

# Thèse de Doctorat

Fahd HACHED

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Recherche clinique, innovation technologie, santé publique

Spécialité : Biologie des organismes

Unité de recherche : INSERM UMR1229-Regenerative Medicine and Skeleton (RMes)

Soutenance le 13 décembre 2017

## Encapsulation de Cellules Stromales Mésenchymateuses humaines dans des hydrogels polysaccharidiques : potentielle application dans le traitement de l'arthrose

### JURY

Président du jury :	<b>Patrice PROGNON</b> , Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Paris-Sud
Rapporteurs :	<b>Sylvie CRAUSTE-MANCIET</b> , Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Bordeaux <b>Pascal ODOU</b> , Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Lille 2
Directeur de Thèse :	<b>Gaël GRIMANDI</b> , Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Co-encadrant de Thèse :	<b>Aurélien BILLON-CHABAUD</b> , Maître de Conférences, Université de Nantes
Co-encadrant de Thèse :	<b>Claire VINATIER</b> , Maître de Conférences, Université de Nantes

## ***Remerciements***

Je tiens à remercier sincèrement :

Pr. Pierre Weiss, directeur du laboratoire LLOAD INSERM UMR791, pour son accueil au sein de son unité et pour ses conseils lors de l'étude de caractérisation de l'HPMC-Si.

Dr. Jérôme Guicheux, directeur du laboratoire RMeS INSERM UMR1229, pour m'avoir accueilli au sein de son unité, pour l'implication et le suivi de qualité de l'avancement du projet de recherche. Merci de m'avoir appris tant de choses et de m'avoir soutenu tout au long de ma thèse.

Pr. Gaël Grimandi pour avoir dirigé cette thèse malgré ses fonctions hospitalo-universitaires très prenantes. Je le remercie pour son soutien, de m'avoir accordé la confiance nécessaire pour la réalisation de ce projet et pour son encadrement de qualité. Merci également de m'avoir donné l'opportunité de m'initier à la vie professionnelle au sein de la faculté de pharmacie de Nantes en tant que vacataire puis ATER en biophysique-pharmacie galénique.

Dr. Aurélie Billon-Chabaud pour le co-encadrement de ce travail et pour le suivi de qualité dont j'ai bénéficié. Sa disponibilité et ses compétences en formulation galénique ont largement contribué à mon apprentissage et à la réalisation de mon projet. Merci également de ton implication dans ma formation en pharmacie galénique lors de mon expérience professionnelle.

Dr. Claire Vinatier pour le co-encadrement de ce projet de recherche et pour le suivi de qualité dont j'ai bénéficié. Sa disponibilité, sa rigueur et ses conseils avisés, notamment en biologie cellulaire et moléculaire, ont largement contribué à la réalisation de ma thèse.

Mes remerciements les plus sincères vont également à :

Pr Sylvie Crauste-Manciet et Pr Pascal Odou pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce projet de thèse en tant que rapporteurs.

Pr Patrice Prognon pour m'avoir fait l'honneur de juger ce projet de thèse en tant qu'examineur.

Je suis très reconnaissant à Catherine Le Visage pour ses conseils avisés, ses encouragements et sa participation active dans la rédaction de mon article et ma revue. Je n'oublierai jamais ses éclats de rire communicatifs ...

J'exprime tous mes remerciements à Hélène Gautier, Johann Clouet, Marie Degraef et Tanguy Le Neel pour leur soutien et leur implication dans ma formation en biophysique et en pharmacie galénique. J'ai beaucoup appris d'eux lors de nos nombreuses heures d'enseignement de TP et d'ED à la faculté.

Je remercie les étudiants en Mastère 2 que j'ai eu l'honneur d'encadrer. Merci à Pierre-Gabriel Pinta et Fabien Nativel de m'avoir fait confiance et d'avoir travaillé comme vous l'avez fait. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes. Leur encadrement m'a été très enrichissant sur le plan personnel. Ce travail n'aurait pu parvenir à ces fins sans Pierre-Gabriel. Je le remercie infiniment d'avoir assuré l'avancement du projet pendant mes absences. Quant à Fabien, je lui suis très reconnaissant pour l'aide qu'il m'a apporté lors des derniers mois de ma thèse.

J'adresse mes chaleureux remerciements à mes « voisins de bureau » (Caroline, Julie, Maeva, Sophie S et Pauline B) dont le soutien, l'humour et la sympathie ont garanti les conditions et l'ambiance nécessaire au bon déroulement de ma thèse.

J'exprime mes remerciements les plus affectueux à Mélanie Verron d'avoir fait les démarches administratives nécessaires (l'obtention d'un Visa d'étude, la recherche d'un logement, les démarches d'inscription à l'Ecole Doctorale, etc) avant et après mon arrivée à Nantes. Je n'oublierai jamais ta bienveillance les premiers jours après mon installation à Nantes.

Je n'oublierai pas les anciens thésards (Elsa, Greig, Nicolas, Nina H, Sophie P et Vincent) pour les bons moments passés ensemble au sein de l'unité ou lors des différents congrès. Ils m'ont tous donné, à un moment ou un autre, les conseils ou le réconfort dont j'avais besoin.

Je remercie tous les membres de l'unité de recherche, en particulier Amadou, Aurore, Boris, Carole, Cécile, Elodie, Martial, Maude, Nina B et Valérie P. Leur présence quotidienne a été plus qu'indispensable et chaque rencontre a été très enrichissante.

Enfin, ma famille à qui j'adresse mes plus affectueux remerciements pour leur bienveillance, leur amour et leur soutien inconditionnels. Ma famille a toujours été confiante dans la réalisation de cette thèse. Toujours prête à m'aider et à m'encourager, je lui suis du fond du cœur reconnaissant pour tout.

## *Liste des publications internationales*

### ➤ Acceptée

**Polysaccharide Hydrogels Support the Long-Term Viability of Encapsulated Human Mesenchymal Stem Cells and Their Ability to Secrete Immunomodulatory Factors (2017).** F. Hached, C. Vinatier, P-G. Pinta, P. Hulin, C. Le Visage, P. Weiss, J. Guicheux, A. Billon-Chabaud, G. Grimandi.

Article publié dans Stem Cells International.

### ➤ Soumise et en cours de révision

**Mesenchymal stem cell administration inhibits colorectal cancer progression and promotes survival: mechanism of action and rationale for clinical use (2017).** S. François, M-E. Forgue-Lafitte, C-H. Che, B. L'Homme, B. Usunier, S. Bouchet, F. Hached, D. Benaoumeur, M. Benderitter, L. Douay, N-C. Gorin, A. Larsen, A. Chapel.

Article soumis dans Cancer Discovery (MS# CD-15-0991).

### ➤ En cours

**Human Mesenchymal Stromal Cells encapsulation: current advances and trends in osteoarthritis treatment (2017).** F. Hached, C. Vinatier, J. Guicheux, C. Le Visage, G. Grimandi, A Billon-Chabaud.

Revue à soumettre dans Best Practice & Research Clinical Rheumatology.

**Human Mesenchymal Stem Cells encapsulation in a polysaccharide hydrogel by millifluidic devices: potential application to osteoarthritis (2017).** F. Nativel, F. Hached, P-G. Pinta, C. d'Arros, J. Guicheux, C. Le Visage, P. Weiss, A. Billon-Chabaud, J. Davy, D. Renard, G. Grimandi.

Article à soumettre dans The International Journal of Molecular Sciences.

## *Liste des communications orales et affichées*

### ➤ Congrès internationaux

**Adipose derived stromal cells encapsulation in hydrogel particles: potential application to osteoarthritis.** *10<sup>th</sup> World Biomaterials Congress*, Montreal, QC Canada, 17-22 Mai 2016.

**Adipose derived stromal cells encapsulation in hydrogel particles: potential application to osteoarthritis.** *OARSI World Congress on Osteoarthritis*, Amsterdam, Pays-Bas, 03 avril 2016.

**Mesenchymal Stromal Cells encapsulation in biomaterials for Osteoarthritis treatment.** *TERMIS World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Gênes, Italie, 10-13 juin 2014.

**Mesenchymal stromal cells encapsulation in innovative biomaterials: application to Osteoarthritis treatment.** *OARSI, World Congress on Osteoarthritis*, Paris, 24-27 avril 2014.

### ➤ Congrès nationaux

**Encapsulation de cellules stromales mésenchymateuses dans un matériau innovant pour une application au traitement de l'arthrose.** *Journée « Mobilité de la personne âgée : Approches spatiale et fonctionnelle »*, Nantes, 12 juin 2015.

**Cellules stromales mésenchymateuses adultes encapsulées dans des biomatériaux, application au traitement de l'arthrose.** *27<sup>ème</sup> Congrès Français de Rhumatologie*, Paris, 07-09 décembre 2014.

**Effet de la variation des paramètres de dispersion sur la taille des particules d'HPMC-Si pour l'encapsulation des cellules stromales mésenchymateuses.** *Journée scientifique de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes*, 20 novembre 2014. (*Prix du 2<sup>ème</sup> poster scientifique*).

**Encapsulation de cellules stromales mésenchymateuses dans des biomatériaux innovants pour la thérapie cellulaire de l'arthrose.** *Journée Scientifique de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes*, 21 novembre 2013.

**Mise au point d'une méthode d'encapsulation de cellules souches mésenchymateuses dans l'HPMC-Si pour le traitement de l'arthrose.** *Journée scientifique de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes*, 21 novembre 2013. (*Prix du 1<sup>er</sup> poster scientifique*).

**Encapsulation de cellules stromales mésenchymateuses dans des biomatériaux : application au traitement de l'arthrose.** *Colloque : "Groupe de recherche GRIMIT"*, Paris, 25 septembre 2013.

## *Activité d'encadrement*

- **2017 : Fabien Nativel (10 mois)**, interne en pharmacie (filière de recherche) au CHU de Nantes et étudiant en Mastère 2 à l'Université de Lille.

Sujet de stage n°1 : Encapsulation de cellules stromales mésenchymateuses par millifluidique dans un hydrogel polysaccharidique pour une potentielle application au traitement de l'arthrose.

Sujet de stage n°2 : Cytotoxicité des plastifiants du PVC et de leurs métabolites ; Projet ARMED 2 (Assessment and Risk Management of MEDical).

- **2017 : Mériadec Gaignard et Clément Guibert (6 semaines)**, stagiaires SIR (Stage d'Initiation à la Recherche) et étudiants en 3<sup>ème</sup> année à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes.

Sujet de stage : Encapsulation de cellules stromales mésenchymateuses humaines par millifluidique : caractérisation et biofonctionnalité.

- **2014 : Pierre-Gabriel Pinta (2 ans)**, interne en pharmacie (filière de recherche) au CHU de Nantes et étudiant en Mastère 2 à l'Université de Nantes.

Sujet de stage n°1 : Mise au point de la génération de particules d'hydrogels par millifluidique.

Sujet de stage n°2 : Cytotoxicité des plastifiants du PVC et de leurs métabolites ; Projet ARMED 1.

- **2014 : Justine Réto et Camille Le Bihan (6 semaines)**, stagiaires SIR et étudiantes en 3<sup>ème</sup> année à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes.

Sujet de stage : Effet de la variation des paramètres de dispersion sur la taille des particules d'HPMC-Si pour l'encapsulation des cellules stromales mésenchymateuses.

- **2013 : Suzy Bruder (8 semaines)**, stagiaire SIR (Stage d'Initiation à la Recherche) et étudiante en 3<sup>ème</sup> année à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes.

Sujet de stage : Mise au point d'une méthode d'encapsulation de cellules souches mésenchymateuses dans l'HPMC-Si pour le traitement de l'arthrose.

## Liste des abréviations

AASAL : Anti-arthrosiques d'action lente

ADAMTS-1 : A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

ALCAM : Activated Leukocyte Cell Adhesion *Molecule*

ALP : Alkaline phosphatase

APA : Alginate-Poly-l-lysine-Alginate

BCR : B-Cell Receptor

BMP : Bone Morphogenic Protein

Btk : Bruton's tyrosine kinase

Calcein AM : Non-fluorescent acetomethoxy derivate of calcein

Cellules NK : Cellules Natural Killer

COX : Cyclooxygenase

COX-1 : Cyclooxygenase 1

COX-2 : Cyclooxygenase 2

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSM : Cellules Stromales Mésoenchymateuse

CTGF : Connective Tissue Growth Factor

DMEM : Dulbecco's modified eagle medium

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

Eth-D1 : Homodimère d'hétidium-1

FGF : Fibroblast Growth Factors

FITC : Fluorescein isothiocyanate

GAG : Glycosaminoglycan

GDF5 :Growth Differentiation Factor 5

GILZ : Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper

GRO $\alpha$  : Growth regulated protein alpha

GVHD : Graft Versus Host Disease

HA : Hyaluronic Acid

hASC : human Adipose derived Stromal Cells

HBSS : Hank's Balanced Sodium Salt

HEPES :4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HLA-G : Human Leukocyte Antigen G

HO : l'hème oxygénase

HPMC-Si : Hydroxypropyl methylcellulose silanisée

HRP : Horseradish Peroxidase

IAS : Insaponifiables d'avocat et de soja

ICAM : Intercellular Adhesion Molecule

IDO : Indoleamine 2,3-dioxygenase

IGF-1 : Insulin Growth Factor 1

IL-1 $\beta$  : Interleukin -1 $\beta$

IL-1RA : Interleukin 1 receptor antagonist

IL-6 : Interleukin 6

IL-10 : Interleukin 10

IL-17 : Interleukin 17

IL-18 : Interleukin 18

IFN- $\gamma$  : Interferon  $\gamma$

IPGTT : Intraperitoneal glucose tolerance test

IRF-1 : Interferon Regulatory Factor 1

ISRE : Interferon-Sensitive Response Element

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

LCST : Lower Critical Solution Temperature

LFA-3 : Lymphocyte Function-associated Antigen 3

LIF : Leukemia Inhibitory Factor

LPS : Polysaccharides

MAP kinase : Mitogen-Activated Protein Kinase

MCF2L : Guanine nucleotide exchange factor DBS

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1

M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor

MEC : Matrice extracellulaire

MIP-1 $\alpha$  : Macrophage Inflammatory Proteins-1 $\alpha$

MMPs : Matrix metalloproteinases

MO : Moelle osseuse

MRP4 : Multidrug Resistance Protein 4

MWCO : Molecular Weight Cut-Off

N-CAM : Neural Cell Adhesion Molecule

NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor-kappa B

NO : Nitric Oxide

NOS : Nitric Oxide Synthase

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAN : Polyacrylonitrile

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCL : Polycaprolactone

PD-L1 : Program Death-Ligand 1

PEG : Polyethylene glycol

PEX : Hemopexin-like-protein

PFO : Perivascular Fibrotic Overgrowth

PGA : Polyglycolic acid

PGE<sub>2</sub> : Prostaglandin E<sub>2</sub>

PGES : Prostaglandin E synthase

PGG<sub>2</sub> : Prostaglandin G<sub>2</sub>

PGH<sub>2</sub> : Prostaglandin H<sub>2</sub>

PHEMA : Poly (2-hydroxyethyl methacrylate)

PLA : Polylactic acid

PLA<sub>2</sub> : Phospholipase A<sub>2</sub>

PLGA : Poly Lactic-co-Glycolic Acid

PMMA : Poly(methyl methacrylate)

PTHrP : Parathyroid Hormone related Peptide

PVA : PolyVinyl Alcohol

RANTES : Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted

RGD : Arginine-Glycine-Aspartate

Rpm : Rotation par minute

RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction

Runx 2 : Runt-related transcription factor 2

Smurf-2 : Smad ubiquitination-related factor 2

STAT1 : Signal Transducer and Activator of Transcription 1

S-TRAIL : Secretable tumor necrosis factor apoptosis inducing ligand

SVF : S rum de veau f etal

TCA : Trichloroacetic acid

TIMPs : Tissue Inhibitors of MMP

TGF-  : Transforming Growth Factor  

TLR : Toll-Like Receptors

TNF-  : Tumor Necrosis Factor  

TNF-  : Tumor Necrosis Factor  

UCST : Upper Critical Solution Temperature

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Articulations les plus souvent touchées par l'arthrose (arthrose diagnostiquée par un examen radiologique).....	24
<b>Figure 2</b> : Articulation saine.....	28
<b>Figure 3</b> : Composition biochimique et arrangement tri-dimensionnel de la MEC du cartilage articulaire.....	31
<b>Figure 4</b> : Comparaison entre une articulation saine et une articulation arthrosique.....	33
<b>Figure 5</b> : Déséquilibre entre les processus anaboliques et cataboliques caractéristique de la physiopathologie de l'arthrose.....	35
<b>Figure 6</b> : Propriétés immunomodulatrices des CSM.....	48
<b>Figure 7</b> : Inhibition des cellules immunitaires par les CSM2 dans un contexte pro-inflammatoire.....	49
<b>Figure 8</b> : Stratégie de traitement de l'arthrose par les CSM.....	51
<b>Figure 9</b> : Représentation des deux types de particules.....	57
<b>Figure 10</b> : Principe de l'encapsulation des CSM.....	58
<b>Figure 11</b> : Structure de l'alginate.....	61
<b>Figure 12</b> : Réticulation ionique de l'alginate en présence du calcium.....	62
<b>Figure 13</b> : Mécanismes de réticulation des polymères.....	69
<b>Figure 14</b> : Encapsulation cellulaire dans l'alginate par extrusion simple ou par application d'une force électrostatique.....	70
<b>Figure 15</b> : Principe de l'encapsulation cellulaire par émulsion.....	72
<b>Figure 16</b> : Principe de la génération de particules par les techniques fluidiques.....	74
<b>Figure 17</b> : Structure de l'HPMC, du GPTMS et de l'HPMC-Si.....	87

<b>Figure 18</b> : Particules d’alginate obtenues par extrusion dans du CaCl <sub>2</sub> . <i>Les particules ont été analysées par microscopie photonique et la dispersion de la taille a été étudiée par granulométrie laser.</i> .....	97
<b>Figure 19</b> : Effet de la stérilisation de l’alginate (sous forme de poudre ou de solution) sur la viscosité de la solution polymérique.....	98
<b>Figure 20</b> : Effet de la stérilisation de l’alginate (sous forme de poudre ou de solution) sur sa masse moléculaire en poids.....	99
<b>Figure 21</b> : Effet de la stérilisation de l’alginate sur l’aspect des particules obtenues. <i>La condition contrôle correspond aux particules d’alginate obtenues sans la stérilisation du matériau (solution à 2% dans du PBS). Les particules ont été générées à partir de l’alginate stérilisé sous la forme d’une solution (à 2% dans du PBS) ou d’une poudre (la poudre stérilisée a ensuite été solubilisée à 2% dans du PBS).</i> .....	100
<b>Figure 22</b> : Influence de la variation des paramètres opératoires de la dispersion sur la taille des particules d’HPMC-Si.....	102
<b>Figure 23</b> : Particules d’HPMC-Si obtenues par dispersion dans l’huile d’olive. <i>Les particules ont été observées par microscopie photonique et la dispersion de la taille a été étudiée par granulométrie laser.</i> .....	103
<b>Figure 24</b> : Etude de la diffusion des dextrans-FITC dans les particules d’alginate et d’HPMC-Si au cours du temps.....	105
<b>Figure 25</b> : Etude des propriétés mécaniques des particules d’alginate et d’HPMC-Si par compressions mécaniques.....	106
<b>Figure 26</b> : Viabilité des hASC encapsulées dans l’alginate et l’HPMC-Si. <i>Les images A et B représentent des hASC vivantes encapsulées respectivement dans l’alginate et l’HPMC-Si à 1 mois. Observation par microscopie confocale. Le graphique C représente le pourcentage de viabilité des hASC dans l’alginate et l’HPMC-Si de 24h jusqu’à 1 mois après encapsulation.</i> .....	108

<b>Figure 27</b> : Evolution du nombre moyen de hASC par particule d'alginate et d'HPMC-Si au cours du temps.....	109
<b>Figure 28</b> : Evaluation de l'activité enzymatique d'IDO secrétée par les hASC encapsulées dans l'alginate et l'HPMC-Si à l'aide du calcul de la concentration de L-kynurénine. <i>Les hASC encapsulées ont été stimulées ou non par le TNF-<math>\alpha</math> et l'IFN-<math>\gamma</math> pendant 72h. Les résultats sont normalisés au nombre d'hASC encapsulées dans l'alginate ou l'HPMC-Si.....</i>	111
<b>Figure 29</b> : Calcul de la concentration de la prostaglandine E <sub>2</sub> secrétée par les hASC encapsulées dans l'alginate et l'HPMC-Si. <i>Les hASC encapsulées ont été stimulées ou non par le TNF-<math>\alpha</math> et l'IFN-<math>\gamma</math> pendant 72h. Les résultats sont normalisés au nombre d'hASC encapsulées dans l'alginate ou l'HPMC-Si.....</i>	112
<b>Figure 30</b> : Calcul de la concentration de l'HGF secrétée par les hASC encapsulées dans l'alginate et l'HPMC-Si. <i>Les hASC encapsulées ont été stimulées ou non par le TNF-<math>\alpha</math> et l'IFN-<math>\gamma</math> pendant 72h. Les résultats sont normalisés au nombre d'hASC encapsulées dans l'alginate ou l'HPMC-Si.....</i>	113
<b>Figure 31</b> : Mécanismes de synthèse d'IDO par les cellules impliquant différentes voies de signalisation.....	127
<b>Figure 32</b> : Mécanisme de la synthèse de la PGE <sub>2</sub> par COX-1 dans une CSM2.....	129
<b>Figure 33</b> : Mécanisme d'action, proposé par Manferdini <i>et al.</i> , de la PGE <sub>2</sub> secrétée par les hASC sur la synthèse de la PGE <sub>2</sub> catabolique par une cellule arthrosique.....	130
<b>Figure 34</b> : Action anti-inflammatoire de l'HGF sur les cellules immunitaires lors de l'inflammation.....	131

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Les marqueurs de surface des CSM d'après Pitterenger <i>et al.</i> .....	47
<b>Tableau II</b> : Principaux polymères naturels utilisés pour l'encapsulation des CSM en ingénierie tissulaire.....	60
<b>Tableau III</b> : Polymères synthétiques les plus utilisés pour l'encapsulation des CSM en ingénierie tissulaire.....	66
<b>Tableau IV</b> : Comparaison de différentes techniques d'encapsulation cellulaire.....	68

# Table des matières

<b>Contexte scientifique</b>	18
<b>Introduction</b>	22
<b>Chapitre 1 : L'arthrose</b>	23
I. Généralités	23
II. Localisation	24
III. Facteurs de risque	26
IV. L'articulation saine	28
V. L'articulation arthrosique	33
VI. Les traitements de l'arthrose	37
a) Les recommandations hygiéno-diététiques	37
b) Les traitements médicamenteux	38
c) La viscosupplémentation	42
d) Les traitements chirurgicaux	43
<b>Chapitre 2 : Les cellules stromales mésenchymateuses</b>	45
I. Sources tissulaires	45
II. Multipotence et chondrogenèse	45
III. Caractéristiques des CSM	47
a) Phénotypes et récepteurs à la surface des CSM	47
b) L'immunomodulation	47
c) Actions anti-inflammatoires des CSM2 sur les cellules immunitaires	49
IV. Applications des CSM dans le traitement de l'arthrose	51
a) Applications anti-inflammatoires des CSM2 en thérapie cellulaire de l'arthrose	51
b) Ingénierie tissulaire et essais cliniques	53
V. Limitations de l'application des CSM	55
<b>Chapitre 3 : L'encapsulation des CSM</b>	57
I. Généralités	57
II. Biomatériaux utilisés pour l'encapsulation des CSM	59
a) Les principaux polymères naturels	60
1. L'alginate	61
2. L'acide hyaluronique	63
3. L'agarose	63
4. Le chitosan	64
5. Le collagène	65
b) Les polymères synthétiques	65
c) Choix du polymère pour l'encapsulation des CSM	66
III. Les principales méthodes de réticulation et d'encapsulation cellulaire	68
a) L'extrusion	70
b) La dispersion huileuse	71
c) Autres techniques	75

