pour interagir avec les cellules et présentent une excellente biocompatibilité. De plus, nous avons montré que la taille moyenne des EV est de 115 ± 2.33 nm, ce qui correspond à notre cahier des charges pour l'élaboration de la MGA (Fig. 23 A, E). Cette valeur correspond également aux données retrouvées dans la littérature [360]. Dans cette étude, nous avons testé différents protocoles afin de charger les EV avec un siARN d'intérêt. Dans un premier temps, on s'est intéressé à l'effet des différents protocoles de chargement sur les paramètres physico-chimiques des EV. Dans un second temps on a mesuré l'efficacité de transfection des EV modifiées.

Effet des protocoles de chargements des siARN sur les propriétés physico-chimiques des EV.

La première stratégie abordée, concerne l'application de traitements physiques pour provoquer des réarrangements membranaires susceptibles de permettre le chargement des siARN dans les EV. Pour cela, plusieurs traitements, simples ou combinés, ont été appliqués, inspirés de [359]. Après traitement, la taille et la concentration des EV ont été analysées par NTA.

Le traitement des EV par des cycles de congélation/décongélation (FTC) est une méthode relativement simple et déjà référencée dans la littérature pour induire des réarrangements membranaires permettant le chargement de protéines [372, 382, 420]. Notre étude a montré que le traitement par FTC entraîne une modification de la distribution de tailles avec la formation de particules de grande taille pouvant atteindre plusieurs centaines de nanomètre, ce qui augmente la taille moyenne des EV (Fig. 23 A, B et C).

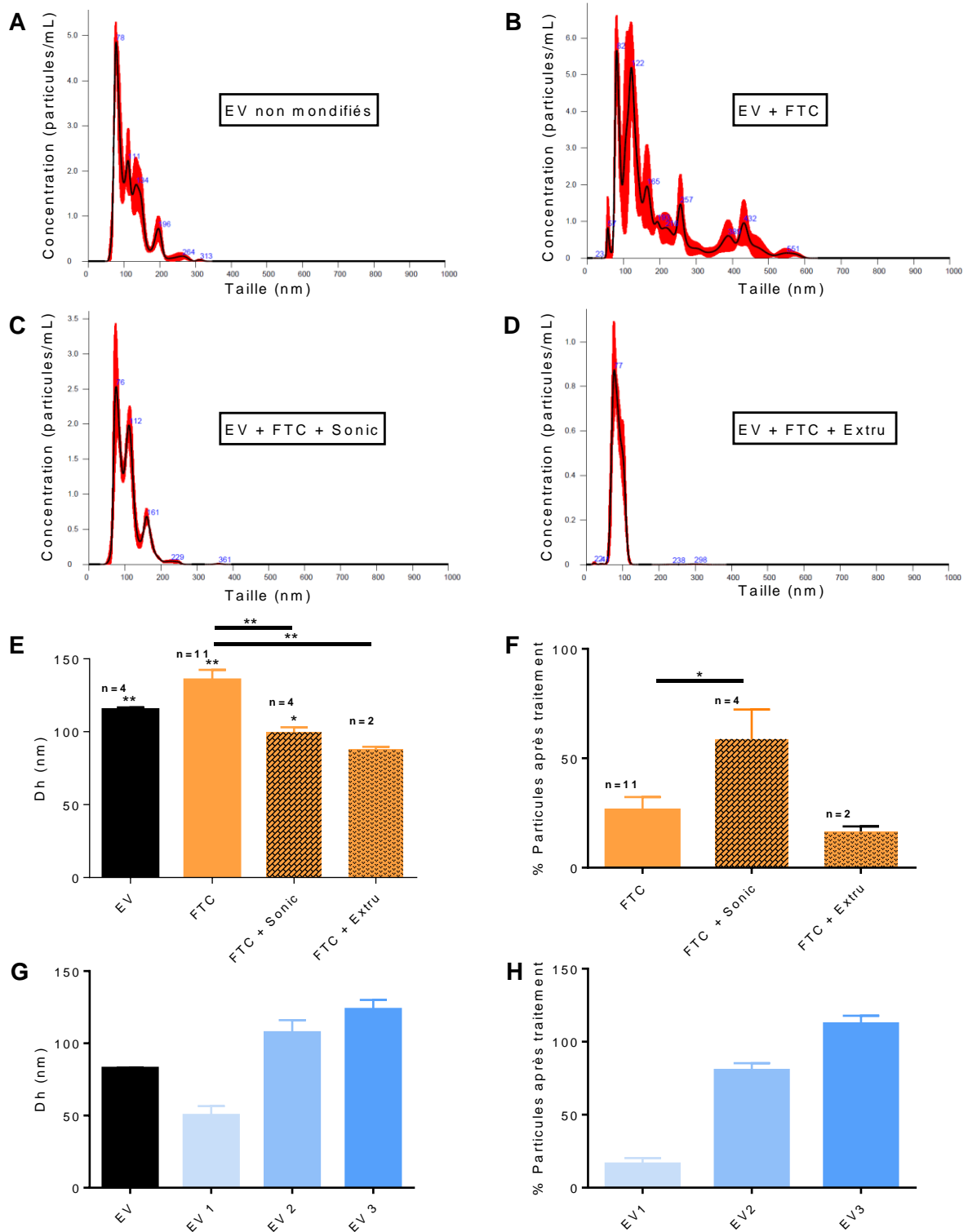


Figure 23 : Analyse physico-chimique des EV et effet des différents traitements utilisés.

Analyse de la taille et de la concentration du mélange EV/siRNA par NTA, sur des EV sans traitement (A), après FTC (B), après FTC + Sonication (C) et après FTC + Extrusion (D). (E) Diamètre hydrodynamique moyen (Dh) des EV mesuré par NTA après différents traitements. La condition EV correspond aux EV avant traitement (n=2-11). (F) Pourcentage de particules après chaque traitement.

Les résultats sont calculés en fonction de la quantité d'EV mesurée par NTA, avant et après le traitement (n=2-11). (G) Diamètre hydrodynamique moyen des EV mesuré par NTA après application des différents protocoles d'électroporation, EV1, EV2 et EV3 ; la condition « EV » correspond à l'état avant électroporation (n = 3). (H) Pourcentage de particules après chaque traitement d'électroporation. Les résultats sont calculés en fonction de la quantité d'EV mesurée par NTA, avant et après électroporation (n=3).

On observe également que le traitement FTC induit une diminution de 74 % de la quantité de particules (Fig. 23 F). Ces observations suggèrent que le traitement FTC appliqué seul, induit la formation d'agrégats ou la fusion des EV en particules de grande taille induisant la formation de vésicules multi-lamellaires comme observé précédemment [360] et explique la perte importante de la concentration en particules. Cette méthode de chargement a déjà été utilisée avec succès pour le chargement de la catalase et les auteurs avaient suggéré une agrégation des EV relative à une légère augmentation de leur taille [382]. De plus, les cycles de congélation/décongélation sont une méthode bien connue pour la formation de liposomes multilamellaires de grande taille [421-423]. Nos observations sont donc en accord avec la littérature et suggèrent un réarrangement des membranes lipidiques des EV. Cependant, de par leur caractère hydrophile et leur charge négative, les siARN sont décrits comme particulièrement difficiles à complexer avec les EV [372]. Afin de favoriser le chargement des siARN dans les EV, nous avons décidé d'appliquer un protocole complémentaire.

Nous avons choisi d'étudier la sonication, qui applique une force de cisaillement mécanique ayant pour effet d'affaiblir la cohésion de la membrane des EV et l'extrusion, qui induit une recombinaison membranaire par des forces de compression [424, 425]. Ces deux méthodes visent également à favoriser le chargement des siARN à l'intérieur des EV.

Après application du protocole d'extrusion en second traitement, on observe une diminution significative de la taille des EV de 47,5 nm comparée aux EV après traitement FTC (Fig. 23 E). On observe également la disparition des populations de particules de grande taille induites par le traitement FTC et par conséquent, une population de particules plus homogène en taille et une quantité de particules qui diminue de 73,7 % (Fig. 23 C, D, F). Les résultats observés sont partiellement en accord avec les données de la littérature. En effet, l'extrusion des EV est déjà décrite comme un moyen efficace pour diminuer la taille et homogénéiser les vésicules, mais le nombre de particules en solution a tendance à augmenter après un protocole d'extrusion [360, 426]. Or dans nos résultats, on observe bien une diminution de la taille des EV, mais la quantité de particules totales est aussi drastiquement diminuée. Cela suggère que

les particules de grande taille formées après le protocole de FTC, sont détruites par le protocole d'extrusion ou sont restées piégées dans les filtres de polycarbonate utilisés. Dans nos conditions, la destruction des particules de grande taille est possible, car le protocole de FTC peut potentiellement fragiliser les EV et les forces de compression exercées par les pores du filtre sont plus importantes sur les particules de grande taille. Au vu de la perte importante d'EV observée, nous avons décidé de ne pas poursuivre les expérimentations avec ce protocole.

Après application du protocole de sonication en second traitement, on observe une diminution significative de la taille des EV de 36 nm comparée aux EV après traitement FTC (Fig. 23 E). On observe également la disparition des populations de particules de grande taille et une distribution plus resserrée des particules (Fig. 23 C, D). Ces résultats sont surprenants car les données de la littérature montrent généralement une augmentation de la taille des EV après application d'un protocole de sonication, probablement attribué à un phénomène d'agrégation [424, 427]. Une explication possible est que dans notre étude, l'étape de sonication a été appliquée en second traitement, après les FTC. La diminution de la taille observée est sûrement le résultat de la fragmentation des particules de grande taille formées par les FTC. Cette hypothèse est appuyée par l'augmentation significative du nombre total de particules de 35.5 % après le protocole de sonication, comparée au nombre de particules mesurées après le traitement FTC (Fig. 23 F).

Par la suite, nous avons essayé de mesurer la quantité de siARN encapsulée dans les EV, en utilisant un siRNA fluorescent (siALEXA 488). Malheureusement, nous n'avons pas observé de particules fluorescentes au NTA. Nous avons également essayé d'évaluer la complexation des siARN avec les EV par électrophorèse sur gel d'agarose mais la faible sensibilité de cette méthode de quantification n'a pas permis d'obtenir des résultats reproductibles. En effet, les méthodes utilisées ici reposent essentiellement sur un chargement passif, par diffusion des siARN et, par conséquent, le taux de chargement attendu est faible. Cependant, nos résultats combinés aux données de la littérature semblent indiquer que l'application du double protocole FTC + sonication, induit des réarrangements membranaires importants et donc potentiellement un chargement efficace des siARN dans les EV. De plus, comparé aux autres protocoles testés, c'est celui qui a induit le moins de pertes en nombre de particules. De plus, la taille des EV modifiées reste compatible avec la formation d'une MGA. C'est pourquoi, nous avons décidé de tester l'efficacité de transfection de ces EV modifiées.

La deuxième stratégie abordée, l'électroporation, utilise un champ électrique pour former des nanopores sur la membrane des EV afin d'améliorer leur perméabilité et permettre le chargement des siARN par diffusion [372].

Les résultats ont été obtenus à partir d'une seule expérimentation et devront être reproduits pour être confirmés. Cependant, nous avons pu observer que le protocole EV1 (1000 V, 100 µsec) diminue la taille moyenne des EV de 32,7 nm et entraîne une diminution du nombre de particules de 83,8 % (Fig. 23 G, H). Le protocole EV2-(1000 V, 200 µsec) augmente la taille moyenne des EV de 24,6 nm et induit une diminution du nombre de particules de 19,7%. Etant donné que les protocoles EV1 et EV2 utilisent le même voltage d'électroporation (1000 V), une explication probable serait la formation d'agrégats de siARN par les protocoles d'électroporation. La précipitation et la formation d'agrégats des acides nucléiques après application d'un courant électrique sont déjà référencées dans la littérature [375, 428, 429]. Dans notre cas, cette hypothèse est supportée par la taille moyenne des particules qui augmente en fonction du temps d'électroporation. D'un autre côté, la condition EV3 (500 V, 1000 µsec) induit une augmentation de la taille des EV de 40,7 nm et une augmentation de la quantité de particules de 12,2 % (Fig. 23 G, H). Cette dernière observation semble indiquer la présence de particules de nature différente des EV, pouvant confirmer l'hypothèse des agrégats de siARN formés par la méthode d'électroporation. Là encore, les taux de chargements attendus étant trop faibles, nous n'avons pas pu mesurer le taux d'encapsulation des siARN.

Bien que les résultats obtenus semblent indiquer une destruction partielle des EV et la formation d'agrégats de siARN par les traitements d'électroporations utilisés, les données encourageantes de la littératures nous ont conduit à tester l'efficacité de transfection des EV chargées en siARN par les trois protocoles d'électroporation [369, 424, 430, 431].

Efficacité de transfection des EV

La transfection des CSM avec les EV modifiées par le protocole FTC + Sonication, n'induit pas d'inhibition significative du gène *Runx2* pour des concentrations finales en siARN de 50 nM et 200 nM, contrairement à la Lipofectamine 2000® qui permet ici une inhibition de 79,9 % de l'expression du gène *Runx2* (Fig. 24 A).

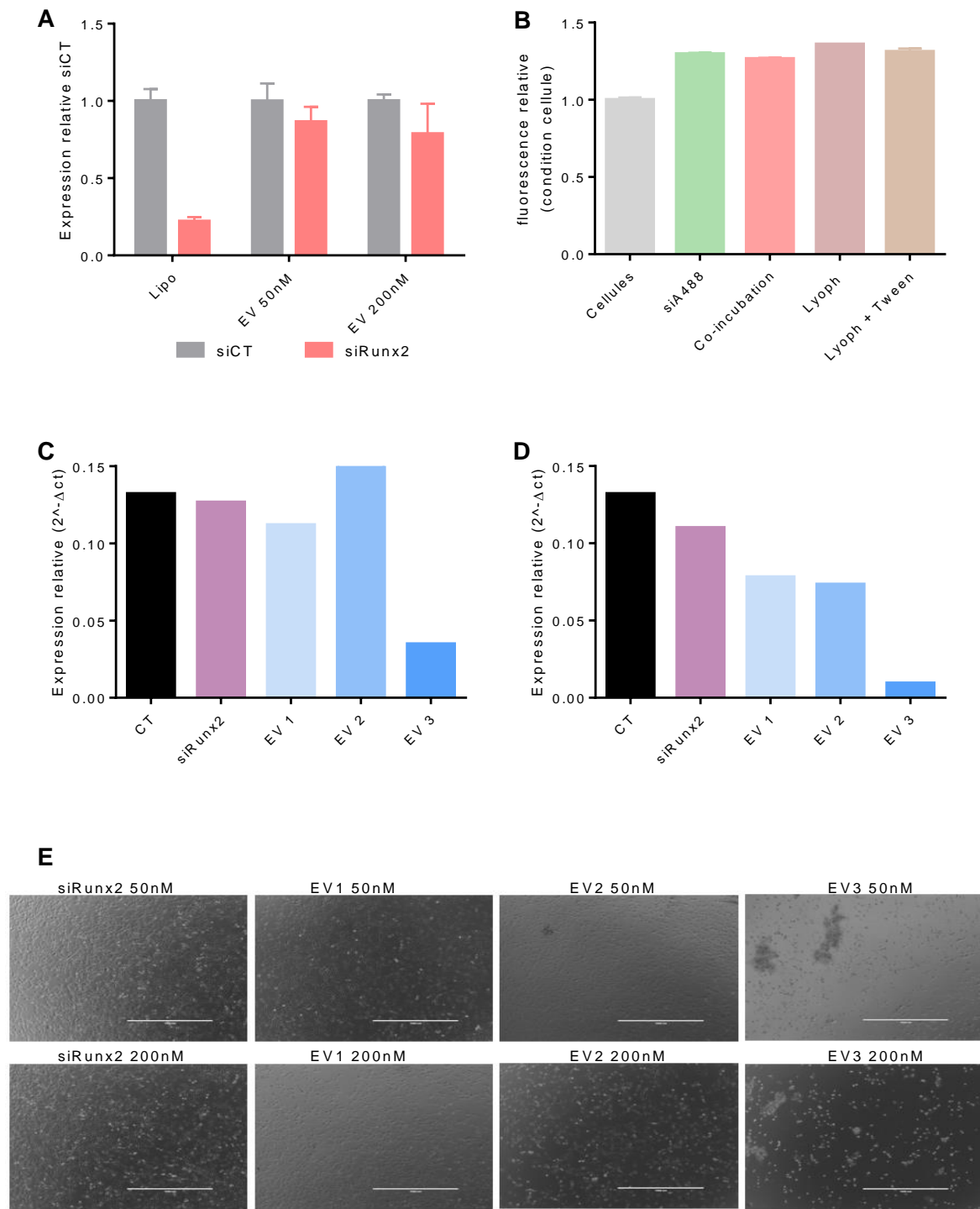


Figure 24 : Efficacité de transfection des EV.

Expression du gène *Runx2* dans les CSM transfectées par la Lipofectamine 2000® ou par des EV. La condition Lipofectamine 2000® correspond à une concentration finale en siCT ou siRunx2 de 50 nM. Les conditions EV 50 nM et EV 200 nM correspondent aux cellules transfectées par des EVs traitées successivement par FTC et sonication en présence de siCT ou siRunx2 et utilisées avec une concentration finale en ARN de 50 nM ou 200 nM (n = 3). (B) Internalisation des EV traitées par co-incubation, lyophilisation (Lyoph) et lyophilisation + surfactant (Lyoph + Tween) dans les CSM,

évaluée par cytométrie en flux. Les conditions cellules et siA488 correspondent aux contrôles négatifs (n = 2). (C) Expression du gène *Runx2* dans les CSM transfectées avec une concentration finale de 50 nM ou 100 nM (D) en siRunx2 seul ou vectorisé par des EV après application des protocoles EV1, EV2 et EV3. (E) Images représentatives des CSM en culture, la barre d'échelle correspond à 1000 µm. Les conditions cellules et siRunx2 correspondent aux contrôles négatifs.

Ces résultats peuvent être expliqués par une mauvaise encapsulation des siARN dans les EV et/ou par une perte des propriétés de transfection des EV, due aux traitements appliqués. L'hypothèse d'une perte de propriétés de transfection nous paraît peu probable car les traitements utilisés, en particulier la sonication, ont été décrits pour favoriser l'internalisation des EV par les cellules [360, 424]. Cependant, nous ne pouvons pas totalement exclure cette hypothèse car dans nos conditions, les deux traitements sont appliqués successivement et les paramètres de FTC et sonication utilisés sont différents de ceux utilisés dans la littérature. En revanche, l'hypothèse d'un taux de chargement trop faible semble la plus probable. D'après les paramètres utilisés dans nos expériences et en supposant que les EV sont des sphères parfaites, nous avons calculé un taux d'encapsulation maximum de 0,00016 % en considérant un chargement passif des siARN. Les résultats obtenus suggèrent que la capacité exceptionnelle des EV à interagir avec les cellules ne suffit pas pour compenser un taux d'encapsulation aussi faible [357-359, 424]. Il serait possible d'améliorer le taux d'encapsulation théorique maximum, en augmentant considérablement la concentration en EV ou en siARN. Cependant, les protocoles utilisés ainsi que les mesures de taille et de concentration faites au NTA demandent un volume minimum. Par conséquent, pour obtenir un taux de chargement théorique maximum de l'ordre de 1%, il faudrait utiliser une quantité d'EV et de siARN trop importante, techniquement et économiquement, pour être envisagée.

Dans l'objectif d'augmenter le taux d'encapsulation des siARN, nous avons lyophilisé les EV pour les resuspendre avec une solution de siALEXA488 concentrée. Nous avons également ajouté un surfactant, le tween 80, déjà utilisé pour augmenter la perméabilité des vésicules lipidiques [432, 433]. Afin d'observer une éventuelle encapsulation des siARN dans les EV, le taux d'internalisation des EV dans les CSM a été évalué par cytométrie en flux. Les résultats ne montrent aucune différence significative de fluorescence entre les cellules co-incubées avec les siARN libres ou avec les EV associées au siAlexa488 par *i*) co-incubation, *ii*) lyophilisation ou *iii*) lyophilisation en présence de Tween 80 (Fig. 24 B). Etant donné que la lyophilisation des EV a été réalisée dans des conditions qui n'induisent pas une inhibition des

interactions avec les cellules, notre hypothèse est là aussi en faveur d'un taux d'internalisation trop faible [360].

L'électroporation des EV a cependant montré des résultats intéressants sur l'inhibition de *Runx2*. En utilisant les protocoles EV1 et EV2 pour électroporer les EV par le siRunx2, les CSM ne montrent pas d'inhibition du gène *Runx2* pour une concentration finale en siARN de 50 nM. En revanche, on observe une diminution de l'expression de *Runx2* avec une concentration finale en siRunx2 de 100 nM. Le protocole d'électroporation EV3 a induit une inhibition importante de l'expression de *Runx2* pour les deux concentrations testées (Fig. 24 C et D). Cependant, nous avons observé une forte mortalité associée au protocole EV3 (Fig. 24 E). Ces résultats sont surprenants car les EV sont généralement décrites pour leur excellente biocompatibilité [372, 434]. Ces résultats combinés aux changements de taille et de concentration observés dans la partie précédente, suggèrent que la toxicité observée pourrait être causée par les agrégats formés lors de l'électroporation. Néanmoins, d'autres analyses sont nécessaires pour déterminer si l'inhibition du gène *Runx2* observée est induite par une transfection efficace des EV ou par la sédimentation et l'internalisation des potentiels agrégats de siARN par les cellules. Les deux hypothèses sont possibles car d'une part, plusieurs études ont montré une efficacité de transfection de siARN par des EV électroporées et d'autre part, la précipitation des acides nucléiques est une méthode de transfection largement décrite pour la transfection des cultures cellulaires en 2D [424, 430, 435].

A ce stade, l'optimisation des protocoles permettant d'associer EV et siRNA nécessitant un fort investissement d'exploration, nous avons choisi d'étudier un autre type de vecteur lipidique : les lipides cationiques.

III.3 Les lipides cationiques.

Depuis plusieurs décennies, les lipides cationiques sont largement utilisés pour la transfection des cellules avec les acides nucléiques [331, 436-438], aboutissant ces dernières années à plusieurs produits mis sur le marché [Onpatro ; Comirnaty, tozinameran (BioNTech/Pfizer) ; mRNA-1273 (Moderna/NIAID/BARDA)] [438, 439]. De par leur nature cationique, ils peuvent complexer facilement les acides nucléiques chargés négativement. Dans

notre étude, deux types de lipides potentiellement compatibles avec notre projet de MGA, le KLN47 et le DOTAP associé au lipide DOPE ont été testés [311, 314].

La complexation des siARN par les lipides cationiques.

L'efficacité de complexation des siARN avec les liposomes DOTAP-DOPE et KLN47 a été évaluée par électrophorèse. Différentes valeurs de CR (0,5, 1, 2, 3 et 4) ont été testées avec une quantité fixe de siARN. En raison de leur charge négative, les siARN libres ont migré vers la cathode et sont révélés par la présence d'une bande fluorescente. Avec les deux types de lipoplexes, l'intensité de la bande correspondant au siARN libre est plus faible à CR = 1 comparée à la condition contrôle avec le siARN seul. À des valeurs de CR plus élevées, la fluorescence correspondant au siARN libre n'est pas détectée (Fig. 25 A et C).

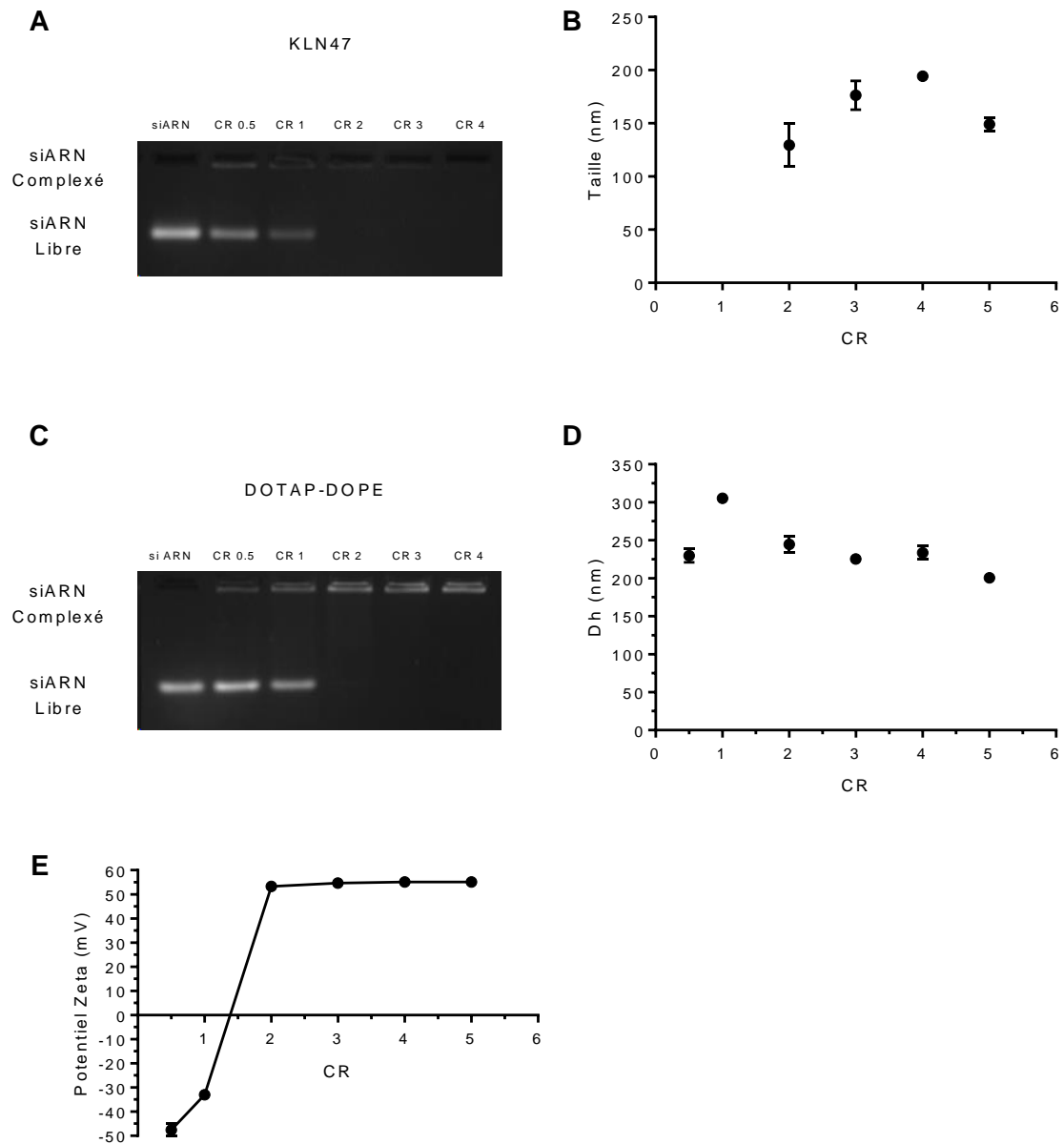


Figure 25 : Analyse physico-chimique des vecteurs lipidiques KLN47 et DOTAP-DOPE.

(A) Electrophorèse sur gel d'agarose de lipoplexes KLN47 formulés avec du siA488 à un rapport de charge (CR) de 0,5, 1, 2, 3 et 4. (B) Diamètre hydrodynamique des lipoplexes KLN47 formulés avec du siA488 à différents rapports de charge (CR), mesuré par NTA (n=3). (C) Electrophorèse sur gel d'agarose de lipoplexes DOTAP-DOPE formulés avec du siA488 à un rapport de charge (CR) de 0,5, 1, 2, 3 et 4. (D) Diamètre hydrodynamique des lipoplexes DOTAP-DOPE formulés avec du siA488 à différents rapports de charge (CR), mesuré par DLS (n=3). (E) Potentiel Zêta des lipoplexes DOTAP-DOPE formulés avec du siA488 à différents rapports de charge (CR) (n=3).

Cela montre que les lipoplexes formulés avec le KLN47 ou avec le système DOTAP-DOPE ont la capacité de complexer totalement les siARN à partir d'un ratio de charge CR égal

à 2. On remarque également que pour les CR 0,5 et 1, l'intensité de fluorescence des siARN libres est plus importante avec la condition DOTAP-DOPE comparée au KLN47, ce qui suggère une complexation plus importante des siARN avec le KLN47 (Fig. 25 A et C). Ce résultat n'était pas forcément attendu dans la mesure où les deux lipides cationiques possèdent une seule charge positive, cependant cette différence peut être expliquée par différents assemblages moléculaires des lipides, notamment le lipide DOPE qui favorise la formation de lipoplexes avec une structure hexagonale inversée [315, 390, 440].

Toxicité des vecteurs lipidiques.

Un autre élément important à prendre en compte pour le choix du vecteur, est la toxicité cellulaire. A ce stade, nous n'avons pas fait d'expérience pour évaluer la toxicité de ces deux vecteurs lipidiques. Cependant, les données de la littérature nous apportent certaines informations. Le vecteur DOTAP-DOPE et la plupart des lipides cationiques sont décrits pour induire une toxicité cellulaire, qui peut varier en fonction des concentrations utilisées ou de la structure des lipoplexes [390, 441, 442]. Le KLN47 fait partie des lipides cationiques les moins toxiques [391, 443]. La faible toxicité de ce lipide est principalement due au fait qu'il possède une tête cationique composée d'un atome d'arsonium, contrairement aux autres lipides cationiques qui possèdent généralement un atome d'azote [312, 314, 391]. Cependant, la toxicité cellulaire n'est pas un élément déterminant pour notre choix de vecteur, car plusieurs méthodes sont décrites pour réduire leur toxicité [328, 444, 445].

Dimension et charge des lipoplexes.

Le diamètre hydrodynamique (D_h) des lipoplexes formés avec le KLN47 a été évalué par NTA pour les ratios de charges 2, 3, 4 et 5. On constate une augmentation du diamètre des particules en fonction du CR jusqu'à atteindre un maximum de 194,3 nm à CR = 4. Le diamètre diminue ensuite à 149,0 nm pour un CR = 5 (Fig. 25 A). Concernant les lipoplexes formulés avec les lipides DOTAP-DOPE, nous avons évalué par DLS le D_h des particules formées aux CR 0,5, 1, 2, 3, 4 et 5. On observe que le D_h est de 229,8 nm pour CR = 0,5 et augmente à 305,3 nm pour CR = 1. Pour des CR plus élevés, on observe que le D_h a tendance à diminuer pour atteindre 200,4 nm à CR = 5 (Fig. 25 D). Les tailles observées des lipoplexes DOTAP-DOPE correspondent aux données de la littérature, de même que le maximum observé est atteint pour

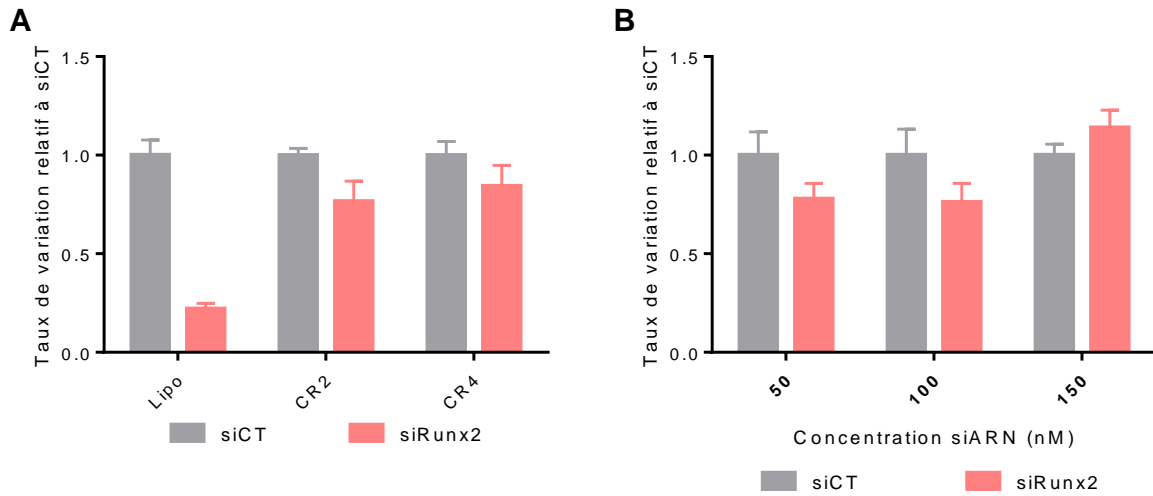
un ratio de charge neutre [446, 447]. Selon nos résultats, les lipoplexes formulés avec le KLN47 pour un ratio de charge supérieur à 2 ont une taille légèrement inférieure au 200 nm correspondant à notre cahier des charges. Pour un ratio de charge de deux, le système DOTAP-DOPE conduit à la formation de lipoplexes deux fois plus grands, mais la différence est plus ténue pour CR = 4. A priori, un CR faible est préférable car les lipoplexes induisent généralement une toxicité cellulaire qui augmente avec des ratios de charge élevés, c'est notamment le cas des lipoplexes DOTAP-DOPE [348]. Ainsi, dans la mesure où les lipoplexes les plus grands seraient potentiellement moins adaptés pour l'imprégnation dans les microsphères de collagène, le système KLN47 serait préférable de ce point de vue.

Les potentiels zêta des lipoplexes DOTAP-DOPE aux CR 0,5 et 1 sont respectivement -47,6 mV et -33,0 mV et à partir du CR = 2, le potentiel zêta des lipoplexes devient largement positif et reste stable, entre 53,3 mV et 55,1 mV pour les CR = 2 et CR = 5, respectivement (Fig. 25 E). La transition du potentiel zêta correspond aux résultats observés sur la complexation des siARN et les valeurs élevées de potentiel zêta observées après CR 2, sont dues à la charge positive portée par le DOTAP [448]. Une valeur élevée de potentiel zêta indique généralement des particules stables en solution, grâce aux répulsions électrostatiques [449, 450]. Cependant, un potentiel zêta élevé peut également induire une toxicité cellulaire et des interactions non désirées avec certaines protéines du sérum qui seraient potentiellement responsables d'une toxicité et d'une hémolyse *in vivo* [448, 451-453]. Dans le cadre de notre projet, la charge positive des lipoplexes n'est pas une limite importante, car notre approche n'est pas systémique et une fois injectés dans l'articulation, les vecteurs n'ont pas vocation à entrer en contact avec le système sanguin. De plus, une charge positive du vecteur serait un avantage pour favoriser les interactions avec la MEC du cartilage qui est chargée négativement [310].