IV. Applications des CSM après encapsulation-----	76
V. Applications des CSM après encapsulation en ingénierie du cartilage-----	78
<b>Objectifs du projet</b> -----	<b>81</b>
<b>Matériels et méthodes</b> -----	<b>84</b>
<b>I. Génération de particules d'alginate et d'HPMC-Si</b> -----	<b>85</b>
a) Particules d'alginate-----	85
1. Procédé de fabrication des particules-----	85
2. Caractérisation de la forme, de la taille et analyse de la dispersité de taille des particules--	85
3. Effets de la stérilisation de l'alginate-----	85
b) Particules d'HPMC-Si-----	86
1. Synthèse et réticulation de l'HPMC-Si-----	86
2. Mise au point de la fabrication des particules d'HPMC-Si-----	88
<b>II. Etudes des propriétés de diffusion et des propriétés mécaniques</b> -----	<b>88</b>
<b>III. Encapsulation des CSM</b> -----	<b>90</b>
a) Obtention des CSM-----	90
b) Encapsulation des hASC-----	91
c) Etude de la viabilité des hASC après encapsulation-----	92
d) Etude de la prolifération des hASC après encapsulation-----	92
<b>IV. Vérification du maintien de la biofonctionnalité des hASC après encapsulation</b> -----	<b>93</b>
<b>V. Analyse statistique</b> -----	<b>95</b>
<b>Résultats</b> -----	<b>96</b>
<b>I. Obtention des particules</b> -----	<b>97</b>
a) L'alginate-----	97
1. Etude de la forme, de la taille et de la dispersion de la taille-----	97
2. Effets de la stérilisation-----	98
b) L'HPMC-Si-----	101
<b>II. Etudes des propriétés de diffusion et des propriétés mécaniques des particules</b> -----	<b>104</b>
a) Propriétés de diffusion-----	104
b) Propriétés mécaniques-----	105
<b>III. Encapsulation des hASC</b> -----	<b>107</b>
a) Viabilité des hASC après encapsulation-----	107
b) Estimation du nombre d'hASC encapsulées et évolution au cours du temps-----	109
<b>IV. Biofonctionnalité des hASC après encapsulation</b> -----	<b>110</b>
<b>Discussion</b> -----	<b>115</b>
<b>I. Etudes de caractérisation des particules</b> -----	<b>117</b>
a) Effets de la stérilisation sur l'alginate-----	117
b) La taille et la forme des particules-----	118
c) Propriétés de diffusion et propriétés mécaniques-----	122
<b>II. Encapsulation des hASC</b> -----	<b>124</b>
<b>III. Biofonctionnalité des hASC après encapsulation</b> -----	<b>127</b>
<b>Conclusions et perspectives</b> -----	<b>133</b>
<b>Bibliographie</b> -----	<b>138</b>

## **Contexte scientifique**

L'arthrose est la forme la plus courante d'arthrite et une cause majeure de douleur et d'incapacité chez les personnes âgées. Cette pathologie est souvent considérée comme une maladie articulaire dégénérative liée au vieillissement. Néanmoins, l'arthrose n'est pas simplement un processus d'usure, mais plutôt un remodelage anormal des tissus articulaires induit par des médiateurs inflammatoires dans l'articulation touchée. Malgré cette nature multifactorielle de l'arthrose, les modifications rencontrées au niveau des articulations arthrosiques ont des caractéristiques communes qui touchent l'ensemble de l'articulation, entraînant des douleurs, des déformations et une perte de fonction. Les phénomènes observés sont une dégradation du cartilage articulaire, un épaissement de l'os sous-chondral, une formation d'ostéophytes, une dégénérescence des ligaments, et des degrés variables d'inflammation de la membrane synoviale. Cliniquement, les patients présentent en effet un degré variable de synovite, mis en évidence par des niveaux élevés d'interleukine IL-1 $\beta$ , Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et des facteurs du complément. Les biopsies de la membrane synoviale de ces patients montrent une hyperplasie et une augmentation du nombre de cellules, principalement des macrophages. Ces macrophages présentent un phénotype activé et produisent des cytokines pro- inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et des facteurs de croissance tels que le VEGF. Toutes ces données suggèrent que ces cellules peuvent jouer un rôle important dans la pathogenèse de l'arthrose et que l'inflammation constitue sans aucun doute une cible pertinente pour le développement de thérapies innovantes dans l'arthrose.

Les solutions thérapeutiques existantes permettent, au mieux, le soulagement symptomatique de la douleur et ne parviennent pas à prévenir les dommages du cartilage et la destruction des autres tissus articulaires. Face à cette situation, la thérapie cellulaire est une nouvelle approche prometteuse. En effet, les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) ont non seulement des capacités régénératrices pour différents tissus (dont le cartilage) mais possèdent également des capacités immunomodulatrices. Ces dernières n'ont été mises en évidence que dans les années 2000 avec des travaux montrant qu'elles pourraient supprimer la prolifération des cellules T *in vitro* et prolonger la survie des greffes de peau allogéniques *in vivo*. Depuis, des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension du mode de médiation de leurs effets immunosuppresseurs et de nombreuses études *in vitro* ont contribué à une meilleure connaissance de leurs effets sur les réponses immunitaires innées et adaptatives. Plus précisément, les CSM ont la capacité d'interférer avec de nombreux composants du système immunitaire inné, y compris le complément, les récepteurs de signalisation Toll-like (TLR), les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles, les mastocytes et les cellules natural

killer. D'autres études ont montré que ces cellules sont aussi capables d'induire l'expression de médiateurs anti-inflammatoires, comme l'IL-10 et IL-12p40 dans les macrophages. De multiples facteurs sécrétés par les CSM et exerçant un effet immunosuppresseur ont été identifiés, par exemple, IL-10, l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1RA), l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), le transforming growth factor (TGF- $\beta$ 3) et la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Aujourd'hui, il est prouvé que les molécules inflammatoires telles que l'IL-1, peuvent fournir le signal d'amorçage pour que les CSM secrètent ces facteurs immunosuppresseurs.

Des études précliniques et cliniques de phase I ou II ont montré que l'injection de MSC en intra-articulaire était sûre et bien tolérée. Cependant, malgré une certaine efficacité clinique, la présence de MSC *in vivo* après injection intra-articulaire est éphémère. En effet, l'injection intra-articulaire de CSM présente quelques limitations majeures, qui sont : (i) une mort cellulaire massive lors de l'injection dans l'espace articulaire ; (ii) un risque de fuite cellulaire en dehors de l'espace articulaire en raison de la propension des CSM à migrer.

Dans ce contexte, notre projet est consacré à lever ces limites afin de pouvoir exploiter les propriétés immunomodulatrices des CSM dans le traitement de l'arthrose. Aussi, nous proposons d'encapsuler les CSM avant leur injection dans des particules cytoprotectrices et perméables dans un biomatériau : l'hydroxypropyl méthylcellulose silanisée (HPMC-Si).

Ce travail comprend, dans un premier temps, le développement de la méthode de production des particules d'HPMC-Si et leur caractérisation (la forme, la taille, les propriétés de diffusion et les propriétés mécaniques). Dans un second temps, les conditions opératoires pour l'incorporation des CSM dans les particules d'HPMC-Si seront étudiées avec une caractérisation de leur viabilité, leur prolifération et leur biofonctionnalité.

L'HPMC-Si sera comparé au biomatériau de référence le plus décrit pour l'encapsulation cellulaire : l'alginate.

Ce projet fait partie d'un large programme de recherche interdisciplinaire qui vise à fournir une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de l'arthrose par thérapie cellulaire utilisant des CSM autologues encapsulées. Une telle approche permettrait un progrès important dans le traitement de l'arthrose. De nombreuses questions restent posées avant de valider le véritable potentiel de ce concept chez l'homme même si ces premiers résultats sont prometteurs. Notre objectif est que les résultats de notre projet aient un impact direct et positif sur la vie quotidienne des patients, conduisant au traitement de différentes pathologies relatives à la dégénérescence

ostéo-articulaire. La demande constante de thérapies améliorées, efficaces et fiables, ainsi que le nombre croissant de maladies liées à l'augmentation de l'espérance de vie et le vieillissement de la population créent la nécessité évidente de développer des stratégies thérapeutiques innovantes.

# **Introduction**

# Chapitre 1

## *L'arthrose*

### I. Généralités

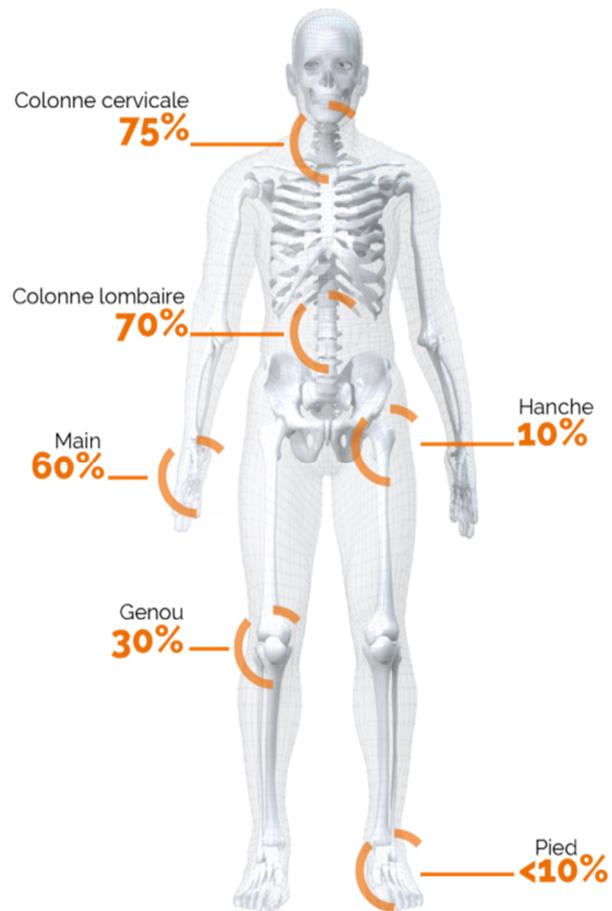
En 2015, l'Osteoarthritis Research Society International (OARSI) a proposé une définition officielle de cette pathologie : "L'arthrose est une affection touchant les articulations mobiles, caractérisée par un stress cellulaire et une dégradation de la matrice extracellulaire, initiés par des micro et macro traumatismes qui activent des réponses réparatrices inadaptées impliquant les voies de l'inflammation de l'immunité innée. La maladie se manifeste initialement par des anomalies moléculaires (métabolisme anormal des tissus articulaires), qui sont suivies par des anomalies anatomiques et/ou physiologiques (dégradation du cartilage, remodelage osseux, formation d'ostéophytes, inflammation articulaire et perte de la fonction articulaire normale) pouvant aboutir à « une maladie »" [1].

Cette maladie est un réel problème de santé publique en France. Elle touche entre 10 et 11 millions de Français, soit environ 17% de la population. La maladie est fortement corrélée à l'âge. En effet, elle touche principalement les personnes âgées : 68% des patients de plus de 50 ans et 85% des personnes de plus de 70 ans sont atteintes par cette maladie. Jusqu'à la cinquantaine, les hommes et les femmes sont touchés de façon égale. Au-delà de la cinquantaine et probablement pour des raisons hormonales, les femmes sont plus nombreuses à être concernées par l'arthrose.

Avec environ 14 millions de consultations par an, elle représente la première cause d'examen clinique après les maladies cardio-vasculaires en France ainsi que dans les pays développés. Les chiffres officiels montrent que l'arthrose coûte chère à la population française. Une étude économique intéressante de Grange L. *et al.*, [2] indique qu'en France, le coût annuel de prise en charge d'un patient arthrosique par un médecin généraliste a été de 755 euros en 2010 (20% pour les consultations et 80% pour les médicaments). En 2014, le coût annuel de l'arthrose en France a été estimé à 3,4 milliards d'euros [3]. Depuis, aucune amélioration n'a été constatée. Il est même probable que le nombre de patients arthrosiques augmente dans les années à venir et les prévisions annoncent que l'incidence de l'arthrose devrait doubler d'ici 2030 [3].

## II. Localisation

Sur le plan anatomique, l'arthrose touche plusieurs articulations : les rachis cervicaux et lombaires, les mains, les genoux, les hanches et les pieds (Figure 1).



**Figure 1** : Articulations les plus souvent touchées par l'arthrose (arthrose diagnostiquée par un examen radiologique). *Source : Sanofi-Arthrose.*

- L'arthrose du rachis

L'arthrose du rachis est fréquente, mais, très souvent, elle ne se traduit par aucun symptôme. Elle touche surtout deux régions de la colonne vertébrale.

- Les cervicales

L'arthrose se manifeste parfois par des raideurs de la nuque et des points douloureux, accompagnés de cervicalgie, qui peuvent devenir chroniques (douleur continue supérieure à 3 mois), et de crises aiguës, consécutives à des facteurs déclenchants.

- Les lombaires

Il s'agit de la localisation rachidienne la plus fréquente. Les douleurs sont présentes tous les jours, mais deviennent plus fortes lors d'activités ou de positions statiques prolongées.

- L'arthrose des mains

Cette localisation arthrosique prédomine chez la femme lors de la ménopause. Dans cette localisation, la maladie touche les doigts et plus souvent le pouce (rhizarthrose).

- Les doigts

Généralement les dernières phalanges sont concernées et l'évolution de l'arthrose des doigts est lente. La maladie se traduit par des déformations inesthétiques et en des poussées douloureuses. Le signe essentiel est l'apparition de nodosités sur la dernière phalange, apparaissant d'abord sur l'index et le médus, et pouvant ensuite s'étendre aux autres doigts.

- La rhizarthrose

Les douleurs sont localisées à la racine du pouce. Elles sont provoquées par l'action de pincer ou de serrer. L'arthrose du pouce peut se traduire par une simple gêne pour les mouvements fins, mais peut également entraîner un enraidissement articulaire. En évoluant, les lésions peuvent aboutir à une déformation de la première phalange du pouce : l'articulation trapézo-métacarpienne se déplace et, par conséquent, les deux os de l'articulation ne sont plus l'un en face de l'autre.

- L'arthrose des genoux (gonarthrose)

Elle est caractérisée par une douleur d'intensité variable, depuis un niveau très modéré jusqu'à un niveau insupportable. La douleur est localisée dans la zone arthrosique, c'est-à-dire la face interne ou externe du genou, mais aussi parfois au niveau de la partie postérieure du genou (appelé creux poplité). La douleur de l'arthrose est essentiellement liée à l'activité, à la marche, à la montée et à la descente des escaliers. Elle diminue généralement avec le repos, en position assise ou couchée. Sur le plan physiopathologique, la membrane synoviale du genou, irritée par les débris de cartilage et de nombreux produits inflammatoires libérés au cours de l'arthrose, accentue la production du lubrifiant intra-articulaire appelé liquide synovial. Son volume peut parfois augmenter et peut causer une gêne conséquente, du fait de l'hyperpression qu'il entraîne, en particulier au niveau de la partie postérieure du genou.

- L'arthrose de la hanche (coxarthrose)

Les douleurs de coxarthrose se localisent dans le pli de l'aîne ou de la fesse et peuvent se propager devant la cuisse, jusqu'au genou. Dans certains cas, la douleur est ressentie uniquement au genou. Chez les jeunes, la coxarthrose est la conséquence des malformations, acquises ou congénitales, de la hanche. Ces malformations doivent être dépistées précocement par radiographie car elles peuvent nécessiter le recours à des traitements chirurgicaux dans un but préventif.

D'autres articulations, plus rarement atteintes, peuvent être concernées par l'arthrose : les chevilles, les épaules et les coudes.

### III. Facteurs de risque

Comme mentionné ci-dessus, l'arthrose est fortement corrélée à l'âge. Cependant, la maladie n'est pas uniquement la simple conséquence du vieillissement. En effet, l'arthrose est une maladie multifactorielle et plusieurs facteurs, en plus de l'âge, favorisent la survenue ou l'aggravation de l'arthrose.

L'obésité exerce un stress sur les articulations portantes comme les hanches et les genoux, et augmente la probabilité d'apparition de la maladie. Il s'agit du plus important facteur de risque

pour les articulations « porteuses » : la coxarthrose et la gonarthrose. Ce facteur explique, en partie, la raison pour laquelle la maladie touche des personnes de plus en plus jeunes.

La génétique joue également un rôle dans l'apparition de l'arthrose. Ce facteur a bien été démontré pour certains cas de coxarthrose, de gonarthrose et d'arthrose des mains. Certaines mutations sont associées avec un risque plus important de survenue d'arthrose. Par exemple, la mutation du gène *GDF5* (*Growth Differentiation Factor 5*) est associée à la gonarthrose [4]. La mutation du gène *MCF2L* (*Guanine nucleotide exchange factor DBS*) favorise également l'apparition de la maladie [5].

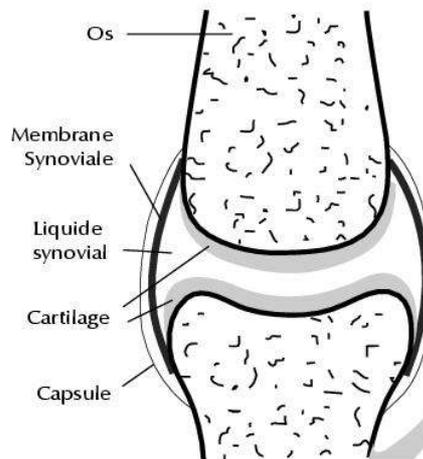
L'arthrose peut aussi apparaître chez certains travailleurs manuels. Les études montrent, par exemple, que les déménageurs et les agriculteurs sont souvent atteints de l'arthrose du rachis lombaire et de la coxarthrose. L'incidence de la maladie est également fortement élevée chez les sportifs de haut niveau. Par exemple, les joueurs de tennis présentent un risque élevé de développer la gonarthrose et l'arthrose des coudes. Du fait de ports de charges lourdes et de traumatismes minimes mais souvent répétés, on parle de microtraumatismes. Ce facteur est une cause d'arthrose importante pour les personnes plus jeunes.

La ménopause est aussi un facteur non négligeable. Les données épidémiologiques montrent que l'arthrose de la main, la gonarthrose et la coxarthrose sont plus fréquentes à la ménopause. Ce résultat est lié à l'arrêt, lors de la ménopause, de la production d'œstrogène. Cette hormone est connue pour son rôle bénéfique dans le métabolisme du cartilage, notamment en participant dans la biosynthèse des protéoglycanes [6].

Dans toutes les formes d'arthroses, l'articulation est affectée et un tissu bien déterminé est dégénéré : le cartilage.

#### IV. L'articulation saine

Anatomiquement, une articulation est une zone de juxtaposition entre 2 extrémités osseuses. Elle est composée de plusieurs éléments [7] (Figure 2).



**Figure 2** : Articulation saine.

##### - La capsule articulaire

La capsule articulaire est un manchon fibreux qui renferme la cavité articulaire. Elle relie une épiphyse à l'autre et possède des propriétés élastiques et résistantes. En fonction de l'articulation, elle s'insère à distance du cartilage (la hanche) ou à proximité (l'épaule). Elle est formée de deux couches [8] : une couche externe fibreuse dans laquelle les fibres sont en direction directe d'une extrémité osseuse à l'autre, soit hélicoïdale ou spiralée, soit récurrente, soit circulaire ou annulaire ou orbiculaire ; une deuxième couche interne, très vascularisée et formée de la membrane synoviale. Ainsi, les principales fonctions de la capsule articulaire sont de permettre aux surfaces articulaires de se maintenir en contact, et au liquide synovial de baigner l'articulation.

##### - La membrane synoviale (la synoviale)

La synoviale est un tissu conjonctif, lâche, d'origine mésenchymateuse. Elle intervient dans la formation du liquide synovial et possède un rôle de trophicité de l'articulation. Elle a également une fonction de défense contre les infections et l'inflammation.

La synoviale tapisse la face intérieure de la capsule articulaire [9]. Elle s'organise en franges et replis et elle est composée de deux couches [10] (de l'extérieur vers l'intérieur) :

- la couche sous-intimale (subintima) en contact avec la capsule articulaire. Cette couche est riche en collagène de type 2 et en mucopolysaccharides. Elle est très vascularisée et contient des cellules telles que les fibroblastes (à 50%), les mastocytes, les cellules endothéliales et les histiocytes ;
- la couche bordante (intima), d'une épaisseur de 30 à 40  $\mu\text{m}$ , en contact avec la cavité articulaire. Dans cette couche, les cellules sont disposées en une à quatre couches de synoviocytes qui sont riches en enzymes oxydatives et en enzymes hydrolytiques telles que la phosphatase acide et la catheptase. La substance intercellulaire est riche en acide hyaluronique. Dans l'intima, on distingue deux types de synoviocytes : les synoviocytes de type A (majoritaires) et les synoviocytes de type B (minoritaires). Les synoviocytes de types A sont des synoviocytes macrophagiques dont la fonction est de phagocyter les débris cellulaires produits lors de l'usure de l'articulation. Les synoviocytes de type B sont des synoviocytes fibroblastiques. Elles produisent la matrice extracellulaire de l'intima et synthétisent le liquide synovial. Les synoviocytes de type B ont un potentiel prolifératif supérieur à celui des synoviocytes de type A [11].

L'intima et la subintima sont séparées de la capsule par la subsynoviale riche en collagènes, cellules adipeuses et mucopolysaccharides.

#### - Le liquide synovial ou synovie

La synovie est produite par les synoviocytes de type B de la membrane synoviale [12]. Ce liquide correspond à un volume inférieur à 3,5 ml et son aspect est semblable au blanc d'œuf : il est visqueux, transparent (ou jaune pâle) et difficile à aspirer. Sa composition est similaire à celle d'un ultrafiltrat du plasma, avec peu de protéines (25 g/l ; dont l'albumine, les globulines et des enzymes telle que la phosphatase) et de cellules (moins de 200 cellules par  $\text{mm}^3$ ) tels que les monocytes et les lymphocytes. Le liquide synovial contient de l'acide hyaluronique (environ 3 g/l) synthétisé par les synoviocytes de type B. Le hyaluronate confère au liquide synovial des propriétés viscoélastiques [13].

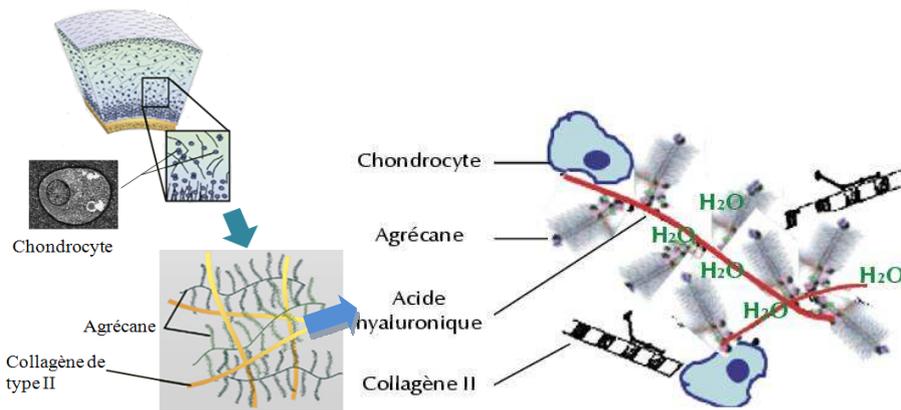
La synovie possède 4 fonctions dans l'articulation :

- Amortir les chocs qui se produisent lors de la marche ou de sauts ;
  - Nourrir le cartilage : elle fournit de l'oxygène et des nutriments aux chondrocytes du cartilage articulaire (qui est avasculaire) et élimine le dioxyde de carbone et les déchets métaboliques produits ;
  - Isoler : elle maintient à distance les surfaces articulaires, empêchant ainsi les forces d'abrasion excessives ;
  - Lubrifier : elle diminue la friction des surfaces cartilagineuse entre elles et contribue ainsi de manière significative à la légèreté et à la liberté de mouvement de l'articulation.
- Le tissu cartilagineux

Le cartilage est un tissu conjonctif non vascularisé et non innervé. Son rôle essentiel est d'assurer un bon glissement entre les pièces osseuses articulaires avec un coefficient de friction extrêmement bas tout en amortissant et en répartissant les pressions, rendant les stress de contact les plus faibles possibles. Il possède des propriétés biochimiques et physiologiques qui lui confèrent son élasticité et sa résistance aux forces de compression. Le cartilage du genou, par exemple, possède une épaisseur de 2 à 4 mm et peut supporter un poids supérieur à 5 fois le poids du corps [14].

Ce tissu est blanc nacré et avec l'âge, devient blanc jaunâtre. Selon l'articulation, son épaisseur est variable : elle est maximale dans les zones supportant le maximum de charge comme les articulations des membres inférieures.

Le cartilage est composé de cellules arrondies et volumineuses (15 à 40  $\mu\text{m}$ ) : les chondrocytes (1% du volume ; Figure 3) [15]. Ces cellules sont incluses dans des logettes : les chondroplastes.



**Figure 3** : Composition biochimique et arrangement tri-dimensionnel de la MEC du cartilage articulaire.

En raison de l'avascularisation du cartilage, les chondrocytes vivent en hypoxie (2 à 6% d'oxygène). La fonction principale des chondrocytes est la synthèse des composants de la matrice extracellulaire (MEC) du cartilage. Cette matrice est composée d'eau (70 à 80%), de protéoglycanes (dont l'agrécane), qui restent groupés en agrégats de haut poids moléculaire, et de fibres de collagène de type 2, 9 et 11 [16,17]. Les chondrocytes élaborent donc la MEC mais peuvent aussi la détruire, assurant ainsi l'homéostasie du tissu cartilagineux.

Les protéoglycanes sont une combinaison entre une protéine et des glycosaminoglycanes (GAG) [18]. Ils sont constitués de longues chaînes disaccharidiques de chondroïtine-sulfates ou de kératane-sulfates. Ils sont présents dans tous les tissus conjonctifs. Sur le plan chimique, les glycosaminoglycanes sont caractérisés par des charges négatives qui contribuent à la rétention des molécules d'eau. Les protéoglycanes sont donc des pièges à eau et la teneur en eau dans le cartilage articulaire est d'environ 72% [19]. Les protéoglycanes jouent également un rôle essentiel dans l'organisation de la MEC en interagissant, de façon non covalentes, avec d'autres molécules comme l'acide hyaluronique, les glycoprotéines et les collagènes de type 2. L'ensemble de ces interactions forme un réseau macromoléculaire hautement organisé et confère à la MEC sa cohésion et sa résistance. Le collagène de type 2 est spécifique du tissu cartilagineux articulaire et constitue 95% des collagènes du cartilage [20]. En microscopie électronique à transmission, les fibres de collagène de type 2 sont visibles avec une striation caractéristique tous les 640 Å et leur diamètre varie de 30 à 80 nm. Ces fibres de collagène sont organisées en arceaux et assurent une armature au tissu cartilagineux. Il existe d'autres types

de collagène dans le cartilage (collagènes de type 9 et 11), en faible quantité (environ 5%), qui permettent le maintien de la structure entre l'agrécan et le collagène de type 2.

En cas de lésion, la réparation du cartilage articulaire est lente voire inexistante chez l'adulte. En effet, la régénération de la matrice cartilagineuse par les chondrocytes nécessiterait 1000 jours pour les protéoglycanes et 200 ans pour le collagène [21].

- Le tissu osseux

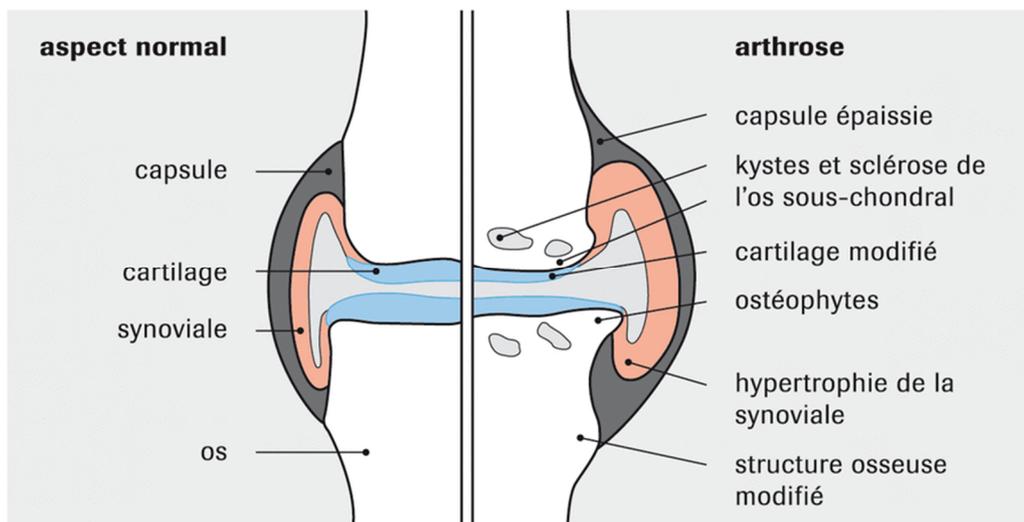
L'os adjacent à une articulation est composé d'une structure spongieuse de collagène calcifié recouverte d'une coque externe solide : l'os sous-chondral. Celui-ci constitue une zone de transition entre le cartilage et l'os. Bien que son épaisseur soit très fine (comprise entre 0,1 et 2 mm), il joue un rôle primordial dans l'amortissement des chocs au niveau de l'articulation. L'os peut supporter des contraintes importantes tant qu'il est protégé par le cartilage articulaire qui assure une répartition harmonieuse des charges. Sans cartilage, l'os spongieux se détériore facilement. Contrairement au cartilage, l'os est un tissu vivant vascularisé qui se renouvelle perpétuellement sous l'effet des contraintes mécaniques.

- Les ligaments et tendons péri-articulaires

Les ligaments et les tendons sont des tissus conjonctifs fibreux qui relient, respectivement, les os à d'autres os et les muscles aux os. Ils sont composés de fibres de collagène. Les ligaments sont caractérisés par leur élasticité variable alors que les tendons sont inélastiques. Dans l'articulation, un maillage de ligaments et de tendons indépendants et mobiles associés aux fascias composent la capsule. Les ligaments ont pour fonction d'assurer une stabilité permanente de ces articulations, tandis que les tendons stabilisent par intermittence les articulations.

## V. L'articulation arthrosique

Une articulation arthrosique se caractérise par une diminution de l'épaisseur du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral, la formation d'excroissances osseuses (les ostéophytes), une modification des caractéristiques du liquide synovial et l'inflammation de la membrane synoviale (Figure 4).



**Figure 4** : Comparaison entre une articulation saine et une articulation arthrosique.

*Source : Ligue suisse contre le rhumatisme.*

Lors de l'arthrose, le cartilage articulaire subit plusieurs modifications à l'échelle tissulaire, cellulaire et moléculaire.

### - Les modifications tissulaires et cellulaires

L'arthrose entraîne une modification de l'aspect du cartilage articulaire. Alors que la surface du cartilage articulaire sain est lisse, le cartilage arthrosique présente une surface rugueuse et des microfissures superficielles. Les microfissures s'approfondissent perpendiculairement à la direction des forces de cisaillement tangentielles. L'importance des fissurations aboutit au détachement de lambeaux de cartilage qui tombent dans la cavité articulaire mettant à nu l'os sous chondral [22]. Les chondrocytes s'activent et, d'une façon intéressante, produisent le collagène de type 2A [23]. Ce type de collagène est principalement sécrété lors de la chondrogenèse embryonnaire ; sa production par les chondrocytes arthrosiques laisse supposer

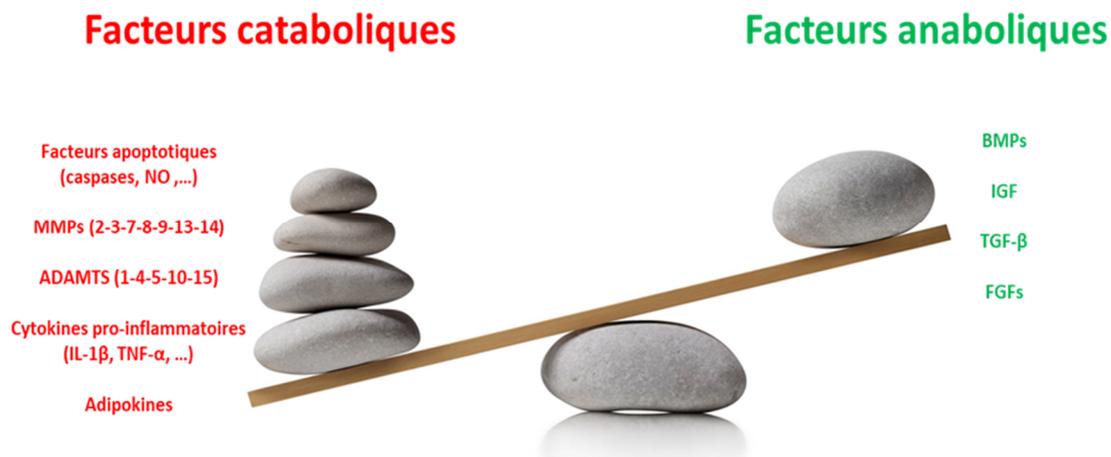
qu'ils évolueraient vers un phénotype de chondroprogéniteurs. La revue de Wollheim F.A. *et al.*, renforce cette hypothèse [24]. Au niveau de la MEC, on observe une augmentation importante (voire excessive) de la synthèse des fibronectines, du fibrocartilage (de type 1 et 3), des protéoglycanes et des collagènes au cours du stade précoce de la maladie. Ceci entraîne une augmentation de l'hydratation, aboutissant au "ramollissement" du cartilage qui perd progressivement ses caractéristiques bio-mécaniques [25]. En effet, à ce stade et sous l'effet de l'agression initiale du tissu, les chondrocytes tentent de réparer le cartilage et de rééquilibrer la balance entre l'anabolisme et le catabolisme. Il s'agit d'une phase d'hypertrophie cartilagineuse. Aux stades intermédiaires de la maladie, les chondrocytes finissent par « s'épuiser ». Les caspases pro-apoptotiques s'activent et provoquent la mort des chondrocytes. Ceci contribue à la dégradation inéluctable de la MEC, des érosions et des effondrements locaux conduisant à la dégénérescence du cartilage articulaire [26]. Les caspases pro-apoptotiques sont activées par plusieurs molécules détaillées dans la littérature comme l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et l'oxyde nitrique (NO). Ces molécules peuvent ainsi être des cibles thérapeutiques dans le traitement de l'arthrose [27].

La libération des débris cartilagineux dans l'articulation provoque une inflammation de la membrane synoviale. On parle alors de synovite [28]. Celle-ci se traduit par une douleur associée à un gonflement de l'articulation. La synovite est caractérisée par une surexpression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) [29]. Ces cytokines sont impliquées dans le processus catabolique du cartilage, mais stimulent aussi la surexpression de NO [30].

L'os sous-chondral subit également des modifications lors des stades précoces de la maladie avec une diminution de l'activité des ostéoblastes qui se traduit par un amincissement de l'os spongieux adjacent [22]. A des stades plus avancés, un remodelage osseux excessif est observé à proximité du cartilage articulaire dégradé entraînant la nécrose et la sclérose de l'os sous-chondral [31]. Les tentatives de réparation cartilagineuse par sécrétion de facteurs de croissance (tels que le TGF- $\beta$  et les BMPs) et l'effusion du liquide synovial vers l'espace médullaire de l'os sous-chondral affectent anormalement les CSM de la moelle osseuse qui s'impliquent pour la formation d'excroissances osseuses (les ostéophytes) au niveau des jonctions capsulo-synoviales. Ces ostéophytes sont également responsables des douleurs articulaires [32].

- Les modifications moléculaires

Dans le cas normal, le cartilage articulaire sain est caractérisé par une homéostasie cellulaire qui se traduit par un équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme. Dans l'arthrose, cet équilibre n'est plus assuré et le catabolisme domine largement l'anabolisme (Figure 5). Ce déséquilibre se traduit par une dégradation des composants de la MEC et une libération de protéases et de cytokines pro-inflammatoires aggravant les lésions cartilagineuses.



**Figure 5** : Déséquilibre entre les processus anaboliques et cataboliques caractéristique de la physiopathologie de l'arthrose.

Parmi les facteurs anaboliques du tissu cartilagineux, on peut citer les protéines osseuses morphogénétiques (BMPs, Bone Morphogenetic proteins), l'IGF-1 (Insulin Growth Factor-1), le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) et les facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs, Fibroblast Growth Factors) qui vont stimuler la synthèse des protéoglycanes, contribuant à la réparation cartilagineuse. La diminution de l'expression de ces facteurs lors de l'arthrose et des maladies liées à la vieillesse est largement décrite dans la littérature [33].

Dans un contexte arthrosique, la domination du processus catabolique se traduit par une surexpression (par les chondrocytes, les synoviocytes ou les ostéoblastes de l'os sous chondral) de :

- métalloprotéinases matricielles (MMPs) de types 2 ; 3 ; 7 ; 8 ; 9 ; 13 et 14 qui induisent la dégradation du collagène. Il existe des inhibiteurs naturels des MMPs, les TIMPs

(Tissue Inhibitors of MMP) dont l'action est insuffisante pour contrebalancer les effets des MMPs ;

- les protéases ADAMTS-1 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1) et les agrécanases de type 1 et 2 secrétées après stimulation par l'IL-1 $\beta$  et qui induisent la dégradation des agrécanes ;
- les médiateurs de l'inflammation [34].

L'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  sont secrétés dans la membrane synoviale et le cartilage arthrosique. Elles sont impliquées dans la dégradation de la matrice extra-chondrocytaire. Ces cytokines pro-inflammatoires sont initialement synthétisées par les synoviocytes pour venir activer les chondrocytes qui assurent dans un deuxième temps la prise en charge de cette synthèse tout en surexprimant les récepteurs à ces cytokines. Ces cytokines pro-inflammatoires ont donc une activité autocrine et paracrine.

L'IL-1 $\beta$  joue un rôle central dans la physiopathologie de l'arthrose. Il a été démontré qu'elle induit sa propre synthèse, inhibe la synthèse des inhibiteurs des protéases tels que les TIMPs, stimule la synthèse des MMPs et stimule le système activateur plasminogène/plasmine ainsi que la synthèse et le relargage des éicosanoïdes telle que la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) [35]. Le TNF- $\alpha$  agit de façon synergique avec l'IL-1 $\beta$  en augmentant la synthèse des MMPs et la libération du monoxyde d'azote (NO) et de la PGE<sub>2</sub>. D'autres cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-17 et IL-18) ont été détectées lors de l'arthrose et contribuent au déséquilibre anabolisme-catabolisme.

- La prostaglandine E<sub>2</sub>

La PGE<sub>2</sub> est synthétisée à partir de l'acide arachidonique, acide gras insaturé localisé dans la membrane nucléaire des cellules. Cette synthèse est possible à l'aide de l'action d'une enzyme : la cyclooxygénase (COX). Cette dernière se présente sous 2 isoformes : une forme constitutive (COX-1) et une forme inflammatoire (COX-2), [36].

M.H. Pillinger *et al.*, ont montré qu'à l'état basal, les chondrocytes expriment COX-1 qui gouverne la synthèse de la PGE<sub>2</sub> basale alors qu'aucune production de COX-2 n'est notée. Lors de l'arthrose, la stimulation par le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  provoque une augmentation de la synthèse de la PGE<sub>2</sub> sous la dépendance de COX-2 [37]. Cette forme catabolique de la PGE<sub>2</sub> inhibe la synthèse des TIMPs, active la surexpression de NO et induit l'apoptose des chondrocytes [38,39].

- NO

Le monoxyde d'azote est un gaz synthétisé naturellement dans l'organisme à partir de la L-arginine et de l'oxygène par plusieurs enzymes dites NO synthases (NOS) [40]. Lors de l'arthrose, le NO possède un effet pro-apoptotique sur les chondrocytes, stimule la synthèse de la prostaglandine E2 et des MMPs, et inhibe la synthèse des composants de la matrice extra-chondrocytaire (collagène de type 2 et les agrécanes). Ainsi, NO augmente le processus catabolique et inhibe le processus anabolique [39,41].

Il existe d'autres médiateurs pro-inflammatoires impliqués dans la dégradation cartilagineuse. Toussiroit E.*et al.*, par exemple, ont réussi à démontrer que, lors de l'arthrose, les adipokines (leptine, adiponectine, resistine, visfatine) sont détectées dans le liquide synovial et contribuent aux processus dégénératif et inflammatoire [42].

## VI. Les traitements de l'arthrose

Aujourd'hui, il existe plusieurs stratégies thérapeutiques de l'arthrose. Elles dépendent du stade de l'évolution de la pathologie. Ces différentes stratégies thérapeutiques font appel à des recommandations hygiéno-diététiques combinées aux traitements médicamenteux et à la viscosupplémentation. Les traitements chirurgicaux sont envisagés en dernier recours [43].

### a) Les recommandations hygiéno-diététiques

Selon les recommandations du « Collège Américain de Rhumatologie » (ACR), la « Ligue Européen contre le Rhumatisme » (Eular) et de la « Société Internationale de Recherche sur l'arthrose » (OARSI), ces traitements non médicamenteux sont préconisés en première intention pour traiter la maladie, en particulier lorsqu'elle touche la hanche ou le genou [44–46].

Les principales mesures hygiéno-diététiques sont les suivantes :

- La perte de poids en cas d'obésité

La surcharge pondérale entraîne des effets néfastes sur les articulations portantes (la hanche et le genou). Ces patients sont amenés à suivre un régime amaigrissant afin de viser une corpulence idéale normale (un Indice de Masse Corporel compris entre 18 et 25 kg/m<sup>2</sup>) et de le stabiliser. Pour la gonarthrose par exemple, il a été démontré qu'une perte de poids de 10% à partir d'un poids de départ de 95 kg (avec un IMC compris entre 29 et 55 kg/m<sup>2</sup>) permet de réduire l'indice de WOMAC de 28% [47]. Cet indice de WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index) est un auto-questionnaire d'évaluation d'une arthrose des membres inférieurs. Il comprend 3 domaines d'analyse : la douleur, la raideur et la fonction quotidienne. Plus le score est élevé, plus l'articulation est douloureuse et non fonctionnelle.

- La cure thermale

Ce traitement ancestral utilise les propriétés physiques et chimiques de composants dissous dans l'eau pour réduire et de soulager les douleurs articulaires et améliorer la mobilité des patients [48,49] . Cette pratique concerne différents types d'arthrose : la hanche, les rachis cervicaux et lombaires, le genou et les doigts.

- L'activité physique

Les exercices aérobies (de 15 à 30 minutes et au moins 3 fois par semaine) soulagent les douleurs, renforcent les muscles, améliorent la mobilité articulaire et réduisent une éventuelle surcharge pondérale [50]. Le choix des activités physiques est large et dépend de la localisation de l'arthrose. Pour l'arthrose de la hanche par exemple, la pratique du cyclisme est plus conseillée que la marche car elle entretient la musculature en usant moins le cartilage de la hanche qui est déchargée du poids du corps [51].

## b) Les traitements médicamenteux

Les médicaments de l'arthrose ont pour objectifs de soulager la douleur et d'améliorer la capacité de mouvement des articulations atteintes. Ces traitements se divisent en 2 familles : les médicaments à action rapide (incluant les antalgiques (analgésiques) et les anti-

inflammatoires) et les médicaments à action lente (anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente, AASAL).

- Les antalgiques

Les antalgiques ont pour but le traitement de la douleur. La douleur est perçue de façon variable entre les individus et il est ainsi important de l'évaluer avec des échelles validées. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les antalgiques sont classés en 3 paliers en fonction de l'intensité de la douleur. Ces médicaments doivent être administrés à intervalles réguliers variant selon la forme à libération prolongée et la forme à libération immédiate.

Les antalgiques du palier 1 (antalgiques périphériques) sont préconisés en première intention pour traiter la douleur arthrosique. Ce sont principalement l'aspirine et le paracétamol. Ils suppriment ou atténuent la douleur par action périphérique. Les antalgiques du palier 2 (antalgiques centraux) sont le tramadol et la codéine. Ce sont des dérivés morphiniques [52]. De manière générale, ils inhibent la production des substances algogènes ou renforcent le système de contrôle des afférences douloureuses. Les antalgiques du palier 2 peuvent être associés aux antalgiques du palier 1 mais sont responsables de plus d'effets secondaires (sommolences, nausées, constipations et vertiges). Les médicaments antalgiques du palier 1 sont destinés aux douleurs légères à modérées alors que les antalgiques du palier 2 sont destinés aux douleurs modérées ou sévères ou aux douleurs insuffisamment soulagées par les antalgiques du palier 1. Les antalgiques du palier 3 sont des opioïdes forts (exemples chlorhydrate et sulfate de morphine, oxycodone et hydromorphone). Ils ne sont pas recommandés dans l'arthrose. Si le médecin est amené à les prescrire, il le fera en fonction de règles d'utilisation très strictes.

La douleur arthrosique est une douleur de type mécanique qui peut s'accompagner de poussées inflammatoires. Les antalgiques des paliers 1 et 2 peuvent être associés à des co-antalgiques tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

- Les anti-inflammatoires

Ces médicaments agissent sur la composante inflammatoire de l'arthrose. Étant donné leurs effets indésirables réels (tels que les troubles gastro-intestinaux et rénaux), ils ne sont prescrits que lorsque les antalgiques ne parviennent pas à soulager la douleur.

On distingue différents types d'anti-inflammatoires : les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la Cox-2 (coxibs) et les anti-inflammatoires stéroïdiens qui sont des dérivés de la cortisone.

La famille des AINS, administrés par voie orale, comprend de nombreux médicaments tels que l'ibuprofène, le kétoprofène et le naproxène [53]. Ces AINS sont des inhibiteurs de cyclo-oxygénases. Ils se fixent sur le site catalytique de l'enzyme en empêchant ou en bloquant de façon définitive la liaison avec son substrat naturel, l'acide arachidonique. L'ensemble des effets pharmacologiques des AINS est donc la conséquence de l'inhibition de la synthèse des prostaglandines. Par leur mécanisme d'action, ces AINS peuvent provoquer des effets indésirables tels que des troubles gastro-intestinaux ou des saignements digestifs parfois graves. Ils sont alors associés à des médicaments protecteurs de la paroi de l'estomac [54]. Les AINS peuvent également être administrés par voie topique. Ils se présentent alors sous forme d'un gel ou d'une crème qui s'appliquent directement sur l'articulation arthrosique [55–57]. Ils constituent une bonne alternative aux AINS par voie orale puisqu'ils entraînent moins d'effets secondaires digestifs. Le Diclofénac est un exemple de cette catégorie d'AINS topiques.

En dépit d'un mode d'action commun, certains AINS présenteraient moins d'effets indésirables que d'autres. Ces différences pourraient s'expliquer par des différences d'affinité pour les deux principales isoformes de cyclo-oxygénases : la COX-1 et la COX-2. La COX-1 est constitutive et participe à la formation physiologique des prostaglandines et de leurs dérivés. Au contraire, la COX-2 est essentiellement une enzyme inductible, apparaissant en particulier lors de processus inflammatoires. Il serait donc théoriquement idéal, pour traiter un phénomène inflammatoire, de bloquer sélectivement la COX-2, en évitant le blocage de la COX-1 responsable en particulier de la gastrotoxicité des AINS. C'est sur cette hypothèse que se sont développés et ont été commercialisés les inhibiteurs dits «sélectifs de la COX-2 » ou «coxibs» [58]. Le célécoxib est un exemple d'anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la Cox-2.

Les anti-inflammatoires stéroïdiens, représentés par les glucocorticoïdes ou corticostéroïdes, sont administrés en injections intra-articulaires et réduisent la douleur symptomatique de la maladie [59]. Ce sont des produits de synthèse dérivés de la cortisone, une hormone secrétée par les glandes surrénales. Après l'administration, les glucocorticoïdes se fixent à leurs récepteurs (GR) au niveau du cytoplasme des cellules arthrosiques, principalement les chondrocytes et les synoviocytes. Ce complexe ligand-récepteur formé migre dans le noyau

cellulaire et, par transactivation, régule l'expression de plusieurs gènes cibles. La lipocortine, protéine anti-inflammatoire qui inhibe la phospholipase A2 est un exemple des protéines stimulés par les glucocorticoïdes. Ces derniers sont également capables d'inhiber la transcription des gènes codants pour des cytokines pro-inflammatoires (tel que l'interleukine 2) ou des collagénases et de la stromélysine, impliquées toutes les 2 dans la dégradation du cartilage articulaire lors de l'arthrose [60,61]. Il existe des corticostéroïdes injectable à action immédiate (Betnesol®, Celestene®) ou à action prolongée (Hydrocortancyl®). Avec les glucocorticoïdes injectables à effet retard (dont l'effet dure plusieurs jours), des réactions douloureuses au site d'injection peuvent survenir dans les douze heures suivant l'injection. Elles disparaissent spontanément. Dans le but de limiter les effets secondaires tels que la perte minérale des os, l'ACR recommande de limiter le nombre d'administration de corticoïdes à 3 ou 4 fois chaque année chez le patient [62,63], ce qui limite leur intérêt thérapeutique.