Efficacité de transfection des vecteurs lipidiques.

La transfection des CSM avec le KLN47 montre une inhibition du gène *Runx2* de 22% et 24 % pour un CR = 2 et une concentration finale en siARN de 50 nM et 100 nM, respectivement. Cependant, aucune différence significative n'est observée entre CR 2 et 4 pour une concentration en siRunx2 de 50 nM (Fig. 25 A et B).

KLN47



DOTAP-DOPE

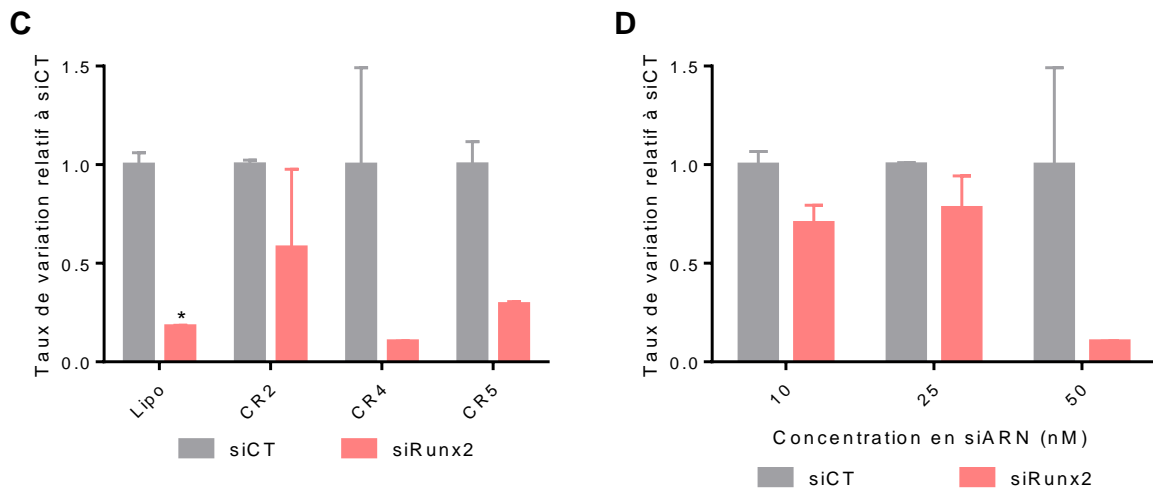


Figure 26 : Efficacité de transfection des vecteurs lipidiques KLN47 et DOTAP-DOPE

(A) Expression du gène *Runx2* dans les CSM transfectées avec une concentration finale de 50nM en siCT ou siRunx2 vectorisés par la Lipofectamine 2000® et par les lipoplexes **KLN47** formulés avec différents ratios de charge (n=3). (B) Expression du gène *Runx2* dans les CSM transfectées avec différentes concentrations de siCT ou siRunx2 vectorisés par le **KLN47** avec un CR = 2 (n = 3). (C) Expression du gène *Runx2* dans les CSM transfectées avec une concentration finale de 50nM en siCT ou siRunx2 vectorisés par la Lipofectamine 2000® et par les lipoplexes **DOTAP-DOPE** formulés avec différents ratios de charge (n=2-4). (D) Expression du gène *Runx2* dans les CSM transfectées avec différentes concentrations de siCT ou siRunx2 vectorisés par les lipides DOTAP-DOPE avec un CR = 4 (n = 2).

Contrairement aux lipoplexes formulés avec le KLN47, nous avons observé une différence significative entre les CR = 2 et CR = 4 avec les lipoplexes DOTAP-DOPE utilisés à la même concentration de 50 nM. Une inhibition maximale de 90 % de l'expression du gène *Runx2* est obtenue avec le CR 4, soit une efficacité supérieure au contrôle commercial, la Lipofectamine 2000®, qui permet ici une inhibition de 82 % de l'expression du gène (Fig. 25 C). Nous avons également observé un effet dose avec une faible inhibition du gène *Runx2* pour les concentrations de 10 et 25 nM, respectivement 30 % et 22 %, alors qu'elle atteint 90 % à la concentration de 50 nM en siRunx2 (Fig. 25 D).

Dans nos conditions, l'efficacité de transfection semble nettement plus grande pour le système DOTAP-DOPE que pour KLN47. A noter toutefois que ce dernier n'a pas été testé avec une formulation comprenant un co-lipide comme DOPE (helper) qui peut permettre d'améliorer la transfection. Cette approche a déjà été envisagée pour complexer l'ADN et les résultats obtenus montrent que l'ajout du lipide DOPE induit une diminution de l'efficacité de transfection sur des cellules HEK293-T7 [454]. Il serait intéressant d'explorer si des résultats similaires sont obtenus avec des CSM primaires.

Par ailleurs, l'augmentation du ratio de charge augmente l'efficacité de transfection des lipoplexes DOTAP-DOPE, alors qu'il ne semble pas avoir d'effet positif sur l'efficacité des lipoplexes KLN47. Ainsi, la formulation des lipoplexes DOTAP-DOPE à différents CR et l'utilisation de différentes concentrations en siARN permet d'améliorer et d'ajuster l'inhibition du gène *Runx2* par les CSM, contrairement aux lipoplexes obtenus avec KLN47. Si on se réfère à la littérature, les lipoplexes KLN47-ADN formulés avec un ratio de charge 4 permettent une meilleure efficacité de transfection que ceux formulés avec CR = 2 [455]. Cependant, l'étude porte sur l'ADN, qui n'est pas totalement complexé par le KLN47 pour la condition CR2 contrairement à notre étude, où une complexation totale des siARN pour un CR = 2 est observée par électrophorèse. Ces données suggèrent, d'une part, que les siARN sont complexés plus efficacement par le KLN47 et, d'autre part, que l'efficacité de transfection des lipoplexes formulés avec le KLN47 dépend du taux de complexation des siARN, avec un maximum atteint une fois la totalité des siARN complexés. Cette hypothèse est appuyée par l'analyse semi-quantitative des gels d'électrophorèse vu précédemment, qui montre une meilleure complexation des siARN avec le lipide cationique KLN47 pour des ratios de charges inférieurs à 2, comparés aux liposomes DOTAP-DOPE (Fig. 25A, C). Cela suggère que l'efficacité maximum sera atteinte pour un CR plus élevée avec les lipoplexes DOTAP-DOPE comparée au KLN47.

Pour résumer, les lipoplexes obtenus avec le lipide cationique KLN47 présentent des caractéristiques physico-chimiques adaptées à notre projet, mais une relativement faible efficacité de transfection. Les lipoplexes DOTAP-DOPE obtenus ici dans les conditions classiques de préparation à partir de liposomes sont légèrement plus grands que la limite des 200 nm fixée dans notre cahier des charges. Cependant, formulés avec un CR égal à 4, ils permettent une inhibition très forte du gène *Runx2*, ce qui en fait un candidat bien plus adapté à notre projet.

IV CONCLUSION

Ce premier chapitre a permis d'étudier différents vecteurs de siARN potentiellement adaptés à notre projet. Un résumé de leurs propriétés est donné dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Evaluation de la compatibilité des vecteurs testés pour la réalisation d'une MGA avec les microsphères de collagène.

	Efficacité de transfection	Taille ≤ 200 nm	Complexation des acides nucléiques	Fonctionnalisable
Micelles M1	+	+++	+++	+
Micelles M2	/	+++	+++	+
Micelles M3	/	+++	+++	+
KLN47	+	++	+++	+++
DOTAP-DOPE	+++	++	+++	+++
EVs	/	+++	/	+

La compatibilité des vecteurs testés pour les différents paramètres est définie ainsi : / = non compatible ; + = peu compatibles ; ++ = compatibles ; +++ = Très compatibles.

Parmi ces vecteurs, les micelles PIC semblent avoir les paramètres physico-chimiques les plus adaptés. Cependant, malgré les différents types de micelles et les différents protocoles

utilisés, ces vecteurs restent faiblement efficaces pour la transfection des CSM et ne permettent pas une inhibition suffisante du gène *Runx2*. L'étude des EV n'a pas permis d'obtenir une transfection des siARN satisfaisante et de nombreuses améliorations sont encore nécessaires pour permettre une encapsulation efficace et reproductible des siARN. Néanmoins, du fait de leurs propriétés naturelles, les EV restent un vecteur prometteur pour la thérapie génique appliquée à l'IT. Les vecteurs lipidiques semblent être les plus efficaces pour la transfection des CSM, en particulier le système DOTAP-DOPE qui permet d'obtenir une inhibition du gène *Runx2* comparable à celle du vecteur commercial contrôle. Néanmoins, la taille de ce vecteur est légèrement au-dessus de la limite fixée par notre cahier des charges. Par ailleurs, ce type de complexes lipidiques est déjà décrit dans la littérature comme instable dans des conditions *in vivo*, conduisant à la formation d'agrégats de grande taille. Malgré ces limitations, le vecteur lipidique DOTAP-DOPE est, dans nos conditions, le plus efficace pour la transfection de siARN dans les CSM. Nous avons donc choisi de modifier la formulation des vecteurs lipidiques DOTAP-DOPE afin de mieux en contrôler leurs paramètres physico-chimiques. Le chapitre suivant rapporte ce travail de modification réalisé afin d'adapter ces vecteurs lipidiques à l'élaboration d'une MGA capable de transférer efficacement des CSM en 3D, dans la perspective d'une application *in vivo*.

Chapitre 2 : Elaboration d'une matrice génétiquement activée pour la réparation du cartilage

Pour rappel, l'objectif central de ce travail de thèse est d'associer, à un matériau servant de support injectable de CSM, des éléments de thérapie génique permettant de contrôler leur différenciation vers un phénotype de chondrocyte stable. Il s'agit donc d'élaborer une Matrice Génétiquement Active (MGA) prenant comme base des microsphères d'hydrogel de collagène, dont le potentiel pour guider la différenciation chondrogénique des CSM a été étudié auparavant [226].

Suite à la sélection du système lipidique DOTAP-DOPE pour vectoriser les acides nucléiques (siARN), ce deuxième chapitre a pour but de déterminer les conditions d'association des vecteurs lipoplexes avec les microsphères poreuses afin de garantir un niveau de chargement élevé, une libération prolongée et, par la suite, la répression du gène cible d'intérêt, *Runx2* et son effet sur la différenciation chondrocytaire des CSM

I Modification du vecteur et élaboration de la MGA.

La première partie de ce chapitre est constituée de l'article : « *Tunable size lipid vector for controlled local delivery of siRNA applied to tissue engineering* » soumis à *Journal of Controlled Release*. Il présente les modifications du vecteur lipidique DOTAP-DOPE entreprises dans le but de le rendre efficace sur des cultures de CSM en trois dimensions et potentiellement compatible avec une application *in vivo*.

Au cours de ce travail, nous avons testé différentes formulations de lipoplexes DOTAP-DOPE afin de former des nanoparticules de taille suffisamment petite et contrôlée pour qu'elles puissent être imprégnées dans les microsphères de collagène. Les modifications concernent le protocole de formation des vecteurs et la modification de leur composition lipidique pour en améliorer la stabilité à long terme. La formulation a été adaptée afin de former des nanoparticules lipidiques (LNP) appelées SELF (Solvent Exchange Lipoplexe Formulation) dont on peut contrôler la taille finale (Annexe 1). Une ancre lipidique a permis d'incorporer

des molécules de PEG afin de stabiliser le vecteur dans un milieu de culture cellulaire et d'inhiber la toxicité cellulaire observée avec les lipoplexes DOTAP-DOPE non modifiés.

Nous avons ensuite adapté et associé ce vecteur avec des microsphères de collagène pour former une MGA. Nous avons évalué la faisabilité du chargement de MScoll avec les lipoplexes et la possibilité de moduler leur cinétique de libération. Nous avons démontré que la taille ajustable de ces nanoparticules lipidiques permet de contrôler la cinétique de libération du vecteur à partir de la MGA.

Enfin, nous avons étudié la capacité de ce système à inhiber l'expression du gène *Runx2* par des CSM humaines. De manière intéressante, les différentes MGA testées présentent différentes cinétiques de libération, permettant d'induire plusieurs cinétiques d'inhibition du gène *Runx2*.

A l'issue de ce travail, nous avons donc pu obtenir des MGA qui permettent 1/ de contrôler de manière temporelle la libération d'un petit acide nucléique tel qu'un siRNA et 2/ de transfecter efficacement des cellules en 3D par des siRNA. Ces MGA représentent un système particulièrement prometteur pour l'IT du cartilage et adaptable à de nombreuses applications de thérapie génique.

Tunable size lipid vector for controlled local delivery of siRNA applied to tissue engineering.

Jeremy Salvador^{1,2,3}, Jade Berthelot^{1,3}, Claire Bony², Danièle Noël^{*2}, Emmanuel Belamie^{*1,3}, Marie Morille^{*1}

Affiliations

1. ICGM, Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France
2. IRMB, University of Montpellier, INSERM, Montpellier, France
3. EPHE, PSL Research University, 75014 Paris, France

* Corresponding authors

Highlights

- Effective siRNA nanocarrier with tunable size.
- Adaptable release kinetics from collagen microparticules.
- High and sustained gene down-regulation in human MSC.

ABSTRACT

Tissue engineering aims to restore or replace different types of biological tissues through the association of cells, biologic factors and biomaterials. Currently, stem cells arise as a major cell source for many therapeutic indications, and their association with and 3D scaffolds allow increasing regenerative medicine efficiency. In this context, the use of RNA interference to enhance or control stem cell differentiation into the desired phenotype appears as a promising strategy. However, achieving high transfection efficiency of cells in a 3D structure requires the use of a vector allowing for the spatiotemporally controlled release of the genetic material from 3D scaffolds. In this study, we report a new siRNA nanovector, called solvent exchange lipoplexe formulation (SELF), which has a tunable size, is stable over time in cell culture conditions and possess a high efficiency to transfect primary human mesenchymal stromal cells. We associated SELF with porous collagen 3D microspheres and demonstrated that loading efficiency and release kinetics are correlated with SELF size. This original and unique type of gene activated matrix, with adaptable release kinetics, could be of interest for long-term and/or sequential transfection profiles of stem cells in 3D culture.

Keywords

Gene therapy, Mesenchymal stromal cells, Nanocarrier, Controlled release, Gene activated matrix, Tissue engineering

1. INTRODUCTION

With the goal to design efficient tissue engineering systems, it is now well established that a fine acting performance between different actors (cells, scaffolds and biomolecules) is required to elicit a specific cell response (i.e to favour a particular phenotype) and induce tissue repair.[1]

In musculoskeletal tissue engineering, mesenchymal stromal cells (MSC) are of particular interest owing to their ability to differentiate towards various cell phenotypes such as chondrocytes, osteoblasts and adipocytes, under appropriate conditions [2]. A number of different biomaterials and growth factors association have been investigated for bone and cartilage repair with interesting results in pre-clinical models (for review, see [3-5]). However, few of them are available in the clinic, highlighting the need for more powerful strategies [6, 7].

Gene therapy can be considered as an additional strategy to tissue engineering [5, 8, 9]. Indeed, RNA interference using small interfering RNAs (siRNA) allows for the transient regulation of gene expression and recent progress in siRNA synthesis has strongly decreased nonspecific toxicity due to immunogenic reactions and off-target activity [10]. Nevertheless, the use of siRNA in therapeutics requires delivery vectors to achieve efficient cell transfection and extend siRNA life span in vivo [11-14]. Viral systems usually yield high transfection rates, but safety concerns and high cost greatly limit their therapeutic applications [15]. Non-viral vectors usually exhibit lower, yet very satisfactory transfection rates, with limited safety issues and relatively low production costs [11, 14]. Among these, cationic liposomes have rapidly become the main non-viral option for gene delivery. Owing to their positive charge, cationic lipids can complex negatively charged nucleic acids to form lipoplexes. Electrostatic complexes obtained by simple mixing from aqueous solutions do not exhibit strong colloidal stability, and are characterized by broad size distributions ranging from the submicron scale to a few microns [16, 17]. Lipoplexes such as those formed with the commercial gold standard Lipofectamine 2000® reagent tend to aggregate and sediment, which is associated with high transfection efficiency in vitro [18, 19]. However, in vivo application of these first generation lipoplexes is limited mainly due to their large size and positive charge promoting their aggregation with serum proteins (such as albumin), which can result in vascular blockage [17]. To address these issues, new generations of lipoplexes called lipid nanoparticles (LNP) have been developed by solvent exchange formulation methods based on the use of detergent or ethanol [20-22]. These

LNP are formulated with ionizable cationic lipids, modified with PEG for steric stabilization and reduced interactions with serum proteins [12, 23, 24].

Application of RNAi to tissue engineering usually requires a spatio-temporal control of gene delivery from the 3D scaffolds of implantable materials. Such biomaterials releasing genetic material are also called gene-activated matrix (MGA) and can be categorized depending on the nucleic acid retention mechanism, either physical entrapment or covalent immobilization [5, 25, 26]. In the case of nucleic acids loaded in nanometer-sized vectors such as lipoplexes, their release profile will obviously depend on their dimensions, as well as the porosity (pore size, structure, connectivity...) and physical properties of the matrix. Other phenomena such as dissolution or erosion of the scaffold will also contribute to the release kinetics [25, 26]. In the context of cartilage repair, we previously demonstrated that collagen-based microspheres releasing TGFB are effective in driving the chondrogenic differentiation of MSC. However, we also observed late hypertrophic differentiation events characterized by the secretion of hypertrophic and ossification markers [27]. Besides, we reported that transient siRNA-driven down-regulation of *Runx2*, which is a late transcription factor involved in the hypertrophic differentiation of MSC, prevented the production of hypertrophic markers in the model of cartilage micropellets [28]. Therefore, implantable microspheres acting as a reservoir for the long-term release of anti-Runx2 siRNA could be useful to control MSC differentiation in the context of cartilage regeneration and might serve as a proof-of-concept for other tissue engineering strategies.

As discussed above, controlling vector size and stability over time is critical to control its association and release from scaffolds. Currently, LNP with different sizes can be prepared, but this requires changes of the lipid composition, and/or the use of different formulation processes. One major drawback is that complexation rate, toxicity, stability and transfection efficiency are strongly dependent upon these parameters, which prevents the universal use of one given formulation. Here, we describe a new solvent-exchange process to produce lipid nanoparticles, whose sizes are controlled and tunable with a fixed lipid composition. These nanoparticles were formulated by the combination of siRNA with the cationic lipid Dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP) and the fusogenic helper lipid, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) with a high nucleic acid complexation rate. A solvent exchange method [29] was adapted to optimize oligonucleotide loading efficiency and form monodisperse and stable nanoparticles, hereafter termed SELF for "Solvent Exchange Lipoplexes Formulation". The resulting SELF were then post-modified with 1,2-distearoyl-sn-

glycero-3-phosphoethanolamine-N-amino polyethylene glycol-2000 (DSPE-PEG2000) to improve their stability in cell culture media. Cell viability and transfection efficiency were evaluated with primary human MSC, which are notoriously difficult to transfect. With the perspective of delivering siRNA loaded lipoplexes from MGA, we investigated the loading of SELF with different sizes into porous type I collagen microspheres previously studied as an injectable MSC scaffold [27] [30]. Finally, the release profiles of SELF with different sizes from collagen microspheres, and their impact on *Runx2* gene expression in 3D MSC cultures were studied over 21 days.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. DOTAP-DOPE Liposome preparation.

DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) and DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride) were obtained from Sigma, Merck. Liposomes were prepared by the thin-film hydration method [31, 32]. Briefly, DOTAP and DOPE (in a molar ratio of 1:1) were dissolved in chloroform before evaporation of the organic solvent using a rotary evaporator to produce a dry thin film. The resulting film was then hydrated with 1.5 ml nuclease-free water at 4°C, overnight. To form small unilamellar vesicles, liposome suspensions were vortexed for 1 min and then sonicated at 20 °C for 3 min. The liposome suspensions were stored at 2–8°C until use.

2.2. Lipoplexes/SELF formulation.

The anti-Runx2 siRNA (siRunx2) was purchased from Dharmacon™(Lafayette, Colorado, États-Unis). The siRNA scramble (siCT) and the Alexa 488 fluorescent probe-labelled siRNA (siAlexa488) were obtained from Eurogentec (Seraing, Belgium). Lipoplexes were formulated at various Charge Ratios (CR): 1, 2, 3 or 4. CR corresponds to the ratio of positive charges brought by the cationic lipids (quaternary amine for DOTAP) with respect to the negative charges brought by the siRNA (phosphate groups). Classical DOTAP-DOPE lipoplexes were prepared extemporaneously by mixing equal volumes of DOTAP-DOPE

liposome suspension and siRNA solution (100 μM) in PBS, followed by 20 min incubation at ambient temperature.

Alternatively, SELF were prepared following a solvent exchange method adapted from previous works [29, 33]. Briefly, liposomes (25 mM) and siRNA solutions (100 μM) were diluted with isopropanol to reach a final 50:50 (v:v) H₂O:Isopropanol mix. Equal volumes of liposome suspensions (DOTAP-DOPE) and siRNA solutions were then mixed to form the reaction mix (RM) (Fig. 1A). The RM was prepared by adding various lipid concentration (188 μM ; 313 μM ; 375 μM ; 469 μM ; 625 μM and 938 μM) with the corresponding siRNA concentration for a CR = 4. The RM was incubated at ambient temperature for 20 s, 60 s, 150 s or 300 s before being diluted ten times with nuclease-free water. The lipoplexes obtained following this solvent-exchange formulation protocol will be further named “SELF” (Fig. 1A).

2.3. DSPE-PEG2000 post-insertion.

DSPE-PEG2000 (Avanti Polar Lipids) was dissolved in water at 2.1 mM, above the critical micellar concentration, at 60 °C under stirring for 3 h to form the micelle stock solution, which was stored at -20 °C until use [34]. SELF were modified by the post-insertion method with appropriate amounts of DSPE-PEG2000 to reach 2.5, 5 or 7.5 % of the total molar lipid quantity. Briefly, the desired quantity of DSPE-PEG2000 stock solution was added to the SELF suspension, heated at 60 °C during 30 min, vortexed every 10 min and finally cooled on ice for 10 min. PEGylated SELF (hereafter termed PEG-SELF) were then stored at 4 °C before use.

2.4. Characterization of siRNA complexation efficiency.

Qualitative evaluation by electrophoresis. 15 μl of samples were loaded in a 4% (w/v) agarose gel stained with Ethidium Bromide. Electrophoresis was carried out at a constant voltage (100 V) for 15 min in Tris borate EDTA (TBE) buffer. Gels were then imaged using a UV lamp and camera. Analysis of relative band fluorescence intensities was made using ImageJ.

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). To determine the nanoparticle hydrodynamic diameter and concentration, lipoplexes and SELF were analysed with a NanoSight NS300 (Malvern Instruments, UK). Measurements were performed with a 488 nm laser, and in a

subsequent time, with a 500 nm filter to identify fluorescent particles. Non-fluorescent particles were not considered in the following tracking data analysis. Videos were analysed using the NanoSight NTA 3.2 software following a tailored script: temperature was set at 25 °C, syringe pump rate at 40 AU (arbitrary unit), and 3 videos of 60 s were recorded for each sample. Videos were recorded with a camera level set to 16 and analysed with a detection threshold of 6.

2.5. Hydrodynamic diameter, Polydispersity Index and zeta potential measurements.

Dynamic light scattering measurements (NanoZS, Malvern Instruments, UK) were performed with a He–Ne laser (wavelength: 632.8 nm), at 25 °C and a scattering angle of 173° for detection. The CONTIN method was used for data analysis. Hydrodynamic diameters (nm) were measured in water or in cell culture media, while zeta potentials (mV) were measured only in water by laser Doppler electrophoresis. Polydispersity Index (PDI), relative to the width of the population size dispersion vs. mean size, was also determined. Results represent the average of at least 10 runs per measurement and three different measurements per sample.

2.6. Collagen microsphere preparation.

Collagen microspheres (MS) were obtained using an emulsion-based microfluidic method published previously [30]. Briefly, type I collagen was extracted from rat tail tendons and dissolved in acetic acid at a concentration of 10 % (w/v). A direct emulsion was formed with droplets of acidic collagen solutions in perfluorinated oil (3M™ Novec™ 7500 Engineered Fluid), and 1 % of a triblock copolymer surfactant synthesized in the lab according to a previously published protocol [27]. Emulsion droplets were collected and placed in an ammonia atmosphere to increase the pH and induce the fibrillation of collagen. The resulting MS were then separated from the oil by successive cycles of centrifugation and washing with distilled water. After the final wash cycle, MS were suspended in H₂O + 0.01 % of polysorbate 80 and stored at 4 °C before use.

2.7. Microsphere loading and release.

Loading assays were performed in a 96 well round bottom ULA plate. After 5 min centrifugation at 300 ×g, the supernatant was removed and the MS re-suspended in H2O containing 5 % trehalose, distributed in wells (5000 MS / well), frozen at -80 °C, and freeze-dried overnight (Heto PowerDry LL 3000 Freeze Dryer, ThermoScientific, USA). For impregnation, dry MS were suspended with a small volume (25 µL) of concentrated 2.5 % PEGylated SELF of 800 nM SiAlexa488. Release assays used SELF particles with different hydrodynamic diameters ($D_h = 50 - 600$ nm) impregnated in the MS maintained at 37 °C. After 24 h, 175 µL of DMEM without phenol red (Gibco™) were added to SELF particles for 24 h. 50 µL of supernatant were collected and replaced by fresh medium. The fluorescent SiAlexa488 was quantified in the collected fractions using a Varioskan LUX microplate reader ($\lambda_{ex} = 495$ nm; $\lambda_{em} = 519$ nm). Measurements were done at day 4, 7 and 11.

2.8. Scanning Electron Microscopy

For scanning electron microscopy (SEM), MS were dried by supercritical CO₂ using a Polaron 3100 autoclave chamber (Quorum technologies). The samples were first fixed in a solution of 2.5 % glutaraldehyde and dehydrated by immersion in successive baths of water and ethanol (increasing concentrations of ethanol from 10 %, 30 %, 50 %, 70 % to 100 %) for 5 min. MS were then quickly introduced into the autoclave at 10 °C and immersed in liquid CO₂. The chamber was then heated to 40 °C and supercritical CO₂ was evacuated. The samples were finally observed using conductive carbon scotch tape and gold metallization using plasmatool-sc device before being imaged at 5 kV with a Phenom proX SEM. Mean pore size of the MS was determined from 7 different images of SEM microscopy. The pore diameter was calculated from the area measured on ImageJ and assuming the pores are circular.

2.9. Confocal Microscopy

Fluorescent SiAlexa488PEGylated SELF (2.5 %) with a D_h of 130 nm (800 nM) were loaded in 5000 MS and imaged using an inverted confocal microscope (TCS SP8 MP Leica Microsystems) in sequential frame mode. Images were processed with ImageJ.

2.10. Cell Culture

Human MSC were isolated from the bone marrow of subjects who gave written consent. Approval was obtained from the French Ministry of Higher Education and Research (DC-2009-1052). MSC were characterized by phenotyping and tri-lineage differentiation potential as described [35]. They were cultured in proliferative medium [α MEM, 2 mmol/ml glutamine, 100 μ g/ml penicillin/streptomycin, 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) and 1 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF)] (R&D Systems, Lille).

2.11. Cell viability assay.

MSC were seeded at 3,000 cells/well (96 well plate) and grown for 24 h to reach 70 % confluency. Cells were transfected in OptiMEM medium with DOTAP-DOPE, SELF and SELF post-inserted with 2.5 %, 5 % or 7.5 % DSPE-PEG2000 at CR4 and with Lipofectamine 2000® to obtain different concentrations of siAlexa488 (0 nM, 12.5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM). After 48 h, cell viability was evaluated using CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, USA) following manufacturer's instructions.

2.12. Cell transfection.

For two-dimensional (2D) cell transfection, MSC were seeded at 70,000 cells/well in Eagle's minimal essential medium (MEM) containing 10% FBS in 6-well plates for 24 h. SELF or PEGylated SELF (RM=37.5 μ M / Incubation=20 s / CR=4) were prepared 24 h before use and concentrated at 400nM with a SpeedVac® vacuum concentrator before storage at 4 °C. Lipofectamine 2000® was used following manufacturer's recommendations with the ratio of 5 μ L Lipofectamine 2000® for 100 pmol of siRunx2 or siCT and formulated at the same final concentration as SELF. Cells were transfected in OptiMEM at the final concentration of 50 nM (siRNA) for 12 h. OPTIMEM supplemented with FBS was then added to obtain a final concentration of 10 % FBS in each well for the remaining 12 h.

For three-dimensional (3D) cell transfection, 5,000 collagen MS were freeze-dried in 15 ml conical centrifuge tubes (Falcon™). MS were suspended in 25 μ L of 2.5 % PEGylated SELF

(800 nM siRNA) of different Dh: 100-150 nm or 500-550 nm for 24h. 250,000 MSC were suspended in 500 μ L of media and then added in each tube and mixed by vortexing. 3D cell cultures were incubated in high glucose DMEM supplemented with 0.1 μ M dexamethasone, 1 mM sodium pyruvate, 170 μ M ascorbic-2-phosphate acid, 1 % ITS (insulin/transferrin/selenic acid) and 0.35 mM proline for 2, 7, 14 or 21 days.

2.13. RNA extraction and RT-qPCR.

Total RNA was isolated from MSC using the RNeasy kit according to the supplier's protocol (Qiagen, Courtaboeuf). Total RNA (0.25 or 0.5 μ g) was reverse transcribed using 100 U of M-MLV reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific), and PCR reactions (using SYBR Green Technologies) were performed as described [36]. Primers of RPS9 (GATTACATCCTGGGCCTGAA/ATGAAGGACGGGATGTTTAC) and *Runx2* (CGGAATGCCTCTGCTGTTAT/TTCCCGAGGTCCATCTACTG) were used. PCR values were normalized to the RPS9 housekeeping gene and expressed as relative expression or fold change using the respective formulae: $2^{-\Delta CT}$ and $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Data are shown as the mean of three different in vitro experiments.

3. RESULTS

3.1. SiRNA complexation with cationic lipids

The complexation efficiency of siRNA (siAlexa488) was first assessed by electrophoresis for classically formulated lipoplexes and for SELF nanoparticles. Different CR values (0, 1, 2, 3 and 4) were tested with a fixed amount of siRNA. Due to their negative charge, free siRNA migrated toward the cathode as assessed by the presence of a clearly visible fluorescent band (Fig. 1B). With the classically formulated lipoplexes, the band intensity corresponding to free siRNA was lower at CR = 1 compared to the condition with siRNA only, but still observed. At higher CR values, fluorescence was detected only at the top of the gel. This suggests that most siRNA molecules were complexed with the cationic lipids to form

lipoplexes with a global positive charge and a size much larger than free nucleic acid. Interestingly, using the SELF formulation, a total complexation of siRNAs was already observed at CR = 1. Furthermore, NTA analysis confirmed the presence of nanometer-sized fluorescent particles for all evaluated CR (Fig. 1C). We also observed that the concomitant increase in particle concentration with increasing CR was associated with a decrease in their hydrodynamic diameter. Because the smaller size of the nanoparticles obtained with CR = 4 (118.45 ± 6.58 nm) was in the appropriate range of the mean pore size of collagen MS (176.54 ± 152.60 nm), this CR was selected for the rest of the study.

3.2. Formulation parameters inducing size variation of SELF.

We also investigated the impact of reaction mix (RM) concentration and incubation time on the size distribution of SELF. Increasing the concentration from $18.8 \mu\text{M}$ to $93.8 \mu\text{M}$ increased the size from 77 ± 1.2 nm to 277 ± 17.1 nm (Fig. 1D). Furthermore, using a fixed RM concentration of $62.5 \mu\text{M}$, the increase of incubation time before dilution also resulted in larger lipoplexe size (Fig. 1E). Indeed, the Dh increased from 269 ± 13.5 nm to 578 ± 14.6 nm after 20 s and 300 s incubation time, respectively. For all tested formulations, the lipoplexes exhibited a narrow size distribution, with a very low PDI ranging from 0.04 to 0.15.