- Les anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente

Les anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente (AASAL) sont, dans certains cas, prescrits en complément aux anti-inflammatoires. Les AASAL sont classés comme « chondroprotecteurs » car ils visent à protéger le cartilage articulaire en ralentissant sa dégradation. Cette catégorie thérapeutique comprend 4 médicaments : la glucosamine, la chondroïtine sulfate, les insaponifiables d'avocat et de soja (IAS) et la diacerhéine.

Dans une étude clinique réalisée par Pavelka K *et al.*, 202 patients arthrosiques (gonarthrose) ont reçu pendant 3 ans, soit de la glucosamine soit un placebo. L'étude a été conduite en double aveugle. Les auteurs ont constaté à l'issue de l'étude que la glucosamine sulfate retarderait la progression de la gonarthrose [64]. D'autres essais non concluants ont provoqué le doute autour de cet acide aminé. Il a également été rapporté que l'administration orale de la chondroïtine sulfate diminue le processus catabolique lors de l'arthrose et stimule la synthèse des GAG et des collagènes dans la matrice extra-chondrocytaire [65]. L'efficacité de ces médicaments est controversée. En février 2006, l'étude GAIT, financée par les National Institutes of Health Américains, n'a pas montré l'effet thérapeutique de la glucosamine par rapport à un placebo [66]. En septembre 2010, une méta-analyse publiée dans le British Medical Journal a montré que la glucosamine et la chondroïtine n'ont pas d'effet bénéfique sur les symptômes de l'arthrose de la hanche et du genou [67]. Par ailleurs, les effets indésirables des AASAL ne sont pas suffisamment décrits. En 2013, le Comité pour l'Evaluation des Risques en matière de Pharmacovigilance (PRAC) de l'Agence européenne du médicament a recommandé de retirer

du marché les médicaments contenant de la diacérhéine (Art 50®, Zondar® et génériques) autorisés en France depuis 1994. De nombreux effets secondaires ont été signalés, de types gastro-intestinaux sévères et fréquents (diarrhées parfois graves, mélanose colique), cutanés de nature allergique ainsi que des troubles hépatiques rares mais parfois graves. Plus récemment, le 16 janvier 2015, le ministère de la santé français a annoncé le déremboursement des médicaments contenant la glucosamine. En effet, la Commission de la transparence de la Haute autorité de santé (HAS) a estimé que ces médicaments présentent un service médical rendu insuffisant pour un maintien sur la liste des spécialités remboursables aux assurés sociaux.

### c) La viscosupplémentation

La viscosupplémentation consiste à injecter dans l'articulation douloureuse une substance visqueuse riche en acide hyaluronique (tel que le Hyalgan®) [68]. Lors de l'arthrose, le liquide synovial est appauvri en acide hyaluronique, ce qui rend le cartilage plus vulnérable aux forces de friction et de compression. La viscosupplémentation a pour objectifs thérapeutiques de stimuler la synthèse des TIMPs dans le but d'inhiber l'action des MMPs, d'améliorer la mobilité et de réduire la douleur [69]. Ce traitement est très utilisé contre l'arthrose de la hanche ou du genou [70]. Le traitement comporte de 2 à 5 injections à raison d'une injection par semaine. Les résultats apparaissent après quelques jours et persistent jusqu'à 1 an au meilleur des cas. Cependant, à l'heure actuelle, comme pour les AASAL, l'efficacité de la viscosupplémentation est discutée (environ 55% de réponse favorable). Par ailleurs, la viscosupplémentation est faiblement prise en charge par l'assurance maladie.

#### d) Les traitements chirurgicaux

La chirurgie représente la solution extrême dans le traitement de l'arthrose à un stade très avancé, caractérisée par la dégradation presque totale du cartilage articulaire entraînant une articulation non fonctionnelle [71].

- L'ostéotomie

L'ostéotomie est surtout réalisée chez les patients gonarthrosiques. Cet acte chirurgical consiste à corriger la déformation du membre inférieur en redressant le tibia ou, plus rarement, le fémur [72]. L'os déformé est d'abord sectionné puis redressé. L'ostéotomie permet aussi de rééquilibrer les pressions au niveau du genou en les diminuant au niveau de la zone arthrosique pour les reporter sur la zone saine [73]. Ce traitement ne guérit pas les gonarthrosiques (le pincement articulaire existera toujours) mais permet à la fois de soulager les douleurs et de stabiliser l'arthrose en inhibant l'aggravation du pincement articulaire. Les principaux effets indésirables constatés à la suite de cet acte chirurgical sont : les réactions inflammatoires, les hémorragies et les lésions nerveuses.

- L'arthroplastie

L'arthroplastie est préconisée pour les patients pour lesquels tous les autres types de traitements ont échoués. Elle est souvent pratiquée sur des patients souffrant de l'arthrose du genou ou de la hanche à un âge avancé. Elle consiste à remplacer, totalement ou en partie, l'articulation malade par une prothèse [74]. Pour la hanche par exemple, la tête et le col du fémur sont remplacés par une prothèse constituée de titane, d'acier ou d'alliages inoxydables associant le chrome et le cobalt. La surface articulaire est quant à elle remplacée par une hémisphère creuse en polyéthylène le plus souvent. En ce qui concerne le genou, il existe 3 familles de prothèses qui diffèrent selon la surface articulaire à remplacer. La prothèse unicompartmentale (PUC) fémoro-patellaire remplace partiellement les surfaces de l'articulation fémoro-patellaire. La PUC fémoro-tibiale substitue partiellement les surfaces d'une des 2 articulations fémoro-tibiales. La prothèse tricompartmentale à glissement (PTG) remplace la totalité des surfaces de l'articulation. L'arthroplastie donne des résultats satisfaisants dans 95% des cas (amélioration de la mobilité des patients et diminution des douleurs) [75]. Par contre, elle présente quelques limites. Les principaux inconvénients sont le risque d'usure du polyéthylène et le descellement aseptique. Les débris d'usure du matériau peuvent occasionner des réactions inflammatoires de

la part du corps humains qui compromettront la stabilité ou la fixation des implants dans l'os. De plus, dans certains cas, des infections, des thromboses veineuses profondes, des lésions neurovasculaires et des mauvaises cicatrisations ont été observées après la chirurgie [76].

- L'arthrodèse

L'arthrodèse consiste à bloquer une articulation lésée, en créant une fusion osseuse de l'extrémité des os, dans le but de corriger une déformation ou d'obtenir l'indolence [77]. Elle est souvent pratiquée lors de l'arthrose du rachis cervico-lombaire par exemple. Deux (ou plusieurs) vertèbres sont fixées entre elles de façon à stabiliser l'étage vertébral défaillant. A cette fin, on utilise un morceau d'os qui est généralement prélevé sur la crête osseuse du bassin, puis ce morceau osseux est fixé par des vis ou des crochets aux vertèbres qui doivent être immobilisées [78]. Il s'agit d'une intervention chirurgicale complexe et la fixation de 2 ou plusieurs vertèbres peut provoquer un excès de travail des disques voisins (effet domino) et accélérer leur vieillissement. L'arthrodèse est de moins en moins utilisée pour l'arthrose du genou ou de la hanche car elle crée un handicap moteur permanent. Pour ces 2 articulations, elle est préconisée lors de l'échec d'une arthroplastie.

Pour conclure ce chapitre, l'arthrose est un réel problème de santé publique. La pathologie touche le cartilage articulaire qui subit plusieurs modifications à l'échelle tissulaire, cellulaire et moléculaire. L'ensemble des traitements disponibles sont symptomatiques et non étiologiques. Ils soulagent les patients, mais n'empêchent pas l'évolution anatomique de l'arthrose et ne parviennent pas à restaurer la fonctionnalité des articulations.

Il est alors indispensable de développer de nouveaux axes thérapeutiques. Ces dernières années, l'utilisation des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) a suscité un intérêt particulier en raison de leurs propriétés spécifiques capables de traiter plusieurs pathologies dont l'arthrose.

## Chapitre 2

### *Les cellules stromales mésenchymateuses*

Au sein de l'organisme, les cellules sont renouvelées en permanence. Ce renouvellement est assuré par les cellules souches. Les cellules souches adultes se multiplient à l'identique (auto-renouvellement) puis prolifèrent pour produire des progénitures qui se différencient en plusieurs lignées cellulaires (multipotentialité). Les organismes humains adultes contiennent plusieurs types de cellules souches : les cellules souches hématopoïétiques, intestinales, épithéliales, neuronales, embryonnaires, mésenchymateuses et adipeuses [79]. Les CSM ont été décrites en 1976 par Friedenstein [80] comme étant capables de former des cellules d'aspect fibroblastique. Ce n'est qu'en 1991 que le terme de cellules souches mésenchymateuses a été donné par Arnold Caplan [81].

#### I. Sources tissulaires

Chez l'adulte, les CSM ont été mises en évidence dans différents tissus. Elles ont été identifiées pour la première fois dans la moelle osseuse [82,83], mais elles sont aussi présentes dans le tissu adipeux, le liquide et la membrane synoviale [84], les muscles et les tendons [85]. Les CSM ont également été isolées à partir de plusieurs autres tissus incluant le tissu foetal [86], la veine ombilicale, le placenta et le système vasculaire [87].

#### II. Multipotence et chondrogenèse

Les CSM sont considérées comme des cellules stromales multipotentes. En effet, elles sont capables de se différencier en lignées cellulaires adultes constituant le cartilage, de l'os, des muscles lisses, des ligaments, des tendons, du tissu adipeux et stromal [88]. Dans certaines conditions environnementales particulières, elles possèdent la capacité de se différencier en une multitude de types cellulaires tels que les cardiomyocytes [89], les fibroblastes [90], les péricytes [91], les myocytes squelettiques [92], les cellules rétinienne [93], les astrocytes [94], les cellules pancréatiques [95] et enfin les cellules neuronales [96].

La différenciation des CSM en chondrocytes (la chondrogenèse) présente un intérêt particulier dans le traitement de l'arthrose.

La chondrogenèse est une succession d'évènements régulés au cours desquels les CSM vont permettre la formation de cartilage par une différenciation en chondrocytes. L'étape la plus précoce de la chondrogenèse se traduit par une étape de migration et de recrutement des CSM au niveau des sites présomptifs de la squelettogenèse suivie d'une étape de prolifération-condensation [97]. Cette étape de prolifération et de condensation favorise les interactions cellules-cellules et cellules-matrices indispensables à la poursuite des étapes de la chondrogenèse. L'importance de ces interactions lors de la chondrogenèse des CSM est la raison pour laquelle ces cellules sont cultivées, *in vitro*, en micromasse.

La différenciation des CSM en chondrocytes, dépend de plusieurs paramètres tels les facteurs de croissance [98,99]. Les TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) sont connus comme étant des inducteurs de la différenciation chondrogénique des CSM favorisant ainsi la formation d'un néo-cartilage hyalin ectopique [100]. Ainsi, *in vitro*, le TGF- $\beta$ 1 est souvent utilisé comme le principal facteur de croissance dans un milieu de culture cellulaire chondrogénique. Ces facteurs de croissance permettent d'une part l'expression des molécules d'adhésion (telles que N-CAM et N-Cadhérine) favorisant les interactions cellule-cellule et cellule-matrice lors de l'étape de condensation des CSM et d'autre part la synthèse des composants de la matrice extra-chondrocytaire tels que les protéoglycanes, des agrécane et du collagène de type 2 [101]. Les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) sont des facteurs de croissance qui favorisent aussi la chondrogenèse des CSM. En effet, les BMP-2, 5 et 6 interviennent lors des stades terminaux de la chondrogenèse [102], tandis que BMP-7 favorise la prolifération des chondrocytes et inhibe la fin de la chondrogenèse [103]. Dans cette famille des BMPs, BMP-2 est celle qui favorise le mieux la différenciation chondrogénique des CSM [100]. Le GDF-5 (growth differentiation factor-5) est également un facteur de croissance qui induit la différenciation chondrogénique des CSM en stimulant la synthèse des protéoglycanes et du collagène 2 [104].

D'autres facteurs, telles que l'IGF (Insulin-like Growth Factor) ou le PTHrP (Parathyroid Hormone related Peptide), intervenant lors de la chondrogenèse ont été étudiées *in vitro* pour améliorer la différenciation chondrogénique des CSM. Cependant, elles ne permettent pas aux CSM de former un tissu cartilagineux comparable au cartilage natif [99].

### III. Caractéristiques des CSM

#### a) Phénotype et récepteurs à la surface des CSM

Les CSM humaines sont distinguées par des marqueurs de surface tels que CD29, CD44, CD90 et CD123 (Tableau I) [105].

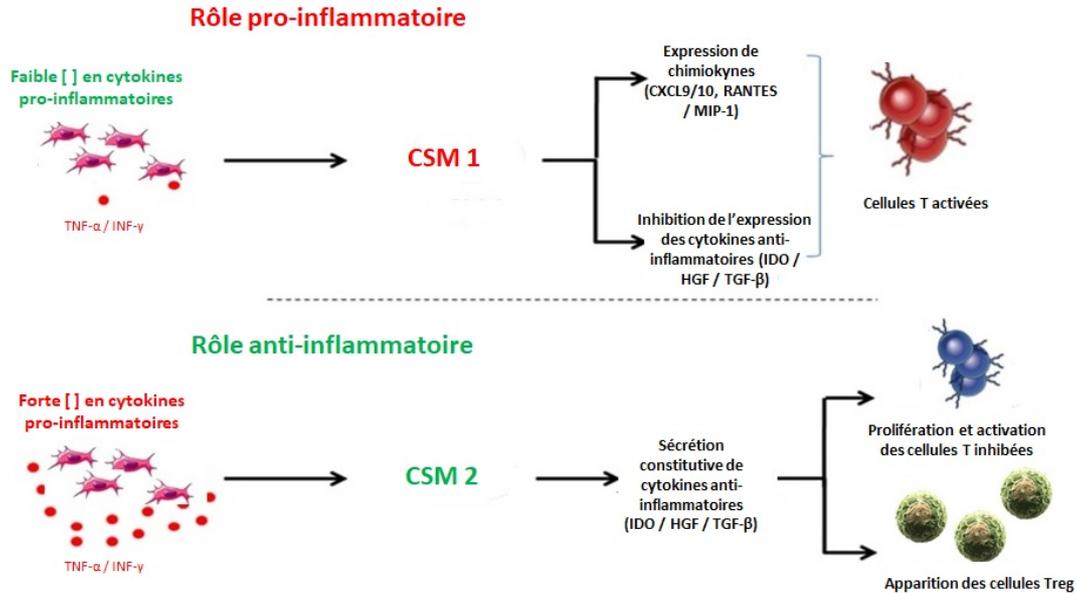
Elles expriment des molécules de surface dont les ligands sont présents sur les cellules matures des lignées hématopoïétiques comme ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, CD72, LFA-3, CD72 et ALCAM [106]. Ceci explique l'étroite interaction entre ces deux types cellulaires. Elles expriment de nombreuses intégrines qui ont un rôle important dans la mobilité cellulaire.

**Tableau I :** Les marqueurs de surface des CSM d'après Pittenger *et al.*, 2004.

Les marqueurs de surfaces de CSM	
Marqueurs présents à la surface des CSM humaines	CD13, CD29, CD44, CD49 (Intégrines)a,b,c,e,f, CD51, CD54 (ICAM1), CD58, CD71, CD73 (SH3), CD90 (Thy-1), CD102, CD105 (SH2), CD106 (VCAM), CDw119, CD120a, CD120b, CD123, CD124, CD126 (ALCAM), CD127, CD140a, CD166, P75, TGFb1R, TGFbIIIR, HLA-A,B,C, SSEA-3, SSEA-4, D7.
Marqueurs absents de la surface des CSM humaines	CD3, CD4, CD6, CD9, CD10, CD11a, CD14, CD15, CD18, CD21, CD25, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD50, CD62E,L,S, CD80, CD86, CD95, CD117, CD133, SSEA-1.

#### b) L'immunomodulation

Les données expérimentales suggèrent que les CSM possèdent des propriétés immunomodulatrices. Elles jouent un rôle anti-inflammatoire mais aussi pro-inflammatoire (Figure 6) [107–109].

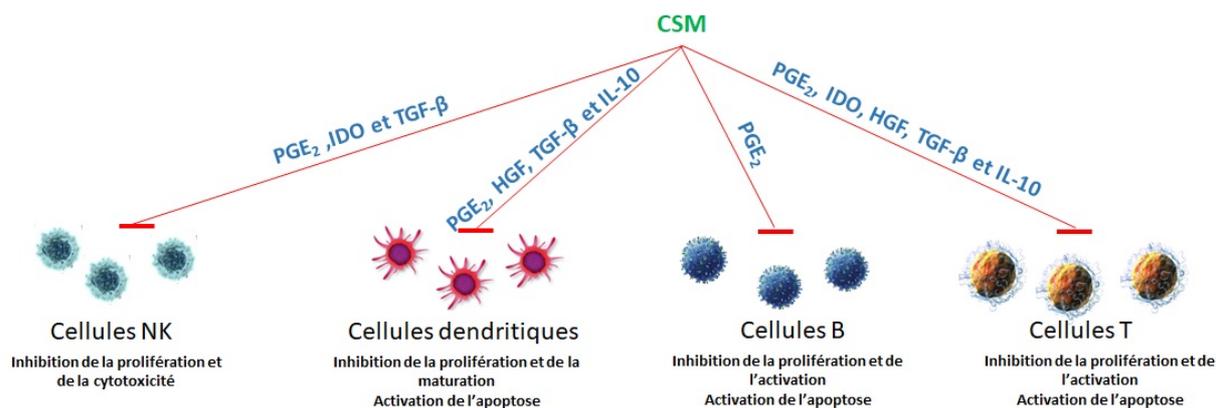


**Figure 6 :** Propriétés immunomodulatrices des CSM.

L'action des CSM dépend de la concentration locale en cytokines pro-inflammatoires tels que l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ . Ainsi, l'immunomodulation assurée par les CSM favorise d'une part la défense de l'hôte par action des CSM1 (phénotype pro-inflammatoire) et d'autre part la prévention des dommages excessifs des tissus et l'activation des mécanismes de réparation par action des CSM2 (phénotype anti-inflammatoire).

Lorsqu'elles acquièrent un phénotype CSM1, elles sécrètent des chimiokines inflammatoires tels que MIP-1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Proteins-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$ , RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted), CXCL9 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 9) et CXCL10 qui recrutent et activent les lymphocytes T [110,111].

Lorsque la concentration locale en cytokines pro-inflammatoires est élevée, les CSM acquièrent le phénotype CSM2. Elles agissent sur les cellules immunitaires en inhibant leur prolifération et leur cytotoxicité à la fois en bloquant le cycle cellulaire en phase G0-G1 des cellules immunitaires par simple contact cellule-cellule [112–114] mais aussi en sécrétant des facteurs solubles anti-inflammatoires tels que la PGE<sub>2</sub>, l'Indoleamine 2,3 Dioxygénase (IDO), l'Hépatocyte Growth Factor (HGF) et le Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) [115–119] (Figure 7).



**Figure 7 :** Inhibition des cellules immunitaires par les CSM2 dans un contexte pro-inflammatoire.

Il a également été démontré que la PGE<sub>2</sub> sécrétée par les CSM2 intervient dans la « reprogrammation » des macrophages pro-inflammatoires (M1) de l'hôte en un profil anti-inflammatoires (M2) sécrétant l'IL-10 et limitant l'extravasation des polynucléaires neutrophiles dans les tissus et l'altération tissulaire qui en résulte [120,121].

### c) Actions anti-inflammatoires des CSM2 sur les cellules immunitaires

- Les cellules NK

Les CSM2 inhibent la prolifération et la cytotoxicité des cellules NK ainsi que leur sécrétion d'une cytokine pro-inflammatoire : l'IFN- $\gamma$  [117,122]. Cette inhibition s'exerce par l'intermédiaire PGE<sub>2</sub> et du TGF- $\beta$ .

- Les cellules dendritiques

Il a été également démontré que les CSM2 agissent en inhibant la différenciation et la maturation des cellules dendritiques. La PGE<sub>2</sub>, M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), l'IL-6, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  sécrétés par les CSM2 sont responsables de l'inhibition de la différenciation des cellules dendritiques [118,123–125]. L'action inhibitrice des CSM2 sur la maturation des cellules dendritiques se produit essentiellement via l'HGF, la PGE<sub>2</sub> et le TGF- $\beta$ . Une baisse de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IL-12) et une augmentation de la synthèse la cytokine anti-inflammatoire IL-10 par les cellules dendritiques immatures ont été détectées [124,126]. Les CSM2 sont capables de bloquer, par contact direct et sans l'intervention de facteurs solubles anti-inflammatoires, l'arrêt de la division des cellules

dendritiques en phase G0-G1 [127]. Cette action des CSM2 sur les cellules dendritiques a pour conséquence l'apparition d'une population de CPA (cellules présentatrices d'antigènes) immatures qui, indirectement, entraîne une diminution de l'activation et la prolifération des lymphocytes T.

- Les lymphocytes T

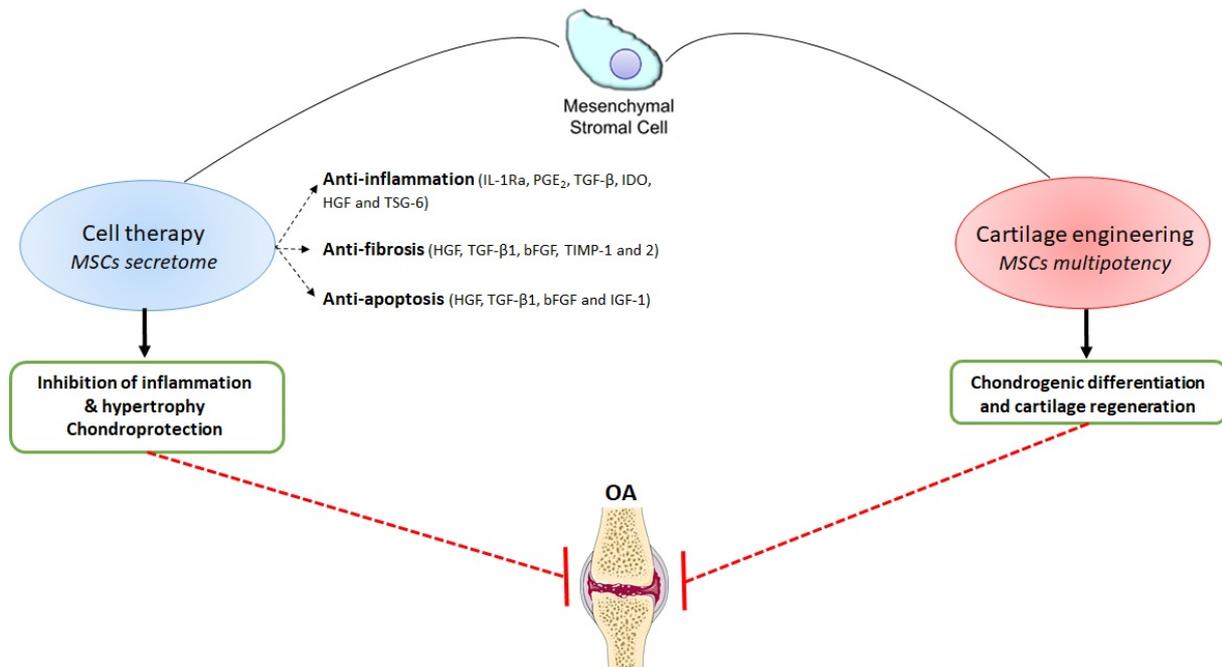
Glennie S.*et al.*, ont montré dans un modèle murin que les CSM2 issues de la moelle osseuse provoquent une baisse de la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  ainsi qu'une inhibition de la prolifération des lymphocytes T [112]. Ils ont démontré que les CSM2 agissent sur le cycle cellulaire des lymphocytes en les bloquant en G1. Les facteurs solubles, sécrétés par les CSM2, agissent également sur les lymphocytes T. Plusieurs études ont montré qu'IDO, IL-10, HGF, TGF- $\beta$ , VEGF et PGE<sub>2</sub> inhibent l'activation des lymphocytes T [119,128–131]. IDO inhibe la prolifération des lymphocytes T par la conversion du tryptophane du milieu en L-kynurénine qui est un agent pro-apoptotique des lymphocytes T, B et des cellules NK (mais sans effet sur les cellules dendritiques) [132,133]. Quant à la PGE<sub>2</sub>, elle induit la prolifération de cellules T régulatrices (Treg) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> inhibant ainsi le degré de la réponse immune. L'ajout dans le milieu de l'indométhacine, une molécule inhibitrice de la PGE<sub>2</sub>, permet de restaurer la prolifération normale des lymphocytes T [134].