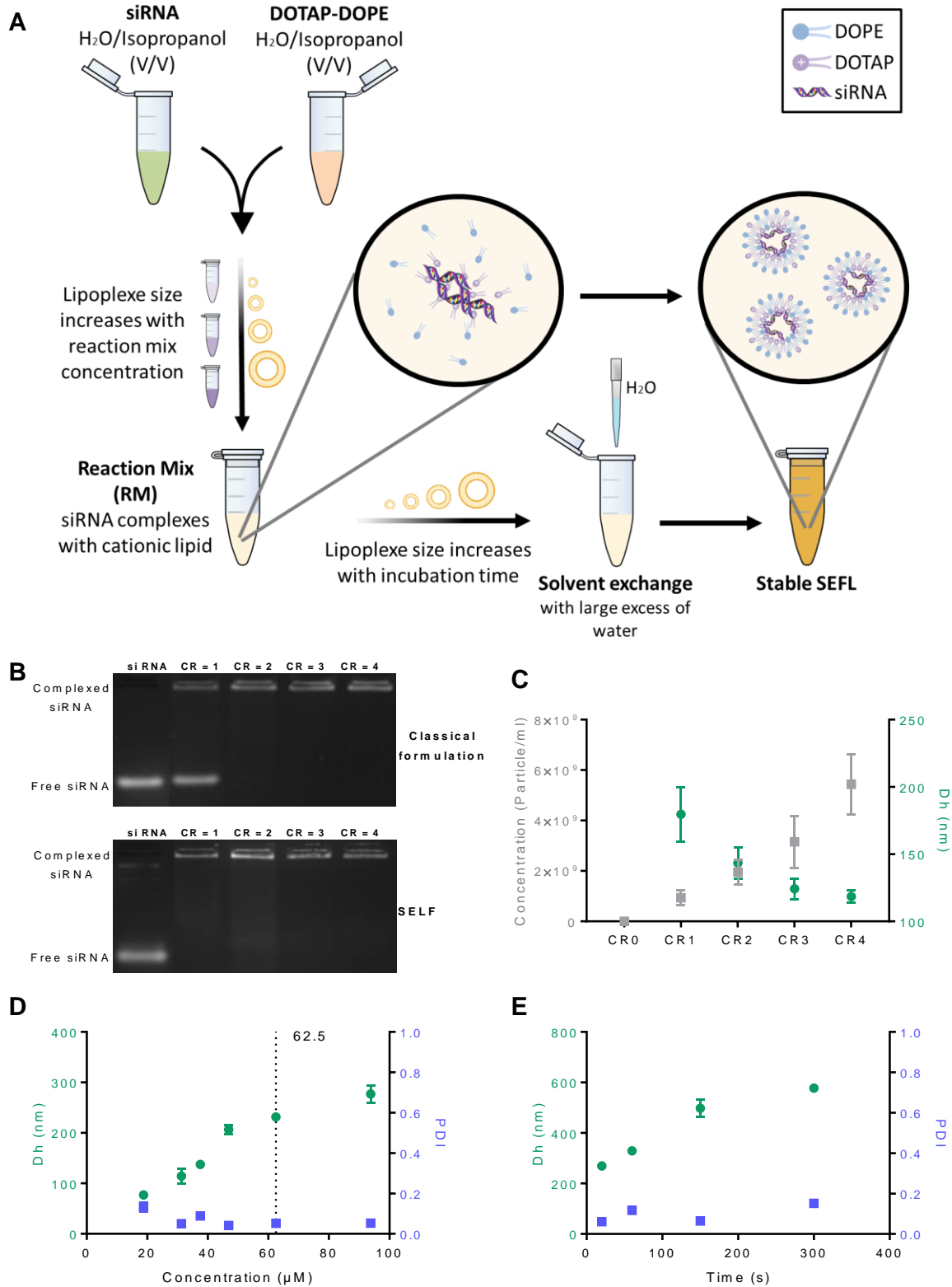


Figure 1: SELF formulation and size control

(A) Schematic representation of Solvent Exchange Lipoplexe Formulation (SELF) protocol. (B) Agarose gel electrophoresis of classical formulations of DOTAP-DOPE lipoplexes and SELF (reaction

mix (RM): 37.5 μM ; incubation time: 20s) at charge ratio (CR) of 1, 2, 3 and 4. (C) Hydrodynamic diameter (D_h) and concentration of fluorescent SELF particles (RM: 37.5 μM ; incubation time: 20s) at different CR determined by NTA ($n = 2$). (D) Hydrodynamic diameter (D_h) and Polydispersity Index (PDI) of SELF with different lipid concentrations. (E) Hydrodynamic diameter (D_h) and Polydispersity Index (PDI) of SELF with different incubation time of RM at 62.5 μM ($n=3$).

3.3. Impact of DSPE-PEG2000 post-insertion on SELF formulation and stability over time.

We then considered the post-insertion of DSPE-PEG2000 into the lipoplexes to improve their stability, especially in cell culture media. The effects of this modification were monitored by assessing the changes in lipoplexe size and zeta potential, which could both be affected by the insertion of the bulky polymer-modified and negatively charged lipid. (Fig. 2A). The zeta potential of nanoparticles decreased from 59.9 ± 1.03 mV in the absence of DSPE-PEG2000 to 45.4 ± 0.9 mV with 7.5 % of DSPE-PEG2000 (Fig. 2B). The size was only slightly impacted by DSPE-PEG2000 post-insertion, with a decrease of 13.1 nm (ca. 10 %) for the condition with the highest DSPE-PEG2000 concentration (Fig. 2C). This is in contrast with the significant size increase observed on formulation upon addition of DSPE-PEG2000 from 2.5 % to 7.5 % directly in the initial lipid mix. (Supplementary data 1).

The stability of different lipoplexe formulations related to size and PDI was monitored during 21 days of incubation in water at 4 °C or in αMEM at 37 °C. We did not observe any significant variation of size or PDI for SELF nanoparticles stored in water (Fig. 2D). By contrast, the size and PDI of non-PEGylated SELF, classic DOTAP-DOPE and Lipofectamine 2000® lipoplexes increased significantly in cell culture medium, after 1 day of incubation at 37 °C (Fig. 2E). This can be related to the aggregation and possible reorganization of the siRNA-lipid complexes over time, with much faster kinetics for Lipofectamine 2000® compared to the other DOTAP-DOPE lipoplexes. Unlike Lipofectamine 2000®, the apparent diameter of DOTAP-DOPE complexes rapidly stabilized, although it reached a plateau value above 1 μm . Most importantly, PEGylated SELF (2.5 %, 5 % and 7.5 %) were remarkably stable over at least 21 days.

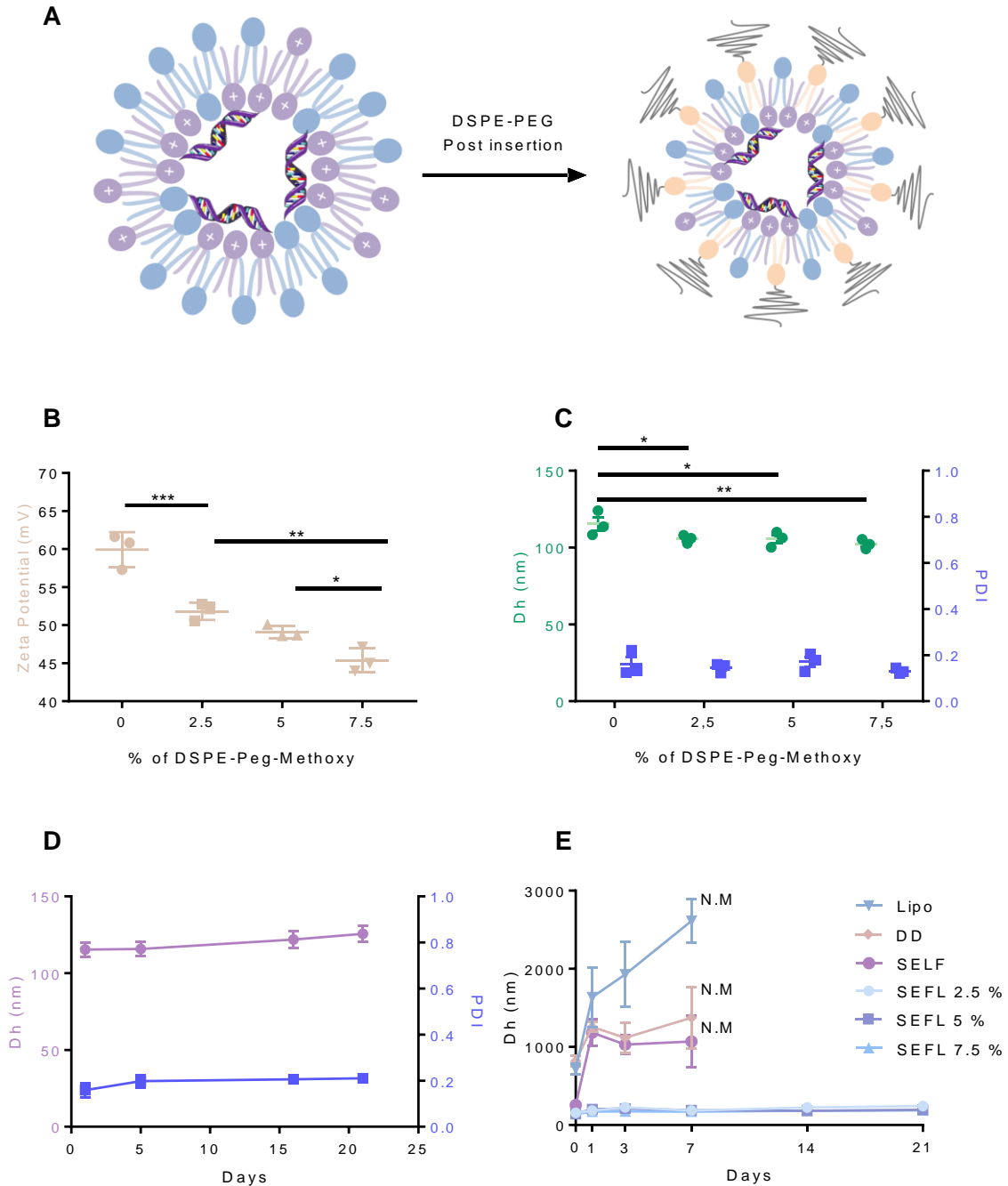


Figure 2: SELF PEGylation and stability over the time.

(A) Schematic drawing of SELF PEGylation by post-insertion. (B) Zeta Potential (mV) of SELF post-inserted with different percentages of DSPE-PEG2000 (n = 3) (C) Hydrodynamic diameter (Dh) and Poly Dispersity Index (PDI) of SELF post-inserted with different percentages of DSPE-PEG2000 (n = 3). (D) Monitoring of Dh and PDI of SELF formulated with a scramble siRNA (200 nM) stored in water at 4 °C for 21 days and evaluated by dynamic light scattering (n = 3). (E) Monitoring of Dh of SELF,

PEGylated SELF (2.5 %, 5 % and 7.5 %), Lipofectamine 2000® (Lipo) or DOTAP-DOPE (DD) lipoplexes formulated with scramble siRNA, incubated in α MEM at 37 °C for 21 days and evaluated by dynamic light scattering (n = 3). (NM = No Measurable).

3.4. Viability and transfection efficiency.

The impact of the different formulations (lipofectamine, classical DOTAP/DOPE lipoplexes and SELF) was then assessed on MSC viability. For DOTAP/DOPE lipoplexes and SELF, the siRNA-lipid complexes were formulated at the same CR = 4. Lipofectamine lipoplexes were formulated with the ratio of 5 μ L Lipofectamine 2000® (1mg/ml) for 100 pmol of siRNA. DOTAP-DOPE lipoplexes decreased the cell viability by 17 % and 50 % at 12.5 nM and 200 nM siRNA concentrations, respectively, compared to non-transfected or lipofectamine transfected MSC (Fig. 3A). By contrast, SELF lipoplexes did not induce toxicity up to 50 nM siRNA, which is a typical concentration used for transfection. However, from 100 nM to 200 nM siRNA, cell viability was decreased by 17 % and 36 %, respectively. Interestingly, in presence of SELF post-inserted with 2.5 %, 5 % and 7.5 % of DSPE-PEG2000, cell viability was not affected over the whole range of concentrations tested (Fig. 3B).

Transfection efficiency was then assessed using a siRNA specific for *Runx2* at the concentration of 50 nM, following the above toxicity data. Transfection of MSC with the commercial control Lipofectamine, DOTAP-DOPE and SELF led to 89.7 %, 95.1 % and 91.5 % of *Runx2* inhibition, respectively, compared to control (MSC transfected with siCT) (Fig. 3C). No significant difference was observed between these formulations. Post-insertion of 2.5 % DSPE-PEG2000 did not significantly affect *Runx2* inhibition (Fig. 3D). However, increasing DSPE-PEG2000 content to 5 % and 7.5 % in SELF lipoplexes tended to affect gene repression, with 73.2 % and 58.4 % of *Runx2* inhibition compared to control.

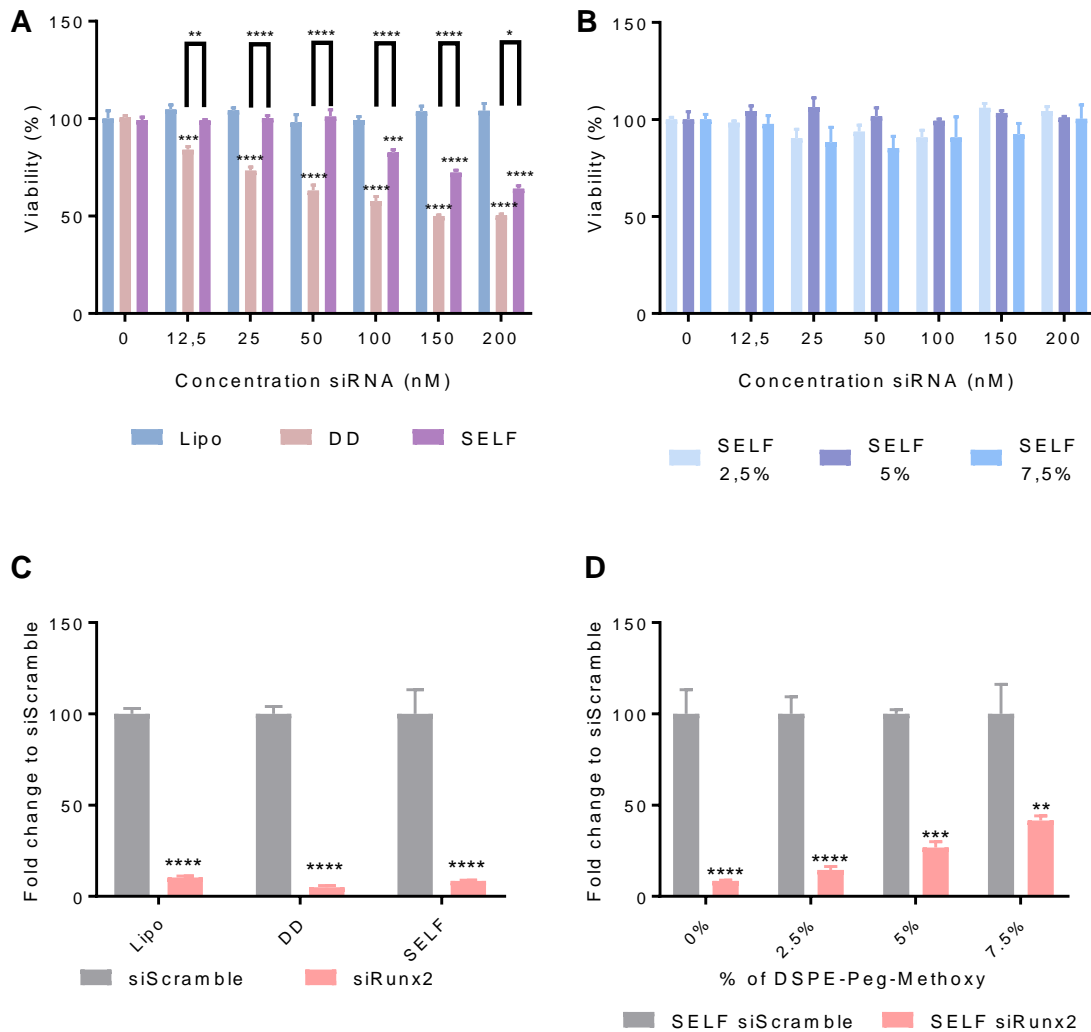


Figure 3: SELF toxicity and transfection efficiency

(A) Viability of mesenchymal stromal cells (MSC) after 24 h of incubation in cell culture conditions with SELF, Lipofectamine 2000® (Lipo) or DOTAP-DOPE (DD) lipoplexes formulated at CR=4 with different concentrations of scramble siRNA (siCtrl). Results are expressed as percentage of viability compared to untransfected cells (n = 3). (B) Viability of MSC after 24 h of incubation at 37°C with SELF formulated with different concentrations of siCtrl and post-inserted with 0, 2.5, 5 and 7.5 % of DSPE-PEG (n = 3). (C) *Runx2* silencing in MSC transfected with different lipoplexes formulated with siCtrl or anti- *Runx2* siRNA (si Runx2). *Runx2* expression is normalized to MSC transfected by siCtrl with the respective lipoplexes. (D) *Runx2* silencing in MSC transfected with SELF post-inserted with different percentages of DSPE-PEG2000 formulated with siCtrl or siRunx2. *Runx2* expression is normalized to siCtrl-transfected MSC by with the respective lipoplexes (n = 3).

3.5. Microsphere loading and release kinetics.

We then investigated the possibility to use porous collagen microspheres as reservoirs for siRNA-containing SELF lipoplexes (Fig. 4A). The porosity of the microspheres being on the order of 100-200 nm we first assessed the loading efficiency and the release profile of SELF as a function of their size. Particles with a Dh in the 50-250 nm range showed the highest loading efficiency with approx. 80 % of SELF particles loaded into the MS (Fig. 4B). For larger SELF particles, in the 400-450 nm and 500-600 nm ranges, the loading efficiency decreased to 69 % and 61 %, respectively. We then evaluated the release kinetics of lipoplexes from microspheres in DMEM culture medium. For SELF particles with a Dh in the 50-150 and 150-250 nm ranges, a rapid release was observed within the first 4 days (up to 68 % of the quantity initially loaded), followed by a slower release rate to reach a plateau value around 90 % at day 11 (Fig. 4D). The larger SELF particles (Dh 400–450 nm and 500–600 nm) exhibited a similar but slower release profile, with 46 % and 36 % of total release at the onset of the plateau phase at day 4. At day 11, 64% of SELF particles in the 500-600 nm range were retained in the MS while it amounted to only 12 % for SELF particles in the 50-150 nm range.

3.6. *Runx2* inhibition profile over time on 3D cell culture.

Finally, we tested the transfection efficiency of MSC by the siRNA contained in SELF lipoplexes loaded in collagen MS, which also serve as cell supporting scaffolds. We used a siRunx2 loaded in small (Dh~100–150 nm) or large (Dh~500–550 nm) PEGylated SELF lipoplexes. The siRunx2 contained in PEG-SELF lipoplexes was shown to greatly reduce the expression of *Runx2* by MSC at day 2, to reach approximately 80 % of control siScramble, whatever the size of PEG-SELF particles (Fig. 4E). The inhibition of *Runx2* tended to decrease for the smaller PEG-SELF (100-150 nm) at days 14 and 21. By contrast, the inhibition rate was still very high (73 %) after 14 days with the larger PEG-SELF (500-550 nm), and started decreasing only at day 21 (Fig. 4E).

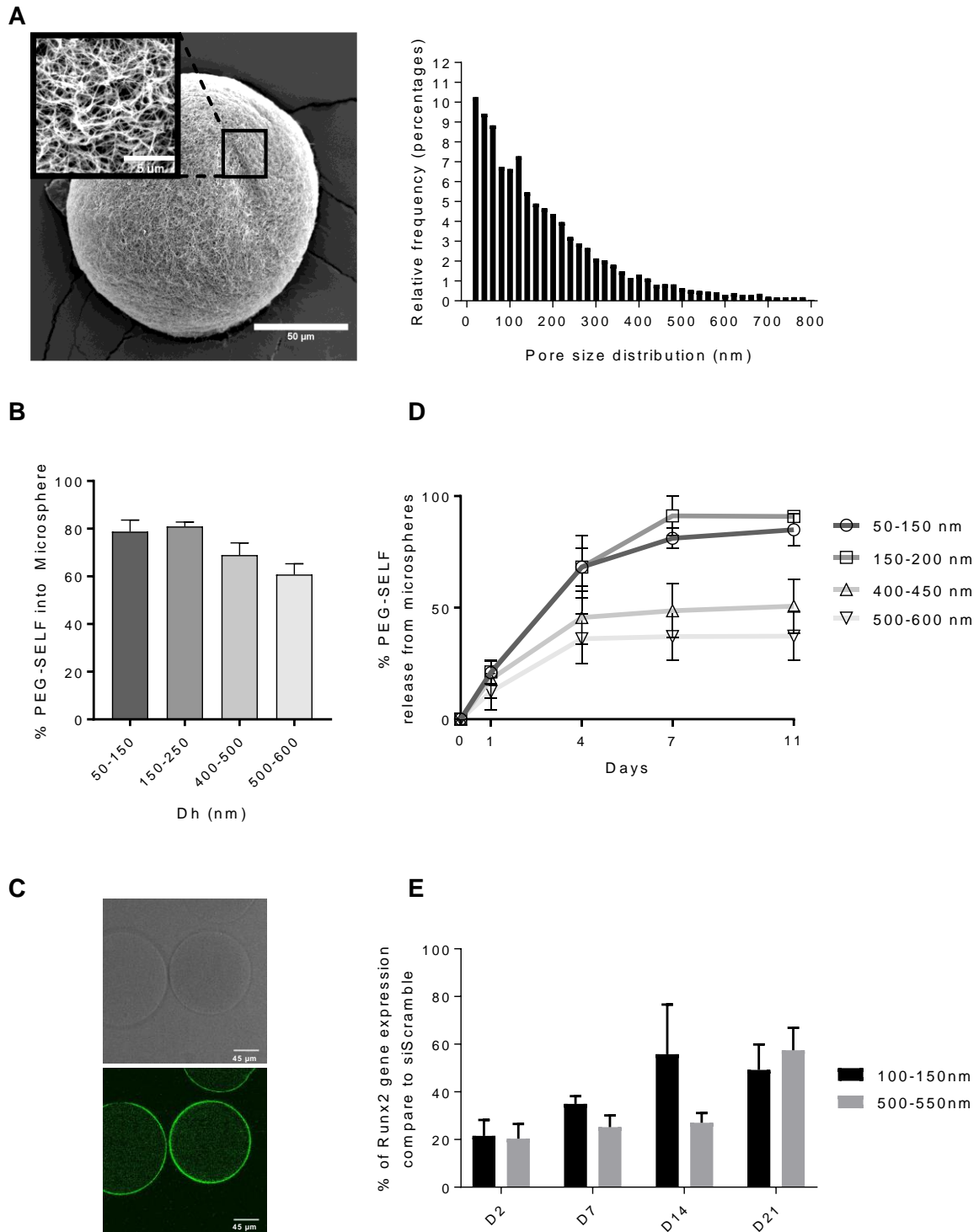


Figure 4: SELF association with collagen microspheres.

(A) Scanning electron microscopy micrographs of a representative collagen microsphere dried by supercritical CO₂ drying (left panel). Pore size distribution in collagen microspheres evaluated by imageJ analysis (right panel). (B) Loading rate of microspheres with siA488 in PEGylated SELF (2.5

%), as a function of hydrodynamic diameter (Dh). (C) Confocal imaging of microspheres loaded with PEGylated SELF (2.5 %) of 130 nm and formulated with fluorescent siA488 siRNA. Images represent a unique focal plan on the center of the microsphere observed by light (upper panel) and fluorescence (lower panel). (D) Release kinetics of siA488-containing PEGylated SELF (2.5 %) with different Dh from microspheres. Values are expressed as the percentage of total amount of SELF initially impregnated for each diameter range. (E) *Runx2* silencing in mesenchymal stromal cells cultured on the surface of microspheres loaded with 2.5 % PEGylated SELF formulated with siCtrl or si *Runx2* and different Dh. *Runx2* expression is normalized to siCtrl-transfected MSC.

4. DISCUSSION

The wide field of action of siRNAs allows them to intervene at different times during a regenerative medicine process. In this idea, the concept of genetically activated matrix aims to avoid the constant injection of biomolecules and allow for their optimal distribution. This work presents a new method for the formulation of siRNA-containing lipoplexes with controlled and tunable size, and with high transfection efficiency. The broader applicability of these nanocarriers relies on the possibility to incorporate them into cell-supporting injectable scaffolds from which they can be progressively released to regulate gene expression.

Solvent-exchange lipoplex formation and stability.

In the present study, we showed that the solvent exchange method is of high interest to allow the formation of small complexes, primarily driven by electrostatic interactions between the negatively charged nucleic acids and the positively charge head of cationic lipids [21, 29, 37, 38]. It is likely that the lower polarity of the water / isopropanol dampers Coulomb and van der Waals attractive interactions, hence slowing down large scale aggregation. The rapid addition of large amounts of water promotes the formation of a second, external lipid layer because of the switch to a mostly aqueous environment fostering hydrophobic interactions between lipid tails. This rapid change in solvent composition quenches the complexes with a size dependent on the incubation time, the charge ratio and the lipid concentration. However,

rapid solvent switch is not sufficient to stabilize non-PEGylated lipoplexes (SELF and classical), whose size continues to evolve over time in cell culture media, probably due to nanovector aggregation. To overcome this limitation, DPSE-PEG2000 was associated to SELF. We first added DPSE-PEG2000 in the initial lipid mix. This led to an increasing SELF size with the addition of increasing quantity of DSPE-PEG2000 (+ 18.73 nm for the condition with 7.5 % DPSE-PEG2000), which can be explained by DSPE-PEG insertion in the inner layer of the lipoplexes (Supplementary data 1). In contrast, when DPSE-PEG2000 was added by post-insertion on already formed SELF, to favour its insertion in the outer layer of the lipoplexes, we observed a decrease in the size of PEG-SELF with increasing DSPE-PEG proportion, which can be attributed to a curvature of the lipid bilayer as already described with DSPC/DSPE liposomes [39]. Decreasing size is consistent with the packing parameter (PP), which determines the aggregation form of lipids: [40]. Based on geometrical considerations, simple DSPE molecules have a $PP > 1$ and are expected to form reverse micelles of inverted hexagonal phase. Interestingly, DSPE-PEG molecules form spherical micelles, suggesting a $PP < 1/3$ for DSPE-PEG due to the long PEG chain [41, 42]. This additional curvature provided by DPSE-PEG molecules located in the external lipid layer could thus partly account for the smaller size of PEG-SELF. Post-insertion of DPSE-PEG2000 also proved very effective in preventing the formation of larger complex aggregates, which can be attributed to steric hindrance provided by the solvated PEG chains forming a corona around SELF. The PEG-SELF exhibited a constant size for at least three weeks, in sharp contrast with the other formulations devoid of PEG and in line with previous observations for stealth formulations [29, 43, 44]. Interestingly, insertion of DPSE-PEG2000 induced a significant decrease in zeta potential. This can be attributed to the screening of positive charges because the slipping plane is shifted further away from the charged lipoplex surface, and possibly to a decrease in electrophoretic mobility owing to the presence of solvated PEG chains [45-47].

This new method of solvent exchange formulation offers a quick and easy way to formulate lipoplexes that are efficient, stable and with a desired size. It should be possible further simplify this method by directly dissolving the lipids in isopropanol without the initial formation of a lipid film from solution in an organic solvent.

Transfection efficiency and toxicity.

It should be noted that SELF exhibited significantly less toxicity than classical ones, although cell viability remains higher for Lipofectamine over the concentration range investigated. Such low cell toxicity is likely due to the complexation of nucleic acids in the mixed solvent, allowing the cationic heads of DOTAP to be located preferentially in the inner layer, hence a lower surface charge density in the outer layer facing the cell membrane [33]. Most importantly, the insertion of DPSE-PEG2000 had a remarkable effect in the reduction of toxicity with almost 100 % MSC viability over the whole siRNA concentration range, whatever the DSPE-PEG2000 content investigated (2.5 %, 5%, and 7.5 %). Again, this result is fully in line with previous reports on PEG coronas preventing cell toxicity [24, 43, 46, 48].

The high transfection rate of siRunx2 complexed in SELF or PEG-SELF, as evaluated by the down-regulation of *Runx2* expression in MSC, was very similar to those obtained with classical formulations such as DOTAP-DOPE lipoplexes and Lipofectamine®. Nevertheless, insertion of DPSE-PEG2000 decreased the transfection efficiency with a dose dependent effect (Fig. 3C). This observation is in agreement with the observation that PEG corona at the surface can sterically hinder the interactions between LNP and cell membrane [44, 48, 49]. Furthermore transfection efficiency is also correlated with the lipoplexe charge and the effect of DSPE-PEG2000 on SELF zeta potential could also explain the dose-dependent decrease of transfection efficiency [43, 50]. Interestingly, post-insertion of 2.5 % of DSPE-PEG on SELF was sufficient to stabilize the lipoplexes in cell culture conditions and reach similar transfection efficiency as Lipofectamine® on human MSC, known to be difficult to transfect [51]. This is consistent with another study showing that transfection efficiency of DOTAP-DOPE lipoplexes is mainly influenced by the cell type or the interactions between components of liposomes and cell membranes, but not by the size [52, 53].

Gene-activated matrix with lipoplexes.

High loading efficiency of PEG-SELF into porous MS can be partly attributed to the freeze-drying of MS, which promotes the diffusion of lipoplexes by capillarity. To prevent protein denaturation and pore collapse observed during freeze-drying, we added trehalose as a cryoprotectant. This resulted in the good preservation of the microspheres structure and a

smooth surface (Supplementary data 2), trehalose possibly filling up the MS porosity. The sugar was described to exert its protective effect by inhibiting crystallization through the vitrification of the trehalose-water solution during freezing [54, 55].

SELF size influences the loading efficiency, with a higher loading rate for SELF under 250 nm. This is in good agreement with the pore size distribution for collagen MS, showing a small proportion of pores beyond 300 nm. Steric hindrance therefore seems to be the main obstacle hampering the diffusion of larger lipoplexes into the MS. More generally, the rather high loading efficiencies observed could be also attributed to SELF adsorption onto collagen, stabilized by both hydrophobic and charge-charge interactions. [56]. Since SELF exhibit a rather high positive zeta potential owing to the DOTAP positive charge at physiological pH, attractive electrostatic interactions can arise with negatively charged residues of the collagen protein. This hypothesis of attractive interactions is supported by the higher fluorescence intensity at the edges of the MS in the initial phases of lipoplexes impregnation into microspheres suspended in PBS (Supplementary data 3).

Two distinct diffusion release profiles were observed related to the size of SELF: smaller lipoplexes (50 nm - 200 nm) were released faster than larger ones (400 nm - 600 nm), which is in agreement with the role of steric interaction on lipoplexe diffusion. Accordingly, inhibition of *Runx2* expression was progressively lost when SELF with a size of 100-150 nm were used, while it remained high for at least 14 days with SELF of 500-550 nm. These results suggest that part of the larger lipoplexes remained trapped in the MS, which allowed delayed transfection due to microspheres biodegradation. The major advantage of our approach is the possibility to use such construct to allow the transfection of cells in 3D cultures by diffusion of the vector inside the construct.

5. CONCLUSIONS

Taken together these results describe a new collagen-based MGA allowing the tunable spatiotemporal release of a siRNA containing cationic lipid vector for efficient transfection of MSC localized at their surface. It could be of interest to transfect cells that produce high amounts of extracellular matrix such as chondrocytes [57]. An association of SELF with different size could also be considered to fine tune the release profile. Furthermore, the tunability of the lipoplexe size and of the formulation method support the interest of this

approach using various types of biomaterials, scaffold structure or genetic material, like DNA or microRNA, for broad applications.

Acknowledgements

This work was supported by the Inserm Institute, the Charles Gerhardt Institute, the University of Montpellier and the RegenHab FHU. We acknowledge the Cartigen platform for equipment and technical support.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- [1] C. Vinatier, D. Mrugala, C. Jorgensen, J. Guicheux, D. Noel, Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors, *Trends in Biotechnology*, 27 (2009) 307-314.
- [2] A.J. Rosenbaum, D.A. Grande, J.S. Dines, The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment, *Organogenesis*, 4 (2008) 23-27.
- [3] M.A. Szychlinska, U. D'Amora, S. Ravalli, L. Ambrosio, M. Di Rosa, G. Musumeci, Functional Biomolecule Delivery Systems and Bioengineering in Cartilage Regeneration, *Current pharmaceutical biotechnology*, 20 (2019) 32-46.
- [4] L. Chen, J. Liu, M. Guan, T. Zhou, X. Duan, Z. Xiang, Growth Factor and Its Polymer Scaffold-Based Delivery System for Cartilage Tissue Engineering, *Int J Nanomedicine*, 15 (2020) 6097-6111.
- [5] S. Raisin, E. Belamie, M. Morille, Non-viral gene activated matrices for mesenchymal stem cells based tissue engineering of bone and cartilage, *Biomaterials*, 104 (2016) 223-237.
- [6] B.S. Dhinsa, A.B. Adesida, Current clinical therapies for cartilage repair, their limitation and the role of stem cells, *Curr Stem Cell Res Ther*, 7 (2012) 143-148.

[7] S.L. Francis, C. Di Bella, G.G. Wallace, P.F.M. Choong, Cartilage Tissue Engineering Using Stem Cells and Bioprinting Technology—Barriers to Clinical Translation, *Frontiers in Surgery*, 5 (2018).

[8] M. Cucchiarini, H. Madry, Advances in gene therapy for cartilage repair, *Annals of Joint*, 3 (2018).

[9] I. Uzieliene, U. Kalvaityte, E. Bernotiene, A. Mobasher, Non-viral Gene Therapy for Osteoarthritis, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8 (2021).

[10] B. Hu, L. Zhong, Y. Weng, L. Peng, Y. Huang, Y. Zhao, X.-J. Liang, Therapeutic siRNA: state of the art, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5 (2020) 101.

[11] H. Yin, R.L. Kanasty, A.A. Eltoukhy, A.J. Vegas, J.R. Dorkin, D.G. Anderson, Non-viral vectors for gene-based therapy, *Nature Reviews Genetics*, 15 (2014) 541-555.

[12] J.A. Kulkarni, P.R. Cullis, R. van der Meel, Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility, *Nucleic Acid Therapeutics*, 28 (2018) 146-157.

[13] S. Rietwyk, D. Peer, Next-Generation Lipids in RNA Interference Therapeutics, *Acs Nano*, 11 (2017) 7572-7586.

[14] T.C. Roberts, R. Langer, M.J.A. Wood, Advances in oligonucleotide drug delivery, *Nature Reviews Drug Discovery*, 19 (2020) 673-694.

[15] C.E. Thomas, A. Ehrhardt, M.A. Kay, Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy, *Nature Reviews Genetics*, 4 (2003) 346-358.

[16] K.A. Jinturkar, A. Misra, 2 - Challenges and Opportunities in Gene Delivery, in: A. Misra (Ed.) *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics*, Elsevier, London, 2011, pp. 45-82.

[17] X.-X. Zhang, T.J. McIntosh, M.W. Grinstaff, Functional lipids and lipoplexes for improved gene delivery, *Biochimie*, 94 (2012) 42-58.

[18] J. Wu, M.E. Lizarzaburu, M.J. Kurth, L. Liu, H. Wege, M.A. Zern, M.H. Nantz, Cationic Lipid Polymerization as a Novel Approach for Constructing New DNA Delivery Agents, *Bioconjugate Chemistry*, 12 (2001) 251-257.

[19] J. Turek, C. Dubertret, G. Jaslin, K. Antonakis, D. Scherman, B. Pitard, Formulations which increase the size of lipoplexes prevent serum-associated inhibition of transfection, *The journal of gene medicine*, 2 (2000) 32-40.

[20] M.J. Campbell, Lipofection reagents prepared by a simple ethanol injection technique, *BioTechniques*, 18 (1995) 1027-1032.

[21] S.C. Semple, S.K. Klimuk, T.O. Harasym, N. Dos Santos, S.M. Ansell, K.F. Wong, N. Maurer, H. Stark, P.R. Cullis, M.J. Hope, P. Scherrer, Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures, *Biochim Biophys Acta*, 1510 (2001) 152-166.

[22] J.W. Meisel, G.W. Gokel, A Simplified Direct Lipid Mixing Lipoplex Preparation: Comparison of Liposomal-, Dimethylsulfoxide-, and Ethanol-Based Methods, *Scientific Reports*, 6 (2016) 27662.

[23] A. Akinc, M.A. Maier, M. Manoharan, K. Fitzgerald, M. Jayaraman, S. Barros, S. Ansell, X.Y. Du, M.J. Hope, T.D. Madden, B.L. Mui, S.C. Semple, Y.K. Tam, M. Ciufolini, D. Witzigmann, J.A. Kulkarni, R. van der Meel, P.R. Cullis, The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs, *Nature Nanotechnology*, 14 (2019) 1084-1087.

[24] S. Zhang, D. Zhi, L. Huang, Lipid-based vectors for siRNA delivery, *Journal of drug targeting*, 20 (2012) 724-735.

[25] R.M. Gower, L.D. Shea, Biomaterial Scaffolds for Controlled, Localized Gene Delivery of Regenerative Factors, *Advances in Wound Care*, 2 (2012) 100-106.

[26] F.J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today*, 14 (2011) 88-95.

[27] M. Mathieu, S. Vigier, M.-N. Labour, C. Jørgensen, E. Belamie, D. Noël, Induction of mesenchymal stem cell differentiation and cartilage formation by cross-linker-free collagen microspheres, *European cells & materials*, 28 (2014) 82-97.

[28] J.O. Gordeladze, D. Noël, C. Bony, F. Apparailly, P. Louis-Pence, C. Jorgensen, Transient down-regulation of cbfa1/Runx2 by RNA interference in murine C3H10T1/2

mesenchymal stromal cells delays in vitro and in vivo osteogenesis, but does not overtly affect chondrogenesis, *Experimental Cell Research*, 314 (2008) 1495-1506.

[29] S. Rudolf, J.O. Rädler, Self-Assembly of Stable Monomolecular Nucleic Acid Lipid Particles with a Size of 30 nm, *Journal of the American Chemical Society*, 134 (2012) 11652-11658.

[30] D. Azria, R. Guermache, S. Raisin, S. Blanquer, F. Gobeaux, M. Morille, E. Belamie, Elaboration of Materials with Functionality Gradients by Assembly of Chitosan-Collagen Microspheres Produced by Microfluidics, *Journal of Renewable Materials*, 6 (2018) 314--324.

[31] A.D. Bangham, LIPID BILAYERS AND BIOMEMBRANES, *Annual Review of Biochemistry*, 41 (1972) 753-+.

[32] S.M. Johnson, A.D. Bangham, M.W. Hill, E.D. Korn, SINGLE BILAYER LIPOSOMES, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 233 (1971) 820-&.

[33] C. Li, T. Li, L. Huang, M. Yang, G. Zhu, Self-assembled Lipid Nanoparticles for Ratiometric Codelivery of Cisplatin and siRNA Targeting XPF to Combat Drug Resistance in Lung Cancer, *Chemistry – An Asian Journal*, 14 (2019) 1570-1576.

[34] B. Ashok, L. Arleth, R.P. Hjelm, I. Rubinstein, H. Önyüksel, In vitro characterization of PEGylated phospholipid micelles for improved drug solubilization: Effects of PEG chain length and PC incorporation, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93 (2004) 2476-2487.

[35] A.T.J. Maria, K. Toupet, M. Maumus, P. Rozier, M.-C. Vozenin, A. Le Quellec, C. Jorgensen, D. Noël, P. Guilpain, Fibrosis Development in HOCl-Induced Systemic Sclerosis: A Multistage Process Hampered by Mesenchymal Stem Cells, *Frontiers in Immunology*, 9 (2018).

[36] S. Domergue, C. Bony, M. Maumus, K. Toupet, E. Frouin, V. Rigau, M.C. Vozenin, G. Magalon, C. Jorgensen, D. Noël, Comparison between Stromal Vascular Fraction and Adipose Mesenchymal Stem Cells in Remodeling Hypertrophic Scars, *PloS one*, 11 (2016) e0156161.

[37] L.B. Jeffs, L.R. Palmer, E.G. Ambegia, C. Giesbrecht, S. Ewanick, I. MacLachlan, A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA, *Pharm Res*, 22 (2005) 362-372.

[38] S.C. Semple, S.K. Klimuk, T.O. Harasym, N. Dos Santos, S.M. Ansell, K.F. Wong, N. Maurer, H. Stark, P.R. Cullis, M.J. Hope, P. Scherrer, Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1510 (2001) 152-166.

[39] M. Johnsson, K. Edwards, Liposomes, disks, and spherical micelles: Aggregate structure in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly(ethylene glycol)-phospholipids, *Biophysical Journal*, 85 (2003) 3839-3847.

[40] J.N. Israelachvili, *Force-Measuring Techniques*, 2011.

[41] O. Garbuzenko, Y. Barenholz, A. Prievo, Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer, *Chemistry and Physics of Lipids*, 135 (2005) 117-129.

[42] M. Johnsson, P. Hansson, K. Edwards, Spherical micelles and other self-assembled structures in dilute aqueous mixtures of poly(ethylene glycol) lipids, *Journal of Physical Chemistry B*, 105 (2001) 8420-8430.

[43] A. Lechanteur, T. Furst, B. Evrard, P. Delvenne, P. Hubert, G. Piel, PEGylation of lipoplexes: The right balance between cytotoxicity and siRNA effectiveness, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93 (2016) 493-503.

[44] J.K. Kim, S.H. Choi, C.O. Kim, J.S. Park, W.S. Ahn, C.K. Kim, Enhancement of polyethylene glycol (PEG)-modified cationic liposome-mediated gene deliveries: effects on serum stability and transfection efficiency, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55 (2003) 453-460.

[45] M.C. Woodle, M.S. Newman, J.A. Cohen, Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties, *J Drug Target*, 2 (1994) 397-403.

[46] J.Y. Kim, J.K. Kim, J.S. Park, Y. Byun, C.K. Kim, The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator, *Biomaterials*, 30 (2009) 5751-5756.

[47] S. Gorle, M. Ariatti, M. Singh, Novel serum-tolerant lipoplexes target the folate receptor efficiently, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 59 (2014) 83-93.

[48] S.J. Sung, S.H. Min, K.Y. Cho, S. Lee, Y.J. Min, Y.I. Yeom, J.K. Park, Effect of polyethylene glycol on gene delivery of polyethylenimine, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26 (2003) 492-500.

[49] M. Morille, C. Passirani, E. Letrou-Bonneval, J.P. Benoit, B. Pitard, Galactosylated DNA lipid nanocapsules for efficient hepatocyte targeting, *Int J Pharm*, 379 (2009) 293-300.

[50] K. Takeuchi, M. Ishihara, C. Kawaura, M. Noji, T. Furuno, M. Nakanishi, Effect of zeta potential of cationic liposomes containing cationic cholesterol derivatives on gene transfection, *Febs Letters*, 397 (1996) 207-209.

[51] J. Das, Y.-J. Choi, H. Yasuda, J.W. Han, C. Park, H. Song, H. Bae, J.-H. Kim, Efficient delivery of C/EBP beta gene into human mesenchymal stem cells via polyethylenimine-coated gold nanoparticles enhances adipogenic differentiation, *Scientific Reports*, 6 (2016) 33784.

[52] B.-K. Kim, G.-B. Hwang, Y.-B. Seu, J.-S. Choi, K.S. Jin, K.-O. Doh, DOTAP/DOPE ratio and cell type determine transfection efficiency with DOTAP-liposomes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848 (2015) 1996-2001.

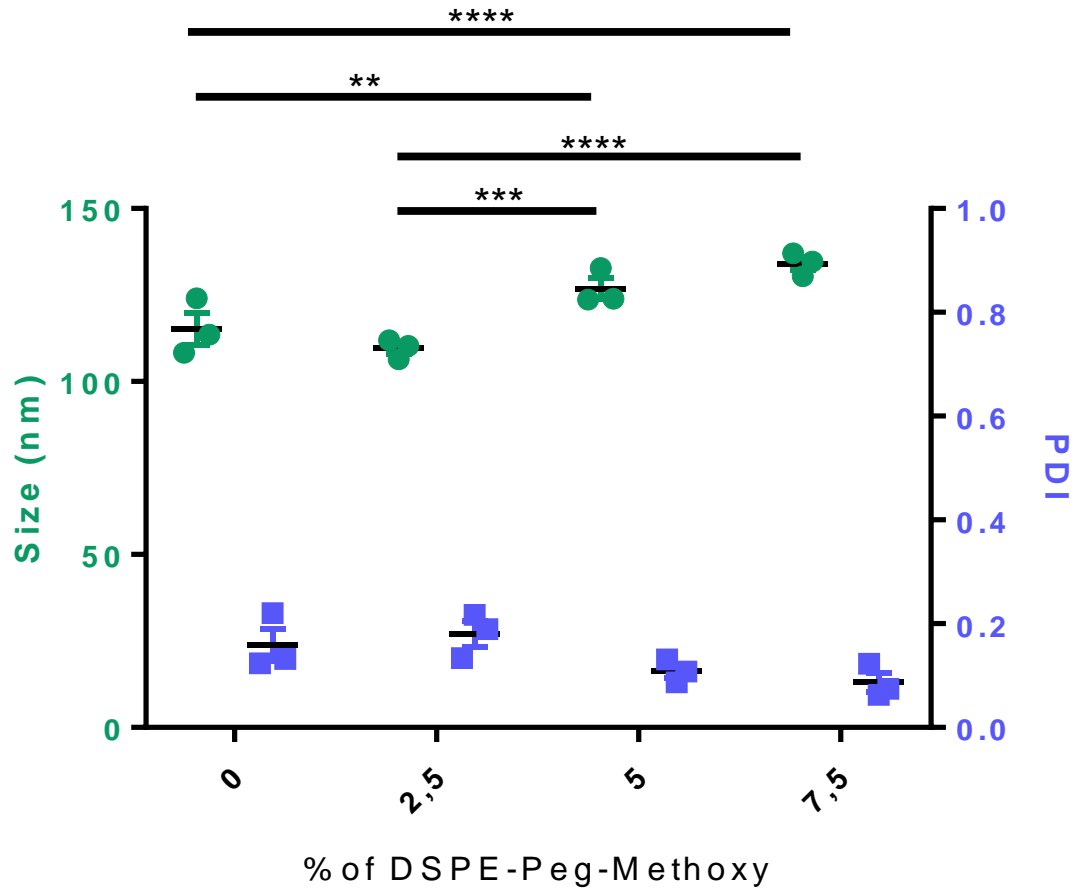
[53] Y.P. Zhang, D.L. Reimer, G.Y. Zhang, P.H. Lee, M.B. Bally, Self-assembling DNA-lipid particles for gene transfer, *Pharmaceutical Research*, 14 (1997) 190-196.

[54] N.K. Jain, I. Roy, Effect of trehalose on protein structure, *Protein Science*, 18 (2009) 24-36.

[55] D. Corradini, E.G. Strekalova, H.E. Stanley, P. Gallo, Microscopic mechanism of protein cryopreservation in an aqueous solution with trehalose, *Scientific Reports*, 3 (2013) 1218.

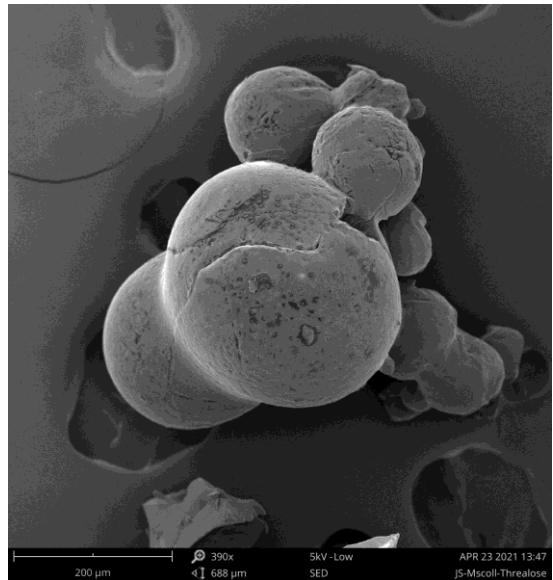
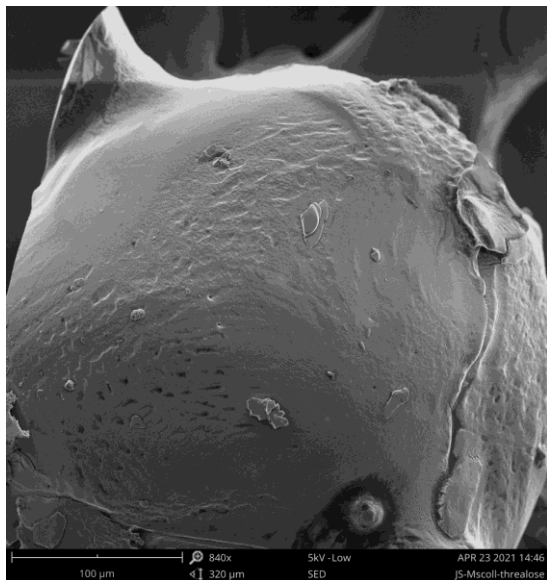
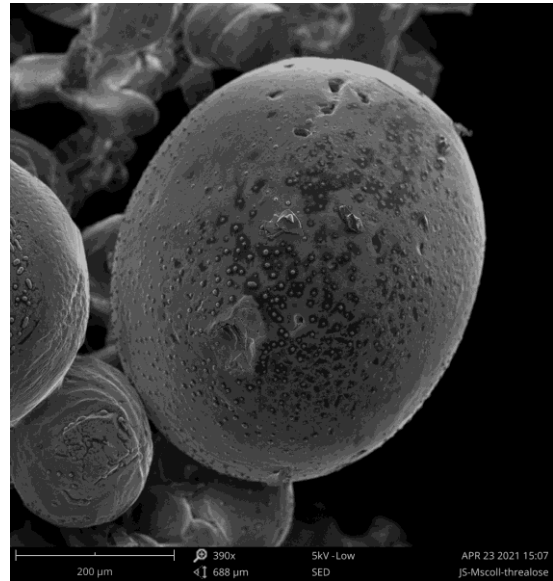
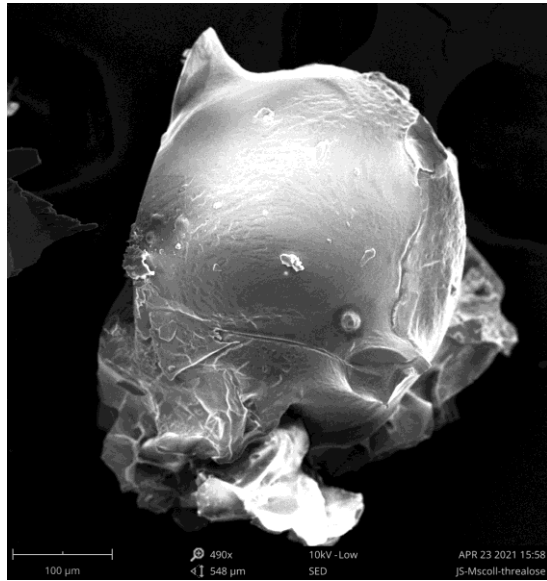
[56] M.M. Mady, Biophysical studies on collagen-lipid interaction, Journal of Bioscience and Bioengineering, 104 (2007) 144-148.

[57] M. Otero, M. Favero, C. Dragomir, K. El Hachem, K. Hashimoto, D.A. Plumb, M.B. Goldring, Human Chondrocyte Cultures as Models of Cartilage-Specific Gene Regulation, in: R.R. Mitry, R.D. Hughes (Eds.) Human Cell Culture Protocols, Third Edition, 2012, pp. 301-336.



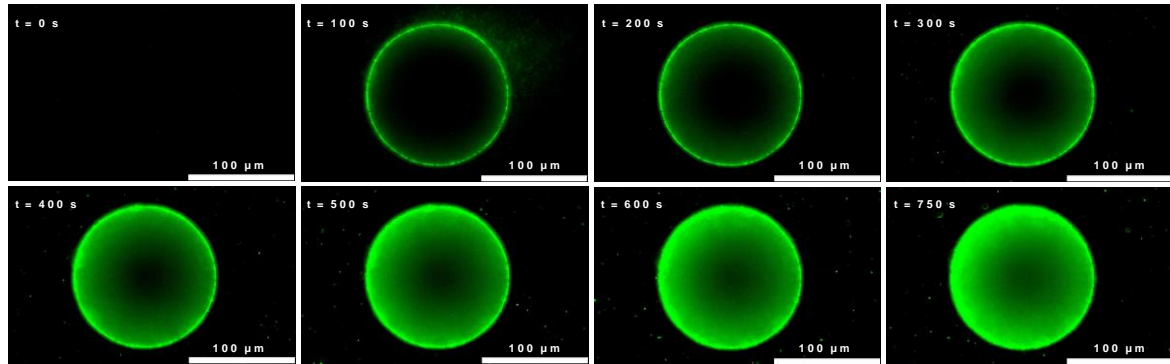
Supplementary data 1: SELF PEGylation in the initial reaction mix

Hydrodynamic diameter (Dh) and Poly Dispersity index (PDI) of SELF formulated with different percentages of DSPE-PEG (n = 3)



Supplementary data 2: Freeze-dried collagen microspheres

Representative scanning electron microscopy micrographs of collagen microspheres freeze-dried in 5% trehalose.



Supplementary data 3: SELF diffusion through microspheres

Representative images of un freeze dried collagen microsphere suspended in pure water loaded with SELF of 130 nm containing fluorescent siA488 (RM at 37,5 μ M and 20s incubation) at different time points (from 0 to 750 s). Images were done on EVOS® FL Cell Imaging System from Thermo Fisher Scientific with fluorescent filter. Magnification x40, scale bars is 100 μ m.

II Etude de la MGA sur la différenciation des CSM

Dans la deuxième partie de ce chapitre, encore préliminaire à ce stade, nous nous sommes intéressés à l'impact des deux composants de cette MGA (microparticules de collagène et lipoplexes) sur la différenciation des CSM en chondrocytes et sur la capacité à inhiber l'hypertrophie des cellules.

Le premier objectif de cette deuxième partie étant d'observer l'impact de la MGA sur la différenciation chondrogénique des CSM, nous avons comparé la méthode de culture classique sous forme d'agrégats cellulaires ou « micropellets » [456], à la culture cellulaire réalisée avec les Mscoll [457] seules ou chargées avec des SELF de différentes tailles. Le deuxième objectif a consisté à étudier l'effet des différents profils d'inhibition du gène *Runx2* induits par la MGA sur la différenciation chondrogénique des CSM en cultivant les CSM en condition de différenciation en présence de MGA chargées avec des SELF-siCT (contrôle négatif) et des SELF-si *Runx2*.

II.1 MATERIELS ET METHODES

Culture cellulaire

* Préparation des CSM

Les CSM humaines ont été isolées à partir de moelle osseuse après obtention du consentement écrit des patients et de l'agrément du ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (DC-2009-1052). Les CSM ont été caractérisées par phénotypage et des tests de différenciation vers les trois lignages mésenchymateux comme décrit [404]. Les cellules sont amplifiées dans un milieu de prolifération [α MEM, 2 mmol/ml de glutamine, 100 μ g/ml de pénicilline/streptomycine, 10 % de sérum bovin fœtal (FBS) et 1 ng/ml de facteur de croissance

basique des fibroblastes (bFGF)] (R&D Systems, Lille). Concernant la différenciation chondrogénique, les cellules sont placées dans un milieu chondro-inducteur [DMEM glucose élevé, 0,1 M de dexaméthasone, 1 mM de pyruvate de sodium, 170 M d'acide ascorbique-2-phosphate, 1% d'insuline/transferrine/acide sélénique et 0,35 mM de proline] ; ce milieu est supplémenté par 10 ng/ml de TGFβ3 (Bio-Techne, Lille) avant utilisation.

* Cultures 3D

Les cultures cellulaires sont réalisées en trois dimensions par la formation d'agrégat en mélangeant les cellules avec les Mscoll ou avec la MGA (Mscoll + lipoplexes) décrite dans la première partie de ce chapitre (Annexe 2). Le contrôle de différenciation correspond au modèle 3D de micropellets (condition « Pellet »), formés par la centrifugation de $2,5 \times 10^5$ CSM dans des tubes coniques de 15 mL à 300 g pendant 5 min. Les agrégats et les micropellets de cellules sont mis en culture pendant 21 jours dans des tubes coniques (Falcon™) de 15 mL avec 500 µL de milieu chondro-inducteur ; 250 µL de milieu sont échangés avec du milieu neuf tous les trois jours. Un micropellet directement congelé sans être exposé au milieu chondro-inducteur servira de contrôle CSM indifférenciées (condition J0).

Extraction d'ARN et RT-qPCR.

Les pellets et agrégats cellulaires correspondant à chaque condition sont placés dans un tube de 2 mL contenant 350 µL de RLT et incubés 30 min à TA. Les tubes sont ensuite congelés à -80 °C pendant au moins 24 h et l'ARN total est isolé à l'aide du kit RNeasy selon le protocole du fournisseur (Qiagen, Courtaboeuf). L'ARN total (0,25 ou 0,5 µg) a été rétrotranscrit en utilisant 100 U de transcriptase inverse M-MLV (ThermoFisher Scientific) et les réactions PCR (en utilisant la technologies SYBR Green) ont été réalisées comme décrit [405].

Les amorces suivantes ont été utilisées :

Tableau 3 : gènes marqueurs considérés et amorces utilisées

Nom du gène	Abréviation	Sequence des amorces	Type de marqueur
Aggrecan	<i>Agg</i>	TCGAGGACAGCGAGGCC / TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA	Chondrocytaire
Alkaline Phosphatase	<i>Ap</i>	CCACGTCTTCACATTTGGTG / GCAGTGAAGGGCTTCTTGTC	Hypertrophique
Collagen Type II Alpha 1 Chain	<i>Col2b</i>	CAGACGCTGGTGCTGCT / TCCTGGTTGCCGGACAT	Chondrocytaire
Collagen Type X Alpha 1 Chain	<i>ColX</i>	GTGGACCAGGAGTACCTTGC / TGCTGCCACAAATACCCTTT	Hypertrophique
Ribosomal Protein S9	<i>Rps9</i>	GCTGTTGACGCTAGACGAGA/ ATCTTCAGGCCCCAGGATGTA	Gène de ménage
RUNX Family Transcription Factor 2	<i>Runx2</i>	ACAGTCCCAACTTCCTGTGC/ ACGGTAACCACAGTCCCATC	Hypertrophique
SRY-Box Transcription Factor 9	<i>Sox9</i>	AGGTGCTCAAAGGCTACGAC/ GTAATCCGGGTGGTCCTTCT	Hypertrophique

Les valeurs de PCR sont ensuite normalisées par rapport au gène de ménage *Rps9* et exprimées en augmentation d'expression par rapport à J0 en utilisant la formule : $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

II.2 RESULTATS ET DISCUSSION

Il est utile de signaler ici que des raisons indépendantes au projet ont fortement perturbé la réalisation de ces expériences de différenciation. Ce qui explique le fait que les résultats de cette étude sur l'impact de l'addition d'une MGA à des microsphères de collagène sur la différenciation chondrocytaire des CSM concernent deux expériences pour l'instant et restent donc encore préliminaires.

Nous avons tout d'abord étudié l'évolution des marqueurs de différenciation chondrogénique qui permettent de s'assurer que les conditions habituelles ont bien permis d'induire l'engagement des CSM vers ce phénotype. On observe effectivement une forte augmentation de l'expression des gènes *Col2b*, *Agg* et *ColX* ainsi que de *Sox9* dans une moindre mesure, pour les contrôles de différenciation Pellet et Mscoll, comparés à la condition J0. Ces données suggèrent une différenciation des CSM en chondrocytes pour les conditions contrôle Pellet et Mscoll, mais indiquent également la présence possible de chondrocytes hypertrophiques, ce qui est décrit dans la littérature dans les modèles, de différenciation chondrocytaires en présence de TGF β [108, 458].

De manière intéressante, on observe un taux de variation de *Col2b* 2,5 fois plus important avec les agrégats cellulaires formés avec les Mscoll, comparés aux cellules cultivées par la méthode des micropellets (Fig. 27 A). Contrairement au *Col2b*, les marqueurs *Sox9* et *Agg*, semblent légèrement moins exprimés chez les cellules cultivées sous forme d'agrégats avec les Mscoll. Concernant les marqueurs de l'hypertrophie chondrocytaire, on observe un taux de variation de *Ap* 4 fois plus important avec les cultures contrôles Pellet, comparées aux cultures contrôle Mscoll. L'expression de *ColX* par rapport à J0 est également supérieure de 25 % sur les contrôles Pellet comparés aux Mscoll. Pour ces mêmes contrôles, l'expression de *Runx2* n'a que légèrement augmenté par rapport à J0. Pour ces trois marqueurs (*Runx2*, *ColX* et *Ap*), l'expression est plus importante pour les cellules cultivées en condition Pellet que dans la condition Mscoll (Fig. 27 D, E et F).

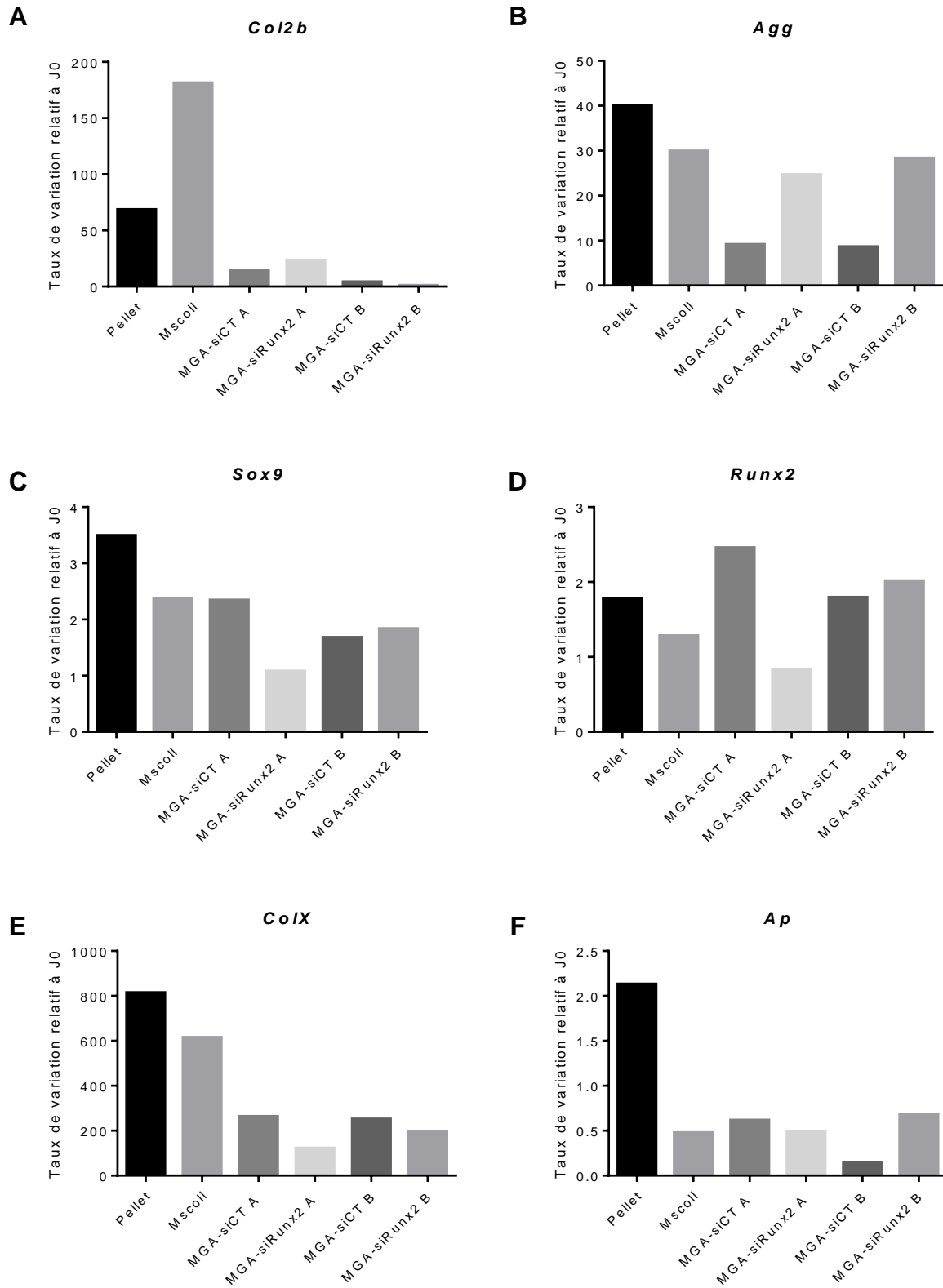


Figure 27 : Impact de la MGA et de l'inhibition de *Runx2* sur la différenciation chondrocytaire des CSM.

Expression relative des marqueurs des chondrocytes matures (A : *Col2b*) (B : *Agg*) (C : *Sox9*) et des chondrocytes hypertrophiques (D : *Runx2*) (E : *ColX*) (F : *Ap*) de CSM cultivées dans différentes conditions, en trois dimensions et avec un milieu de différenciation chondrocytaire.

Ces données suggèrent que les cultures en agrégats avec les Mscoll semblent induire une expression des marqueurs chondrocytaires plus faible qu'ils soient associés au phénotype mature ou hypertrophique.

Notre deuxième objectif a été d'étudier l'effet de deux MGA, caractérisées par deux profils de libération différents, sur la différenciation chondrocytaire des CSM. Pour cela, nous avons réalisé une MGA-A qui est chargée avec des SELF de petite taille (70 – 160 nm) et une MGA-B, chargée avec des SELF de grande taille (480 – 540 nm). Selon les données de notre étude précédente, la MGA chargée avec les SELF de grande taille maintient une forte inhibition de *Runx2* pendant plus de 14 jours, alors que la MGA chargée avec les SELF de petite taille perd en efficacité plus rapidement (Article #2, Figure 4 E).

Dans un premier temps, nous avons remarqué, qu'en présence des deux MGA-siCT, l'expression de *Col2b* est diminuée de plus de 75%, par rapport aux cultures contrôles sur MScoll (Fig. 27 A). Cet effet est aussi présent, bien que beaucoup moins marqué, pour *Agg* et *Sox9* (Fig. 27 B, C). L'hypothèse la plus probable est que la transfection précoce des CSM par le siCT inhibe ou retarde leurs capacités de différenciation en chondrocytes. Etant donné que les profils d'inhibition induits par les deux MGA utilisées ici sont similaires sur les premiers jours de culture (Article #2, Figure 4 E) des expériences complémentaires seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Cet effet des SELF sur les CSM pourrait être propre à la nature du vecteur, mais aussi plus simplement lié au stress subit par les cellules lors de la transfection.

Une seconde hypothèse pourrait être une action des vecteurs lipidiques SELF sur l'expression de certains gènes, en faisant varier l'homéostasie du métabolisme lipidique. En effet, la modulation pharmacologique du métabolisme des lipides a montré l'implication de voies spécifiques, telles que l'oxydation des acides gras, dans la régulation du comportement des cellules souches adultes [459].

Ce phénomène a déjà été observé sur des ostéoblastes transfectés avec des liposomes de DOTAP qui ont induit une inhibition de la minéralisation [460].

Une troisième hypothèse pourrait être la complexation du TGF- β 3 qui possède une légère charge négative à pH neutre, avec les SELF cationiques, ce qui le rendrait indisponible pour les cellules [461]. Cependant cette dernière hypothèse nous paraît peu probable car dans nos conditions de cultures, le TGF- β 3 est en excès et le milieu contenant le TGF- β 3 est changé tous les trois jours.

Finalement, on s'est intéressé à l'effet de l'inhibition de *Runx2* sur la différenciation des CSM. Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de la MGA sur l'inhibition de l'expression du gène cible, *Runx2*. En présence des MGA-siRunx2, l'inhibition du gène *Runx2* n'est visible que dans le cas des lipoplexes de faible diamètre (A : 70 – 160 nm), par rapport à la condition MScoll seule et MScoll-siCT (Fig. 27 D). En revanche, les MGA-siRunx2 B contenant des lipoplexes de beaucoup plus grande dimension (B : 480 – 540 nm) n'ont pas d'effet d'inhibition par rapport au MGA-siCT. Dans l'article présenté dans le chapitre précédent, l'inhibition de *Runx2* à 21 jours était similaire pour les deux tailles de lipoplexes, mais il faut noter que les cellules n'étaient pas placées en conditions chondro-inductrices (présence de TGF- β 3 dans le milieu). Comme dit précédemment, le TGF- β 3 peut interagir avec les vecteurs et potentiellement modifier les interactions cellules-vecteur ou modifier la cinétique de libération. De plus le TGF est décrit pour réguler le niveau d'expression de *Runx2*, de manière positive par la voie de signalisation MAPK (« p38 protéine kinase activée par un mitogène/p38 ») ou de manière négative par la voie de signalisation Smad2/3, il est donc possible que le niveau d'expression de *Runx2* soit plus élevé dans le milieu chondro-inducteur [462]. Cela pourrait en partie expliquer le profil d'inhibition des lipoplexes de grandes tailles observé ici, comparé aux résultats obtenus précédemment (article #2 Fig. 4D). Il faut également noter que la MGA-siCT A a tendance à augmenter l'expression de *Runx2* par comparaison aux Mscoll seules (Fig. 27 D).