- Lymphocytes B

L'action des CSM2 sur les lymphocytes B se fait à la fois par interaction cellulaire directe et par la sécrétion de facteurs solubles telle que la PGE<sub>2</sub>. *In vitro*, lorsque des CSM2 murines sont co-cultivées avec des lymphocytes B, la stimulation du milieu par l'IL-4 induit une interaction CSM2-Lymphocytes B par l'intermédiaire du BCR qui se traduit par une inhibition de la prolifération, l'activation et la différenciation des lymphocytes B [112].

#### IV. Applications des CSM dans le traitement de l'arthrose

Classiquement, le traitement de l'arthrose par les CSM est basé sur 2 concepts : l'ingénierie tissulaire et la thérapie cellulaire (Figure 8).



**Figure 8** : Stratégie de traitement de l'arthrose par les CSM.

L'ingénierie tissulaire est basée sur la multipotence des CSM, en particulier leur capacité de différenciation chondrogénique, dans le but de former un néo-cartilage qui comblera le cartilage articulaire dégradé lors de la pathologie. Le second concept, la thérapie cellulaire, se repose sur la capacité des CSM2 à sécréter, dans un contexte pro-inflammatoire arthrosique, des facteurs solubles thérapeutiques permettant à la fois de réduire l'inflammation et de protéger les chondrocytes du cartilage articulaire de la dégradation dans le but de freiner l'évolution de la maladie.

##### a) Applications anti-inflammatoires des CSM2 en thérapie cellulaire de l'arthrose

En 2013, Manferdini C. *et al.*, ont co-cultivé pendant une semaine des CSM issues du tissu adipeux (hASC, human Adipose Stem Cells) soit avec des chondrocytes soit avec des

synoviocytes inflammatoires provenant de patients gonarthrosiques (à différents stades inflammatoires) [135]. Les résultats ont montré que, par apport au contrôle (chondrocytes ou synoviocytes cultivés seuls), les hASC ont permis une diminution significative de la sécrétion dans le milieu de culture des différentes molécules pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL8/IL-8) et de chimiokines directement impliquées dans l'évolution de la maladie (CXCL1/GRO $\alpha$ , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$  et CCL5/RANTES). Ils ont également vérifié qu'IL-10, IL-1Ra, FGF-2, IDO-1 et la galectine 1 secrétés par les hASC n'étaient pas impliqués dans l'action anti-inflammatoire exercée par les hASC sur les chondrocytes et les synoviocytes. En revanche, ils ont démontré que la PGE2 sécrétée par les hASC était directement responsable de cet effet anti-inflammatoire par rétrocontrôle négatif. En effet, en co-culture, les hASC surexpriment PGE2 qui, paradoxalement, inhibe COX-2 (et donc la synthèse de la PGE2 catabolique) au niveau des chondrocytes et des synoviocytes. Cette action anti-inflammatoire des hASC n'a été observée que lorsque les chondrocytes et les synoviocytes arthrosiques exprimaient un taux élevé de cytokines inflammatoires. Cette observation est conforme avec les résultats obtenus auparavant par Bonfield TL *et al.*, dans un modèle d'inflammation pulmonaire murin [136]. Selon ces travaux, les CSM devraient être injectées lors de la phase de l'inflammation aiguë pour obtenir un effet thérapeutique optimal.

L'action anti-inflammatoire des CSM a également été démontrée par Desando *et al.*, *in vivo* sur des lapins gonarthrosiques [137]. L'injection d'ASC autologues ( $2 \times 10^6$  par injection et  $6 \times 10^6$  de cellules par injection) a permis de réduire significativement l'expression de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  au niveau du cartilage et de la membrane synoviale jusqu'à 6 mois. Cette réduction de la concentration du TNF- $\alpha$  n'est pas dose dépendante. Les auteurs ont aussi pu mettre en évidence une action chondroprotectrice des ASC par expression de l'HGF. Le rôle anti-fibrotique et chondroprotecteur de l'HGF sécrété par les CSM lors de l'arthrose a été démontré *in vitro* par Maumus M. *et al.*, [138] avec des co-cultures de chondrocytes de patients arthrosiques et des hASC. Dans ces conditions, une importante diminution de l'expression de TGF- $\beta$ 1 et des collagènes de type 1 et 3 par les chondrocytes a été observée, ainsi qu'une surexpression de l'HGF par les hASC. Ces modifications se sont traduites par une baisse de l'hypertrophie et de la fibrose. Le rôle de l'HGF a été prouvé par son blocage par un anticorps qui a permis de rétablir la fibrose des chondrocytes. L'action anti-hypertrophique de l'HGF s'expliquerait par la diminution de la sécrétion du TGF-1 $\beta$  par les chondrocytes arthrosiques. En effet, il a été montré que la diminution de la concentration du TGF-1 $\beta$  dans le milieu inhibe la voie de signalisation ALK1-Smad1/5/8, qui lorsqu'elle est activée, permet l'hypertrophie par activation de Runx2 et la synthèse de MMP13. L'augmentation de la concentration de l'HGF

dans le milieu active le facteur de croissance CTGF (Connective Tissue Growth Factor), un inhibiteur de la synthèse du collagène de type 1 et donc de l'hypertrophie et de la fibrose [139]. Enfin, le rôle anti-fibrotique et anti-hypertrophique exercé par l'HGF a permis de protéger les chondrocytes de l'apoptose.

## b) Ingénierie tissulaire et essais cliniques

Dans l'ingénierie du cartilage, la première approche a été d'injecter des cellules déjà spécialisées, les chondrocytes, pour combler les défauts du cartilage articulaire. En pratique, cette stratégie présente 2 inconvénients : (i) les chondrocytes, avant leur injection et au cours de leur prolifération *in vitro*, ont tendance à se différencier [99,140,141] et, (ii) leur efficacité thérapeutique, *in vivo*, semble dépendre de l'âge des patients [142]. Cette dernière étude clinique, qui porte sur un total de 72 patients arthrosiques, 10 à 15 millions de chondrocytes autologues issues du cartilage d'une articulation saine (32 patients) ou de CSM autologues issues de la moelle osseuse (32 patients) ont été injecté en intra-articulaire. Les résultats ont montré un effet bénéfique des CSM, sur la formation d'un néo-cartilage hyalin et une amélioration de la qualité de vie, chez les 32 patients traités, indépendamment de leur âge. En revanche, un état thérapeutique des chondrocytes n'a été observé que chez les patients de plus de 45 ans.

Prenant en comptes les limites de l'injection des chondrocytes, les CSM sont considérées comme une nouvelle source cellulaire prometteuse dans le traitement de l'arthrose du fait de leur potentiel de différenciation. Elles constituent ainsi un outil thérapeutique prometteur pour la régénération et la réparation du tissu cartilagineux. Plusieurs essais cliniques utilisent les CSM dans la régénération du cartilage. Ces essais cliniques, de phase 1 à 2, sont soit en cours ou bien terminés et visent à évaluer la capacité des CSM à réparer des défauts de cartilages traumatiques, essentiellement de la hanche ou du genou. Plusieurs stratégies ont été testées. La plus simple et la plus fréquente consiste à injecter directement dans l'articulation des CSM « fraîches » directement après leur collecte et sans étape de culture cellulaire [143] ou après une étape de prolifération *in vitro* de 2 à 4 semaines. Dans ces cas, les CSM injectées sont essentiellement issues de la moelle osseuse, du tissu adipeux ou du cordon ombilical du patient arthrosique ou de donneurs sains [144,145].

Parmi les premiers essais cliniques publiés, Centeno CJ *et al.*, ont prélevé des CSM de la moelle osseuse de la crête iliaque d'un patient de 46 ans présentant une gonarthrose sévère du genou

gauche [146]. Après une étape de prolifération comprenant 5 passages, 22 millions de CSM ont été injectées par voie percutanée (aiguille 25 G, 0,5 mm de diamètre) dans l'articulation gauche. Six mois après l'injection, l'IRM a mis en évidence une augmentation du volume supérieure à 20% et 28% respectivement du cartilage articulaire et du ménisque gauche du patient. Ce traitement a également montré un effet antalgique indirect et a permis une amélioration de la mobilité du patient. Dans un autre essai, Orozco L *et al.*, ont traité 12 patients gonarthrosiques sévèrement atteints (stade 2 à 4 selon le score de Kellgren et Lawrence), en leur injectant, après 3 semaines d'amplification, 40 millions de CSM autologues issues de la moelle osseuse [147]. Un an après, l'étude quantitative par T2-mapping en IRM a montré une diminution d'environ 27% du PCI (Poor Cartilage Index) chez 11 des 12 volontaires et une diminution progressive (de 65% à 78%) des gênes fonctionnelles et des douleurs ressenties, mettant ainsi en évidence l'effet thérapeutique des CSM injectées.

Dernièrement, la 1<sup>ère</sup> phase de l'essai ADIPOA, conduit par les professeurs Christian Jorgensen et Frank Barry, a pris fin [148]. Il a été conduit sur 18 patients volontaires gonarthrosiques (du stade primaire aux stades plus avancés avec une majorité au stade 4 (83% des patients)) qui ont reçu une injection unique de CSM autologues (issues du tissu adipeux) directement dans l'articulation. Trois doses différentes de cellules ont été injectés en intra-articulaire ( $2 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  et  $50 \times 10^6$ ). Les premiers résultats ont montré une réponse positive chez 80% des sujets, avec un gain de fonctionnalité et une baisse significative de la douleur neuf mois après l'injection. Les améliorations les plus importantes ont été observées chez les patients ayant reçu  $2 \times 10^6$  CSM au total. Ainsi, un excès en CSM injectées par rapport à la concentration optimale, ne favorise pas leur effet thérapeutique. La phase 2 de l'essai, qui consiste à évaluer à l'échelle moléculaire et histologique les effets des CSM sur l'évolution de la maladie, a débuté à la fin de l'année 2015 sur 150 patients.

En raison de leur capacité à réparer d'autres tissus et de leur aptitude à diminuer le processus inflammatoire, les CSM ont été appliquées dans des essais cliniques en rapport avec d'autres pathologies. Les CSM ont démontré un effet thérapeutique dans le traitement du diabète, de l'ostéogenèse imparfaite, des pathologies gastro-intestinales, des maladies cardio-vasculaires, dans le soutien de l'hématopoïèse et la prévention des réactions de GVHD (Graft Versus Host Disease) [149,150].

Les résultats de ces essais cliniques sont assez contradictoires en ce qui concerne la dose optimale de CSM à injecter et la durée nécessaire pour observer un effet thérapeutique, probablement en raison de limitations de cette stratégie.

## V. Limitations de l'application des CSM

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'application des CSM présente deux principales limites. D'une part, les méthodes d'injection utilisées entraînent une mort cellulaire massive dépendante du diamètre interne du système d'injection [151,152] et d'autre part une fuite de la zone d'injection des CSM est observée en raison de leur propension à migrer [153,154]. Ainsi, Detante *et al.*, ont injecté par voie intraveineuse  $3 \times 10^6$  de CSM marquées chez des rats sains et des rats présentant un accident vasculaire cérébral [154]. Deux heures et 20 heures après l'injection, les CSM ont été localisées chez les 2 groupes de rats traités dans divers organes et essentiellement, par ordre croissant, le poumon, les reins, le foie, la rate, le sang, l'estomac, le cœur et le cerveau. Un nombre important de CSM a aussi été détectées dans l'urine de ces animaux. Dans une autre étude, lorsque Toupet K. *et al.*, ont injecté, par voie intra-articulaire, un million de CSM humaines issues du tissu adipeux dans des souris [153], seuls 15% des CSM injectées ont été détectées *in situ* après 1 mois et uniquement 1,5% après 6 mois. La majorité des cellules avaient migrées vers divers organes tels que le cœur, les poumons, les intestins, la rate et le cerveau des souris.

L'encapsulation des CSM dans des biomatériaux polymériques est une approche qui pourrait contourner ces limitations décrites et améliorer ainsi leur utilisation thérapeutique. En effet, l'incorporation des cellules dans des particules polymériques permet de les protéger lors de l'injection [155,156]. Aguado *et al.*, ont comparé la viabilité des CSM, avec ou sans encapsulation dans l'alginate, après une injection à travers une aiguille de 28 G [151]. La viabilité des cellules non encapsulées n'est que de 58% contre 89% lorsqu'elles sont encapsulées. Cette technique permet également de diminuer la migration des CSM en réduisant leur mobilité. Des CSM encapsulées et marquées dans l'agarose (particules de 106  $\mu\text{m}$  de diamètres) ont été injectées en intra-myocardique dans un modèle animal présentant une lésion cardiaque [157]. Elles ont été détectées au niveau du site d'injection pendant toute la durée de l'étude (6 mois). En revanche, lorsqu'elles ont été injectées directement sans être encapsulées,

elles n'ont été détectées *in situ* que pendant les deux premiers jours confirmant ainsi leur capacité de migration.

Il a été également démontré que l'encapsulation dans des biomatériaux fournit aux CSM encapsulées un micro-environnement comparable à celui de leur matrice extracellulaire ce qui favoriserait, par rapport à leur injection en 2 dimensions, une amélioration de leur biofonctionnalité [158,159] sur une durée prolongée [160].

Pour conclure ce chapitre, les CSM semblent avoir un avenir prometteur en médecine. De par leur multipotence et leur sécrétome, elles peuvent constituer un outil thérapeutique en médecine régénérative et dans le traitement des maladies inflammatoires.

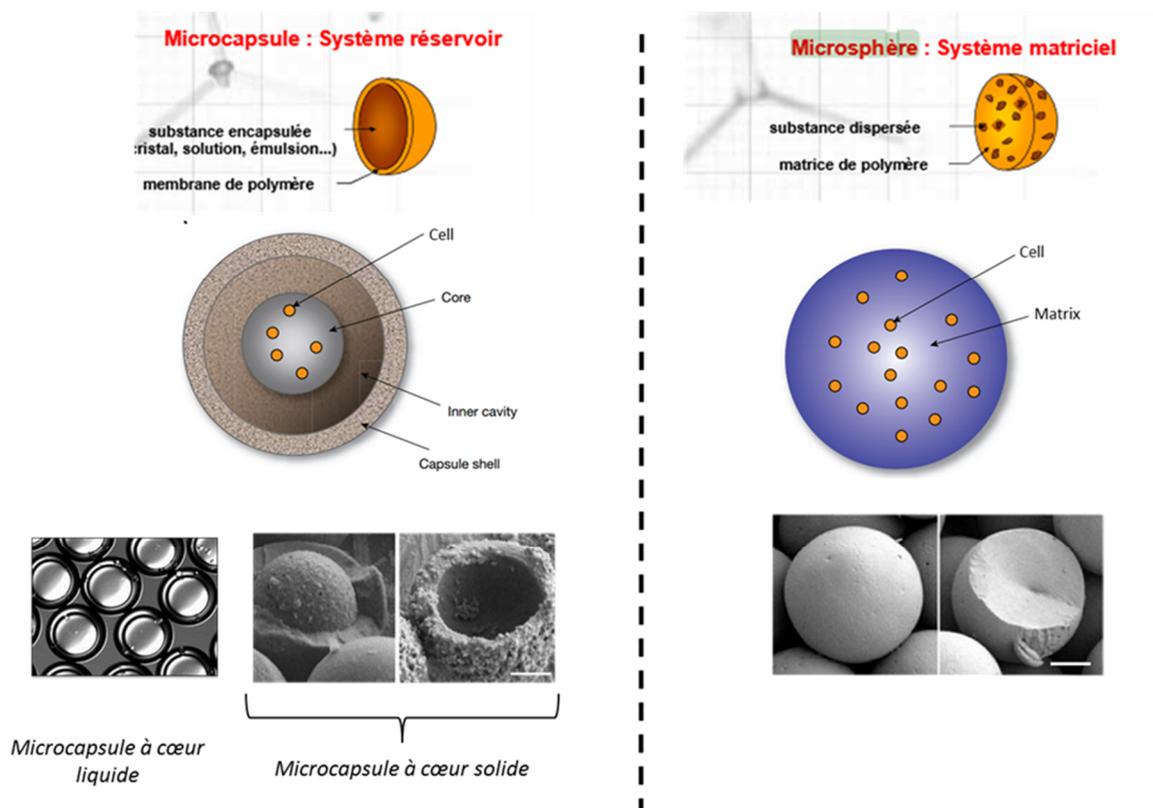
Cependant, l'injection des CSM souffre de 2 limitations majeures. Plusieurs travaux montrent que la protection des CSM dans des particules d'hydrogels réticulés (issus de matériaux biocompatibles) permettrait de contourner les limitations et ainsi améliorer l'efficacité thérapeutique des CSM.

# Chapitre 3

## L'encapsulation des CSM

### I. Généralités

L'encapsulation des CSM a pour objectif de les protéger au sein d'une structure sphérique, appelée particule, constituée de biomatériaux. Les particules formées sont classées en deux groupes de structure différente (Figure 9).

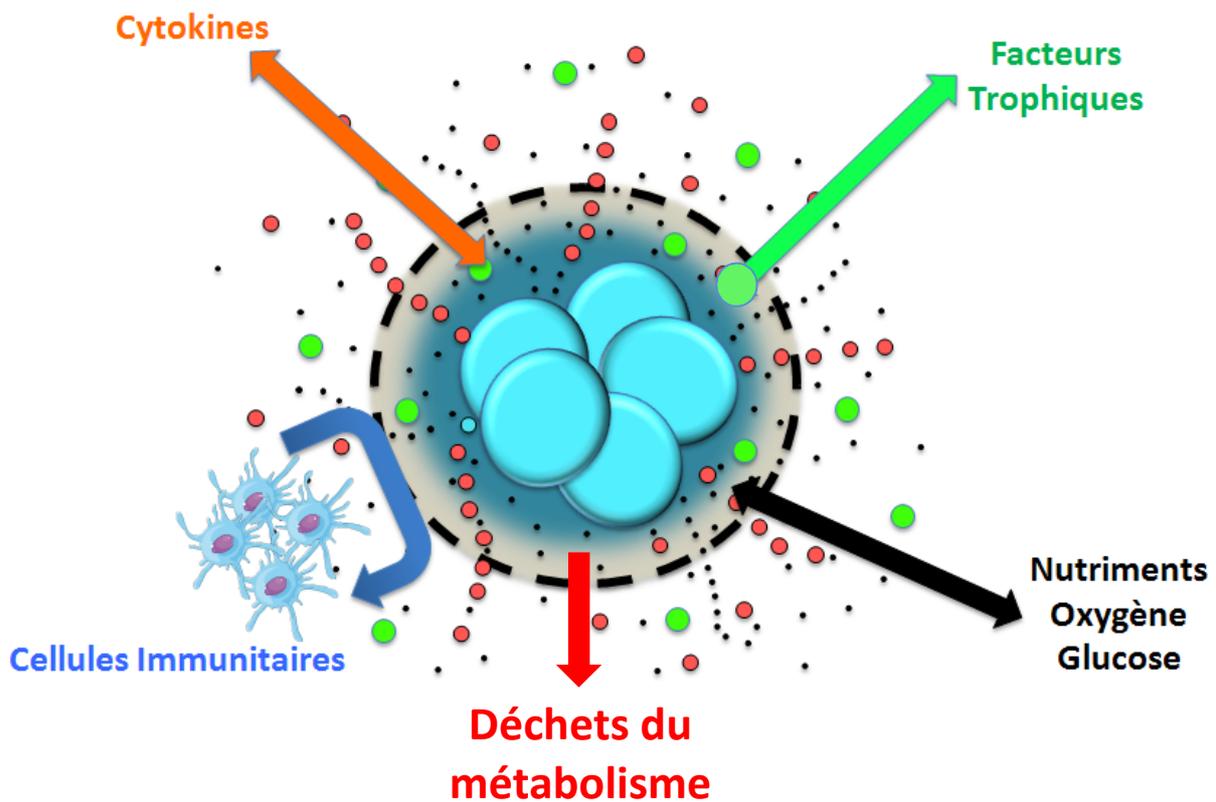


**Figure 9** : Représentation des deux types de particules.

Source : Figure modifiée à partir de « Orbis Biosciences ».

Les capsules sont des particules creuses composées d'une enveloppe formée par un film continu du polymère réticulé qui isole les cellules encapsulées au cœur de cette entité. Il s'agit d'un système réservoir. Les sphères, quant à elles, sont des particules pleines composées d'un réseau continu de matériau support dans lequel sont dispersées les cellules encapsulées. Il s'agit d'un système matriciel.

L'encapsulation des CSM consiste à incorporer les CSM à l'intérieur d'un hydrogel réticulé biocompatible et composé d'une matrice semi-perméable qui évitera aux composants du système immunitaire (incluant les anticorps et les cellules immunitaires) de l'hôte d'entrer directement en contact avec les cellules encapsulées afin d'éviter une activation de la réponse immunitaire et donc préserver les CSM (Figure 10). Cette notion de perméabilité dépend directement de la taille et la densité des pores à la surface des particules.



**Figure 10** : Principe de l'encapsulation des CSM.

Ainsi, la taille des pores de la matrice devra donc être suffisamment petite afin d'empêcher (i) les cellules immunitaires de rentrer en contact avec les CSM encapsulées et (ii) les CSM encapsulées de migrer vers l'extérieur de la particule.

A l'inverse, le matériau qui entoure les cellules ne doit pas constituer une barrière physique contre la diffusion d'éléments indispensables à la survie et la biofonctionnalité des CSM encapsulées. Ainsi, il doit permettre la diffusion libre de l'oxygène et des nutriments qui proviennent du sang, et des déchets du métabolisme cellulaire. Il doit également permettre à la

fois la diffusion des cytokines pro-inflammatoires vers les CSM et la diffusion des facteurs solubles thérapeutiques, produits par les CSM stimulées, vers l'extérieur de la particule. Ainsi, la réussite de l'encapsulation cellulaire requiert un équilibre précis entre la perméabilité et le seuil de rétention des molécules (MWCO, molecular weight cut-off) [161,162].

L'encapsulation cellulaire est mise en œuvre après mélange des cellules avec le polymère en solution qui est ensuite réticulé dans des conditions opératoires qui dépendent de la nature du polymère. Ce procédé a été proposé par Lim et Sun en 1980 qui ont encapsulé des cellules pancréatiques dans de l'alginate pour les injecter chez des rats diabétiques dans le but d'éviter les traitements immunosuppresseurs [163].

## II. Biomatériaux utilisés pour l'encapsulation des CSM

L'encapsulation cellulaire requiert l'utilisation de matériaux biocompatibles [164]. La nature des biomatériaux, leur degré de polymérisation et le procédé d'encapsulation ont une influence sur les propriétés physico-mécaniques des particules générées. Plusieurs polymères naturels ou synthétiques ont déjà été évalués pour l'encapsulation des CSM [165]. Chaque polymère possède des avantages mais aussi des inconvénients. Les polymères naturels ont été les plus étudiés en raison de leur biocompatibilité et de la simplicité de leur procédé de polymérisation. Cependant, pour leur obtention, ils nécessitent souvent des procédés d'extraction avec des traitements chimiques lourds ainsi qu'une purification poussée pour éviter la présence de toxines résiduelles qui peuvent provoquer des réponses immunitaires *in vivo* [166,167]. Enfin, il a été démontré que les polymères naturels présentent aussi de faibles propriétés mécaniques difficilement modifiables [168], d'autant plus que les modifications chimiques expérimentées ont été associées à une augmentation de leur toxicité [169].

Les polymères synthétiques utilisés offrent de plus grandes propriétés mécaniques et une modulation facilitée de ces propriétés pour adapter les particules obtenues aux propriétés et aux exigences du tissu étudié. Une meilleure reproductibilité des particules a également été observée [170]. Cependant, l'encapsulation cellulaire dans ce type de polymère n'est pas autant décrite que celle dans les polymères naturels et les effets indésirables à long (voire moyen) terme sont peu connus. Par ailleurs, la mise en œuvre de certains de ces polymères nécessite des conditions opératoires extrêmes (température et pH) inappropriées pour l'encapsulation cellulaire [171].

Dans le but d'optimiser l'encapsulation des cellules, des polymères ont été associés entre eux pour former des copolymères. Cette stratégie a montré son intérêt pour améliorer les propriétés mécaniques des hydrogels et de les rendre adéquat pour une application en ingénierie tissulaire [172–175].

#### a) Les principaux polymères naturels

Plusieurs polymères naturels ont été utilisés pour l'encapsulation de CSM (Tableau II).