Dans un deuxième temps, on a observé que les MGA-siRunx2 A et B permettent une sur-expression de *Col2b* et *Agg* importante, par rapport à la condition J0, ce qui suggère une différenciation des CSM en chondrocytes (Fig. 27 A et B). Si on regarde l'effet de l'inhibition de *Runx2* par les MGA-siRunx2 A et B sur les marqueurs chondrocytaires, on observe une augmentation de l'expression de *Agg*, mais les variations sont moins marquées sur les niveaux

d'expression de *ColX* et *Sox9*, avec même une tendance inverse entre la MGA-siRunx2 A et la MGA-siRunx2 B. Concernant les marqueurs de l'hypertrophie, la MGA-siRunx2 A inhibe l'expression de *ColX* par un facteur deux comparée à la condition MGA-siCT A. Notons tout de même que cette différence est moins marquée dans le cas des lipoplexes de plus grande dimension, c'est-à-dire entre les MGA-siCT B et MGA-siRunx2 B (Fig. 27 D).

Nous avons vu que l'inhibition de *Runx2* par les MGA-siRunx2 A et B semble réguler l'expression des marqueurs de l'hypertrophie des chondrocytes, mais induit également une variation des marqueurs de la chondrogenèse, avec parfois des tendances opposées entre les deux MDA. Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition de *Runx2* peut influencer la chondrogenèse des CSM, avec différents effets en fonction de la cinétique d'inhibition de gène *Runx2*, au cours de la différenciation. Ces résultats sont supportés par une étude de Biming Wu *et al.* qui montre que l'inhibition de *Runx2* à des points spécifiques de la maturation des chondrocytes, induit différents profils de différenciation chez les cellules ATDC5 [463]. De même que *Runx2* est déjà décrit pour occuper différentes fonctions au cours de la chondrogenèse [116, 132, 464]. De plus, cette hypothèse pourrait expliquer l'inhibition de *Sox9* par la MGA-siRunx2 A. En effet, le gène *Runx2* est décrit dans la littérature pour moduler négativement la transcription du gène *Sox9*, ce qui est contradictoire avec nos résultats obtenus après l'inhibition de *Runx2* par la MGA-siRunx2 A [465].

Bien que préliminaires, ces résultats confirment que les Mscoll sont un support adapté à la chondrogenèse des CSM. De plus les observations faites sur l'inhibition de *Runx2* par la MGA sont encourageantes, puisque l'inhibition de *Runx2* par la MGA-si *Runx2* A semble permettre une différenciation chondrocytaire tout en réduisant l'expression des marqueurs de l'hypertrophie *ColX* et *Runx2*. Cependant, des améliorations restent nécessaires pour contrôler le potentiel effet de l'inhibition de *Runx2* sur la chondrogenèse et la différenciation moins marquée des CSM en chondrocytes en présence de la MGA.

II.3 CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons décrit la préparation de lipoplexes DOTAP-DOPE à l'aide d'un processus de complexation du siRNA par échange de solvant et leur modification par la post-insertion d'un lipide PEGylé. Les SELF ainsi formés sont stables pendant au moins 21 jours en conditions de culture cellulaire, non toxiques et capables de transférer efficacement des CSM cultivées en trois dimensions. L'association de ce vecteur avec des microsphères de collagène poreuse par un simple procédé d'imprégnation, permet la formation d'une MGA qui a la capacité de réguler négativement l'expression génique de notre cible *Runx2* pendant au moins 21 jours. De plus, la taille adaptable des SELF donne la possibilité de réguler le profil de libération du vecteur et nous avons montré que cela permet *in fine* de moduler le profil d'inhibition du gène cible. Cette inhibition du gène *Runx2* par la MGA a montré des résultats prometteurs sur le contrôle de la différenciation hypertrophique des chondrocytes induits à partir de CSM humaines. Mais les vecteurs contenus dans la MGA semblent également perturber la différenciation chondrogénique des CSM, ce qui peut diminuer l'efficacité de notre stratégie de réparation du cartilage. Afin de réduire cet effet néfaste des vecteurs et de contrôler précisément le profil d'inhibition de *Runx2*, la stratégie envisagée pour la suite de ce projet est d'accrocher le vecteur sur la matrice de collagène des microsphères par un lien covalent et clivable. Cela permettrait de déclencher la libération des vecteurs au moment le plus avantageux pour inhiber l'hypertrophie sans perturber la différenciation chondrogénique des CSM.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

L'objectif final de mon projet de thèse était d'élaborer une matrice injectable permettant de contrôler la différenciation de cellules stromales mésenchymateuses primaires en chondrocytes et la sécrétion d'une matrice extracellulaire similaire au cartilage articulaire natif. Pour cela, nous avons proposé de développer une matrice génétiquement activée en étudiant l'association de siARN vectorisés avec des microsphères de collagène.

Le premier objectif était de trouver un vecteur de siARN permettant une transfection efficace des CSM humaines et possédant des propriétés physico-chimiques adaptées à l'élaboration d'un MGA.

Pour cela, nous avons étudié et testé différents vecteurs de siARN, potentiellement adaptés à ce projet. Parmi ces vecteurs, les micelles PIC déjà décrites dans de précédents travaux du laboratoire [299, 389] semblaient avoir les paramètres physico-chimiques les plus adaptés pour ce projet. Cependant, malgré les différents types de micelles et les différents protocoles utilisés, ces vecteurs restent faiblement efficaces pour la transfection des CSM et permettent au mieux une inhibition de 20 % de l'expression du gène *Runx2*. L'étude des EV n'a pas parmi d'obtenir une transfection des siARN satisfaisante et de nombreuses améliorations sont encore nécessaires pour permettre une encapsulation efficace et reproductible des siARN. Néanmoins, du fait de leurs propriétés naturelles à libérer efficacement le contenu de leur cargo dans les cellules cibles, les EV restent un vecteur prometteur pour la thérapie génique appliquée à l'IT. En revanche, les vecteurs lipidiques semblent être les plus efficaces pour la transfection des CSM. En particulier, le système DOTAP-DOPE qui permet d'obtenir une inhibition de 82 % de l'expression du gène *Runx2*, est même supérieur au vecteur commercial contrôle. Toutefois, la taille de ce vecteur est légèrement supérieure à la limite fixée par notre cahier des charges. Par ailleurs, ce type de complexes lipidiques est déjà décrit dans la littérature comme instable dans des conditions *in vivo*, conduisant à la formation d'agrégats de grande taille. Malgré ces limitations, ce type de vecteur synthétique basé sur une formulation de lipides cationiques est, dans nos conditions, le plus efficace pour la transfection de siARN dans les CSM. Nous avons donc choisi d'étudier et de modifier la formulation des vecteurs lipidiques DOTAP-DOPE afin de mieux en contrôler les paramètres physico-chimiques.

Le deuxième objectif était d'optimiser le vecteur lipidique DOTAP-DOPE afin de permettre son association avec les microsphères de collagène pour former la MGA.

Pour répondre à cet objectif, nous avons modifié les lipoplexes DOTAP-DOPE afin d'en faire des nanoparticules lipidiques (LNP) de deuxième génération que nous avons appelées SELF. Ces LNP sont stables pendant au moins 21 jours en conditions de culture cellulaire, non toxiques et capables de transférer efficacement des CSM cultivées en trois dimensions. La première des deux principales améliorations réalisées concerne la mise au point d'un protocole de formulation par échange de solvants. Nous avons démontré que cette méthode de formulation permet la formation de nanoparticules lipidiques complexées aux siARN et que de simples modifications des paramètres de formulation permettent *in fine* de contrôler la taille des SELF. La deuxième amélioration principale est la PEGylation des lipoplexes par une méthode de post-insertion. La formation d'une couronne de PEG₂₀₀₀ autour des SELF a permis d'augmenter significativement leur stabilité en conditions de culture cellulaire, sans impacter l'efficacité de transfection avec l'introduction de 2,5% de DSPE-PEG dans la formulation lipidique. Cette couronne permet également d'envisager la fonctionnalisation des chaînes PEG sur l'extrémité libre afin de contrôler l'attachement à la matrice.

Par la suite, nous avons étudié l'association de ce vecteur par imprégnation au sein de microsphères de collagène poreuses, pour former la MGA. Nous avons montré que la MGA ainsi obtenue a la capacité de réguler négativement l'expression génique de notre cible thérapeutique (*Runx2*) pendant au moins 21 jours. De plus, nous avons remarqué que la taille ajustable des SELF donne la possibilité de réguler la capacité de chargement des SELF dans les microsphères de collagène. De plus, des vecteurs de tailles différentes conduisent aussi à des profils de libération différents, ce qui permet *in fine* de moduler le profil d'inhibition du gène cible dans le temps.

Le troisième objectif concernait l'étude de la MGA sur un modèle *in vitro* de différenciation chondrocytaire de CSM humaines. Pour cela, nous avons étudié les profils d'inhibition du gène *Runx2* induits par la MGA, sur la différenciation des CSM, en chondrocytes matures ou hypertrophiques dans un milieu de différenciation chondrogénique. L'inhibition du gène *Runx2* par la MGA a montré des résultats prometteurs sur le contrôle de

la différenciation des chondrocytes induits, avec une inhibition des marqueurs de l'hypertrophie *Runx2* et *ColX*. De manière intéressante, les vecteurs contenus dans la MGA semblent impacter positivement la différenciation chondrogénique des CSM observée par une augmentation des marqueurs COL2B et AGG comparé aux cultures contrôles avec SELF-siCtrl. Ces résultats sont bien sûr à prendre avec précaution car il s'agit d'une seule expérience préliminaire. Il faut cependant noter que l'addition des SELF au sein des microsphères réduit le potentiel de différenciation des CSM. La principale hypothèse pour expliquer ces résultats, est que la transfection précoce des CSM entraîne une certaine toxicité, qui aurait pour conséquence un retard ou une diminution de la différenciation des CSM en chondrocytes. Ces résultats confirment le potentiel de notre stratégie de régénération du cartilage et soulignent la nécessité de contrôler plus précisément la cinétique d'action des vecteurs de siARN.

Contrôle de la libération des vecteurs d'acides nucléiques

La principale perspective de ces travaux est d'obtenir un contrôle précis de la libération des vecteurs SELF à partir des microsphères de collagène. Pour avancer sur cet objectif, nous avons conduit plusieurs travaux préliminaires. La stratégie envisagée est d'accrocher le vecteur sur la matrice de collagène des microsphères par un lien covalent et clivable. Cette approche permettrait de rendre le vecteur SELF indisponible pour les cellules pendant les premières phases de différenciation des CSM pour ensuite déclencher la libération des vecteurs au moment adéquat pour inhiber l'hypertrophie des chondrocytes. Afin de conserver l'autonomie du système de différenciation, nous avons choisi une méthode de libération déclenchée par un mécanisme endogène au système. Les premiers travaux concernant l'élaboration de ce système se sont portés sur l'accroche covalente des SELF sur les Mscoll par l'intermédiaire d'un peptide sensible aux métalloprotéases. Comme nous l'avons vu dans la partie introductive de cette thèse, certaines métalloprotéases sont sécrétées en grande quantité par les chondrocytes hypertrophiques dès l'induction de cette étape de différenciation ; c'est notamment le cas de la MMP-13. La sécrétion de cette métalloprotéase permettrait donc de cliver un peptide de reconnaissance et de déclencher la libération des vecteurs au moment le plus opportun. Des expériences préliminaires ont déjà été conduites au cours de mes travaux de thèse.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un peptide sensible à la MMP13 qui présente deux fonctions « clickables » à ses extrémités. D'un côté de la séquence peptidique sensible à la MMP13 « GPLGLWARK », nous avons ajouté une cystéine qui présente un groupement

thiol susceptible de réagir avec une fonction maléimide. Un cyclooctyne (DBCO) a été ajouté à l'autre extrémité dans la perspective d'une réaction click avec un azide (Fig. 28).

La fonction maléimide a été introduite sur les vecteurs de siRNA par la post-insertion d'un lipide-PEG - maléimide (1,2-istearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyéthylène glycol)-2000]), capable de former une liaison stable avec le groupement thiol présent sur la cystéine du peptide. Il s'agit donc d'une modification relativement mineure du vecteur étudié dans les chapitres précédents après post-insertion du DSPE-PEG₂₀₀₀.

Par ailleurs, nous avons modifié les Mscoll afin d'ajouter un groupement azide capable de réagir par chimie click avec le groupement DBCO présent sur l'autre extrémité du peptide. Cette modification a été réalisée à l'aide d'un agent de transfert, l'imidazole sulfonyl azide hydrochloride (ISH) qui permet de convertir les amines primaires du collagène en groupements azides (Annexe 3).

Enfin, nous avons étudié la liaison du peptide sur les SELF-Maléimide d'une part et sur les Mscoll-Azide d'autre part. En effet, les premiers résultats obtenus sur le système complet (Mscoll – peptide – vecteurs) étaient difficiles à interpréter, notamment en raison de difficultés analytiques et nous avons choisi d'étudier plus en détail chaque étape.

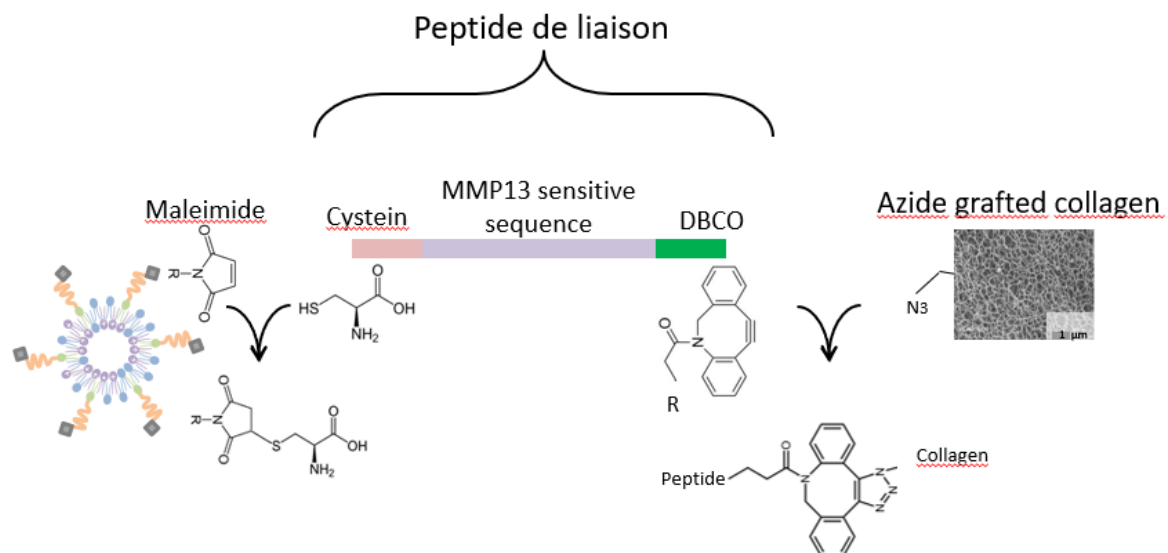


Figure 28 : Schéma des interactions du peptide de liaison avec les SELF et Mscoll.

Les premiers résultats obtenus concernant l'interaction du peptide de liaison avec les SELF ont montré l'accroche d'environ 50 % de la quantité totale de peptides incubés avec les SELF modifiés avec la fonction maléimide. Par ailleurs, environ 55 % des peptides ajoutés sont restés accrochés aux microsphères de collagène modifiés avec les groupements azides (Annexe 4). Ces résultats préliminaires, ont permis de montrer la faisabilité du système d'accroche envisagé pour retenir les vecteurs d'acides nucléiques au sein de la MGA. Les expériences doivent être reproduites et optimiser pour améliorer les rendements, mais ces données suggèrent qu'il est possible d'une part, de lier le peptide aux Mscoll-Azide et d'autre part, de le lier aux SELF. Les prochaines expériences de l'équipe devraient pouvoir déterminer si ce peptide est bien capable de relier les SELF aux Mscoll-Azide et vérifier l'efficacité du système de libération déclenchée par MMP-13. Ces travaux ont été financés récemment par l'ANR (projet SPACECART, 2022-2025) et seront développés au sein des laboratoires de l'IRMB et de l'ICGM.

Il existe également d'autres systèmes permettant de contrôler la libération des vecteurs à partir des microsphères de collagène, par exemple, on pourrait greffer sur la fonction maléimide des SELF modifiés, un peptide possédant un CBD (collagen-binding domain) ce qui permettrait de retarder la libération des SELF. Il existe une grande variété de CBD, avec différentes K_d (constante de dissociation), il serait intéressant d'observer si certains CBD, permettent d'obtenir des profils de libération différents ou plus étendus que ceux obtenus jusqu'à présent en ajustant la taille des SELF [466].

Perspectives sur les acides nucléiques/ vecteurs d'acides nucléiques

Au cours de ces recherches, nous avons mis au point une MGA, capable d'induire l'inhibition prolongée du gène *Runx2*, mais il serait également intéressant d'utiliser ce système pour induire la libération de plusieurs acides nucléiques thérapeutiques, en simultané ou de manière séquentielle. En effet, la formation d'une MGA contenant différents acteurs de régulation génique, vectorisés spécifiquement par des SELF de différentes tailles pourrait

permettre une inhibition séquentielle des gènes cibles, avec de nombreuses applications en IT. Pour améliorer la réparation du cartilage, de nouvelles cibles de régulation génique pourraient être envisagées, notamment l'utilisation des microARN qui sont décrits pour être impliqués dans de nombreux mécanismes du développement ou de l'homéostasie du cartilage, en particulier l'hypertrophie des chondrocytes et la sécrétion de la MEC par les chondrocytes.

La formulation de lipoplexes SELF reposant sur un système de nanoprecipitation de solvant permet d'envisager l'utilisation d'une stratégie de microfluidique afin de mieux contrôler les mélanges et d'ajouter un niveau de contrôle sur la reproductibilité des systèmes obtenus, plus compatible avec une production thérapeutique comme cela a été réalisé pour la formulation de LNP [353, 354, 467, 468]. Enfin, la composition des SELF pourrait être modifiée pour partir vers les stratégies développées dans la formulation des LNP actuellement sur le marché [334, 439], en particulier à travers l'utilisation de lipides cationiques ionisables tels que le DODAP (1,2-dioleoyl-3-diméthylammonium-propane), le DODMA (1,2-dioleoyloxy-3-diméthylaminopropane), l' ALC-0315 [(4-Hydroxybutyl)azanediyl]di(hexane-6,1-diyl) bis(2-hexyldecanoate) ou encore D-Lin-MC3-DMA (MC3), (6Z,9Z,28Z,31Z)-Heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(diméthylamino)butanoate). En effet, ces lipides exposant des pKas < pH 7,0 (généralement autour de 6) sont capable de complexer les acides nucléiques à faible pH (pH 5) et de maintenir leur structure tout en devenant faiblement chargé ou neutre à pH 7,4. En parallèle de ces lipides cationiques ionisables, sont généralement associés des lipides constitutifs/helper tels que la distearoylphosphatidylcholine (DSPC) ou le cholestérol (CH), ainsi des lipides PEG (1-O-(2P-(w-méthoxypolyéthylène glycol)succinoyl)-2-N-myristoylsphingosine (PEG-CerC14) ; 1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-méthoxypolyéthylène glycol-2000 (DMG-PEG). Dans notre projet, cela permettrait d'envisager une option intéressante, également basé sur les outils micro fluidiques permettant de produire les vecteurs, de les associer à la solution de collagène à pH acide avant de former l'émulsion puis les microsphères (Fig. 29).

- 1 siRNA en tampon sodium acétate (pH 5,2)
- 2 Lipides : DODAP, DSPC, Chol, DMG-PEG dans EtOH
- 3 H₂O
- 4 Phase huileuse
- 5 Solution de collagène (PH acide)
- 6 Emulsion (Eau/Huile) avec les siRNA vectorisés dans la phase aqueuse.

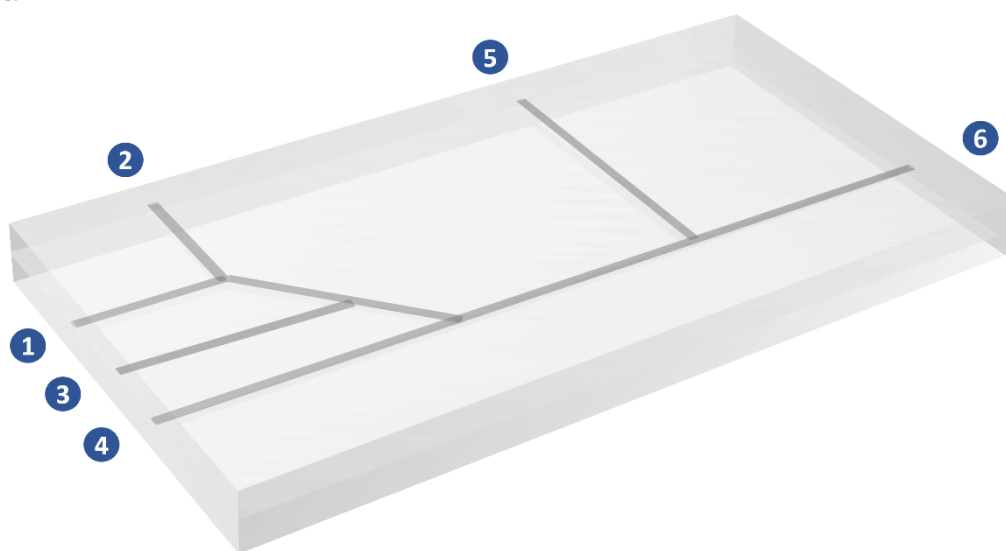


Figure 29 : Stratégie potentiel de microfluidiques pour la formation de MGA.

En parallèle, il serait intéressant d'étudier la formation d'EV hybrides avec des lipides cationiques ou des lipides ionisables. D'un côté les lipides possédant une charge positive, permettent une complexation efficace des siARN et de l'autre côté, les protéines présentes sur la membrane des EV permettent une transfection efficace des cellules. Plusieurs études se sont déjà intéressées à la formation d'EV hybrides, par hybridation passive [469], ouverture transitoire des bicouches lipidiques [470] ou encore par fusion membranaire [471]. Ainsi il serait possible d'adapter les protocoles de modifications des EV décrit dans le chapitre 1, pour former des EV hybrides [472]. D'autre part, une méthode de chargement des EV, décrite dans la littérature, consiste à les dissoudre dans un solvant organique pour former un film lipidique et reprendre ensuite ce film lipidique avec une solution aqueuse contenant la molécule d'intérêt et ainsi induire la reformation des EV [473]. Dans notre cas, il serait intéressant d'utiliser cette méthode pour former des EV hybrides avec des lipides cationiques afin de favoriser le chargement des EV. Ces stratégies, actuellement évaluées au sein de l'ICGM dans le contexte d'une thèse portant sur l'encapsulation de protéines au sein d'EV, pourront être évaluées pour la complexation des acides nucléiques.

Par la suite, il s'agira de montrer l'efficacité de notre système de réparation dans un modèle *in vivo*. Une approche préliminaire pourrait utiliser le modèle d'implantation ectopique, en sous-cutané chez la souris SCID, cette approche permettra d'établir une preuve de concept avant d'envisager l'étude de notre système sur de grands modèles animaux tels que la chèvre, qui sont pertinents pour évaluer la réparation du cartilage sur les lésions focales.

REFERENCES

1. Sophia Fox, A.J., A. Bedi, and S.A. Rodeo, *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*. Sports Health, 2009. **1**(6): p. 461-8.
2. Hamood, R., M. Tirosh, and N. Fallach, *Prevalence and Incidence of Osteoarthritis: A Population-Based Retrospective Cohort Study*. 2021. **10**(18).
3. Quicke, J.G., et al., *Osteoarthritis year in review 2021: epidemiology & therapy*. Osteoarthritis Cartilage, 2022. **30**(2): p. 196-206.
4. Hotham, W.E. and A. Malviya, *A systematic review of surgical methods to restore articular cartilage in the hip*. Bone Joint Res, 2018. **7**(5): p. 336-342.
5. Caddeo, S., M. Boffito, and S. Sartori, *Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models*. Front Bioeng Biotechnol, 2017. **5**: p. 40.
6. Aydelotte, M.B., R.R. Greenhill, and K.E. Kuettner, *Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism*. Connect Tissue Res, 1988. **18**(3): p. 223-34.
7. Aydelotte, M.B. and K.E. Kuettner, *Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production*. Connect Tissue Res, 1988. **18**(3): p. 205-22.
8. Mow, V.C., A. Ratcliffe, and A.R. Poole, *Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures*. Biomaterials, 1992. **13**(2): p. 67-97.
9. Hu, J. and K. Athanasiou, *Structure and Function of Articular Cartilage*. 2003. p. 73-95.
10. Ng, H.Y., K.-X.A. Lee, and Y.-F. Shen. *Articular Cartilage : Structure , Composition , Injuries and Repair*. 2017.
11. Chevalier, X. and P. Richette, *Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement*. EMC - Rhumatologie-Orthopédie, 2005. **2**(1): p. 41-58.
12. Kheir, E. and D. Shaw, *Hyaline articular cartilage*. Orthopaedics and Trauma, 2009. **23**(6): p. 450-455.
13. Uitto, J., R.E. Allan, and K.L. Polak, *Conversion of type II procollagen to collagen. Extracellular removal of the amino-terminal and carboxy-terminal extensions without a preferential sequence*. Eur J Biochem, 1979. **99**(1): p. 97-103.
14. Hojima, Y., et al., *Cleavage of type I procollagen by C- and N-proteinases is more rapid if the substrate is aggregated with dextran sulfate or polyethylene glycol*. Anal Biochem, 1994. **223**(2): p. 173-80.

15. Murdoch, A.D., et al., *The development of a mature collagen network in cartilage from human bone marrow stem cells in Transwell culture*. Matrix Biol, 2016. **50**: p. 16-26.
16. Poole, A.R., et al., *Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair*. Clin Orthop Relat Res, 2001(391 Suppl): p. S26-33.
17. Fabre, H., et al., *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, 2016. **24**: p. S507-S508.
18. Responde, D.J., R.M. Natoli, and K.A. Athanasiou, *Collagens of articular cartilage: structure, function, and importance in tissue engineering*. Crit Rev Biomed Eng, 2007. **35**(5): p. 363-411.
19. Mendler, M., et al., *Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI*. J Cell Biol, 1989. **108**(1): p. 191-7.
20. Luo, Y., et al., *The minor collagens in articular cartilage*. Protein Cell, 2017. **8**(8): p. 560-572.
21. Eyre, D.R., *The collagens of articular cartilage*. Semin Arthritis Rheum, 1991. **21**(3 Suppl 2): p. 2-11.
22. Eyre, D.R., et al., *Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage*. FEBS Lett, 1987. **220**(2): p. 337-41.
23. Kvist, A.J., et al., *The major basement membrane components localize to the chondrocyte pericellular matrix--a cartilage basement membrane equivalent?* Matrix Biol, 2008. **27**(1): p. 22-33.
24. Schmid, T.M., R.G. Popp, and T.F. Linsenmayer, *Hypertrophic cartilage matrix. Type X collagen, supramolecular assembly, and calcification*. Ann N Y Acad Sci, 1990. **580**: p. 64-73.
25. Luckman, S.P., E. Rees, and A.P. Kwan, *Partial characterization of cell-type X collagen interactions*. Biochem J, 2003. **372**(Pt 2): p. 485-93.
26. Shen, G., *The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage*. Orthod Craniofac Res, 2005. **8**(1): p. 11-7.
27. Iozzo, R.V. and L. Schaefer, *Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans*. Matrix Biol, 2015. **42**: p. 11-55.
28. Gahunia, H.K., et al., *Articular Cartilage of the Knee*. Springer, New York, NY, 2020. **978-1-4939-7587-7**.
29. Heinegard, D., *Fell-Muir Lecture: Proteoglycans and more--from molecules to biology*. Int J Exp Pathol, 2009. **90**(6): p. 575-86.
30. Taylor, D.W., et al., *Collagen type XII and versican are present in the early stages of cartilage tissue formation by both redifferentating passaged and primary chondrocytes*. Tissue Eng Part A, 2015. **21**(3-4): p. 683-93.

31. Dreyfuss, J.L., et al., *Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling*. An Acad Bras Cienc, 2009. **81**(3): p. 409-29.
32. Scott, J.E., *Proteoglycan-fibrillar collagen interactions*. Biochem J, 1988. **252**(2): p. 313-23.
33. Roughley, P.J. and E.R. Lee, *Cartilage proteoglycans: structure and potential functions*. Microsc Res Tech, 1994. **28**(5): p. 385-97.
34. Scott, J.E. and R.W. Glanville, *Homologous sequences in fibrillar collagens may be proteoglycan binding sites*. Biochem Soc Trans, 1993. **21**(2): p. 123s.
35. Hauser, N. and M. Paulsson, *Native cartilage matrix protein (CMP). A compact trimer of subunits assembled via a coiled-coil alpha-helix*. J Biol Chem, 1994. **269**(41): p. 25747-53.
36. Makihiro, S., et al., *Enhancement of cell adhesion and spreading by a cartilage-specific noncollagenous protein, cartilage matrix protein (CMP/Matrilin-1), via integrin alpha1beta1*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 11417-23.
37. Loeser, R., et al., *Articular-cartilage matrix gamma-carboxyglutamic acid-containing protein. Characterization and immunolocalization*. Biochem J, 1992. **282 (Pt 1)**(Pt 1): p. 1-6.
38. Loeser, R.F., *Modulation of integrin-mediated attachment of chondrocytes to extracellular matrix proteins by cations, retinoic acid, and transforming growth factor beta*. Exp Cell Res, 1994. **211**(1): p. 17-23.
39. Mollenhauer, J., et al., *Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen*. J Cell Biol, 1984. **98**(4): p. 1572-9.
40. Lucic, D., et al., *N-Telopeptide of Type II Collagen Interacts with Annexin V on Human Chondrocytes*. Connective Tissue Research, 2009. **44**(5): p. 225-239.
41. Prockop, D.J. and K.I. Kivirikko, *Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 403-34.
42. Hyc, A., et al., *The morphology and selected biological properties of articular cartilage*. Ortop Traumatol Rehabil, 2001. **3**(2): p. 151-62.
43. Vonk, L.A., et al., *Autologous, allogeneic, induced pluripotent stem cell or a combination stem cell therapy? Where are we headed in cartilage repair and why: a concise review*. Stem Cell Res Ther, 2015. **6**: p. 94.
44. Roux, S., et al., *[Mesenchymal stromal cells: Biological properties and clinical prospects]*. Transfus Clin Biol, 2011. **18**(1): p. 1-12.
45. Salem, H.K. and C. Thiemermann, *Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status*. Stem Cells, 2010. **28**(3): p. 585-96.

46. Churchman, S.M., et al., *Transient Existence of Circulating Mesenchymal Stem Cells in the Deep Veins in Humans Following Long Bone Intramedullary Reaming*. J Clin Med, 2020. **9**(4).
47. Sakaguchi, Y., et al., *Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2728-2735.
48. Gronthos, S., et al., *Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 9): p. 1827-35.
49. Dowthwaite, G.P., et al., *The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 6): p. 889-97.
50. Gronthos, S., et al., *Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13625-30.
51. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
52. Rosenbaum, A.J., D.A. Grande, and J.S. Dines, *The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment*. Organogenesis, 2008. **4**(1): p. 23-7.
53. Olsen, B.R., A.M. Reginato, and W. Wang, *Bone development*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 191-220.
54. Lefebvre, V. and M. Dvir-Ginzberg, *SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage*. Connect Tissue Res, 2017. **58**(1): p. 2-14.
55. Bi, W., et al., *Sox9 is required for cartilage formation*. Nat Genet, 1999. **22**(1): p. 85-9.
56. Liu, C.F. and V. Lefebvre, *The transcription factors SOX9 and SOX5/SOX6 cooperate genome-wide through super-enhancers to drive chondrogenesis*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(17): p. 8183-203.
57. Adams, S.L., A.J. Cohen, and L. Lassoová, *Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation*. J Cell Physiol, 2007. **213**(3): p. 635-41.
58. Zuscik, M.J., et al., *Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 429-38.
59. Klein, R., *Understanding the burden of musculoskeletal conditions*. BMJ, 2001. **322**: p. 1079-80.
60. Navarro-Sarabia, F., et al., *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*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(11): p. 1957-62.
61. Moseley, J.B., et al., *A Controlled Trial of Arthroscopic Surgery for Osteoarthritis of the Knee*. New England Journal of Medicine, 2002. **347**(2): p. 81-88.

62. Browne, J.E. and T.P. Branch, *Surgical alternatives for treatment of articular cartilage lesions*. J Am Acad Orthop Surg, 2000. **8**(3): p. 180-9.
63. Mollon, B., R. Kandel, and J. Theodoropoulos, *Human-Derived Cells in Chondral or Osteochondral Repair*. 2020. p. 391-410.
64. Hangody, L., et al., *Autologous osteochondral grafting--technique and long-term results*. Injury, 2008. **39 Suppl 1**: p. S32-9.
65. Flanigan, D.C., J.S. Everhart, and N.A. Early, *Autologous Chondrocyte Implantation: Scaffold-Based Solutions*. 2018.
66. Ruta, D.J., A.D. Villarreal, and D.R. Richardson, *Orthopedic Surgical Options for Joint Cartilage Repair and Restoration*. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2016. **27**(4): p. 1019-1042.
67. Briggs, K.K., et al., *The reliability, validity, and responsiveness of the Lysholm score and Tegner activity scale for anterior cruciate ligament injuries of the knee: 25 years later*. Am J Sports Med, 2009. **37**(5): p. 890-7.
68. Hubbard, M.J., *Articular debridement versus washout for degeneration of the medial femoral condyle. A five-year study*. J Bone Joint Surg Br, 1996. **78**(2): p. 217-9.
69. Lysholm, J. and J. Gillquist, *Evaluation of knee ligament surgery results with special emphasis on use of a scoring scale*. Am J Sports Med, 1982. **10**(3): p. 150-4.
70. Kirkley, A., et al., *A Randomized Trial of Arthroscopic Surgery for Osteoarthritis of the Knee*. New England Journal of Medicine, 2008. **359**(11): p. 1097-1107.
71. Hurst, J.M., et al., *Rehabilitation following microfracture for chondral injury in the knee*. Clin Sports Med, 2010. **29**(2): p. 257-65, viii.
72. Guilak, F., et al., *Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix*. Matrix Biol, 2018. **71-72**: p. 40-50.
73. Mithoefer, K., et al., *The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study*. J Bone Joint Surg Am, 2005. **87**(9): p. 1911-20.
74. Mayne, R., et al., *Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(5): p. 1674-8.
75. Solheim, E., et al., *Randomized Study of Long-term (15-17 Years) Outcome After Microfracture Versus Mosaicplasty in Knee Articular Cartilage Defects*. Am J Sports Med, 2018. **46**(4): p. 826-831.
76. Solheim, E., J. Hegna, and E. Inderhaug, *Clinical outcome after mosaicplasty of knee articular cartilage defects of patellofemoral joint versus tibiofemoral joint*. Journal of orthopaedics, 2019. **18**: p. 36-40.
77. Solheim, E., J. Hegna, and E. Inderhaug, *Long-Term Survival after Microfracture and Mosaicplasty for Knee Articular Cartilage Repair: A*

- Comparative Study Between Two Treatments Cohorts. Cartilage*, 2020. **11**(1): p. 71-76.
78. Viamont-Guerra, M.R., et al., *Promising outcomes of hip mosaicplasty by minimally invasive anterior approach using osteochondral autografts from the ipsilateral femoral head*. 2020. **28**(3): p. 767-776.
 79. Hangody, L., et al., *Clinical experiences with autologous osteochondral mosaicplasty in an athletic population: a 17-year prospective multicenter study*. *Am J Sports Med*, 2010. **38**(6): p. 1125-33.
 80. Bartlett, W., et al., *Autologous chondrocyte implantation at the knee using a bilayer collagen membrane with bone graft. A preliminary report*. *J Bone Joint Surg Br*, 2005. **87**(3): p. 330-2.
 81. Jo, C.H., et al., *Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial*. *Stem Cells*, 2014. **32**(5): p. 1254-66.
 82. Lamo-Espinosa, J.M., et al., *Intra-articular injection of two different doses of autologous bone marrow mesenchymal stem cells versus hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: long-term follow up of a multicenter randomized controlled clinical trial (phase I/II)*. *J Transl Med*, 2018. **16**(1): p. 213.
 83. Murphy, J.M., et al., *Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(12): p. 3464-74.
 84. Caplan, A.I. and J.E. Dennis, *Mesenchymal stem cells as trophic mediators*. *J Cell Biochem*, 2006. **98**(5): p. 1076-84.
 85. Aldrich, E.D. and X. Cui, *Allogeneic mesenchymal stromal cells for cartilage regeneration: A review of in vitro evaluation, clinical experience, and translational opportunities*. 2021. **10**(11): p. 1500-1515.
 86. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Mesenchymal stem cells in health and disease*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(9): p. 726-36.
 87. Kan, I., E. Melamed, and D. Offen, *Autotransplantation of bone marrow-derived stem cells as a therapy for neurodegenerative diseases*. *Handb Exp Pharmacol*, 2007(180): p. 219-42.
 88. Aggarwal, S. and M.F. Pittenger, *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*. *Blood*, 2005. **105**(4): p. 1815-22.
 89. Waterman, R.S., et al., *A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype*. *PLOS ONE*, 2010. **5**(4): p. e10088.
 90. Song, J.S., et al., *Implantation of allogenic umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improves knee osteoarthritis outcomes: Two-year follow-up*. *Regen Ther*, 2020. **14**: p. 32-39.

91. Davatchi, F., et al., *Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients.* Int J Rheum Dis, 2011. **14**(2): p. 211-5.
92. Lamo-Espinosa, J.M., et al., *Phase II multicenter randomized controlled clinical trial on the efficacy of intra-articular injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells with platelet rich plasma for the treatment of knee osteoarthritis.* Journal of translational medicine, 2020. **18**(1): p. 356-356.
93. Matas, J., et al., *Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) for Knee Osteoarthritis: Repeated MSC Dosing Is Superior to a Single MSC Dose and to Hyaluronic Acid in a Controlled Randomized Phase I/II Trial.* 2019. **8**(3): p. 215-224.
94. Hashimoto, Y., et al., *Transplantation of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells under arthroscopic surgery with microfracture versus microfracture alone for articular cartilage lesions in the knee: A multicenter prospective randomized control clinical trial.* Regen Ther, 2019. **11**: p. 106-113.
95. To, K., et al., *The Treatment of Cartilage Damage Using Human Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: A Systematic Review of in vivo Studies.* Front Bioeng Biotechnol, 2020. **8**: p. 580.
96. Cho, P.S., et al., *Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells.* Blood, 2008. **111**(1): p. 430-8.
97. Vonk, L.A., et al., *Mesenchymal Stromal/stem Cell-derived Extracellular Vesicles Promote Human Cartilage Regeneration In Vitro.* Theranostics, 2018. **8**(4): p. 906-920.
98. Alves da Silva, M.L., et al., *Conditioned medium as a strategy for human stem cells chondrogenic differentiation.* J Tissue Eng Regen Med, 2015. **9**(6): p. 714-23.
99. Bian, L., et al., *Coculture of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes reduces hypertrophy and enhances functional properties of engineered cartilage.* Tissue Eng Part A, 2011. **17**(7-8): p. 1137-45.
100. Zhang, W., et al., *Inhibitory function of parathyroid hormone-related protein on chondrocyte hypertrophy: the implication for articular cartilage repair.* Arthritis Research & Therapy, 2012. **14**(4): p. 221.
101. Kim, Y.J., H.J. Kim, and G.I. Im, *PTHrP promotes chondrogenesis and suppresses hypertrophy from both bone marrow-derived and adipose tissue-derived MSCs.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **373**(1): p. 104-8.
102. Vinatier, C., et al., *Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors.* Trends Biotechnol, 2009. **27**(5): p. 307-14.

103. Horbelt, D., A. Denkis, and P. Knaus, *A portrait of Transforming Growth Factor beta superfamily signalling: Background matters*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(3): p. 469-74.
104. Wang, W., D. Rigueur, and K.M. Lyons, *TGFbeta signaling in cartilage development and maintenance*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2014. **102**(1): p. 37-51.
105. Barry, F., et al., *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components*. Exp Cell Res, 2001. **268**(2): p. 189-200.
106. Bian, L., et al., *Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF-beta3 from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels in vitro and in vivo*. Biomaterials, 2011. **32**(27): p. 6425-34.
107. Sekiya, I., et al., *Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma*. Cell Tissue Res, 2005. **320**(2): p. 269-76.
108. Cals, F.L., et al., *Effects of transforming growth factor-beta subtypes on in vitro cartilage production and mineralization of human bone marrow stromal-derived mesenchymal stem cells*. J Tissue Eng Regen Med, 2012. **6**(1): p. 68-76.
109. Kreuz, P.C., et al., *Classification of graft hypertrophy after autologous chondrocyte implantation of full-thickness chondral defects in the knee*. Osteoarthritis and Cartilage, 2007. **15**(12): p. 1339-1347.
110. Caron, M.M.J., et al., *Aggrecan and COMP Improve Periosteal Chondrogenesis by Delaying Chondrocyte Hypertrophic Maturation*. Front Bioeng Biotechnol, 2020. **8**: p. 1036.
111. Studer, D., et al., *Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells*. Eur Cell Mater, 2012. **24**: p. 118-35; discussion 135.
112. Chen, S., et al., *Strategies to minimize hypertrophy in cartilage engineering and regeneration*. Genes Dis, 2015. **2**(1): p. 76-95.
113. Yamashita, S., et al., *Sox9 directly promotes Bapx1 gene expression to repress Runx2 in chondrocytes*. Exp Cell Res, 2009. **315**(13): p. 2231-40.
114. Arnold, M.A., et al., *MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development*. Dev Cell, 2007. **12**(3): p. 377-89.
115. Kim, J.M., et al., *A RUNX2 stabilization pathway mediates physiologic and pathologic bone formation*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 2289.
116. Enomoto, H., et al., *Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8695-702.
117. Goldring, M.B., K. Tsuchimochi, and K. Ijiri, *The control of chondrogenesis*. J Cell Biochem, 2006. **97**(1): p. 33-44.

118. Lefebvre, V. and P. Smits, *Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2005. **75**(3): p. 200-12.
119. Inada, M., et al., *Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17192-7.
120. Fosang, A.J., et al., *Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13)*. FEBS Lett, 1996. **380**(1-2): p. 17-20.
121. Anderson, H.C., *Matrix vesicles and calcification*. Current Rheumatology Reports, 2003. **5**(3): p. 222-226.
122. Golub, E. and K. Boesze-Battaglia, *The role of alkaline phosphatase in mineralization*. Current Opinion in Orthopaedics, 2007. **18**: p. 444-448.
123. Provot, S., et al., *Nkx3.2/Bapx1 acts as a negative regulator of chondrocyte maturation*. Development, 2006. **133**(4): p. 651-62.
124. Li, T.F., et al., *Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) inhibits Runx2 expression through the PKA signaling pathway*. Exp Cell Res, 2004. **299**(1): p. 128-36.
125. Kang, J.S., et al., *Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3*. Embo j, 2005. **24**(14): p. 2543-55.
126. Mello, M. and R. Tuan, *Effects of TGF- β 1 and Triiodothyronine on cartilage maturation: In vitro analysis using long-term high-density micromass cultures of chick embryonic limb mesenchymal cells*. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 2006. **24**: p. 2095-105.
127. Miljkovic, N.D., G.M. Cooper, and K.G. Marra, *Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. **16**(10): p. 1121-30.
128. Caron, M.M., et al., *Hypertrophic differentiation during chondrogenic differentiation of progenitor cells is stimulated by BMP-2 but suppressed by BMP-7*. Osteoarthritis Cartilage, 2013. **21**(4): p. 604-13.
129. Shen, B., et al., *BMP-13 emerges as a potential inhibitor of bone formation*. Int J Biol Sci, 2009. **5**(2): p. 192-200.
130. Zeng, L., et al., *Shh establishes an Nkx3.2/Sox9 autoregulatory loop that is maintained by BMP signals to induce somitic chondrogenesis*. Genes & development, 2002. **16**: p. 1990-2005.
131. Komori, T., et al., *Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts*. Cell, 1997. **89**(5): p. 755-64.
132. Yoshida, C.A., et al., *Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog*. Genes Dev, 2004. **18**(8): p. 952-63.

133. Shibata, S., et al., *Runx2-deficient mice lack mandibular condylar cartilage and have deformed Meckel's cartilage*. *Anat Embryol (Berl)*, 2004. **208**(4): p. 273-80.
134. Wang, Y., et al., *Runx1/AML1/Cbfa2 mediates onset of mesenchymal cell differentiation toward chondrogenesis*. *J Bone Miner Res*, 2005. **20**(9): p. 1624-36.
135. Kim, E.J., et al., *Ihh and Runx2/Runx3 signaling interact to coordinate early chondrogenesis: a mouse model*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e55296.
136. Green, J.D., et al., *Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering*. *Genes Dis*, 2015. **2**(4): p. 307-327.
137. Gordeladze, J.O., et al., *Transient down-regulation of cbfa1/Runx2 by RNA interference in murine C3H10T1/2 mesenchymal stromal cells delays in vitro and in vivo osteogenesis, but does not overtly affect chondrogenesis*. *Exp Cell Res*, 2008. **314**(7): p. 1495-506.
138. Xu, J., et al., *Nanocarrier-Mediated Codelivery of Small Molecular Drugs and siRNA to Enhance Chondrogenic Differentiation and Suppress Hypertrophy of Human Mesenchymal Stem Cells*. *Advanced Functional Materials*, 2016. **26**(15): p. 2463-2472.
139. Huang, B.J., J.C. Hu, and K.A. Athanasiou, *Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage*. *Biomaterials*, 2016. **98**: p. 1-22.
140. Kreuz, P.C., et al., *Repair of focal cartilage defects with scaffold-assisted autologous chondrocyte grafts: clinical and biomechanical results 48 months after transplantation*. *Am J Sports Med*, 2011. **39**(8): p. 1697-705.
141. Ossendorf, C., et al., *Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: 2-year clinical results*. *Arthritis research & therapy*, 2007. **9**(2): p. R41-R41.
142. Schneider, U., et al., *A prospective multicenter study on the outcome of type I collagen hydrogel-based autologous chondrocyte implantation (CaReS) for the repair of articular cartilage defects in the knee*. *Am J Sports Med*, 2011. **39**(12): p. 2558-65.
143. Crawford, D.C., T.M. DeBerardino, and R.J. Williams, 3rd, *NeoCart, an autologous cartilage tissue implant, compared with microfracture for treatment of distal femoral cartilage lesions: an FDA phase-II prospective, randomized clinical trial after two years*. *J Bone Joint Surg Am*, 2012. **94**(11): p. 979-89.
144. Anderson, D.E., et al., *Magnetic Resonance Imaging Characterization and Clinical Outcomes After NeoCart Surgical Therapy as a Primary*

- Reparative Treatment for Knee Cartilage Injuries*. Am J Sports Med, 2017. **45**(4): p. 875-883.
145. Jiang, S., et al., *Clinical Application Status of Articular Cartilage Regeneration Techniques: Tissue-Engineered Cartilage Brings New Hope*. Stem Cells Int, 2020. **2020**: p. 5690252.
 146. Girotto, D., et al., *Tissue-specific gene expression in chondrocytes grown on three-dimensional hyaluronic acid scaffolds*. Biomaterials, 2003. **24**(19): p. 3265-3275.
 147. Nehrer, S., et al., *Treatment of full-thickness chondral defects with hyalograft C in the knee: a prospective clinical case series with 2 to 7 years' follow-up*. Am J Sports Med, 2009. **37 Suppl 1**: p. 81S-87S.
 148. Darling, E.M. and K.A. Athanasiou, *Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations*. J Orthop Res, 2005. **23**(2): p. 425-32.
 149. Graceffa, V., et al., *Chasing Chimeras - The elusive stable chondrogenic phenotype*. Biomaterials, 2019. **192**: p. 199-225.
 150. Wei, W. and H. Dai, *Articular cartilage and osteochondral tissue engineering techniques: Recent advances and challenges*. Bioact Mater, 2021. **6**(12): p. 4830-4855.
 151. Caplan, A.I. and D. Correa, *The MSC: an injury drugstore*. Cell Stem Cell, 2011. **9**(1): p. 11-5.
 152. Wei, X., et al., *Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy*. Acta Pharmacol Sin, 2013. **34**(6): p. 747-54.
 153. Le, H., et al., *Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration*. J Tissue Eng, 2020. **11**: p. 2041731420943839.
 154. Satue, M., et al., *Intra-articularly injected mesenchymal stem cells promote cartilage regeneration, but do not permanently engraft in distant organs*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 10153.
 155. Marlovits, S., et al., *Quantitative analysis of gene expression in human articular chondrocytes in monolayer culture*. Int J Mol Med, 2004. **13**(2): p. 281-7.
 156. Schnabel, M., et al., *Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**(1): p. 62-70.
 157. Nava, M.M., et al., *The effect of scaffold pore size in cartilage tissue engineering*. J Appl Biomater Funct Mater, 2016. **14**(3): p. e223-9.
 158. Camarero-Espinosa, S., et al., *Additive manufactured, highly resilient, elastic, and biodegradable poly(ester)urethane scaffolds with chondroinductive properties for cartilage tissue engineering*. Materials Today Bio, 2020. **6**: p. 100051.
 159. Zamanlui, S., et al., *Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on PCL/PLGA electrospun with*

- different alignments and compositions.* International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2017. **67**(1): p. 50-60.
160. Nehrer, S., et al., *Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes.* Biomaterials, 1997. **18**(11): p. 769-76.
 161. Kuberka, M., et al., *Magnification of the pore size in biodegradable collagen sponges.* Int J Artif Organs, 2002. **25**(1): p. 67-73.
 162. Lee, K.-X.A., et al., *3D functional scaffolds for cartilage tissue engineering.* 2018: p. 391-421.
 163. Ouyang, X., Y. Xie, and G. Wang, *Mechanical stimulation promotes the proliferation and the cartilage phenotype of mesenchymal stem cells and chondrocytes co-cultured in vitro.* Biomed Pharmacother, 2019. **117**: p. 109146.
 164. Xie, Y., et al., *Proper mechanical stimulation improve the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: Improve the viscoelasticity and chondrogenic phenotype.* Biomed Pharmacother, 2019. **115**: p. 108935.
 165. Choi, J.W., et al., *Mechanical stimulation by ultrasound enhances chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a fibrin-hyaluronic acid hydrogel.* Artif Organs, 2013. **37**(7): p. 648-55.
 166. Morille, M., et al., *PLGA-based microcarriers induce mesenchymal stem cell chondrogenesis and stimulate cartilage repair in osteoarthritis.* Biomaterials, 2016. **88**: p. 60-9.
 167. Middleton, J.C. and A.J. Tipton, *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices.* Biomaterials, 2000. **21**(23): p. 2335-46.
 168. Lima, A.C., et al., *Biodegradable polymers: an update on drug delivery in bone and cartilage diseases.* Expert Opin Drug Deliv, 2019. **16**(8): p. 795-813.
 169. Xing, M. and S.-B. Tsai, *Tissue Engineering Scaffold Materials to Repair Sports Cartilage Injury.* Mathematical Problems in Engineering, 2021. **2021**: p. 1-9.
 170. Bouffi, C., et al., *The role of pharmacologically active microcarriers releasing TGF-beta3 in cartilage formation in vivo by mesenchymal stem cells.* Biomaterials, 2010. **31**(25): p. 6485-93.
 171. Rahman, M.S. and T. Tsuchiya, *Enhancement of chondrogenic differentiation of human articular chondrocytes by biodegradable polymers.* Tissue Eng, 2001. **7**(6): p. 781-90.
 172. Jeon, Y.H., et al., *Different effects of PLGA and chitosan scaffolds on human cartilage tissue engineering.* J Craniofac Surg, 2007. **18**(6): p. 1249-58.
 173. Sokolsky-Papkov, M., et al., *Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering.* Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(4-5): p. 187-206.

174. Chia, S.L., et al., *Biodegradable elastomeric polyurethane membranes as chondrocyte carriers for cartilage repair*. Tissue Eng, 2006. **12**(7): p. 1945-53.
175. Gugala, Z. and S. Gogolewski, *In vitro growth and activity of primary chondrocytes on a resorbable polylactide three-dimensional scaffold*. J Biomed Mater Res, 2000. **49**(2): p. 183-91.
176. Grad, S., et al., *The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations*. Biomaterials, 2003. **24**(28): p. 5163-5171.
177. Raghunath, J., et al., *Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage*. Biotechnol Appl Biochem, 2007. **46**(Pt 2): p. 73-84.
178. Liu, M., et al., *Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering*. Bone Res, 2017. **5**: p. 17014.
179. Wasyleczko, M., W. Sikorska, and A. Chwojnowski, *Review of Synthetic and Hybrid Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering*. Membranes (Basel), 2020. **10**(11).
180. Drira, Z. and V.K. Yadavalli, *Nanomechanical measurements of polyethylene glycol hydrogels using atomic force microscopy*. J Mech Behav Biomed Mater, 2013. **18**: p. 20-8.
181. Yang, X., et al., *Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2018. **83**: p. 195-201.
182. Costantini, M., et al., *3D bioprinting of BM-MSCs-loaded ECM biomimetic hydrogels for in vitro neocartilage formation*. Biofabrication, 2016. **8**(3): p. 035002.
183. Daly, A.C., et al., *A comparison of different bioinks for 3D bioprinting of fibrocartilage and hyaline cartilage*. Biofabrication, 2016. **8**(4): p. 045002.
184. Mata, M., et al., *In Vivo Articular Cartilage Regeneration Using Human Dental Pulp Stem Cells Cultured in an Alginate Scaffold: A Preliminary Study*. Stem Cells Int, 2017. **2017**: p. 8309256.
185. Rastogi, P. and B. Kandasubramanian, *Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering*. Biofabrication, 2019. **11**(4): p. 042001.
186. Caterson, E.J., et al., *Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells seeded in polylactide/alginate amalgam*. J Biomed Mater Res, 2001. **57**(3): p. 394-403.
187. Benya, P.D. and J.D. Shaffer, *Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels*. Cell, 1982. **30**(1): p. 215-24.

188. Oliver-Ferrandiz, M., et al., *Alginate-Agarose Hydrogels Improve the In Vitro Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells in Chondrocytes. A Histological Study*. Biomedicines, 2021. **9**(7).
189. Zarrintaj, P., et al., *A Novel Electroactive Agarose-Aniline Pentamer Platform as a Potential Candidate for Neural Tissue Engineering*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 17187.
190. Salati, M.A., et al., *Agarose-Based Biomaterials: Opportunities and Challenges in Cartilage Tissue Engineering*. Polymers (Basel), 2020. **12**(5).
191. Heo, D.N., et al., *Comparison of polysaccharides in articular cartilage regeneration associated with chondrogenic and autophagy-related gene expression*. Int J Biol Macromol, 2020. **146**: p. 922-930.
192. Brown, T.J., U.B. Laurent, and J.R. Fraser, *Turnover of hyaluronan in synovial joints: elimination of labelled hyaluronan from the knee joint of the rabbit*. Exp Physiol, 1991. **76**(1): p. 125-34.
193. Larsen, N.E., et al., *Clearance kinetics of a hylan-based viscosupplement after intra-articular and intravenous administration in animal models*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2012. **100**(2): p. 457-62.
194. Jin, Y., et al., *Injectable anti-inflammatory hyaluronic acid hydrogel for osteoarthritic cartilage repair*. Materials Science and Engineering: C, 2020. **115**: p. 111096.
195. Camci-Unal, G., et al., *Hydrogel surfaces to promote attachment and spreading of endothelial progenitor cells*. J Tissue Eng Regen Med, 2013. **7**(5): p. 337-47.
196. Chaffey, N., Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. *Molecular biology of the cell. 4th edn*. Annals of Botany, 2003. **91**(3): p. 401-401.
197. Parenteau-Bareil, R., R. Gauvin, and F. Berthod, *Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications*. Materials, 2010. **3**(3): p. 1863-1887.
198. Bosnakovski, D., et al., *Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis*. Biotechnol Bioeng, 2006. **93**(6): p. 1152-63.
199. Noth, U., et al., *Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels*. J Biomed Mater Res A, 2007. **83**(3): p. 626-35.
200. Matsiko, A., J.P. Gleeson, and F.J. O'Brien, *Scaffold mean pore size influences mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation and matrix deposition*. Tissue Eng Part A, 2015. **21**(3-4): p. 486-97.

201. Hunziker, E.B., *Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**(6): p. 432-63.
202. Hoque, M.E., et al., *Gelatin Based Scaffolds For Tissue Engineering – A review*. Polymers Research Journal, 2015. **9**: p. 15-32.
203. Chen, S., et al., *Gelatin Scaffolds with Controlled Pore Structure and Mechanical Property for Cartilage Tissue Engineering*. Tissue Eng Part C Methods, 2016. **22**(3): p. 189-98.
204. Amadori, S., et al., *Highly Porous Gelatin Reinforced 3D Scaffolds for Articular Cartilage Regeneration*. Macromol Biosci, 2015. **15**(7): p. 941-52.
205. de Britto, D., et al., *Quaternary Salts of Chitosan: History, Antimicrobial Features, and Prospects*. International Journal of Carbohydrate Chemistry, 2011. **2011**: p. 1-12.
206. Rao, S.B. and C.P. Sharma, *Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential*. J Biomed Mater Res, 1997. **34**(1): p. 21-8.
207. Shi, S.F., et al., *Biocompatibility of chitosan-coated iron oxide nanoparticles with osteoblast cells*. Int J Nanomedicine, 2012. **7**: p. 5593-602.
208. Kean, T. and M. Thanou, *Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(1): p. 3-11.
209. Ravi Kumar, M.N.V., *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive and Functional Polymers, 2000. **46**(1): p. 1-27.
210. Suh, J.K. and H.W. Matthew, *Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review*. Biomaterials, 2000. **21**(24): p. 2589-98.
211. Li, H., et al., *Chitosan composite scaffolds for articular cartilage defect repair: a review*. RSC Advances, 2018. **8**(7): p. 3736-3749.
212. Lahiji, A., et al., *Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes*. J Biomed Mater Res, 2000. **51**(4): p. 586-95.
213. Hoemann, C.D., et al., *Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. **13**(4): p. 318-29.
214. Chung, C. and J.A. Burdick, *Engineering cartilage tissue*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(2): p. 243-62.
215. Nettles, D.L., S.H. Elder, and J.A. Gilbert, *Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering*. Tissue Eng, 2002. **8**(6): p. 1009-16.
216. Wang, Y., et al., *Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes*. Biomaterials, 2006. **27**(25): p. 4434-42.

217. Wang, Y., et al., *In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells*. Biomaterials, 2005. **26**(34): p. 7082-94.
218. Asadi, N., et al., *Nanocomposite hydrogels for cartilage tissue engineering: a review*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018. **46**(3): p. 465-471.
219. Hoffman, A.S., *Hydrogels for biomedical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. **64**: p. 18-23.
220. Klouda, L., *Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications: A seven-year update*. Eur J Pharm Biopharm, 2015. **97**(Pt B): p. 338-49.
221. Loh, X.J., et al., *Controlled drug release from biodegradable thermoresponsive physical hydrogel nanofibers*. J Control Release, 2010. **143**(2): p. 175-82.
222. Li, W.J., et al., *Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds*. J Biomed Mater Res A, 2003. **67**(4): p. 1105-14.
223. Chen, Y., et al., *Three-dimensional porous gas-foamed electrospun nanofiber scaffold for cartilage regeneration*. J Colloid Interface Sci, 2021. **603**: p. 94-109.
224. Chen, A.X., et al., *Disruption of cell-cell contact-mediated notch signaling via hydrogel encapsulation reduces mesenchymal stem cell chondrogenic potential: winner of the Society for Biomaterials Student Award in the Undergraduate Category, Charlotte, NC, April 15 to 18, 2015*. J Biomed Mater Res A, 2015. **103**(4): p. 1291-302.
225. Zhang, J., et al., *Development and evaluation of a novel phytosome-loaded chitosan microsphere system for curcumin delivery*. Int J Pharm, 2013. **448**(1): p. 168-74.
226. Mathieu, M., et al., *Induction of mesenchymal stem cell differentiation and cartilage formation by cross-linker-free collagen microspheres*. Eur Cell Mater, 2014. **28**: p. 82-96; discussion 96-7.
227. Morille, M., et al., *New PLGA-P188-PLGA matrix enhances TGF- β 3 release from pharmacologically active microcarriers and promotes chondrogenesis of mesenchymal stem cells*. Journal of Controlled Release, 2013. **170**(1): p. 99-110.
228. Kulchar, R.J., et al., *A Review of the Use of Microparticles for Cartilage Tissue Engineering*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(19).
229. Azria, D., et al., *Elaboration of Materials with Functionality Gradients by Assembly of Chitosan-Collagen Microspheres Produced by Microfluidics*. Journal of Renewable Materials, 2018.
230. Tangtrongsup, S. and J.D. Kisiday, *Effects of Dexamethasone Concentration and Timing of Exposure on Chondrogenesis of Equine*

- Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. Cartilage*, 2016. **7**(1): p. 92-103.
231. Chijimatsu, R., et al., *Impact of dexamethasone concentration on cartilage tissue formation from human synovial derived stem cells in vitro*. *Cytotechnology*, 2018. **70**(2): p. 819-829.
232. Kang, M.L., et al., *Intra-articular delivery of kartogenin-conjugated chitosan nano/microparticles for cartilage regeneration*. *Biomaterials*, 2014. **35**(37): p. 9984-9994.
233. Cai, G., et al., *Recent advances in kartogenin for cartilage regeneration*. *J Drug Target*, 2019. **27**(1): p. 28-32.
234. Ginn, S.L., et al., *Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update*. *The journal of gene medicine*, 2018. **20**(5): p. e3015.
235. Evans, C.H., et al., *Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis*. *Hum Gene Ther*, 1996. **7**(10): p. 1261-80.
236. Evans, C.H., et al., *Gene transfer to human joints: progress toward a gene therapy of arthritis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(24): p. 8698-703.
237. Grol, M.W. and B.H. Lee, *Gene therapy for repair and regeneration of bone and cartilage*. *Curr Opin Pharmacol*, 2018. **40**: p. 59-66.
238. Uzieliene, I., et al., *Non-viral Gene Therapy for Osteoarthritis*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020. **8**: p. 618399.
239. Cherian, J.J., et al., *Preliminary results of a phase II randomized study to determine the efficacy and safety of genetically engineered allogeneic human chondrocytes expressing TGF-beta1 in patients with grade 3 chronic degenerative joint disease of the knee*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015. **23**(12): p. 2109-2118.
240. Ha, C.W., et al., *A Multicenter, Single-Blind, Phase IIa Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of a Cell-Mediated Gene Therapy in Degenerative Knee Arthritis Patients*. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2015. **26**(2): p. 125-30.
241. Lee, M.C., et al., *A placebo-controlled randomised trial to assess the effect of TGF- β 1-expressing chondrocytes in patients with arthritis of the knee*. *Bone Joint J*, 2015. **97-b**(7): p. 924-32.
242. Noh, M.J., et al., *Pre-clinical studies of retrovirally transduced human chondrocytes expressing transforming growth factor-beta-1 (TG-C)*. *Cytherapy*, 2010. **12**(3): p. 384-93.
243. Chan, J.M., et al., *Intraarticular gene transfer of TNFR:Fc suppresses experimental arthritis with reduced systemic distribution of the gene product*. *Mol Ther*, 2002. **6**(6): p. 727-36.

244. Frisbie, D.D., et al., *Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene*. *Gene Therapy*, 2002. **9**(1): p. 12-20.
245. Morscheid, S., J.K. Venkatesan, and A. Rey-Rico, *Remodeling of Human Osteochondral Defects via rAAV-Mediated Co-Overexpression of TGF- β and IGF-I from Implanted Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells*. 2019. **8**(9).
246. Lee, K., et al., *Regeneration of Hyaline Cartilage by Cell-Mediated Gene Therapy Using Transforming Growth Factor β 1-Producing Fibroblasts*. *Human gene therapy*, 2001. **12**: p. 1805-13.
247. Weissenberger, M., et al., *Reduced hypertrophy in vitro after chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells following adenoviral SOX9 gene delivery*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2020. **21**(1): p. 109.
248. Raftery, R.M., et al., *Activation of the SOX-5, SOX-6, and SOX-9 Trio of Transcription Factors Using a Gene-Activated Scaffold Stimulates Mesenchymal Stromal Cell Chondrogenesis and Inhibits Endochondral Ossification*. *Adv Healthc Mater*, 2020. **9**(10): p. e1901827.
249. Raisin, S., E. Belamie, and M. Morille, *Non-viral gene activated matrices for mesenchymal stem cells based tissue engineering of bone and cartilage*. *Biomaterials*, 2016. **104**: p. 223-37.
250. Meyerrose, T., et al., *Mesenchymal stem cells for the sustained in vivo delivery of bioactive factors*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010. **62**(12): p. 1167-74.
251. Armbruster, N., et al., *Rescued Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells under Interleukin 1 Challenge by Foamyviral Interleukin 1 Receptor Antagonist Gene Transfer*. *Front Pharmacol*, 2017. **8**: p. 255.
252. Gabner, S., et al., *Cytokine-induced interleukin-1 receptor antagonist protein expression in genetically engineered equine mesenchymal stem cells for osteoarthritis treatment*. *J Gene Med*, 2018. **20**(5): p. e3021.
253. Gabner, S., et al., *Inflammation-induced transgene expression in genetically engineered equine mesenchymal stem cells*. *J Gene Med*, 2016. **18**(8): p. 154-64.
254. van der Kraan, P.M., *The changing role of TGFbeta in healthy, ageing and osteoarthritic joints*. *Nat Rev Rheumatol*, 2017. **13**(3): p. 155-163.
255. Seok, H., et al., *Evaluation and control of miRNA-like off-target repression for RNA interference*. *Cell Mol Life Sci*, 2018. **75**(5): p. 797-814.
256. Daugaard, I. and T.B. Hansen, *Biogenesis and Function of Ago-Associated RNAs*. *Trends Genet*, 2017. **33**(3): p. 208-219.
257. O'Brien, J., et al., *Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. **9**: p. 402.

258. Nozawa, M. and S. Kinjo, *Noncoding RNAs, Origin and Evolution of*. 2016: p. 130-135.
259. Gibson, G. and H. Asahara, *microRNAs and cartilage*. J Orthop Res, 2013. **31**(9): p. 1333-44.
260. Hong, E. and A.H. Reddi, *MicroRNAs in chondrogenesis, articular cartilage, and osteoarthritis: implications for tissue engineering*. Tissue Eng Part B Rev, 2012. **18**(6): p. 445-53.
261. Asahara, H., *Current Status and Strategy of microRNA Research for Cartilage Development and Osteoarthritis Pathogenesis*. J Bone Metab, 2016. **23**(3): p. 121-7.
262. Miyaki, S., et al., *MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis*. Genes Dev, 2010. **24**(11): p. 1173-85.
263. Miyaki, S., et al., *MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(9): p. 2723-30.
264. Duan, L., et al., *Recent progress on the role of miR-140 in cartilage matrix remodelling and its implications for osteoarthritis treatment*. Arthritis Research & Therapy, 2020. **22**(1): p. 194.
265. Rajagopal, K., et al., *Controlled Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Hyaline Cartilage in miR-140-Activated Collagen Hydrogel*. 2021. **13**(2_suppl): p. 571s-581s.
266. Geng, Y., et al., *Intra-articular injection of hUC-MSCs expressing miR-140-5p induces cartilage self-repairing in the rat osteoarthritis*. J Bone Miner Metab, 2020. **38**(3): p. 277-288.
267. Zhou, L., et al., *Short interfering RNA (siRNA)-Based Therapeutics for Cartilage Diseases*. Regen Eng Transl Med, 2020. **7**(3): p. 283-290.
268. Wang, S., et al., *A novel therapeutic strategy for cartilage diseases based on lipid nanoparticle-RNAi delivery system*. International journal of nanomedicine, 2018. **13**: p. 617-631.
269. Gonzalez-Fernandez, T., D.J. Kelly, and F.J. O'Brien, *Controlled Non-Viral Gene Delivery in Cartilage and Bone Repair: Current Strategies and Future Directions*. Advanced Therapeutics, 2018. **1**(7): p. 1800038.
270. Gantenbein, B., et al., *Non-viral Gene Delivery Methods for Bone and Joints*. Front Bioeng Biotechnol, 2020. **8**: p. 598466.
271. Cucchiarini, M., et al., *New trends in articular cartilage repair*. J Exp Orthop, 2015. **2**(1): p. 8.
272. McMahon, J.M., et al., *Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors*. Stem Cells Dev, 2006. **15**(1): p. 87-96.
273. Evans, C.H., et al., *Gene therapeutic approaches-transfer in vivo*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(2): p. 243-58.