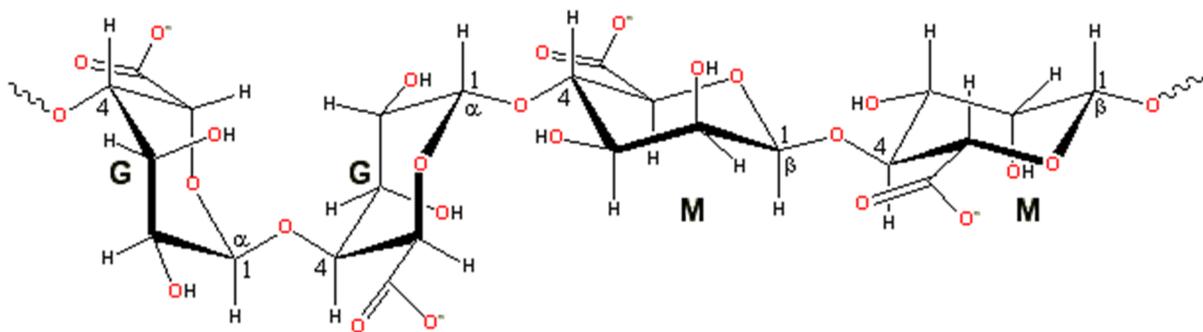
**Tableau II** : Principaux polymères naturels utilisés pour l'encapsulation des CSM en ingénierie tissulaire.

Polymères	Origine	Type et caractéristiques	Réticulation	Avantages et Inconvénients	Exemples d'encapsulation de CSM
<b>Alginate</b>	Algues marines	Polysaccharide anionique	Ionique	+ Gélification rapide -Forte résorbabilité en milieux physiologiques	[176–178]
<b>Chitosan</b>	Crustacés	Polysaccharide cationique	Ionique	+ Biocompatible -Réticulation nécessite des modifications chimiques qui augmentent le risque de toxicité	[179,180]
<b>Collagène</b>	MEC	Protéine	Thermique et par variation du pH	+ Favorise les interactions « cellules-matrice » -Faibles propriétés mécaniques	[181,182]
<b>Agarose</b>	Algues marines	Polysaccharide de charge neutre	Thermique	+ Biocompatible -La température de réticulation doit être ajustée pour être compatible avec l'encapsulation cellulaire	[157,183]

<b>Acide Hyaluronique</b>	MEC	Polysaccharide anionique	Thermique ou photonique	+ Biocompatible Réticulation nécessite des modifications chimiques qui augmentent le risque de toxicité	[184,185]
---------------------------	-----	--------------------------	-------------------------	--	-----------

### 1. L'alginate

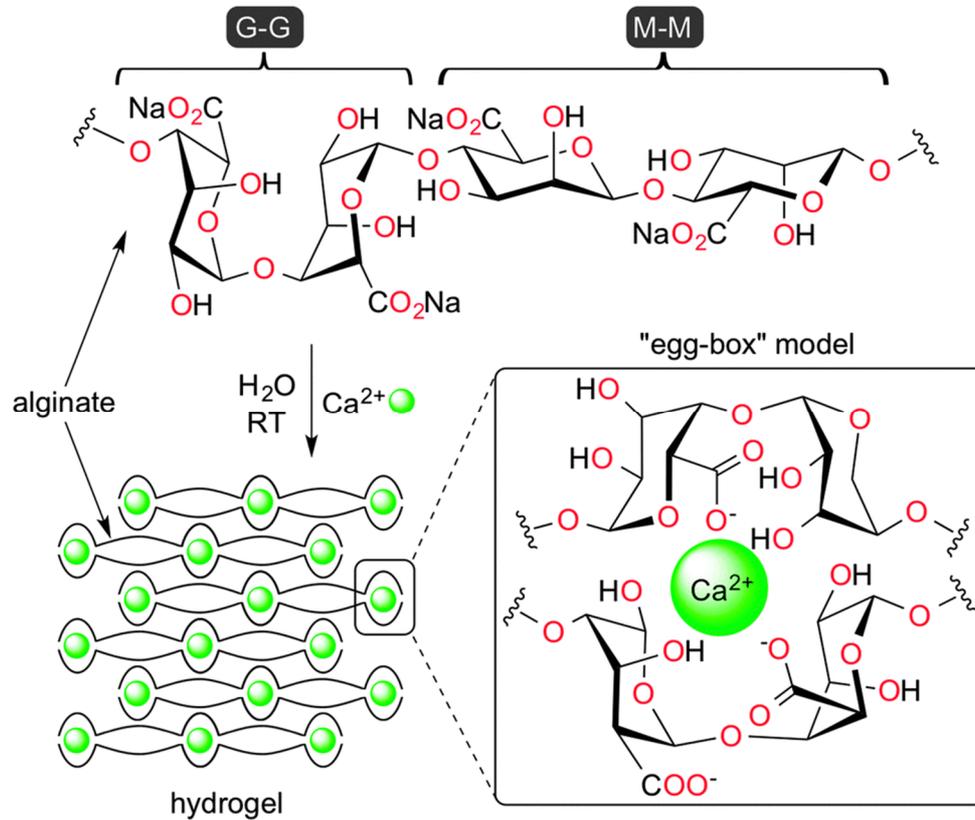
Il s'agit du polymère le plus décrit pour l'encapsulation cellulaire. L'alginate de sodium est un polysaccharide issu des algues marines brunes [186]. Ce polymère anionique est composé de deux types de monomères : l'acide  $\alpha$ -L-guluronique (G) et l'acide  $\beta$ -D-mannuronique (M) liés en 1-4 selon des proportions et des arrangements variables (Figure 11).



**Figure 11** : Structure de l'alginate.

Les caractéristiques physico-chimiques et mécaniques, telles que la rigidité, l'élasticité et la taille des pores [187,188] des particules issues de l'alginate dépendent fortement de la proportion G / M. Une forte proportion en G renforce les propriétés mécaniques (résistance à la contrainte mécanique) et génère une taille de pore plus importante, alors que la richesse en M favorise son élasticité. La réticulation de l'hydrogel d'alginate, se fait en présence d'un cation divalent tel que le calcium ou le baryum. Une réticulation ionique se produit par échange entre l'ion sodium monovalent et le cation divalent entraînant des interactions essentiellement entre

les blocks G des chaînes d'alginate et le cation divalent. Cette dimérisation est appelée structure type "boite à œufs" [189] (Figure 12).



**Figure 12** : Réticulation ionique de l'alginate en présence du calcium.

Source : [190].

La réticulation est réversible *in vitro* mais aussi *in vivo* ce qui limite son utilisation pour le développement de système de libération de molécules thérapeutiques sur une longue période, mais par contre, favorise son emploi en ingénierie tissulaire. Ainsi, lorsque les particules d'alginate sont placées dans des solutions contenant des agents chélateurs à des concentrations physiologiques, elles dérétyculent [191]. Une étude a montré qu'après l'encapsulation de CSM (humaines et issues du cordon ombilical) dans l'alginate, le début de dérétyculation des particules est observé à partir du 21ème jour après la culture dans un milieu ostéogénique [192].

## 2. *L'acide hyaluronique*

L'acide hyaluronique (HA) est un polysaccharide anionique synthétisé par la hyaluronate synthétase et composé d'une répétition de 1,3- $\beta$ -D-acide glucuronique et de 1,4- $\beta$ -N-acetyl-D-glucosamine [193]. Il s'agit d'un composant majeur de la MEC des tissus conjonctifs tel que le cartilage [194]. Dans sa forme native, cet acide est hydrophile, soluble en solution aqueuse et possède de faibles propriétés mécaniques. Une modification chimique au niveau des groupements carboxyliques, hydroxyles ou acétyles permet sa réticulation [195,196]. L'une des stratégies consiste à traiter l'acide par du méthacrylate pour permettre une photoréticulation. L'augmentation de la concentration du méthacrylate augmente la rigidité de l'hydrogel HA réticulé et diminue la capacité de diffusion des molécules à travers la matrice [197,198].

Dans la littérature, l'acide hyaluronique est surtout utilisé pour encapsuler des cellules dont la MEC est riche en acide hyaluronique et en glycosaminoglycanes. Dans l'ingénierie tissulaire du cartilage, ce polymère est très utilisé pour la différenciation chondrogénique des CSM encapsulées [199–201].

Une étude de Khetan. S nous montre l'importance des propriétés mécaniques de l'acide hyaluronique sur la multipotence des CSM encapsulées [202]. Lorsque ces dernières sont encapsulées dans l'acide hyaluronique dont les propriétés élastiques sont importantes, les CSM subissent des forces de tractions qui induisent leur différenciation ostéogénique. En revanche, une réduction de cette élasticité (notamment par double réticulation du polymère) favorise la différenciation adipocytaire des CSM encapsulées.

## 3. *L'agarose*

L'agarose est un polysaccharide de charge neutre et issu des algues marines rouges : *Rhodophyceae* [203]. Ce polysaccharide est composé de deux types de monomères : le  $\beta$ -D-galactopyranose et le 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galactopyranose[204]. Les groupes hydrophobes de l'agarose sont responsables de sa réticulation. Cette dernière nécessite 2 étapes : la solubilisation de l'agarose et une augmentation de la température. La solubilisation du polysaccharide dans une solution aqueuse entraîne des modifications structurelles : il se déroule et s'étire. A partir de 35° à 40°C, les chaînes se rapprochent de façon parallèle pour isoler leurs groupes hydrophobes et expulser les molécules d'eau entre eux. Ces groupes se tournent vers l'intérieur et permettent un rapprochement des chaînes et la formation de liaisons hydrogènes. L'association se produit en adoptant une structure en hélice. Ces hélices se lient pour former

des agrégats au sein desquels l'eau sera « emprisonnée », l'hydrogel devient alors solide [205]. La température de réticulation de l'agarose dépend fortement de la structure et de la masse moléculaire du polymère. Quant à la taille des pores des particules d'agarose obtenues, elle dépend essentiellement de 2 paramètres : la température de réticulation et la concentration de l'hydrogel. Plus la température de réticulation est faible, plus la taille des pores des particules sera faible et l'élasticité importante [206]. L'augmentation de la concentration de l'agarose provoque également une diminution de la taille des pores [207]. *In vitro*, la dégradation des particules d'agarose est possible à l'aide de l'agarase [208]. *In vivo*, cette enzyme n'existe pas et les particules d'agarose ne sont pas alors biodégradables.

#### 4. *Le chitosan*

Le chitosan est un polysaccharide cationique issu de la chitine, composant de l'exosquelette des arthropodes ou de l'endosquelette des céphalopodes. La désacétylation de la chitine permet l'obtention du chitosan [209]. Ce dernier n'est soluble qu'en milieu acide par protonation des groupes amines présents sur la macromolécule. Le chitosan est souvent réticulé chimiquement en présence d'aldéhyde, tel que le glutaraldéhyde [210,211], comme agent de réticulation.

Les propriétés physiques et chimiques d'un gel de chitosan réticulé sont modulables. Elles peuvent être contrôlées en particulier par le degré de désacétylation de la chitine. Ainsi, l'augmentation de la désacétylation favorise l'adhésion et la prolifération des cellules encapsulées et diminue la dégradation enzymatique des particules de chitosan par les lysozymes [212].

La solubilisation du chitosan en milieu acide constitue un obstacle majeur à l'encapsulation des cellules. Plusieurs solutions ont été proposées pour contourner ce problème. Il a été montré par exemple que la neutralisation du gel de chitosan acide, par ajout d'un sucre phosphate ou polyol-phosphate, permet la réticulation à la température corporelle [213] et favorise ainsi l'encapsulation des cellules.

## 5. Le collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante dans l'organisme humain. Cette protéine est constituée de 3 hélices comptant chacune 1050 acides aminés. Celles-ci sont reliées par des liaisons covalentes et des liaisons hydrogène entre l'hydroxylysine et l'hydroxyproline [214]. Le collagène est classiquement solubilisé dans un milieu acide. Il a été démontré, *in vitro*, que cette protéine est capable de s'autoréticuler par neutralisation du pH du milieu acide (par addition de NaOH par exemple) ou par modification de la température [179,215,216]. Le collagène peut être également réticulé par un traitement physique tel que l'irradiation UV [217,218] ou par addition de glutaraldéhyde.

Parmi les différents types de collagène animaux, seuls les collagènes de type 1 et 2 ont été utilisés pour l'encapsulation cellulaire. Les particules de collagènes sont pH-réversibles et sont biodégradables par voie enzymatique (métalloprotéinase et collagénase) [219]. En revanche, ces hydrogels favorisent l'adhésion et la prolifération des cellules encapsulées [220]. Enfin, bien qu'il soit possible d'améliorer les propriétés mécaniques d'un collagène par l'incorporation de différents agents de réticulation (glutaraldehyde, formaldéhyde, carbodiimide), ces propriétés demeurent faibles. Par ailleurs, ces agents de réticulation sont des facteurs de toxicité mutagènes.

### b) Les polymères synthétiques

Parmi les polymères synthétiques le Polyéthylène glycol (PEG) est le plus utilisé pour l'encapsulation cellulaire. Le PEG est un polyéther linéaire hydrophile et composé d'une répétition (supérieure à 4) de la séquence ( - O - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub>- ) [221]. Ce polymère est très souvent co-polymérisé avec des diacrylates (PEGDA) ou diméthacrylates (PEGDMA), puis réticulé par photoréticulation [222]. L'application des rayons UV permet la réticulation rapide du co-polymère en créant des liaisons covalentes, notamment entre les groupements thiols. Les particules obtenues ont des propriétés mécaniques modifiables pour les adapter aux tissus étudiés [223]. La viabilité des CSM encapsulées dans ces co-polymères est faible. Pour contourner ce problème, Nuttelman CR *et al.*, ont proposé une modification du co-polymère PEGDA en lui greffant soit des groupements phosphates (pour attirer dans les particules de l'ostéopontine) ou bien la séquence peptidique RGD (Arg-Gly-Asp, connue pour favoriser

l'adhésion des cellules encapsulées) [224]. Les auteurs ont montré qu'en greffant la séquence peptidique RGD ou les groupements phosphate, la viabilité des CSM encapsulées à J7 passe de 15% à respectivement 75% et 97%. D'autres modifications chimiques du PEG ont été réalisées, notamment pour le rendre biodégradable et favoriser l'adhésion des cellules encapsulées, dans le but optimiser son utilisation en ingénierie tissulaire [225].

De façon plus marginale, d'autres polymères synthétiques, de la famille des polyacrylates et des polyesters aliphatiques, ont été utilisés pour l'encapsulation des CSM (Tableau III).

**Tableau III** : Polymères synthétiques les plus utilisés pour l'encapsulation des CSM en ingénierie tissulaire.

<b>Polymère</b>	<b>Famille</b>	<b>Encapsulation de CSM</b>
PEG	Polyéther	[226–228]
Méthacrylate	Polyacrylate	[229]
Polyacrylamide	Polyacrylate	[172,230]
HEMA (HydroxyethylMethacrylate)	Polyacrylate	[231]
PLGA(acide poly(lactique- co-glycolique))	Polyester aliphatique	[232]
Polycaprolactone	Polyester aliphatique	[232]
PVA	Acétate de polyvinyle	[233]

### c) Choix du polymère pour l'encapsulation des CSM

Comme abordé précédemment, le traitement de l'arthrose par les CSM se repose sur 2 stratégies : l'ingénierie tissulaire et la thérapie cellulaire.

Le succès de la première stratégie, l'ingénierie du cartilage, lors de l'encapsulation des CSM dépend de plusieurs facteurs. Les CSM doivent rester viables et maintenir leur chondrogenèse après l'encapsulation. Par conséquent, le choix du polymère est crucial pour assurer ces 2 conditions. Le polymère sélectionné doit favoriser l'adhésion des CSM encapsulées et la formation d'interactions cellules-matrice et cellules-cellules. Ces interactions sont

indispensables à l'activation des voies de signalisation, telles que Notch et Wnt/ $\beta$ -caténine, impliquées dans la chondrogenèse des CSM [234,235]. Les propriétés mécaniques et de diffusion des particules obtenues sont également à prendre en considération. La particule doit être plutôt élastique que rigide pour favoriser la chondrogenèse des CSM plutôt que leur ostéogénèse [236,237]. Le polymère sélectionné doit également générer des particules dont la matrice (i) est assez perméable pour la diffusion des nutriments essentiels à la survie des cellules encapsulées et (ii) présente une taille de pore inférieure à la taille des cellules encapsulées et immunitaires. Enfin, le polymère doit être assez résorbable après l'injection *in vivo*, pour permettre aux CSM, encapsulées et différenciées en chondrocytes, d'être libérées pour combler le défaut cartilagineux et régénérer le cartilage articulaire.

La réussite de la thérapie cellulaire, requiert des exigences similaires à celles évoquées précédemment : le maintien de la viabilité et de la biofonctionnalité, c'est-à-dire la capacité des CSM après leur encapsulation à sécréter des facteurs solubles dans un contexte pro-inflammatoire. En revanche, le polymère sélectionné doit générer des particules non résorbables pendant la durée de l'effet souhaité. Quant à l'adhésion des CSM à la matrice de la particule après leur encapsulation, contrairement à la stratégie précédente, cette condition n'est pas obligatoire pour le succès de ce concept.

Il n'existe donc pas un matériau « idéal » pour l'encapsulation des CSM. Un matériau peut être plus adapté pour l'ingénierie tissulaire et inapproprié pour la thérapie cellulaire.

Le choix du matériau est donc dicté par les objectifs attendus. De par leur biodégradabilité et leur capacité à favoriser la chondrogenèse des CSM encapsulées, le collagène, la fibrine et l'acide hyaluronique sont adaptés pour des applications en ingénierie du cartilage. D'autres polymères biodégradables (tel que l'alginate) nécessitent une modification chimique pour améliorer la chondrogenèse des CSM encapsulées. L'agarose et le PEG, en raison de leur non biodégradabilité, pourraient être les mieux adaptés pour des applications en thérapie cellulaire.

Il est envisageable de développer de nouveaux polymères, tels que les polymères hémisynthétiques, dont les propriétés pourraient être modulées en fonction des objectifs pour éventuellement une utilisation simultanée en ingénierie du cartilage et en thérapie cellulaire.

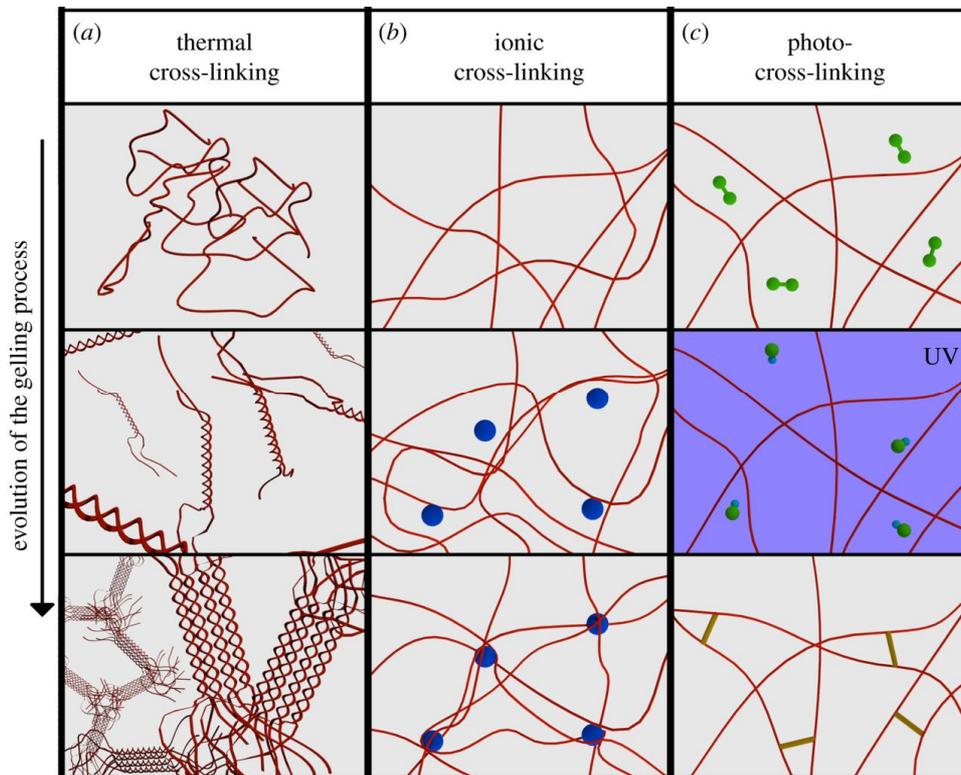
### III. Les principales méthodes de réticulation et d'encapsulation cellulaire

Il existe plusieurs techniques pour l'encapsulation des cellules (Tableau IV).

**Tableau IV** : Comparaison de différentes techniques d'encapsulation cellulaire.

<b>Techniques d'encapsulation</b>	<b>Uniformité de la forme</b>	<b>Uniformité de la taille</b>	<b>Avantages / Inconvénients</b>
Extrusion	Moyenne	Moyenne	<i>Avantages</i> : simplicité, rapidité et faible coût. <i>Inconvénients</i> : homogénéité et uniformité de taille des particules à améliorer.
Emulsion	Bonne	Faible	<i>Avantages</i> : contrôle de la cinétique de diffusion des molécules thérapeutiques possible ; rendement de production important. <i>Inconvénients</i> : rendement d'encapsulation faible, forces de cisaillement et importante polydispersité de taille.
Microfluidique	Bonne	Bonne	<i>Avantages</i> : excellents rendement d'encapsulation et d'uniformité de la taille et de la forme des particules. <i>Inconvénient</i> : faible rendement de production des particules.
Impression 3D	Bonne	Bonne	<i>Avantages</i> : excellents rendement d'encapsulation et d'uniformité de la taille des particules. <i>Inconvénients</i> : pas encore assez développée, complexité et technique coûteuse.
Photolithographie	Bonne	Bonne	<i>Avantages</i> : excellents rendement d'encapsulation et d'uniformité de la taille des particules. <i>Inconvénients</i> : pas encore assez développée, complexité et pas toujours adaptée à l'encapsulation cellulaire.

Cette diversité de techniques est la conséquence des différents choix de polymères disponibles et de leur mode de réticulation. Il existe 3 types de réticulation permettant la génération de particules à partir d'un hydrogel : les réticulations thermiques, ioniques, et chimiques (Figure 13).



**Figure 13** : Mécanismes de réticulation des polymères.

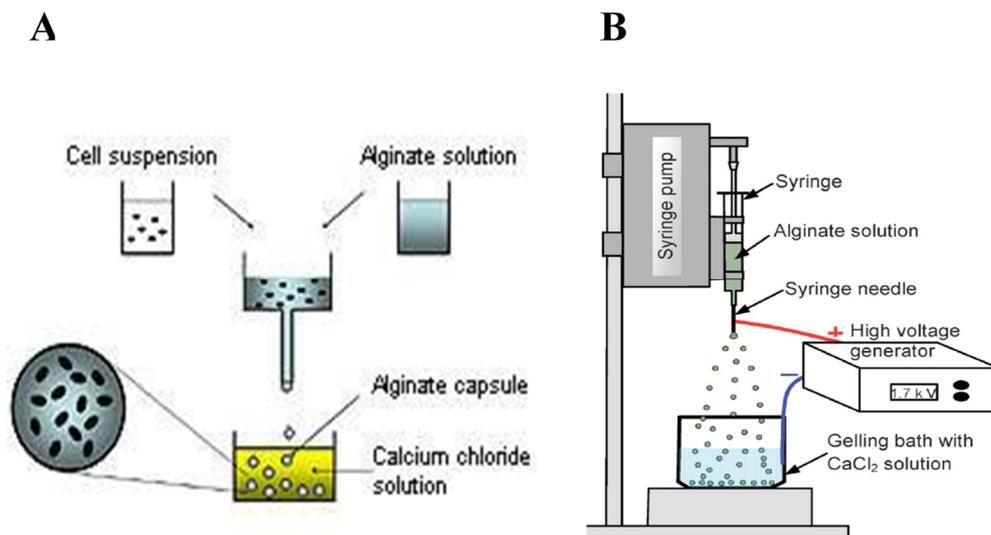
*Source : Gasperini L et al. (2014).*

La réticulation thermique (Figure 13a) concerne les polymères thermosensibles tels que l'agarose et la gélatine. Ces derniers, sous l'effet de la variation de la température, réticulent. La plupart des hydrogels issues de polymères naturels thermosensibles, contrairement à ceux issues de polymères synthétiques thermosensibles, réticulent après l'augmentation puis le refroidissement de la température [238,239]. La réticulation ionique (Figure 13b) concerne certains polymères anioniques ou cationiques. Lorsque ces polymères polyélectrolytes sont sous forme d'hydrogels, l'addition d'ions de charges opposées provoque leur réticulation ionique [240]. La réticulation de l'alginate de sodium à l'aide d'un cation divalent est un exemple de ce type de réticulation. Une autre catégorie de polymères, tel que le PEG, nécessitent une réticulation chimique pour des particules. Ce type de réticulation peut être initié par exemple par un rayonnement UV (Figure 13c). Cette méthode nécessite la présence d'une

molécule photoinitiatrice [241]. Au préalable, le polymère doit être modifié chimiquement notamment en lui greffant un groupement fonctionnel tel que l'acrylate.