274. Saraf, A. and A.G. Mikos, *Gene delivery strategies for cartilage tissue engineering*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006. **58**(4): p. 592-603.
275. Bellavia, D., et al., *Gene therapy for chondral and osteochondral regeneration: is the future now?* *Cell Mol Life Sci*, 2018. **75**(4): p. 649-667.
276. Thomas, C.E., A. Ehrhardt, and M.A. Kay, *Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy*. *Nat Rev Genet*, 2003. **4**(5): p. 346-58.
277. Baldo, A., et al., *General considerations on the biosafety of virus-derived vectors used in gene therapy and vaccination*. *Current gene therapy*, 2013. **13**(6): p. 385-394.
278. Ghosh, S., et al., *Viral Vector Systems for Gene Therapy: A Comprehensive Literature Review of Progress and Biosafety Challenges*. *Applied Biosafety*, 2020. **25**(1): p. 7-18.
279. Graceffa, V., et al., *State of art and limitations in genetic engineering to induce stable chondrogenic phenotype*. *Biotechnol Adv*, 2018. **36**(7): p. 1855-1869.
280. Bouard, D., D. Alazard-Dany, and F.L. Cosset, *Viral vectors: from virology to transgene expression*. *Br J Pharmacol*, 2009. **157**(2): p. 153-65.
281. Shive, M.S. and J.M. Anderson, *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997. **28**(1): p. 5-24.
282. Prokop, A., et al., *Maximizing the in vivo efficiency of gene transfer by means of nonviral polymeric gene delivery vehicles*. *J Pharm Sci*, 2002. **91**(1): p. 67-76.
283. Pack, D.W., et al., *Design and development of polymers for gene delivery*. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. **4**(7): p. 581-93.
284. Patil, S., et al., *The Development of Functional Non-Viral Vectors for Gene Delivery*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(21).
285. Zelphati, O., et al., *Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1998. **1390**(2): p. 119-133.
286. Gaspar, R. and F. Coelho, *Lipid-Nucleic Acid Complexes: Physicochemical Aspects and Prospects for Cancer Treatment*. 2020. **25**(21).
287. Samaridou, E., J. Heyes, and P. Lutwyche, *Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020. **154-155**: p. 37-63.
288. Wagner, D.E. and S.B. Bhaduri, *Progress and outlook of inorganic nanoparticles for delivery of nucleic acid sequences related to orthopedic pathologies: a review*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2012. **18**(1): p. 1-14.

289. Dizaj, S.M., S. Jafari, and A.Y. Khosroushahi, *A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors*. *Nanoscale Res Lett*, 2014. **9**(1): p. 252.
290. Riley, M.K. and W. Vermerris, *Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery-A Review*. *Nanomaterials (Basel)*, 2017. **7**(5).
291. Yang, R., et al., *Recent advances in polymeric biomaterials-based gene delivery for cartilage repair*. *Bioact Mater*, 2020. **5**(4): p. 990-1003.
292. Cucchiarini, M. and H. Madry, *Biomaterial-guided delivery of gene vectors for targeted articular cartilage repair*. *Nat Rev Rheumatol*, 2019. **15**(1): p. 18-29.
293. Pi, Y., et al., *Targeted delivery of non-viral vectors to cartilage in vivo using a chondrocyte-homing peptide identified by phage display*. *Biomaterials*, 2011. **32**(26): p. 6324-32.
294. Wang, W., et al., *In vivo restoration of full-thickness cartilage defects by poly(lactide-co-glycolide) sponges filled with fibrin gel, bone marrow mesenchymal stem cells and DNA complexes*. *Biomaterials*, 2010. **31**(23): p. 5953-65.
295. Jeon, S.Y., et al., *Co-delivery of SOX9 genes and anti-Cbfa-1 siRNA coated onto PLGA nanoparticles for chondrogenesis of human MSCs*. *Biomaterials*, 2012. **33**(17): p. 4413-23.
296. Li, B., et al., *Fabrication of poly(lactide-co-glycolide) scaffold filled with fibrin gel, mesenchymal stem cells, and poly(ethylene oxide)-b-poly(L-lysine)/TGF- β 1 plasmid DNA complexes for cartilage restoration in vivo*. *J Biomed Mater Res A*, 2013. **101**(11): p. 3097-108.
297. Aini, H., et al., *Messenger RNA delivery of a cartilage-anabolic transcription factor as a disease-modifying strategy for osteoarthritis treatment*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 18743.
298. Uchida, S., et al., *In vivo messenger RNA introduction into the central nervous system using polyplex nanomicelle*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56220.
299. Raisin, S., et al., *Tripartite polyionic complex (PIC) micelles as non-viral vectors for mesenchymal stem cell siRNA transfection*. *Biomater Sci*, 2017. **5**(9): p. 1910-1921.
300. Cölfen, H., *Double-Hydrophilic Block Copolymers: Synthesis and Application as Novel Surfactants and Crystal Growth Modifiers*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2001. **22**(4): p. 219-252.
301. Geisow, M.J. and W.H. Evans, *pH in the endosome. Measurements during pinocytosis and receptor-mediated endocytosis*. *Exp Cell Res*, 1984. **150**(1): p. 36-46.
302. Tila, D., et al., *pH-sensitive, polymer modified, plasma stable niosomes: promising carriers for anti-cancer drugs*. *EXCLI J*, 2015. **14**: p. 21-32.

303. Felgner, P.L., et al., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7413-7.
304. Rädler, J.O., et al., *Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes*. Science, 1997. **275**(5301): p. 810-4.
305. Allain, V., C. Bourgaux, and P. Couvreur, *Self-assembled nucleolipids: from supramolecular structure to soft nucleic acid and drug delivery devices*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(5): p. 1891-903.
306. Ma, B., et al., *Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery*. Journal of Controlled Release, 2007. **123**(3): p. 184-194.
307. Koltover, I., et al., *An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery*. Science, 1998. **281**(5373): p. 78-81.
308. Hou, X., et al., *Lipid nanoparticles for mRNA delivery*. Nature Reviews Materials, 2021. **6**(12): p. 1078-1094.
309. Anderson, E.J., et al., *Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults*. N Engl J Med, 2020. **383**(25): p. 2427-2438.
310. Stanescu, R. and S.J. Leibovich, *The negative charge of articular cartilage surfaces*. Arthritis Rheum, 1986. **29**(4): p. 573.
311. Qadir, A., et al., *Non-Viral Delivery System and Targeted Bone Disease Therapy*. 2019. **20**(3).
312. Picquet, E., et al., *Cationic lipophosphoramidates and lipophosphoguanidines are very efficient for in vivo DNA delivery*. Bioconj Chem, 2005. **16**(5): p. 1051-3.
313. Floch, V., et al., *Cation substitution in cationic phosphonolipids: a new concept to improve transfection activity and decrease cellular toxicity*. J Med Chem, 2000. **43**(24): p. 4617-28.
314. Berchel, M., et al., *Lipophosphonate/lipophosphoramidates: a family of synthetic vectors efficient for gene delivery*. Biochimie, 2012. **94**(1): p. 33-41.
315. Belmadi, N., et al., *Evaluation of New Fluorescent Lipophosphoramidates for Gene Transfer and Biodistribution Studies after Systemic Administration*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(11): p. 26055-76.
316. Le Gall, T., et al., *A novel cationic lipophosphoramidate with diunsaturated lipid chains: synthesis, physicochemical properties, and transfection activities*. J Med Chem, 2010. **53**(4): p. 1496-508.
317. Du, Z., et al., *The role of the helper lipid on the DNA transfection efficiency of lipopolyplex formulations*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 7107.

318. Mochizuki, S., et al., *The role of the helper lipid dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) for DNA transfection cooperating with a cationic lipid bearing ethylenediamine*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1828**(2): p. 412-8.
319. Faneca, H., S. Simões, and M.C. Pedroso de Lima, *Evaluation of lipid-based reagents to mediate intracellular gene delivery*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2002. **1567**: p. 23-33.
320. Kowalski, P.S., et al., *Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery*. *Mol Ther*, 2019. **27**(4): p. 710-728.
321. Madry, H., P. Orth, and M. Cucchiaroni, *Gene Therapy for Cartilage Repair*. *Cartilage*, 2011. **2**(3): p. 201-25.
322. Buyens, K., et al., *A fast and sensitive method for measuring the integrity of siRNA-carrier complexes in full human serum*. *J Control Release*, 2008. **126**(1): p. 67-76.
323. Klibanov, A.L., et al., *Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes*. *FEBS Lett*, 1990. **268**(1): p. 235-7.
324. Papahadjopoulos, D., et al., *Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(24): p. 11460-4.
325. Martin-Herranz, A., et al., *Surface functionalized cationic lipid-DNA complexes for gene delivery: PEGylated lamellar complexes exhibit distinct DNA-DNA interaction regimes*. *Biophysical journal*, 2004. **86**(2): p. 1160-1168.
326. Morille, M., et al., *Tumor transfection after systemic injection of DNA lipid nanocapsules*. *Biomaterials*, 2011. **32**(9): p. 2327-33.
327. Suk, J.S., et al., *PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016. **99**(Pt A): p. 28-51.
328. Hattori, Y., et al., *Effects of PEG anchors in PEGylated siRNA lipoplexes on in vitro genesilencing effects and siRNA biodistribution in mice*. *Mol Med Rep*, 2020. **22**(5): p. 4183-4196.
329. Hatakeyama, H., H. Akita, and H. Harashima, *The polyethyleneglycol dilemma: advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors*. *Biol Pharm Bull*, 2013. **36**(6): p. 892-9.
330. Wang, T., J.R. Upponi, and V.P. Torchilin, *Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: dilemmas and strategies*. *Int J Pharm*, 2012. **427**(1): p. 3-20.
331. Semple, S.C., et al., *Rational design of cationic lipids for siRNA delivery*. *Nature Biotechnology*, 2010. **28**(2): p. 172-176.

332. Semple, S.C., et al., *Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2001. **1510**(1): p. 152-166.
333. Hajj, K.A. and K.A. Whitehead, *Tools for translation: non-viral materials for therapeutic mRNA delivery*. *Nature Reviews Materials*, 2017. **2**(10): p. 17056.
334. Akinc, A., et al., *The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs*. *Nat Nanotechnol*, 2019. **14**(12): p. 1084-1087.
335. Miller, J.B., et al., *Non-Viral CRISPR/Cas Gene Editing In Vitro and In Vivo Enabled by Synthetic Nanoparticle Co-Delivery of Cas9 mRNA and sgRNA*. 2017. **56**(4): p. 1059-1063.
336. Kim, J., A. Jozic, and G. Sahay, *Naturally Derived Membrane Lipids Impact Nanoparticle-Based Messenger RNA Delivery*. *Cell Mol Bioeng*, 2020: p. 1-12.
337. Patel, S., et al., *Lipid nanoparticles for delivery of messenger RNA to the back of the eye*. *J Control Release*, 2019. **303**: p. 91-100.
338. Ma, B., et al., *Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery*. *J Control Release*, 2007. **123**(3): p. 184-94.
339. Balazs, D.A. and W. Godbey, *Liposomes for use in gene delivery*. *J Drug Deliv*, 2011. **2011**: p. 326497.
340. Simberg, D., et al., *Phase behavior, DNA ordering, and size instability of cationic lipoplexes Relevance to optimal transfection activity*. *The Journal of biological chemistry*, 2002. **276**: p. 47453-9.
341. Ewert, K.K., et al., *Cationic lipid-DNA complexes for non-viral gene therapy: relating supramolecular structures to cellular pathways*. *Expert Opin Biol Ther*, 2005. **5**(1): p. 33-53.
342. Lin, A., et al., *Structure and Structure—Function Studies of Lipid/Plasmid DNA Complexes*. *Journal of Drug Targeting*, 2000. **8**(1): p. 13-27.
343. Katayama, R., et al., *Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow*. *Rheumatology (Oxford)*, 2004. **43**(8): p. 980-5.
344. Godbey, W.T., et al., *Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency*. *Gene Ther*, 1999. **6**(8): p. 1380-8.
345. Kaul, G., et al., *Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo*. *J Gene Med*, 2006. **8**(1): p. 100-11.

346. Madry, H., et al., *Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I)*. *Gene Ther*, 2005. **12**(15): p. 1171-9.
347. Madry, H. and S.B. Trippel, *Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes*. *Gene Ther*, 2000. **7**(4): p. 286-91.
348. Masotti, A., et al., *Comparison of different commercially available cationic liposome-DNA lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2009. **68**(2): p. 136-44.
349. Evers, M.J.W., et al. *State-of-the-Art Design and Rapid-Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery*. 2018.
350. Abrams, M.T., et al., *Evaluation of efficacy, biodistribution, and inflammation for a potent siRNA nanoparticle: effect of dexamethasone co-treatment*. *Molecular therapy*, 2010. **18**(1): p. 171-180.
351. Jeffs, L.B., et al., *A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA*. *Pharm Res*, 2005. **22**(3): p. 362-72.
352. Kulkarni, J.A., et al., *Design of lipid nanoparticles for in vitro and in vivo delivery of plasmid DNA*. *Nanomedicine*, 2017. **13**(4): p. 1377-1387.
353. Belliveau, N.M., et al., *Microfluidic synthesis of highly potent limit-size lipid nanoparticles for in vivo delivery of siRNA*. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2012. **1**: p. e37.
354. Leung, A.K.K., et al., *Lipid Nanoparticles Containing siRNA Synthesized by Microfluidic Mixing Exhibit an Electron-Dense Nanostructured Core*. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2012. **116**(34): p. 18440-18450.
355. Ambegia, E., et al., *Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1669**(2): p. 155-63.
356. Liu, S., et al., *Membrane-destabilizing ionizable phospholipids for organ-selective mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing*. *Nat Mater*, 2021. **20**(5): p. 701-710.
357. Smyth, T.J., et al., *Examination of the specificity of tumor cell derived exosomes with tumor cells in vitro*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2014. **1838**(11): p. 2954-2965.
358. Alvarez-Erviti, L., et al., *Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes*. *Nature Biotechnology*, 2011. **29**(4): p. 341-U179.
359. Le Saux, S., et al., *Post-production modifications of murine mesenchymal stem cell (mMSC) derived extracellular vesicles (EVs) and impact on their cellular interaction*. *Biomaterials*, 2020. **231**: p. 16.
360. Le Saux, S., et al., *Post-production modifications of murine mesenchymal stem cell (mMSC) derived extracellular vesicles (EVs) and impact on their cellular interaction*. *Biomaterials*, 2020. **231**: p. 119675.

361. van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo, *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018. **19**(4): p. 213-228.
362. S, E.L.A., et al., *Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities*. Nat Rev Drug Discov, 2013. **12**(5): p. 347-57.
363. Schwechheimer, C. and M.J. Kuehn, *Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(10): p. 605-19.
364. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 654-9.
365. Montecalvo, A., et al., *Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes*. Blood, 2012. **119**(3): p. 756-766.
366. Jiang, L., P. Vader, and R.M. Schiffelers, *Extracellular vesicles for nucleic acid delivery: progress and prospects for safe RNA-based gene therapy*. Gene Therapy, 2017. **24**(3): p. 157-166.
367. Mizrak, A., et al., *Genetically engineered microvesicles carrying suicide mRNA/protein inhibit schwannoma tumor growth*. Mol Ther, 2013. **21**(1): p. 101-8.
368. Yang, Z., et al., *Large-scale generation of functional mRNA-encapsulating exosomes via cellular nanoporation*. Nat Biomed Eng, 2020. **4**(1): p. 69-83.
369. Massaro, C., et al., *Extracellular Vesicle-Based Nucleic Acid Delivery: Current Advances and Future Perspectives in Cancer Therapeutic Strategies*. Pharmaceutics, 2020. **12**(10).
370. Tao, S.C., et al., *Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model*. Theranostics, 2017. **7**(1): p. 180-195.
371. Johnsen, K.B., et al., *Evaluation of electroporation-induced adverse effects on adipose-derived stem cell exosomes*. Cytotechnology, 2016. **68**(5): p. 2125-2138.
372. Fu, S., et al., *Exosome engineering: Current progress in cargo loading and targeted delivery*. NanoImpact, 2020. **20**: p. 100261.
373. Tominaga, N., Y. Yoshioka, and T. Ochiya, *A novel platform for cancer therapy using extracellular vesicles*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **95**: p. 50-5.
374. Didiot, M.C., et al., *Exosome-mediated Delivery of Hydrophobically Modified siRNA for Huntingtin mRNA Silencing*. Mol Ther, 2016. **24**(10): p. 1836-1847.

375. Kooijmans, S.A.A., et al., *Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles.* J Control Release, 2013. **172**(1): p. 229-238.
376. Kooijmans, S.A.A., et al., *Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles.* Journal of Controlled Release, 2013. **172**(1): p. 229-238.
377. Mendt, M., et al., *Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer.* Jci Insight, 2018. **3**(8).
378. Kamerkar, S., et al., *Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer.* Nature, 2017. **546**(7659): p. 498-+.
379. Zhang, D., et al., *Enrichment of selective miRNAs in exosomes and delivery of exosomal miRNAs in vitro and in vivo.* American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2017. **312**(1): p. L110-L121.
380. Usman, W.M., et al., *Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles.* Nature Communications, 2018. **9**.
381. Lamichhane, T.N., et al., *Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication.* Cell Mol Bioeng, 2016. **9**(3): p. 315-324.
382. Haney, M.J., et al., *Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy.* J Control Release, 2015. **207**: p. 18-30.
383. Patel, S., et al., *Messenger RNA Delivery for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications.* Tissue Eng Part A, 2019. **25**(1-2): p. 91-112.
384. Bleiziffer, O., et al., *Gene transfer strategies in tissue engineering.* J Cell Mol Med, 2007. **11**(2): p. 206-23.
385. Evans, C.H., S.C. Ghivizzani, and P.D. Robbins, *Gene Delivery to Joints by Intra-Articular Injection.* Hum Gene Ther, 2018. **29**(1): p. 2-14.
386. Decastro, M., Y. Saijoh, and G.C. Schoenwolf, *Optimized cationic lipid-based gene delivery reagents for use in developing vertebrate embryos.* Dev Dyn, 2006. **235**(8): p. 2210-9.
387. Reddy, A.M., et al., *In vivo tracking of mesenchymal stem cells labeled with a novel chitosan-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles using 3.0T MRI.* J Korean Med Sci, 2010. **25**(2): p. 211-9.
388. Ahn, H.H., et al., *Polyethyleneimine-mediated gene delivery into human adipose derived stem cells.* Biomaterials, 2008. **29**(15): p. 2415-22.
389. El Jundi, A., et al., *Degradable double hydrophilic block copolymers and tripartite polyionic complex micelles thereof for small interfering ribonucleic acids (siRNA) delivery.* J Colloid Interface Sci, 2020. **580**: p. 449-459.

390. Kim, B.K., et al., *DOTAP/DOPE ratio and cell type determine transfection efficiency with DOTAP-liposomes*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1848**(10 Pt A): p. 1996-2001.
391. Berchel, M., et al., *Cationic Lipophosphoramidates Containing a Hydroxylated Polar Headgroup for Improving Gene Delivery*. *Molecular Pharmaceutics*, 2015. **12**(6): p. 1902-1910.
392. Rana, S., et al., *Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection*. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2012. **44**(9): p. 1574-1584.
393. Hemler, M.E., *Tetraspanin functions and associated microdomains*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2005. **6**(10): p. 801-811.
394. Redzic, J.S., T.H. Ung, and M.W. Graner, *Glioblastoma extracellular vesicles: reservoirs of potential biomarkers*. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 2014. **7**: p. 65.
395. Heusermann, W., et al., *Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots, traffic within endosomes, and are targeted to the ER*. *Journal of Cell Biology*, 2016. **213**(2): p. 173-184.
396. Rols, M.P., et al., *In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma*. *Nature Biotechnology*, 1998. **16**(2): p. 168-171.
397. Paganin-Gioanni, A., et al., *Cyclin B1 knockdown mediated by clinically approved pulsed electric fields siRNA delivery induces tumor regression in murine melanoma*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020. **573**.
398. Mauroy, C., et al., *Electric Destabilization of Supramolecular Lipid Vesicles Subjected to Fast Electric Pulses*. *Langmuir*, 2015. **31**(44): p. 12215-12222.
399. Golzio, M., J. Teissie, and M.P. Rols, *Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. **99**(3): p. 1292-1297.
400. Mebarek, N., et al., *Versatile polyion complex micelles for peptide and siRNA vectorization to engineer tolerogenic dendritic cells*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015. **92**: p. 216-27.
401. Zhang, H., *Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation*. 2017. **1522**: p. 17-22.
402. Le Saux, S., et al., *Post-production modifications of murine mesenchymal stem cell (mMSC) derived extracellular vesicles (EVs) and impact on their cellular interaction*. *Biomaterials*, 2020. **231**: p. 119675-119675.
403. Kim, M.S., et al., *Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells*. *Nanomedicine*, 2016. **12**(3): p. 655-664.

404. Maria, A.T.J., et al., *Fibrosis Development in HOCl-Induced Systemic Sclerosis: A Multistage Process Hampered by Mesenchymal Stem Cells*. *Frontiers in Immunology*, 2018. **9**.
405. Domergue, S., et al., *Comparison between Stromal Vascular Fraction and Adipose Mesenchymal Stem Cells in Remodeling Hypertrophic Scars*. *PLoS One*, 2016. **11**(5): p. e0156161.
406. Shim, M.S., et al., *Dynamics of nucleic acid/cationic polymer complexation and disassembly under biologically simulated conditions using in situ atomic force microscopy*. *Microsc Res Tech*, 2010. **73**(9): p. 845-56.
407. Gorzkiewicz, M., et al., *Poly(lysine) Dendrimers Form Complexes with siRNA and Provide Its Efficient Uptake by Myeloid Cells: Model Studies for Therapeutic Nucleic Acid Delivery*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(9).
408. Höbel, S. and A. Aigner, *Polyethylenimine (PEI)/siRNA-mediated gene knockdown in vitro and in vivo*. *Methods Mol Biol*, 2010. **623**: p. 283-97.
409. Wirth, M., et al., *A simple and cost-effective method to transfect small interfering RNAs into pancreatic cancer cell lines using polyethylenimine*. *Pancreas*, 2011. **40**(1): p. 144-50.
410. Urban-Klein, B., et al., *RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo*. *Gene Ther*, 2005. **12**(5): p. 461-6.
411. Wu, L., et al., *Gene delivery ability of polyethylenimine and polyethylene glycol dual-functionalized nanographene oxide in 11 different cell lines*. 2017. **4**(10): p. 170822.
412. Patil, M.L., M. Zhang, and T. Minko, *Multifunctional triblock Nanocarrier (PAMAM-PEG-PLL) for the efficient intracellular siRNA delivery and gene silencing*. *ACS Nano*, 2011. **5**(3): p. 1877-87.
413. Benjaminsen, R.V., et al., *The possible "proton sponge " effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH*. *Mol Ther*, 2013. **21**(1): p. 149-57.
414. Freeman, E.C., L.M. Weiland, and W.S. Meng, *Modeling the proton sponge hypothesis: examining proton sponge effectiveness for enhancing intracellular gene delivery through multiscale modeling*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2013. **24**(4): p. 398-416.
415. Woodrow, K.A., et al., *Intravaginal gene silencing using biodegradable polymer nanoparticles densely loaded with small-interfering RNA*. *Nat Mater*, 2009. **8**(6): p. 526-33.
416. Sung, S.J., et al., *Effect of polyethylene glycol on gene delivery of polyethylenimine*. *Biol Pharm Bull*, 2003. **26**(4): p. 492-500.
417. Bally, M.B., et al., *Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers*. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999. **38**(3): p. 291-315.

418. Romoren, K., et al., *Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in salmonid cell lines of hepatocyte and macrophage origin*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1663**(1-2): p. 127-34.
419. Ross, P.C. and S.W. Hui, *Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency*. Gene Ther, 1999. **6**(4): p. 651-9.
420. Sato, Y.T., et al., *Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 21933.
421. Pick, U., *Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures*. Arch Biochem Biophys, 1981. **212**(1): p. 186-94.
422. Oku, N. and R.C. MacDonald, *Differential effects of alkali metal chlorides on formation of giant liposomes by freezing and thawing and by dialysis*. Biochemistry, 1983. **22**(4): p. 855-863.
423. Castile, J.D. and K.M.G. Taylor, *Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze-thaw extrusion*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. **188**(1): p. 87-95.
424. Alvarez-Erviti, L., et al., *Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(4): p. 341-5.
425. Narayanan, E., *Exosomes as Drug Delivery Vehicles for Cancer Treatment*. Current Nanoscience, 2020. **16**(1): p. 15-26.
426. Van Deun, J., et al., *Feasibility of Mechanical Extrusion to Coat Nanoparticles with Extracellular Vesicle Membranes*. Cells, 2020. **9**(8).
427. Li, Y.J., et al., *Gemcitabine loaded autologous exosomes for effective and safe chemotherapy of pancreatic cancer*. Acta Biomater, 2020. **101**: p. 519-530.
428. Kuriyama, N., Y. Yoshioka, and S. Kikuchi, *Challenges for the Development of Extracellular Vesicle-Based Nucleic Acid Medicines*. 2021. **13**(23).
429. Stapulionis, R., *Electric pulse-induced precipitation of biological macromolecules in electroporation*. Bioelectrochem Bioenerg, 1999. **48**(1): p. 249-54.
430. Liang, G., et al., *Engineered exosomes for targeted co-delivery of miR-21 inhibitor and chemotherapeutics to reverse drug resistance in colon cancer*. J Nanobiotechnology, 2020. **18**(1): p. 10.
431. Lamichhane, T.N. and S.M. Jay, *Production of Extracellular Vesicles Loaded with Therapeutic Cargo*. Methods Mol Biol, 2018. **1831**: p. 37-47.
432. Young, M., M. Dinda, and M. Singer, *Effect of Tween 80 on lipid vesicle permeability*. Biochim Biophys Acta, 1983. **735**(3): p. 429-32.
433. Osteikoetxea, X., et al., *Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations*. Org Biomol Chem, 2015. **13**(38): p. 9775-82.

434. Akuma, P., O.D. Okagu, and C.C. Udenigwe, *Naturally Occurring Exosome Vesicles as Potential Delivery Vehicle for Bioactive Compounds*. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2019. **3**.
435. Kwon, M. and B.L. Firestein, *DNA transfection: calcium phosphate method*. *Methods Mol Biol*, 2013. **1018**: p. 107-10.
436. Felgner, P.L., et al., *Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy*. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. **772**: p. 126-39.
437. Kanasty, R., et al., *Delivery materials for siRNA therapeutics*. *Nature Materials*, 2013. **12**(11): p. 967-977.
438. Akinc, A., et al., *The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs*. *Nature Nanotechnology*, 2019. **14**(12): p. 1084-1087.
439. Kulkarni, J.A., et al., *The current landscape of nucleic acid therapeutics*. *Nature Nanotechnology*, 2021. **16**(6): p. 630-643.
440. Choosakoonkriang, S., et al., *Infrared spectroscopic characterization of the interaction of cationic lipids with plasmid DNA*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(11): p. 8037-43.
441. Fillion, M.C. and N.C. Phillips, *Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1329**(2): p. 345-56.
442. Romoren, K., et al., *Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1717**(1): p. 50-7.
443. Laurent, V., et al., *Highly efficient gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells: new means for drug metabolism and toxicity studies*. *Biotechnol J*, 2010. **5**(3): p. 314-20.
444. Schlegel, A., et al., *Reduced in vitro and in vivo toxicity of siRNA-lipoplexes with addition of polyglutamate*. *J Control Release*, 2013. **165**(1): p. 1-8.
445. Qian, Y., et al., *Hyaluronan Reduces Cationic Liposome-Induced Toxicity and Enhances the Antitumor Effect of Targeted Gene Delivery in Mice*. 2018. **10**(38): p. 32006-32016.
446. Almofti, M.R., et al., *Lipoplex size determines lipofection efficiency with or without serum*. *Mol Membr Biol*, 2003. **20**(1): p. 35-43.
447. Taetz, S., et al., *Hyaluronic acid-modified DOTAP/DOPE liposomes for the targeted delivery of anti-telomerase siRNA to CD44-expressing lung cancer cells*. *Oligonucleotides*, 2009. **19**(2): p. 103-16.
448. Khatri, N., et al., *Development and characterization of siRNA lipoplexes: Effect of different lipids, in vitro evaluation in cancerous cell lines and in vivo toxicity study*. *AAPS PharmSciTech*, 2014. **15**(6): p. 1630-43.

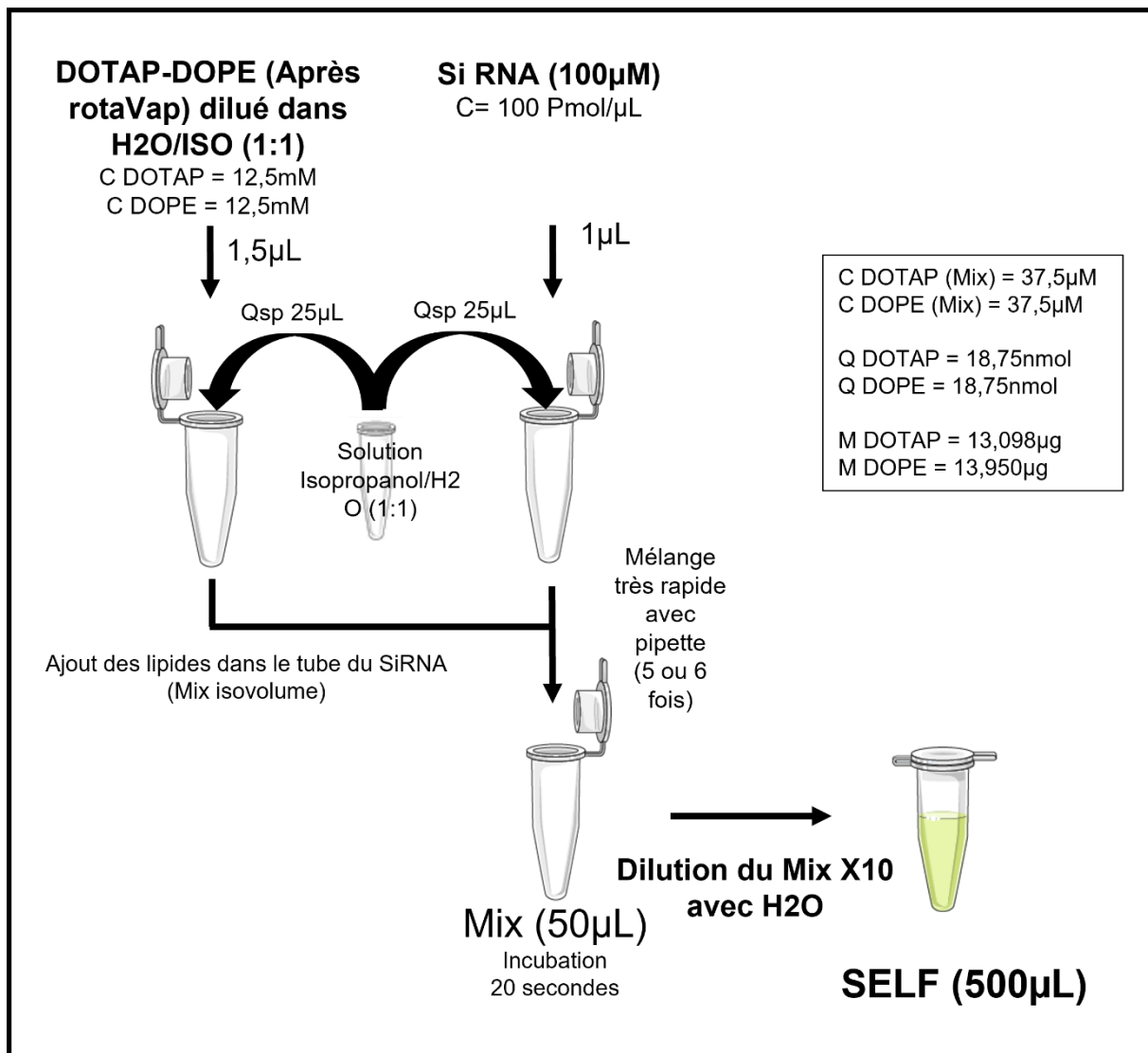
449. Sou, K., *Electrostatics of carboxylated anionic vesicles for improving entrapment capacity*. Chemistry and Physics of Lipids, 2011. **164**(3): p. 211-215.
450. Brgles, M., et al., *Entrapment of ovalbumin into liposomes--factors affecting entrapment efficiency, liposome size, and zeta potential*. J Liposome Res, 2008. **18**(3): p. 235-48.
451. van der Woude, I., et al., *Parameters influencing the introduction of plasmid DNA into cells by the use of synthetic amphiphiles as a carrier system*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1240**(1): p. 34-40.
452. Resina, S., P. Prevot, and A.R. Thierry, *Physico-chemical characteristics of lipoplexes influence cell uptake mechanisms and transfection efficacy*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e6058.
453. Eliyahu, H., et al., *Lipoplex-induced hemagglutination: potential involvement in intravenous gene delivery*. Gene Ther, 2002. **9**(13): p. 850-8.
454. Mevel, M., et al., *Synthesis and transfection activity of new cationic phosphoramidate lipids: high efficiency of an imidazolium derivative*. Chembiochem, 2008. **9**(9): p. 1462-71.
455. Khalil, M., et al., *Phosphonodithioester–Amine Coupling as a Key Reaction Step for the Design of Cationic Amphiphiles Used for Gene Delivery*. Molecules, 2021. **26**(24): p. 7507.
456. Zhang, L., et al., *Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems*. Biotechnol Lett, 2010. **32**(9): p. 1339-46.
457. Mathieu, M., et al., *Collagen-Based Microspheres Delivering TGF-beta 3 For Mesenchymal Stem Cell Differentiation: An Innovative Strategy For Cartilage Engineering*. Arthritis and Rheumatism, 2013. **65**: p. S20-S21.
458. Mueller, M.B., et al., *Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF-beta isoforms and chondrogenic conditioning*. Cells Tissues Organs, 2010. **192**(3): p. 158-66.
459. Clémot, M., R. Sênos Demarco, and D.L. Jones, *Lipid Mediated Regulation of Adult Stem Cell Behavior*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020. **8**.
460. Chang, S.F., et al., *The Impact of Lipid Types and Liposomal Formulations on Osteoblast Adiposity and Mineralization*. Molecules, 2018. **23**(1).
461. Kim, S.K., et al., *An engineered transforming growth factor β (TGF- β) monomer that functions as a dominant negative to block TGF- β signaling*. The Journal of biological chemistry, 2017. **292**(17): p. 7173-7188.
462. Wu, M., G. Chen, and Y.-P. Li, *TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease*. Bone Research, 2016. **4**(1): p. 16009.

463. Yano, F., et al., *Runx1 contributes to articular cartilage maintenance by enhancement of cartilage matrix production and suppression of hypertrophic differentiation*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 7666.
464. Komori, T., *Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development*. J Cell Biochem, 2002. **87**(1): p. 1-8.
465. Cheng, A. and P.G. Genever, *SOX9 determines RUNX2 transactivity by directing intracellular degradation*. J Bone Miner Res, 2010. **25**(12): p. 2680-9.
466. Addi, C., F. Murschel, and G. De Crescenzo, *Design and Use of Chimeric Proteins Containing a Collagen-Binding Domain for Wound Healing and Bone Regeneration*. Tissue Eng Part B Rev, 2017. **23**(2): p. 163-182.
467. Belliveau, N.M., et al., *Microfluidic Synthesis of Highly Potent Limit-size Lipid Nanoparticles for In Vivo Delivery of siRNA*. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2012. **1**.
468. Leung, A.K.K., et al., *Lipid Nanoparticles Containing siRNA Synthesized by Microfluidic Mixing Exhibit an Electron-Dense Nanostructured Core*. Journal of Physical Chemistry C, 2012. **116**(34): p. 18440-18450.
469. Lin, Y., et al., *Exosome-Liposome Hybrid Nanoparticles Deliver CRISPR/Cas9 System in MSCs*. Advanced Science, 2018. **5**(4): p. 1700611.
470. Lv, Q., et al., *Thermosensitive Exosome-Liposome Hybrid Nanoparticle-Mediated Chemoimmunotherapy for Improved Treatment of Metastatic Peritoneal Cancer*. Advanced Science, 2020. **7**(18): p. 2000515.
471. Piffoux, M., et al., *Modification of Extracellular Vesicles by Fusion with Liposomes for the Design of Personalized Biogenic Drug Delivery Systems*. ACS Nano, 2018. **12**(7): p. 6830-6842.
472. Rodríguez, D.A. and P. Vader, *Extracellular Vesicle-Based Hybrid Systems for Advanced Drug Delivery*. Pharmaceutics, 2022. **14**(2): p. 267.
473. Bheri, S., et al., *Engineering Cardiac Small Extracellular Vesicle-Derived Vehicles with Thin-Film Hydration for Customized microRNA Loading*. Journal of Cardiovascular Development and Disease, 2021. **8**(11).
474. Cruje, C. and D.B. Chithrani, *Polyethylene Glycol Functionalized Nanoparticles for Improved Cancer Treatment*. Reviews in Nanoscience and Nanotechnology, 2014. **3**(1): p. 20-30.
475. Kim, J.Y., et al., *The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator*. Biomaterials, 2009. **30**(29): p. 5751-6.
476. Woodle, M.C., M.S. Newman, and J.A. Cohen, *Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties*. J Drug Target, 1994. **2**(5): p. 397-403.

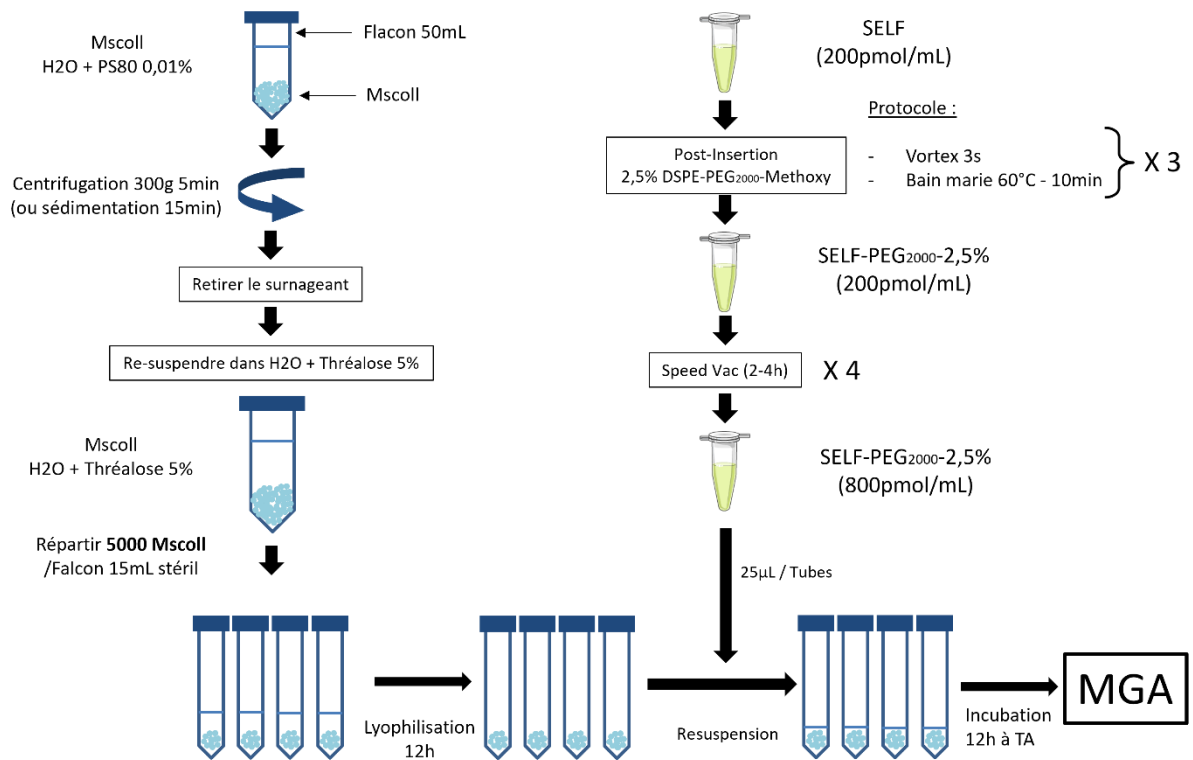
477. Gorle, S., M. Ariatti, and M. Singh, *Novel serum-tolerant lipoplexes target the folate receptor efficiently*. Eur J Pharm Sci, 2014. **59**: p. 83-93.
478. Kumar, A. and C.K. Dixit, *Methods for characterization of nanoparticles*. 2017: p. 43-58.
479. Maurel, M., et al., *Design of PEGylated Three Ligands Silica Nanoparticles for Multi-Receptor Targeting*. Nanomaterials (Basel), 2021. **11**(1).

ANNEXES

I Annexe 1 : Protocole de formulation des SELF



II Annexe 2 : Protocole de formation des MGA



III Annexe 3 : Matériels et méthodes des expériences préliminaires

Synthèse du peptide de liaison.

Le peptide CGPLGLWARK (DBCO) a été synthétisé par la société GENPEP. Ce peptide contient une séquence clivable par les MMP13 "GPLGLWAR", une cystéine terminale qui permettra le greffage sur les SELF modifiées via un groupement maléimide et un groupement DBCO sur l'autre extrémité, qui permettra le greffage sur les Mscoll-Azides par chimie clic.

Modification des SELF.

Les SELF ont été préparés selon la méthode d'échange de solvants décrite dans le chapitre précédent. Le DSPE-PEG₂₀₀₀-MET (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]) et le DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000]) (Avanti Polar Lipids), ont été dissous dans de l'eau à 2,1 mM, au-dessus de la concentration micellaire critique, à 60 °C sous agitation pendant 3 h pour former la solution mère de micelles, qui a été conservée à -20°C jusqu'à utilisation. Les SELF sont ensuite modifiés par post-insertion avec des quantités appropriées de DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL seul pour atteindre 2,5, 5 ou 7,5% de la quantité molaire totale des lipides ou par un mélange DSPE-PEG₂₀₀₀-MET / DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL (75% : 25%) pour atteindre 7,5% de la quantité molaire totale de lipides. La post-insertion est réalisée selon la méthode décrite précédemment dans la première partie du chapitre 2.

Modification des Mscoll.

Afin de modifier les Mscoll, nous avons utilisé un agent de transfert, l'imidazole sulfonyle azide hydrochloride (ISH) qui permet de convertir les amines primaires du collagène en groupement azide capables de réagir par chimie clic avec le groupement DBCO du peptide de liaison.

Les Mscoll-azide ont été préparés à partir de microsphères de collagène lyophilisées dans les mêmes conditions que décrite dans le chapitre précédent. Les microsphères lyophilisées sont réhydratées dans un tampon carbonate contenant l'ISH et du CUSO₄ pour catalyser la réaction. Pour 100 000 Mscoll lyophilisés, on utilise une solution d'azidation composé de 405 ml tampon Na₂CO₃ (10mg/ml) complété avec 70µL d'ISH (20mg/ml) et 25µL de CUSO₄ (1mg/ml) pour obtenir un volume final de 500µL. Cette solution est ensuite ajoutée sur les Mscoll lyophilisées et incubé 12h à l'obscurité, sous agitations. Après incubation, les Mscoll-Azides sont rincées 3 fois dans de l'H₂O stérile, PS80 (Polysorbate 80) 0.001%. Après le dernier rinçage, les Mscoll-Azide sont re-suspendues dans un de l'H₂O stérile, 5% Tréhalose, PS 0.001% et conservées à 4°C avant utilisation.

Mesures du diamètre hydrodynamique et du potentiel zêta.

Les mesures de diffusion dynamique de la lumière (NanoZS, Malvern Instruments, Royaume-Uni) ont été effectuées avec un laser He-Ne (longueur d'onde : 632,8 nm), à 25 °C et un angle de diffusion de 173° pour la détection. La méthode CONTIN a été utilisée pour l'analyse des données. Les diamètres hydrodynamiques (nm) ont été mesurés dans l'eau ou dans des milieux de culture cellulaire, tandis que les potentiels zêta (mV) ont été mesurés uniquement dans l'eau par électrophorèse laser Doppler. Les résultats représentent la moyenne de au moins 10 analyses par mesure et de trois mesures différentes par échantillon.

Quantification du peptide accroché aux Mscoll et aux SELF.

Dans les deux expériences la quantification du peptide a été réalisé par un test microBCA (Termo scientific) selon les recommandations du fabricant. Brièvement, ce test repose sur la détection du Cu¹⁺ par l'acide bicinchoninic (BCA), se formant lorsque les Cu²⁺ soient réduits par des protéines en milieu alcalin. Un produit de réaction violet est alors produit

grâce à la chélation de deux molécules de BCA avec une molécule de Cu^{1+} . Ce complexe hydrosoluble est ensuite détecté par absorbance à 562nm.

Pour la quantification du peptide sur les microsphères, 1 000 Mscoll ou Mscoll-Azide hydratés sont placés dans les puits d'une plaque 96 puits à fond rond puis lyophilisées pendant 12h. Les microsphères sont ensuite réhydratées avec une solution à 50 $\mu\text{g/ml}$ du peptide de liaison pendant 3h. Ensuite, le surnageant est récupéré et la quantité de peptide présente dans le surnageant est quantifié par microBCA. La quantification du peptide accroché aux vecteur a été réalisée avec des SELF (RM : 370 μM ; temps d'incubation : 20s) modifiés par post insertion avec 2.5% de DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL (SELF-MAL 2.5%) ou avec un mélange composé de 75% de DSPE-PEG₂₀₀₀-MET et 25% de DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL (SELF-MET5%-MAL2.5%) pour atteindre 7.5% de la quantité molaire totale de lipides. Ensuite, 5.6 μg de peptide sont ensuite ajouté aux solutions de SELF modifiés ou non modifiés et les solutions obtenues sont incubée 3h à température ambiante. Après incubation, les SELF sont séparés du peptide soluble à l'aide de tubes a centrifugation Amicon[®] dont les pores de la membrane mesures 100kDa. Le filtrat, qui contient le peptide non lié au SELF, est récupéré après centrifugation 15 min a 14 000g. Le concentrat, qui contient les SELF avec les potentiel peptides accrochés, est récupéré après retournement des tubes et centrifugation 15min à 1 000g. Le peptide est ensuite quantifié dans le filtrat et le concentrat à l'aide du test microBCA.

IV ANNEXE 4 : Resultats et discussion experiences preliminaires

Modification des SELF par PEGylation avec du DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide. On observe que la post-insertion de 2,5% et 5% DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide sur les SELF, ne change pas significativement leurs diamètres hydrodynamiques, seule la concentration de 7,5% augmente significativement la taille des SELF de 13,01nm (Fig. 30 A). En revanche, la post-insertion de 2,5%, 5% et 7,5% de DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL sur les SELF induit une diminution significative du potentiel zêta de respectivement 13,08mV, 24,04 mV et 33,66mV (Fig. 30 B). L'étude de stabilité dans l'eau pure a 4°C montre que la taille des SELF-MAL 7,5% augmente dans le temps, à partir du premier jour d'incubation, alors que l'on observe une augmentation de la taille des SELF-MAL 5% seulement à partir du 10^{ème} jour (Fig. 30 C). Ces résultats sont corrélés à la diminution dans le temps, du potentiel zêta mesuré sur ces deux formulations. Le potentiel zêta des SELF-Mal 7,5% et 5% deviennent négatif à partir du jour 7 et du jour 12 respectivement (Fig. 30 D). Contrairement à ces deux formulations, les SELF non modifiés et les SELF-MAL 2,5% restent stables dans le temps sur une période de 12 jours. Cependant le potentiel zêta de ces deux formulations a tendance à diminué à partir du jour 7. Une étude de stabilité en condition de culture cellulaire (milieu α MEM à 37°C) a également été réalisée sur des SELF-MET5%-MAL2,5%. On remarque que la taille de ces SELF augmente légèrement sur les 7 premiers jours et se stabilise autour des 200nm pendant les 14 jours suivants (Fig. 30 E).

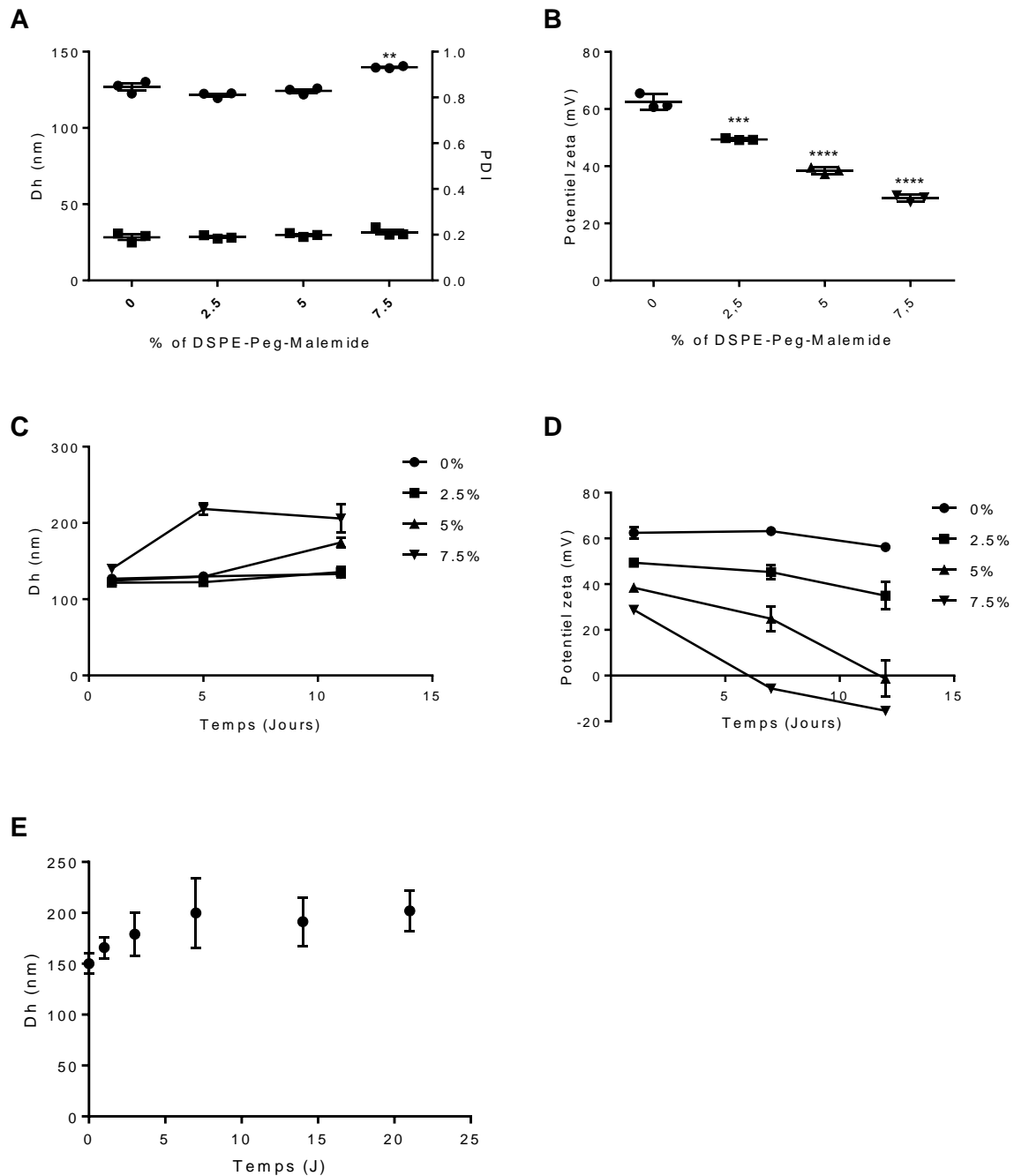


Figure 30 : Post modification des SELF avec un DSPE-PEG2000-Maléimide

Les SELF sont formulés avec un mélange réactionnel de 37,5 μ M et un temps d'incubation de 20 s, avec un siARN contrôle pour un rapport de charge de 4. (A) Diamètre hydrodynamique (Dh) et indice de polydispersité (PDI) de SELF avec différentes concentrations de lipides. (B) Potentiel Zeta (mV) des SELF post-inséré avec différents pourcentages de DSPE-PEG2000-Maleimide (n =3). (C) Suivi du diamètre hydrodynamique et (D) du potentiel zeta des SELF PEGylés avec 2,5 %, 5 % et 7,5 % de DSPE-PEG2000-Maleimide incubés dans de l'eau pure à 4°C pendant 11 jours (n = 3). (E) Suivi du diamètre hydrodynamique des SELF PEGylés avec 4,5 % de DSPE-PEG2000-Maleimide et 0,5% de DSPE-PEG-Méthoxy incubés dans du milieu de culture α MEM à 37°C pendant 21 jours (n = 2-6).

Les expérimentations réalisées pour évaluer les interactions SELF-Peptide ont montrées que 51,36% de la quantité totale de peptide mesuré est retrouvée dans le concentrat. Alors que la quantité de peptide retrouvée dans le concentrat augmente de 7,74% et 18,10% avec les SELF-MAL2.5 et SELF-MET 5%-MAL 2,5% respectivement (Fig. 31 A). Concernant l'accroche des peptides sur les Mscoll et Mscoll-Azide, on observe que 26,92% de la quantité totale de peptide est complexé avec les Mscoll, alors les Mscoll-Azide permettent de complexer 54,92% du peptide ajouté.

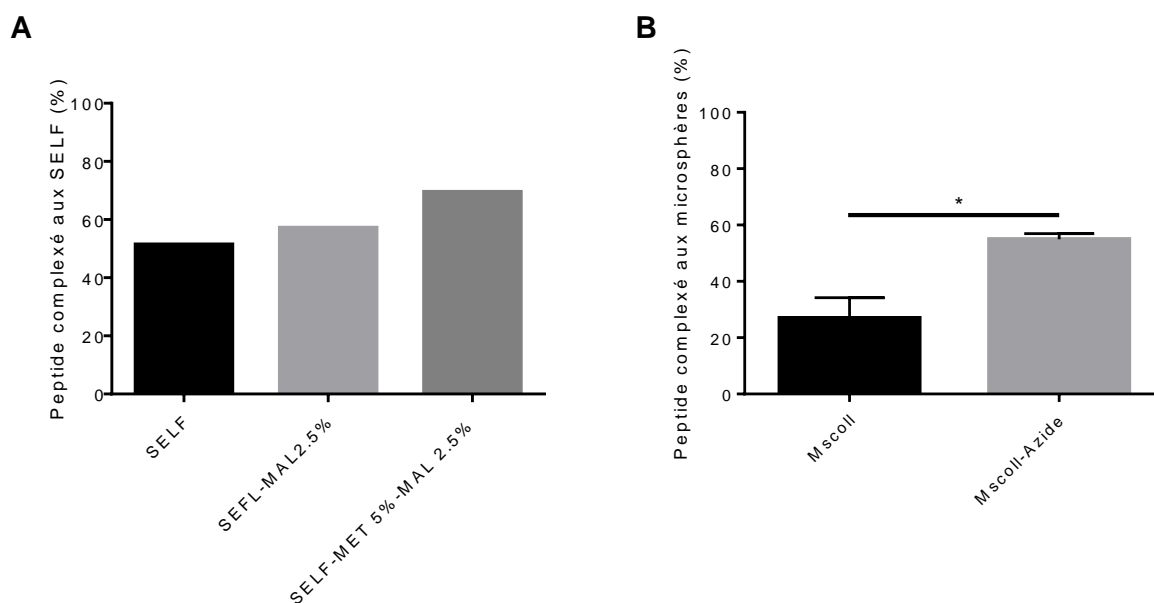


Figure 31 : Interactions Mscoll-Peptide et Peptide-SELF.

(A) Quantité de peptide mesurée dans le concentrat, exprimé en pourcentage par rapport à la quantité totale mesuré dans me concentrat et dans le filtrat de chaque condition (n=1). (B) Quantité de peptide

complexé aux Mscoll et Mscoll-Azide, calculé à partir de la quantité de peptide mesuré dans le surnageant et exprimé en pourcentage par rapport à la quantité totale de peptide déposé dans la solution de Mscoll (n=3).

DISCUSSION

La post insertion des DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide sur les SELF, induit une augmentation de la taille uniquement pour la condition 7,5%. Cette observation pourrait être expliquée par le changement de conformation des chaînes de PEG qui sont connues pour adopter différentes conformations en fonction de l'espace disponible entre les chaînes de PEG présentes à la surface des liposomes. On obtient une conformation « Champignon » avec de faible concentration en PEG et une conformation « Brosse » pour des concentrations plus élevées [474].

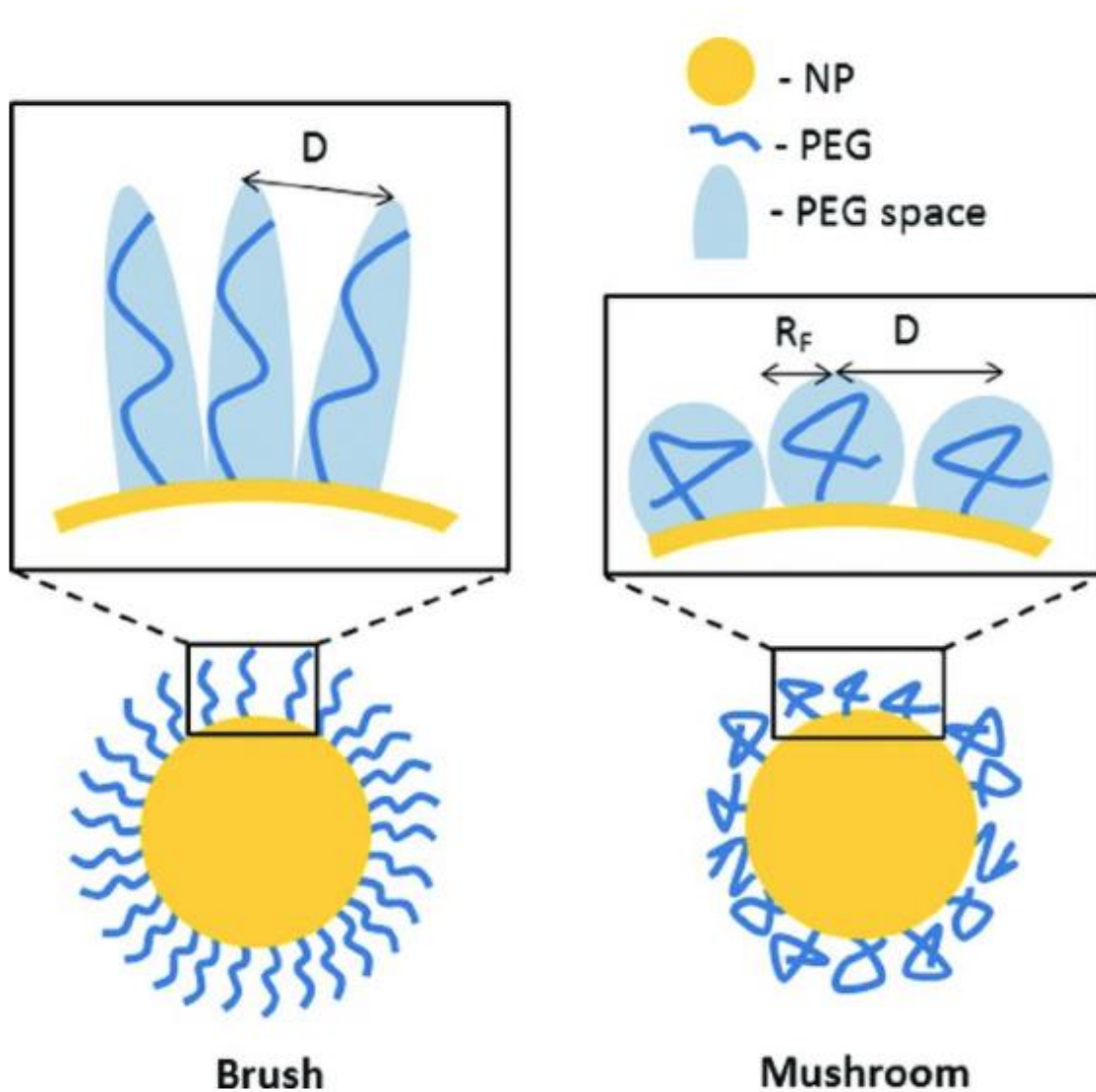


Figure 32 La conformation en brosse et en champignon du PEG sur les NP sphériques.

La zone bleue ombrée indique l'espace que les molécules de PEG peuvent occuper (Selon Charmainne Cruje et Devika B. Chithrani).

Il est possible de déterminer la configuration des molécules de PEG greffées avec le rayon de Flory (R_F) et la distance (D) entre les sites de greffage (Fig. 1). La conformation « champignon » se produit lorsque la distance entre les sites de greffage D dépasse R_F et inversement, lorsque R_F dépasse D , les chaînes PEG prennent une conformation « en brosse ». Dans notre cas l'augmentation de la taille des SELF 7,5% de DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal pourrait être due à la présence des chaînes de PEG en conformation « brosse ».

Le DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal a également induit une diminution significative du potentiel zêta. Ceci peut être également attribué aux chaînes de PEG qui induisent un décalage du plan de cisaillement vers une zone plus éloignée de la surface du lipoplexe chargé et éventuellement à une diminution de la mobilité électrophorétique due à la présence des chaînes de PEG [475-477]. L'étude de stabilité dans l'eau, a montré que les SELF post-insérés avec plus de 2,5% de DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal sont instables dans le temps et ces observations sont corrélées avec une diminution du potentiel zêta. Le potentiel zêta est un bon indicateur de la stabilité des colloïdes en solution, dans notre étude, la diminution observée dans le temps peut expliquer l'augmentation de la taille moyenne des lipoplexes par un phénomène d'agrégation [478]. Cette diminution du potentiel zêta dans le temps semble être corrélée avec la quantité de DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal, ce qui suggère l'implication des groupements maléimides, qui pourraient interagir avec certains composants solubles dans la solution, tels que des lipides ou siARN non complexés. De manière intéressante, la quantité de 2,5% DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal ne semble pas déstabiliser la taille des SELF et les SELF-MET 5%-MAL 2,5% restent stables en condition de culture cellulaire pendant au moins 21 jours. Cependant on remarque une faible augmentation de la taille sur les 7 premiers jours, ce qui suggère là aussi des interactions avec les composants du milieu, possiblement dues aux groupements maléimides.

L'étude de l'interaction du peptide avec les SELF, montre qu'une partie des peptides ajoutés est retrouvé dans le concentrat, cela peut être en partie expliqué par le système de filtration utilisé qui concentre les particules en fonction de leurs tailles, mais ne permet pas d'éliminer totalement la phase liquide qui peut encore contenir une partie de la quantité de peptide ajouté. Cependant la quantité importante de peptide retrouvé dans le concentrat suggère également la présence d'interaction non spécifique des peptides avec les SELF non modifiés. De manière intéressante, on remarque que les SELF-MAL 2.5% augmentent la quantité de peptide présent dans le concentrat, ce qui suggère l'interaction du groupement maléimide avec le peptide. De plus les SELF-MET 5%-MAL 2,5% semblent retenir davantage de peptide que les SELF-MAL 2,5% ce qui est en accord avec les résultats de la figure 3, car la conformation brosse des chaînes de PEG peut favoriser les interactions des peptides avec les groupements maléimides qui pourraient être partiellement cachés ou inaccessibles en conformation champignon [479]. D'un autre côté l'étude de l'accroche du peptide sur les Mscoll, montre d'une part une interaction non spécifique du peptide avec les Mscoll et d'autre part suggère que les groupements azides ont bien été greffés sur les microsphères de collagène et permettent

une liaison efficace des peptides. Cependant si la perte de stabilité des SELF-MAL 2,5% est bien due à l'interaction des groupements maléimides avec certains composants du milieu, cela pourrait également impacter l'accroche des peptides sur les SELF. Ces résultats suggèrent que l'efficacité du système d'accroche du peptide sur les SELF pourrait être amélioré par le greffage des peptides sur les DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL avant l'étape de post-insertion.

RESUME

Les pathologies du cartilage articulaire constituent aujourd'hui un problème majeur de santé publique. À ce jour, il n'existe pas de traitement permettant la réparation du cartilage. Cependant, parmi les approches thérapeutiques en cours d'évaluation, l'ingénierie tissulaire, dont l'objectif est la formation de néo-tissus semble être une solution thérapeutique prometteuse.

L'objectif final de ce projet de thèse concerne l'élaboration d'une matrice génétiquement activée (MGA) injectable, permettant de contrôler la différenciation chondrocytaire des cellules stromales mésenchymateuses (CSM). Pour mener à bien ce projet, le premier objectif a été de trouver un vecteur d'acides nucléiques adapté à l'élaboration d'une MGA et capable de transférer efficacement les CSM. Nous avons donc développé un nouveau nanovecteur de siARN, nommé SELF (*Solvent Exchange Lipoplexe Formulations*), dont la taille est ajustable en contrôlant les paramètres de formulation, qui est stable dans le temps dans des conditions de culture cellulaire et qui possède une grande efficacité pour transférer les cellules stromales mésenchymateuses humaines primaires. Nous avons associé les SELF à des microsphères 3D poreuses de collagène et démontré que l'efficacité du chargement et la cinétique de libération sont corrélées à la taille des SELF. Ce type original et unique de MGA, avec une cinétique de libération adaptable, pourrait être intéressant pour des profils de transfection à long terme et/ou séquentielle de cellules souches en culture 3D. Ainsi, nous avons formé différentes MGA capables d'induire différents profils d'inhibition d'un gène spécifique sur au moins 21 jours. Enfin, nous avons étudié l'efficacité de la MGA sur un modèle *in vitro* de différenciation chondrocytaire de CSM humaines. Nous avons montré que la MGA induit une inhibition prolongée de l'expression du gène *Runx2* pendant au moins 21 jours. En conditions de différenciation chondrocytaire, cette diminution d'expression de *Runx2* semble diminuer l'expression de certains marqueurs de l'hypertrophie. Malgré ces résultats prometteurs, un effet inhibiteur de la MGA sur la différenciation des CSM reste à vérifier. En résumé, nos travaux ont montré l'intérêt de notre approche pour contrôler l'expression des marqueurs hypertrophiques d'un néocartilage. Un contrôle plus précis de la libération des vecteurs devrait permettre d'améliorer l'efficacité de la MGA pour des applications d'ingénierie tissulaire du cartilage.

ABSTRACT

Articular cartilage pathologies are a major public health problem today. To date, there is no treatment that can repair the cartilage. However, among the therapeutic approaches currently being evaluated, tissue engineering, the objective of which is the formation of neo-tissues, seems to be a promising therapeutic solution.

The final objective of this thesis project concerns the development of an injectable genetically activated matrix (MGA), making it possible to control the hypertrophic chondrocyte differentiation of mesenchymal stromal cells (MSCs). To carry out this project, the first objective was to find a nucleic acid vector suitable for the development of an MGA and capable of efficiently transfecting MSCs. We therefore designed a new siRNA nanovector, called solvent exchange lipoplexe formulation (SELF), which has a tunable size, is stable over time in cell culture conditions and possess a high efficiency to transfect primary human mesenchymal stromal cells. We associated SELF with porous collagen 3D microspheres and demonstrated that loading efficiency and release kinetics are correlated with SELF size. This original and unique type of gene activated matrix, with adaptable release kinetics, could be of interest for long-term and/or sequential transfection profiles of stem cells in 3D culture. Thus, we formed different MGAs capable of inducing different inhibition profiles of a specific gene over at least 21 days. Finally, we studied the efficiency of MGA on an in vitro model of chondrocyte differentiation of human MSCs. We have shown that MGA induces a prolonged inhibition of *Runx2* gene expression for at least 21 days. Under chondrocyte differentiation conditions, this decrease in *Runx2* expression seems to decrease the expression of certain markers of hypertrophy. Despite these promising results, an inhibitory effect of MGA on MSC differentiation remains to be verified. In summary, our work has shown the interest of our approach to control the expression of hypertrophic markers of a neocartilage. More precise control of vector release should improve the efficiency of MGA for cartilage tissue engineering applications.