#### a) L'extrusion

C'est la technique la plus simple et la plus utilisée pour encapsuler les cellules et notamment les CSM. Elle consiste à former des gouttes d'hydrogel, au travers d'un tube capillaire, dans un bain contenant l'agent réticulant entraînant la formation de particules dans la solution de réticulation [242]. C'est la technique couramment utilisée avec l'alginate de sodium qui réticule dans un bain de chlorure de calcium (Figure 14A).



**Figure 14** : Encapsulation cellulaire dans l'alginate par extrusion simple (A) ; ou par application d'une force électrostatique (B).

Source : Wujie Zhang, 2015.

La taille finale des particules obtenues dépend d'un certain nombre de paramètres comme la concentration de l'hydrogel, la tension superficielle de la goutte et son diamètre à la sortie du capillaire d'injection [243]. La taille des particules obtenues est en général de l'ordre du millimètre, ce qui peut limiter leur utilisation *in vivo* dans les petits modèles animaux mais permet l'incorporation d'un grand nombre de cellules. Il est possible de réduire cette taille de l'ordre du micromètre en appliquant une force additionnelle à la gravité qui peut être force électrostatique (Figure 14B) [244], une vibration [245] ou un flux d'air [246]. Ces 3 dernières

méthodes d'extrusion sont compatibles avec l'encapsulation des CSM. Ainsi, il a été démontré que la variation de la fréquence des vibrations électrostatiques (15 à 30 kV) n'altère pas la viabilité et la multipotence des CSM encapsulées dans l'alginate [247].

Cette technique a été décrite dans différents travaux en rapport avec l'ingénierie du cartilage [248,249] et de l'os [250,251], les maladies hépatiques [252] et les maladies neurodégénératives [253] par exemple. Le principal polymère utilisé est l'alginate de sodium qui réticule en présence de cations divalents, tels que le calcium et le barium, par échange ionique.

D'autres polymères (le carraghénane ou la fibrine) ont été associés à l'alginate afin d'améliorer les propriétés mécaniques des particules obtenues par extrusion [176,254].

Quelques travaux ont décrit avec succès l'utilisation d'autres matériaux tels que l'agarose, la fibrine ou la gomme gellane [248,255,256].

L'ensemble de ces publications montrent que la méthode d'encapsulation par extrusion possède plusieurs inconvénients. L'échantillon de particules généré n'est pas homogène : la première particule formée n'a pas le même temps de réticulation, c'est-à-dire d'exposition dans le bain de réticulation, que la dernière. L'extrusion possède aussi des limites qui rendent difficile d'optimiser les conditions opératoires pour combiner sphéricité, monodispersité, contrôle de la taille des particules et utilisation d'un hydrogel à haute viscosité.

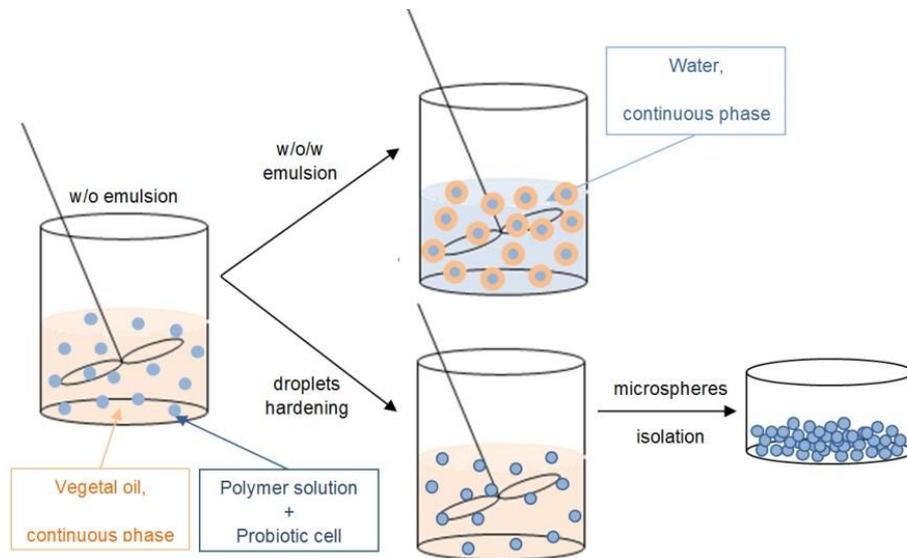
## b) La dispersion huileuse

L'encapsulation des cellules par la dispersion huileuse fait appel à l'émulsion ou aux méthodes fluidiques.

### ➤ L'émulsion

Une émulsion est un mélange de 2 phases qui en situation normale sont non miscibles. L'une des phases est dispersée dans la seconde sous forme de gouttelettes. Ce mélange reste stable grâce à l'utilisation d'agents de surface appelés tensioactifs. L'encapsulation des cellules par émulsion consiste le plus souvent à disperser l'hydrogel contenant la suspension cellulaire à encapsuler (phase discontinue) dans une phase huileuse non miscible et continue (W/O) La

phase discontinue prend la forme de gouttelettes dans la phase continue sous l'effet de l'agitation [257,258] (Figure 15).



**Figure 15** : Principe de l'encapsulation cellulaire par émulsion.

Source : [259].

L'utilisation des tensioactifs (émulsifiants) permet stabiliser l'émulsion et de générer des particules de plus petites tailles [260]. Cependant, ces tensioactifs ne doivent pas être cytotoxiques. Dans les travaux d'encapsulation des CSM par émulsion, le principal tensioactif non cytotoxique utilisé et n'altérant pas la matrice des particules a été le Span 85<sup>TM</sup> (Trioléate de sorbitane).

Les paramètres d'émulsion, tels que la vitesse et la durée d'agitation, influencent la taille des particules obtenues [174]. Ainsi, Batorsky *et al.*, ont encapsulé des CSM humaines issues de la moelle osseuse dans de l'agarose et dans un copolymère agarose-collagène 1 par émulsion dans de l'huile de polydiméthylsiloxane (PDMS). La variation de la vitesse d'agitation et de la distance entre les pales d'agitation a modifié significativement la taille et la polydispersité de taille des particules obtenues. L'augmentation de ces 2 paramètres a favorisé la monodispersité de taille et réduit le diamètre moyen des particules d'environ 96  $\mu\text{m}$  pour 500 rpm et de 60  $\mu\text{m}$  pour 1000 rpm. Lorsque les conditions opératoires sont adaptées, l'émulsion n'a pas un impact négatif sur la viabilité des CSM encapsulées. Ainsi, dans une étude, des CSM humaines issues de la moelle osseuse ont été encapsulées dans un copolymère chitosan-collagène 1 par émulsion

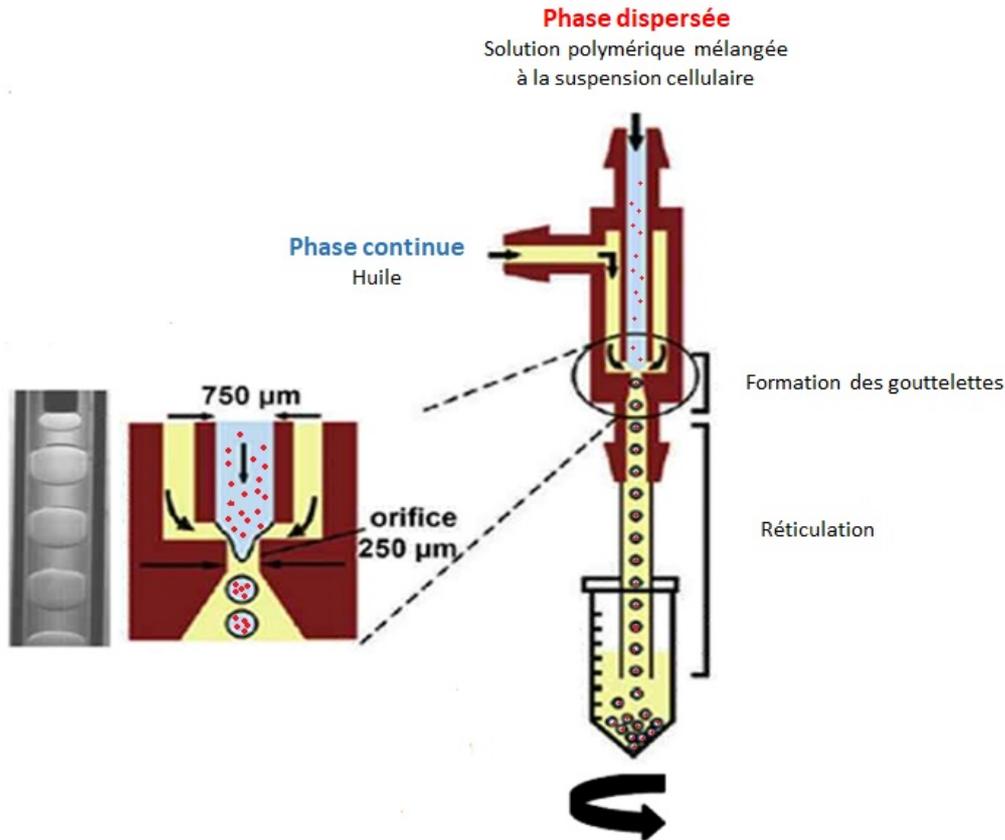
dans le PDMS [179]. Des particules sphériques avec une taille allant de 82 à 290  $\mu\text{m}$  ont été obtenues. La viabilité des CSM encapsulées a été supérieure à 90% à J9. Pour étudier l'effet des forces de cisaillements lors d'une injection sur la viabilité des CSM encapsulées, les auteurs, *in vitro*, ont injecté ces particules à travers des aiguilles de diamètres standards de 1,6 mm (16G), 0,9 mm (20G) et 0,5 mm (25G). Aucune injection n'a pas affecté la viabilité des CSM encapsulées.

L'émulsion a été appliquée pour encapsuler des CSM pour l'ingénierie du cartilage et/ou de l'os [173,175,261–263]. Dans ces études à majorité *in vitro*, les CSM de différentes provenances (rat, souris et humaines), issues de la moelle osseuse ou du tissu adipeux ont été encapsulées dans plusieurs polymères (collagène 1- chitosan, collagène 1 ou 2- agarose, collagène 1-fibrine, agarose et chitosan) par émulsion dans de l'huile du PDMS ou de l'huile de coton. Le principal tensioactif a et le Span 85<sup>TM</sup>. Les tailles moyennes des particules obtenues ont varié de 10 à 800  $\mu\text{m}$ .

L'ensemble de ces études ont montré que l'encapsulation par émulsion des CSM permet de maintenir leur viabilité et leur multipotence. En revanche, elle génère des particules présentant une polydispersité de taille non négligeable.

#### ➤ Les techniques fluidiques

Elles consistent à injecter un hydrogel (phase dispersée), mélangée à la suspension cellulaire, dans un micro ou millicanal. Lorsque ce mélange aqueux atteint la jonction avec une phase continue non miscible huileuse, des gouttelettes renfermant les cellules se forment. La réticulation est obtenue par divers moyens qui dépendent du polymère utilisé, à l'intérieur ou à l'extérieur du dispositif [264] (Figure 16).



**Figure 16** : Principe de la génération de particules par les techniques fluidiques.

La taille des particules générées est fortement influencée par le débit de ces 2 phases. Headen DM *et al.*, ont ainsi encapsulé des CSM humaines issues de la moelle osseuse par microfluidique dans du PEG [265]. Une huile minérale légère et mélangée à du Span 80<sup>TM</sup> (monooléate de sorbitane) a été utilisée en phase continue. Cette technique a permis d'obtenir des particules de taille homogène, allant de 50 à 400 µm en fonction des conditions opératoires. Les particules de plus grandes tailles ont été obtenues pour les plus faibles débits. La viabilité des hCSM encapsulées a été évaluée pendant une semaine. Les résultats ont montré que, quel que soit le paramètre appliqué, la viabilité des CSM a toujours été supérieure à 90%.

Les techniques fluidiques sont de plus en plus utilisées pour l'encapsulation des CSM. Cependant, elles n'ont pas encore été exploitées pour l'ingénierie du cartilage. La plupart des travaux réalisés ont concerné des applications osseuses. Ainsi, Chan HF *et al.*, ont encapsulé des hCSM issues de la moelle osseuse par microfluidique dans l'alginate ou l'alginate-RGD avec comme phase continue l'huile perfluorée (HFE-7500) [266]. Dans les 2 types de particules la viabilité des CSM encapsulées à J7 avoisinait les 95%. Cette étude *in vitro* a également

démontré que l'encapsulation par microfluidique maintient la capacité des CSM à se différencier en ostéocytes lorsqu'elles sont encapsulées dans l'alginate-RGD. Cette différenciation ostéogénique a été confirmée *in vivo* par Moshaverinia A *et al.* [267]. Des hCSM gingivales ont été encapsulées par microfluidique dans de l'alginate-RGD avec comme phase continue de l'huile de soja. La taille des particules obtenues était d'environ 420 µm avec une viabilité des CSM, *in vitro*, de 95% après une semaine et 75% à 2 semaines de culture. La culture de ces CSM encapsulées dans un milieu de différenciation ostéogénique puis leur injection dans un modèle murin (présentant une lésion osseuse de 5 mm de diamètre au niveau de la calvaria) a permis d'observer au niveau de la lésion une régénération osseuse. Les auteurs ont montré que la différenciation des CSM encapsulées en ostéocytes était responsable, après la biodégradation des particules, de cette régénération osseuse.

L'ensemble de ces travaux montrent que les techniques fluidiques présentent l'avantage de nécessiter une faible quantité de réactifs, de générer des particules de forme sphérique uniforme et d'une taille monodisperse. De plus, la taille des particules est facilement contrôlable et modifiable par variation des débits des différentes phases. Cependant, leur principal inconvénient est la faiblesse de leur rendement de production [268].

### c) Autres techniques

Depuis quelques années, les CSM commencent à être encapsulées par de nouvelles techniques. Parmi ces nouvelles techniques, on peut citer l'impression tridimensionnelle [269] et la photolithographie [270]. Ces 2 techniques permettent de générer des particules de taille monodisperse avec un excellent rendement d'encapsulation cellulaire. Cependant, elles ne sont pas encore assez étudiées et présentent quelques limitations. L'impression tridimensionnelle nécessite d'être encore optimisées dans le but de réduire les coûts d'encapsulation. Quant à la photolithographie, elle n'est pas adaptée à tous les matériaux. Elle nécessite l'utilisation d'un matériau photoréticulable.

#### IV. Applications des CSM après encapsulation

De par leur multipotence et leurs propriétés immunosuppressives et pro-angiogéniques, les CSM encapsulées ont été appliquées dans différentes pathologies et lésions tissulaires.

##### - Le diabète

La majorité des études d'encapsulation des CSM visent à traiter le diabète [271]. Deux stratégies sont adoptées. La première consiste à cultiver les CSM encapsulées dans un milieu de différenciation pancréatique afin de les différencier en cellules sécrétrices de l'insuline (cellules  $\beta$ ). En adoptant ce protocole, Ngoc *et al.*, par exemple, ont réussi à diminuer la glycémie chez des souris diabétiques [272]. La deuxième stratégie consiste à co-encapsuler les CSM avec des cellules  $\beta$ . De par leur propriétés immunosuppressives, les CSM protègent et améliorent l'action des cellules  $\beta$  en empêchant l'activation du système immunitaire de l'hôte [273,274]. Dans les travaux cités, les CSM humaines ou animales de la moelle osseuse ont été encapsulées dans l'alginate ou la fibroïne de soie.

##### - Maladies hépatiques

Lors des troubles et des maladies hépatiques aiguës, il a été démontré que la co-encapsulation des CSM avec les hépatocytes permet de : réduire la fibrose (Pericapsular fibrotic overgrowth, PFO), améliorer la viabilité et la biofonctionnalité (la synthèse de l'urée et de l'albumine) des hépatocytes [252,275]. Les CSM de souris ou du rat et issues de la moelle osseuse ont été encapsulées dans l'alginate ou l'APA (alginate/poly-l-lysine/alginate) dans ces études.

##### - Maladies cardiovasculaires

L'injection des CSM encapsulées chez des rats présentant un infarctus du myocarde réduit la mort des myocytes par apoptose et augmente significativement la densité microvasculaire dans la zone péri-infarctus [276–278]. Dans ces travaux, les CSM (d'origine humaine ou animale) sont issues de la moelle osseuse et encapsulées dans l'acide hyaluronique, la fibrine et l'alginate.

- Le cancer

Deux études réalisées sur des souris présentant des glioblastomes ont montré que l'injection des CSM encapsulées réduit significativement le volume et le poids des tumeurs et prolonge la survie des souris [279,280]. Les résultats observés sont la conséquence de la surexpression PEX (hemopexin-like-protein, un inhibiteur de l'angiogénèse) et de S-TRAIL (secretable tumor necrosis factor apoptosis inducing ligand, un inducteur spécifique de l'apoptose des cellules tumorales) par les CSM encapsulées. Ces dernières, d'origine humaine, ont été issues de la moelle osseuse et encapsulées dans l'AP (alginate-poly-l-lysine).

- Lésions cutanées

Plusieurs travaux ont analysé l'effet des CSM encapsulées puis injectées dans des modèles animaux présentant de sévères lésions cutanées [236,281,282]. Les résultats de l'ensemble de ces études ont démontré que cette stratégie thérapeutique permettait la cicatrisation des lésions et la revascularisation des tissus. Ces résultats sont liés à la multipotence des CSM (différenciation en cellules épidermiques) et à leur activité pro-angiogénique (capacité à sécréter VEGF) [283]. Dans ces travaux, les CSM (d'origine humaine ou du rat) ont été issues de la moelle osseuse, le cordon ombilical ou le tissu adipeux. Elles ont été encapsulées dans l'alginate, l'APA, et des copolymères (gélatine-PEG ou alginate-chitosan).

- Les lésions osseuses

Lors des lésions osseuses, l'injection des CSM encapsulées vise essentiellement, de par leur propriété de différenciation en ostéocytes, à régénérer le tissu osseux. Les études *in vivo* ont mis en évidence que l'injection des CSM encapsulées permet la régénération des tissus osseux au niveau des lésions avec une augmentation de la minéralisation de l'os [251,284–286]. Dans les travaux cités, les CSM (humaines ou du rat) ont été isolées de la moelle osseuse et encapsulées dans l'alginate ou l'APA.

## V. Applications des CSM après encapsulation en ingénierie du cartilage

Comme évoqué précédemment, la chondrogenèse des CSM requiert l'utilisation d'un matériau dont l'hydrogel réticulé favorise les interactions cellules-cellules et cellules-matrices.

L'alginate et le PEG, contrairement à la fibrine ou à l'acide hyaluronique par exemple, ne semblent pas appropriés pour l'encapsulation des CSM en ingénierie du cartilage parce qu'ils n'assurent pas cette condition [200,248].

Deux principales stratégies sont proposées pour favoriser ces interactions.

La première consiste à incorporer dans le polymère ou la matrice polymérique des protéines (telles que du collagène ou la séquence peptidique RGD) pour améliorer l'adhésion des CSM encapsulées à la matrice. Liu SQ *et al.*, ont par exemple incorporé un peptide mimétique du collagène au PEG 10 000 [228]. Par rapport à la condition contrôle (CSM encapsulées dans le PEG non modifié), cette stratégie a permis d'augmenter la viabilité de 17%, la prolifération et la différenciation chondrogénique. L'expression des gènes *ACAN* et *COL2A1* qui codent respectivement pour l'agrécan et le collagène de type 2 a augmenté d'un facteur 4 et 6 respectivement lorsque le PEG a été modifié. Selon les auteurs, la modification du PEG a permis d'une part d'augmenter les interactions cellules-matrice et d'autre part de favoriser l'élasticité de l'hydrogel obtenu conduisant à une différenciation chondrogénique. Dans une autre étude plus récente, Raghothaman D *et al.*, ont encapsulé les CSM dans un copolymère alginate-chitine modifié (ou non) par le collagène de type 1 [178]. Les auteurs ont observé une adhésion et une condensation des CSM à la matrice de l'hydrogel associée : (i) à une activation de la voie N-cadherin/ $\beta$ -catenin, (ii) une expression des gènes qui codent pour les marqueurs chondrogéniques (Sox9, agrécane et collagène de type 2) et (iii) la formation d'un néocartilage hyalin. Ces observations n'ont pas été détectées lorsque les CSM ont été encapsulées dans le copolymère non modifié. Le succès de cette première stratégie nécessite un contrôle particulier de la concentration de la protéine à incorporer. Ainsi, l'encapsulation des CSM dans le PEG 10 000 modifié avec 1 mM de RGD est plus efficace en terme de chondrogenèse qu'avec 5 mM de RGD [227].

La deuxième stratégie consiste en la mise au point de nouveaux biomatériaux biodégradables, avec des propriétés adaptées qui favorisent les interactions cellules-matrice. Soleimani M *et al.*, ont, par exemple, encapsulé des CSM issues du cordon ombilical du BTAG (phosphate

tricalcique, alginate et gélatine) [287]. Après 21 jours de culture dans un milieu chondrogénique (ou un milieu de culture normal pour la condition de contrôle), ils ont observé une chondrogenèse des CSM avec une surexpression des gènes qui codent pour des marqueurs chondrogéniques spécifiques (tels que les agrécanes, les collagènes de type 2 et BMP-6). Naderi-Meshkin H *et al.*, ont développé un nouveau polymère thermorétractable à 37°C composé de chitosan et de cellulose [180]. L'encapsulation de CSM humaines dans ce biomatériau maintient *in vitro* leur viabilité, leur prolifération, et leur chondrogenèse pendant toute la durée de leur étude (1 mois).

D'autres stratégies originales d'amélioration du potentiel chondrogénique des CSM ont été proposées. Elles consistent soit à encapsuler CSM dans un polymère sur lequel a été greffée au préalable une protéine spécifique de la matrice extra-chondrocytaire, soit à les co-encapsuler avec un facteur de croissance favorisant la chondrogenèse [288]. Tiruvannamalai Annamalai *et al.*, ont ainsi encapsulé des CSM humaines, issues de la moelle osseuse, dans de l'agarose (contrôle) ou dans un copolymère collagène 2 - agarose par émulsion dans du PDMS [173]. Après 21 jours de culture *in vitro* dans un milieu de différenciation chondrogénique supplémenté en TGF- $\beta$ 1, le copolymère a permis d'augmenter la viabilité des cellules encapsulées (30% pour l'agarose contre 70% pour le copolymère à J21) et leur chondrogenèse avec l'observation d'une augmentation de la synthèse de glycosaminoglycanes sulfatés de 60% par rapport au contrôle. Park KH *et al.*, ont co-encapsulé des CSM issues de la moelle osseuse de lapin, du TGF- $\beta$ 1 et de la dexaméthasone dans un copolymère composé d'isopropylacrylamide et de vinylimidazole [288]. Les particules ont été injectées dans un modèle de souris nude. Après 2 mois, ils ont observé une différenciation chondrogénique plus importante par rapport au groupe contrôle (CSM encapsulées seules dans le copolymère) au niveau des sites d'injection. Cette stratégie a permis d'augmenter significativement la synthèse des composants spécifiques de la matrice extra-cartilagineuse (glycosaminoglycanes, agrécanes et collagène de type 2). Lors des analyses histologiques, les auteurs ont détecté une augmentation significative de la quantité de cartilage néoformé.

Pour conclure ce chapitre, la majorité des études réalisées montrent le succès des différentes stratégies mises en œuvre sur la chondrogenèse des CSM encapsulées. Cependant, ces résultats prometteurs nécessitent d'être confirmés *in vivo*, en montrant la formation d'un néocartilage. Par ailleurs, d'après l'ensemble des travaux publiés, la concentration optimale de CSM à

encapsuler est de 2 millions de cellules par millilitre d'hydrogel. En revanche, le nombre total optimal de CSM encapsulées puis injecté (effet dose) et la durée (effet durée) restent controversées et mal précisés.

Des progrès restent à faire notamment concernant les biomatériaux et les techniques d'encapsulation. Concernant les biomatériaux, d'autres types de polymères, alternant à la fois les avantages des polymères naturels et synthétiques, doivent être développés. Les techniques d'encapsulation doivent être également optimisées dans le but de simplifier la génération et la collecte des particules ainsi que l'amélioration de la monodispersité des particules et le rendement d'encapsulation cellulaire.

Si le potentiel chondrogénique des CSM encapsulées semble bien étudié pour une potentielle application dans l'ingénierie tissulaire de l'arthrose, la thérapie cellulaire est en revanche inexploitée.

## **Objectifs du projet**

Notre projet a pour objectif de pallier les inconvénients de l'injection des CSM afin de pouvoir exploiter leurs propriétés immuno-modulatrices dans le traitement de l'arthrose. Aussi, nous proposons de mettre au point l'incorporation des CSM avant leur injection dans des particules cytoprotectrices et perméables réalisées à partir de l'alginate et de l'hydroxypropyl methylcellulose silanisée (HPMC-Si). Si l'incorporation des CSM dans l'hydrogel d'alginate a été bien démontrée, l'utilisation de l'HPMC-Si (sous forme de particules) n'a jamais été réalisée.

Les particules d'alginate seront générées par la méthode d'extrusion classiquement utilisée. Cependant, les propriétés chimiques de l'HPMC-Si ne sont pas compatibles avec cette méthode d'obtention de particules. Une autre méthode adaptée aux caractéristiques de réticulation de l'HPMC-Si devrait alors être mise au point pour la génération de particules.

Les particules d'alginate et d'HPMC-Si devront répondre à des critères de : (i) taille reproductible et compatible avec le mode d'injection ; (ii) propriétés de diffusion suffisantes pour permettre la diffusion des nutriments, de l'oxygène (indispensables à la survie des cellules encapsulées) et des molécules thérapeutiques produites par les cellules encapsulées et (iii) propriétés mécaniques favorisant la protection des CSM lors de l'injection. Ainsi, les particules seront caractérisées par granulométrie laser pour analyser leur distribution de taille, par des tests de diffusions de molécules tracés pour évaluer leurs propriétés de diffusion et par des tests de compressions pour appréhender les propriétés mécaniques. Une comparaison de l'alginate et de l'HPMC-Si est indispensable pour sélectionner le meilleur candidat pour une potentielle application en thérapie cellulaire de l'arthrose.

Dans un deuxième temps, les cellules d'intérêts seront encapsulées dans les 2 biomatériaux. Parmi nos objectifs, les CSM doivent nécessairement rester viables après leur encapsulation. Ce maintien de leur viabilité est indispensable à la suite du projet. La viabilité des CSM sera alors étudiée jusqu'à 1 mois après encapsulation. Cette étude nous permettra de vérifier à la fois la non cytotoxicité de l'alginate et de l'HPMC-Si, mais aussi que les 2 méthodes d'incorporation des CSM ne sont pas néfastes à leur survie. Le nombre moyen de CSM encapsulées au cours du temps dans l'alginate et l'HPMC-Si devra également être estimé dans ce projet. Ainsi, le comportement des CSM après leur encapsulation sera analysé en étudiant leur prolifération pendant 1 mois. Sachant qu'il a déjà été démontré dans la littérature que les CSM ne proliféraient pas dans l'alginate non modifié, cette étude nous permettra de connaître leur comportement dans les particules d'HPMC-Si.

Enfin, ce projet repose sur la capacité des CSM à sécréter des facteurs trophiques thérapeutiques qui permettront à la fois de ralentir (voire bloquer) l'évolution de la maladie et de diminuer l'inflammation caractéristique de la physiopathologie de l'arthrose. Notre dernier objectif est par conséquent le maintien de cette caractéristique des CSM après leur encapsulation. Ce dernier point sera vérifié en cultivant les CSM encapsulées dans l'alginate et l'HPMC-Si, dans un environnement pro-inflammatoire mimant celui de l'arthrose, et en étudiant leur capacité à sécréter différents facteurs solubles anti-inflammatoires, anti-fibrotiques et anti-hypertrophiques.

## **Matériels & méthodes**

## I. Génération de particules d'alginate et d'HPMC-Si

### a) Particules d'alginate

#### *1. Procédé de fabrication des particules*

L'alginate utilisé provient de FMC Biopolymer (Protanal LF10/60 FT). Il a été solubilisé dans du tampon phosphate salin 1X à pH 7,2 (phosphate buffered saline, PBS, 20012-019 *Invitrogen*) à une concentration de 2% (w/v) sous agitation à 200 tours par minutes, pendant 3 heures et à température ambiante. Les particules d'alginate ont été obtenues par extrusion à travers une aiguille de 0,22 mm de diamètre (31 G) de la solution polymérique dans un bain contenant une solution de chlorure de calcium (C1016, Sigma-Aldrich) à 100 mM, sous agitation à 100 tours par minute pendant 15 minutes et à température ambiante.

Les particules générées ont été filtrées sur un tamis de 150  $\mu\text{m}$  puis stockées dans du PBS à température ambiante.

#### *2. Caractérisation de la forme, de la taille et analyse de la dispersité de taille des particules*

L'évaluation de la forme et de la taille des particules a été réalisée par microscopie photonique (Leica confocal system, TCS NT/SP series, Germany).

La taille des particules a été mesurée par granulométrie laser (Mastersizer 3000, *Malvern*). Pour chaque mesure granulométrique, les particules d'alginate dispersées dans du PBS ont été introduites dans la cuve de l'appareil en quantité suffisante correspondant à un niveau d'obscurité de 10% selon les recommandations du fabricant. Le diamètre moyen en nombre a été sélectionné pour déterminer la distribution des particules d'alginate.

#### *3. Effets de la stérilisation de l'alginate*

L'alginate a été stérilisé par la vapeur d'eau sous pression, sous forme de poudre (conditionnée en sachets papier/plastique) ou de solution (à 2% dans du PBS), à 134°C pendant 4 ou 18 minutes.

La viscosité de la solution polymérique et la masse moléculaire en poids du polymère ont été mesurées, avant et après stérilisation, respectivement à l'aide d'un viscosimètre (DV1 Viscometer, *Brookfield*) et par la technique de diffusion dynamique de la lumière (Viscotek 270 Dual Detector, *Malvern*). Pour chaque condition, la mesure de la viscosité a été réalisée

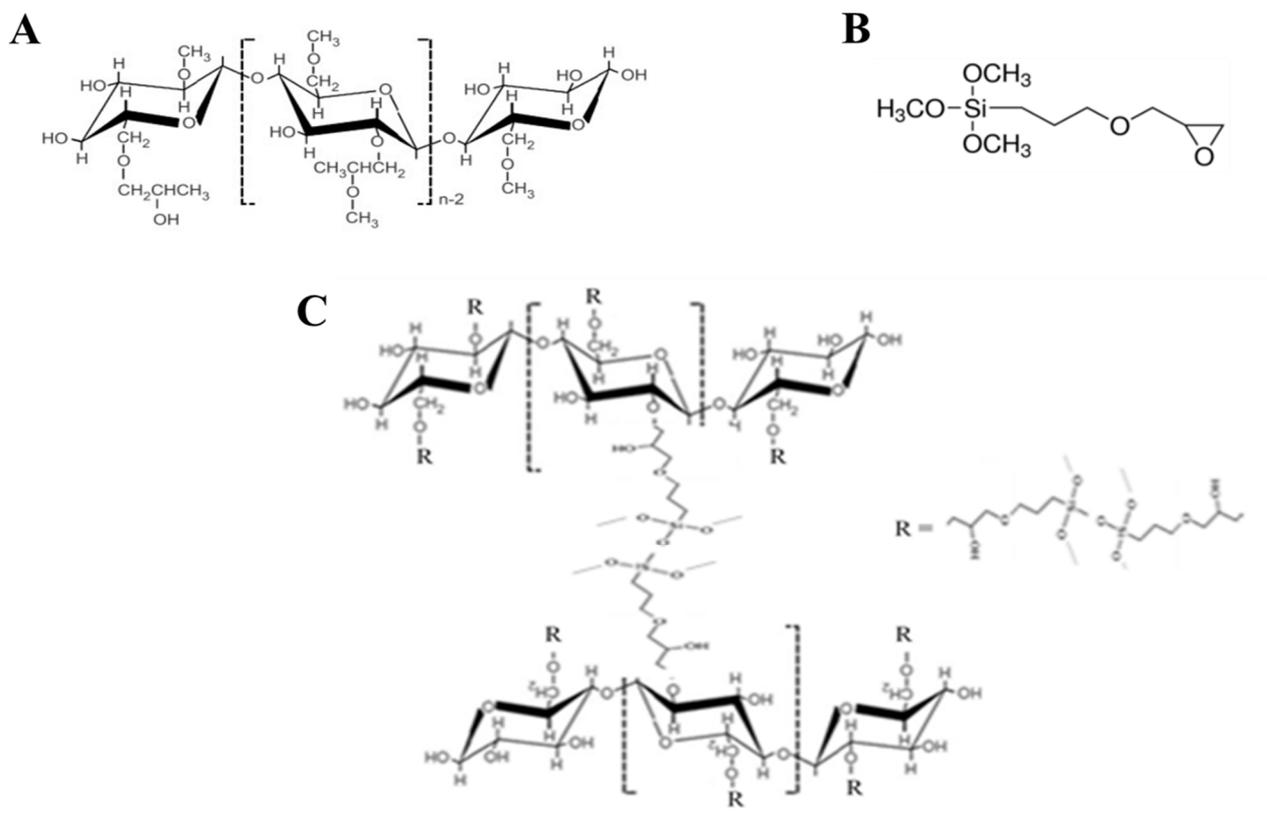
sur 200 ml de la solution d'alginate et avec le V-71 comme rotor cylindrique (6 à 50 rpm, à température ambiante). Un millilitre de chaque condition a été introduit dans la cuve du Viscotek 270 Dual Detector. La mesure de la masse moléculaire en poids de l'alginate a duré une heure à température ambiante.

Des particules d'alginate ont été fabriquées avec le polymère après stérilisation selon le mode opératoire précédemment décrit.

## b) Particules d'HPMC-Si

### *1. Synthèse et réticulation de l'HPMC-Si*

L'HydroxyPropylMéthylCellulose (HPMC) est un dérivé de la cellulose (Figure 17A). En le greffant par un groupement silane, le 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTMS, Figure 17B), il devient de l'HydroxyPropylMéthylCellulose Silanisé (HPMC-Si, Figure 17C) caractérisé, sous forme de solution, par un pH basique [289,290].



**Figure 17** : Structure de l'HPMC (A), du GPTMS (B) et de l'HPMC-Si.

La synthèse de l'HPMC-Si a été réalisée au sein de l'unité de recherche en greffant 14,24% (w/w) du GPTMS (*Acros Organics; Geel*) à l'HPMC (E4M1, *Colorcon-Dow chemical; Bougival*) dans un milieu hétérogène comme décrit par Bourges X.*et al.* [291]. La poudre d'HPMC-Si a été solubilisée à 3% (w/v) dans une solution de NaOH à 0,2 M (*Sigma-Aldrich*) pendant 48 heures sous agitation à 150 tours par minute et à température ambiante. Après 2 dialyses et un conditionnement dans des flacons de 10 ml, la solution d'HPMC-Si a été stérilisée par la vapeur d'eau sous pression pendant 18 minutes à 121°C. Le pH de la solution d'HPMC-Si obtenue est de 13,2. La pré-réticulation de l'HPMC-Si a été amorcée par le mélange, dans un rapport (2/1), avec un tampon HEPES 0,26 M (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique, *H4034-29G Sigma-Aldrich*) de pH 3,6. Ce mélange aboutit à la formation d'un hydrogel d'une concentration finale de 2% et de pH neutre. La neutralisation du pH de la solution d'HPMC-Si par le tampon HEPES induit l'hydroxylation des radicaux (R-Si-O-Na<sup>+</sup>) en (R-Si-OH) et la formation de liaisons covalentes entre les groupements hydroxyles permettant ainsi la formation d'un réseau tridimensionnel [291].

## 2. Mise au point de la fabrication des particules d'HPMC-Si

Un protocole de dispersion huileuse a été développé. Dans un premier temps, la pré-réticulation de l'HPMC-Si est amorcée par mélange avec le tampon HEPES comme décrit ci-dessus. La solution d'HPMC-Si à 2% est ensuite immédiatement extrudée avant la réticulation à travers une aiguille de 0,7 mm de diamètre (22 G) dans un bain contenant de l'huile d'olive (O1514, *Sigma-Aldrich*) sous agitation.

Trois conditions opératoires ont été appliquées pour déterminer leur influence sur la taille des particules d'HPMC-Si obtenues. Ces paramètres sont : la durée de la dispersion (1 heure ou 1h30), la température (ambiante ou à 37°C) et la vitesse d'agitation (250 rotations par minute (rpm) ou 400 rpm). Les différentes particules d'HPMC-Si générées ont été filtrées sur un tamis de 20 µm, lavées au sérum de veau fœtal (SVF ; Fetal Bovine Serum, 3302-P290907 *Dominique Dutscher*) puis stockées dans une solution de PBS à température ambiante. La taille de ces particules a ensuite été mesurée par granulométrie laser dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les particules d'alginate (un niveau d'obscurité de 10%). Le diamètre moyen en nombre a été également sélectionné pour déterminer la distribution des différentes particules d'HPMC-Si.

## II. Etude des propriétés de diffusion et des propriétés mécaniques

Deux propriétés des particules ont été analysées : les propriétés de diffusion et les propriétés mécaniques des particules.

L'ensemble de ces travaux de caractérisation a été réalisé sur des particules d'alginate et d'HPMC-Si de  $1 \pm 0.2$  mm de diamètre, sélectionnées par microscopie photonique. Les propriétés de diffusion

Afin de caractériser les propriétés de diffusion des particules, la cinétique de diffusion intraparticulaire de traceurs marqués a été analysée. Pour cette étude, trois dextrans couplés à la fluorescéine (FITC) et de masse moléculaire différente ont été sélectionnés : 20 kDa (Fluorescein isothiocyanate-dextran, *FD20S Sigma-Aldrich*), 250 kDa (Fluorescein isothiocyanate-dextran, *FD250S Sigma-Aldrich*) et 2 000 kDa (Fluorescein isothiocyanate-dextran, *FD2000S Sigma-Aldrich*). Des particules d'alginate ou d'HPMC-Si ont été

immobilisées dans une chambre Lab-Tek (055070, *Dominique Dutscher*) puis incubées pendant 2 heures 30 avec les différentes solutions de dextran-FITC à la concentration de 1mg/mL. La diffusion des dextrans à l'intérieur des particules a été observée par microscopie confocale (Nikon A1R Si, Champigny sur Marne ; excitation à 488 nm et émission à 520 nm) toutes les 30 minutes pendant 2h30. L'intensité de la fluorescence à l'intérieur des particules a été mesurée en fonction du temps. Afin de comparer les propriétés de diffusion des particules, un ratio, correspondant au rapport entre l'intensité de la fluorescence à l'intérieur de la particule et celle à l'extérieur, a été calculé. Un ratio de 1 indique que la fluorescence intra-particulaire est identique à celle extra-particulaire et que l'équilibre a été atteint.

Les particules d'alginate et d'HPMC-Si ont été soumises à des tests de compression (MicroSquisher (*CellScale, World Precision Instruments*)) dans le but d'évaluer leurs propriétés mécaniques.

L'échantillon a été compressé pendant 30 secondes entre 2 plaques parallèles et les résultats sont représentés sous forme d'une courbe représentant la déformation d'une particule (en %) en fonction de la force de compression appliquée (en  $\mu\text{N}$ ). La contrainte a été appliquée de manière à obtenir une déformation maximale de 30% des particules. Ce pourcentage de déformation n'a pas été dépassé pour éviter tout risque de fracture des particules. Le module de Young de chaque type de particule a été déterminé selon la formule :  $E = \frac{\text{stress}}{\text{strain}} = \frac{F/A}{\Delta l/l_0}$  avec  $E$  le module de Young,  $F$  la force appliqué sur la particule,  $A$  la surface de la particule sur laquelle a été appliquée la force,  $\Delta l$  la déformation et  $l_0$  le diamètre initial de la particule.

### III. Encapsulation des CSM

Après la caractérisation des particules d'alginate et d'HPMC-Si, les cellules d'intérêts ont été encapsulées dans les 2 polymères. Après encapsulation, la viabilité et la prolifération de ces CSM encapsulées ont été étudiées.

#### a) Obtention des CSM

Les CSM ont été isolées à partir du tissu adipeux de patients ayant subi une lipoaspiration. Ces CSM issues du tissu adipeux humain sont dénommées hASC (human Adipose derived Stromal Cells).

Le tissu graisseux prélevé a été lavé plusieurs fois par une solution d'HBSS (Hank's Balanced Sodium Salt, 24020117 *Invitrogen Corporation*) pour éliminer le sang. Le tissu a ensuite été digéré par de la collagénase de type IA (Collagenase crude type I A C-2674, *Sigma-Aldrich*) concentrée à 0,025% dans l'HBSS pendant 1 heure à 37°C sous agitation. L'action de la collagénase a été inhibée par addition d'un volume de milieu de culture cellulaire composé du DMEM + GlutaMax (Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (4.5g/L), 31966-021 *Invitrogen Corporation*), 10% SVF, 1% pénicilline-streptomycine (15140-122 *Invitrogen Corporation*) et 1% de L-glutamine (25030081 *Invitrogen Corporation*) (milieu de culture complet). Le produit de la digestion a ensuite été centrifugé pendant 5 minutes (260 g à 4°C). Après l'élimination de la phase supérieure contenant la graisse et les adipocytes, la phase inférieure contenant la fraction stromale a été resuspendue puis filtrée sur un tamis cellulaire de 70 µm. Le filtrat a été centrifugé pendant 8 minutes (260 g à 4°C) puis les cellules ont été comptées (cellule de Malassez) au bleu trypan puis cultivées dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> à une densité de 5 000 cellules par cm<sup>2</sup>. Les flasques ont été incubées sous atmosphère humide à 5% CO<sub>2</sub> et à 37°C. Le milieu nutritif cellulaire a été remplacé tous les 2 jours. Un décollement des cellules par la trypsination (trypsin-EDTA 0,05%, 25300054 *Invitrogen Corporation*) des hASC a été réalisée lorsque les flasques F75 ont été à 80-85% de confluence. A chaque passage, les cellules ont été repiquées à la densité de 5000 cellules/cm<sup>2</sup>, soit 375000 cellules par flasque. Dans ce projet, toutes les hASC utilisées correspondent au 5<sup>ème</sup> passage.

## b) Encapsulation des hASC

Les hASC ont été encapsulées dans l'alginate et l'HPMC-Si préalablement stérilisés par la vapeur d'eau sous pression (sous forme de poudre et à 134°C pendant 4 minutes pour l'alginate et sous forme de solution et à 121°C pendant 18 minutes pour l'HPMC-Si).

Les cultures d'hASC ont été traitées par la trypsine 0,05% / EDTA pour décoller les cellules des flasques de 75 cm<sup>2</sup>. Après une centrifugation (1 minute à 1 200 g), les hASC ont été comptées. Vingt microlitres de la suspension cellulaire ont été prélevés afin de réaliser une numération en présence de bleu Trypan à 0,2% en cellule de Malassez.

Pour l'alginate,  $2 \cdot 10^6$  hASC (100 µl) ont été mélangées avec 1 millilitre de la solution d'alginate de sodium à 2%. L'encapsulation des cellules dans l'alginate est réalisée par la méthode d'extrusion à travers une aiguille de 31 G dans une solution de chlorure de calcium à 100 mM, sous agitation à 100 tours par minutes et à température ambiante. Après 15 minutes, les particules d'alginate renfermant les hASC ont été filtrées sur un tamis de 150 µm puis incubées dans le milieu de culture complet à 37°C et sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture a été remplacé tous les 2 jours.

Pour l'HPMC-Si,  $2 \cdot 10^6$  hASC (100 µl) ont également été mélangées avec 1 millilitre de la solution polymérique à 2%. Au préalable, après le décollement puis le comptage au bleu de trypan des hASC, la solution d'HPMC-Si à 3% a été pré-réticulée par mélange avec le tampon acide pour obtenir une solution à 2% et de pH neutre. Les cellules d'intérêts ont ensuite été mélangées à cette dernière solution d'HPMC-Si. L'encapsulation a été réalisée par extrusion à travers une aiguille de 22G du mélange solution polymérique/hASC dans l'huile d'olive. Les conditions opératoires de la dispersion huileuse ont été : une durée de 1h30, à température ambiante et à une vitesse de rotation de 250 tours par minutes. L'huile d'olive a été éliminée par filtration sur un tamis de 20 µm puis les particules d'HPMC-Si ont fait l'objet de plusieurs lavages successifs au SVF dans le but d'éliminer l'huile résiduelle à leur surface. Les particules ont été incubées dans le milieu nutritif cellulaire à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu nutritif a été remplacé tous les 2 jours.

### c) Etude de la viabilité des hASC après encapsulation

La viabilité des cellules après encapsulation a été évaluée par coloration (Live/Dead Viability/Cytotoxicity kit, *L3224 Molecular Probes*). Le kit de viabilité est composé de 2 réactifs : la calcéine non fluorescente (calcein AM, non-fluorescent acetomethoxy derivate of calcein) et l'homodimère d'hétidium-1 (Eth-D1). Les cellules vivantes sont caractérisées par une activité de l'estérase qui permet la conversion de la calcéine non fluorescente en calcéine fluorescente (fluorescence verte) détectable à une longueur d'onde comprise entre 494 et 517 nm. Le deuxième réactif du kit de viabilité, l'homodimère d'hétidium-1, diffuse spécifiquement dans les cellules ayant une membrane cytoplasmique endommagée (cellules mortes) et se lie à l'ADN des cellules mortes provoquant ainsi l'émission d'une fluorescence rouge détectable entre 528 et 617 nm.

24 heures après l'encapsulation des hASC, les particules d'alginate et d'HPMC-Si ont été lavées 2 fois au PBS pendant 20 secondes. Puis, elles ont été incubées, pendant 45 minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière, avec les composés du kit de viabilité (la calcéine AM et l'Eth-D1) préalablement dilués dans le milieu nutritif cellulaire. Après un dernier lavage de 2 minutes des particules dans le PBS, les cellules vivantes et mortes ont été observées au microscope confocal. Enfin, dans le but de déterminer le pourcentage d'hASC vivantes dans chaque type de particule, les images récupérées par microscopie confocale ont été traitées et analysées à l'aide du logiciel Volocity V6.2 (Perkin Elmer, MA, USA). Ce test a été répété toutes les semaines pendant 1 mois.

### d) Etude de la prolifération des hASC après encapsulation

24 heures après l'encapsulation des hASC dans l'alginate, les particules ont été lavées pendant 5 minutes dans du PBS puis déréiculées en utilisant un tampon de citrate de sodium (*W302600 Sigma-Aldrich*) à 60 mM. Les particules d'alginate ont été incubées dans ce tampon pendant 15 minutes puis centrifugées pendant 3 minutes à 1200 tours par minute afin de récupérer les hASC encapsulées. Comme décrit précédemment, un comptage cellulaire au bleu Trypan à 0,2% a permis d'estimer le nombre moyen d'hASC encapsulées par particule d'alginate. Cette méthode d'estimation du nombre moyen de cellules encapsulées par particule d'alginate a été au préalable validée (résultats non représentés) à l'aide de la quantification de l'ADN des hASC

par PicoGreen (Quant-iT PicoGreen dsDNA assay kit ; 11496 *Life Technologies*) comme décrit dans les travaux de Bosworth L.A. *et al.*, et Thibault R.A. *et al.* [292,293].

24 heures après l'encapsulation des hASC dans l'HPMC-Si, les particules ont été déréticulées par ultrasonication pendant 15 secondes (Misonix XL2000 Microson Ultrasonic Cell Disruptor). L'ultrasonication de l'HPMC-Si a été immédiatement suivie par une quantification de l'ADN des hASC, initialement encapsulées, par PicoGreen.

Le calcul du nombre moyen d'hASC encapsulées par particule d'alginate et d'HPMC-Si a été réalisé toutes les semaines pendant un mois.

#### IV. Vérification du maintien de la biofonctionnalité des hASC après encapsulation

Dans le but d'étudier la biofonctionnalité des hASC après l'encapsulation dans l'alginate et l'HPMC-Si, l'activité enzymatique de l'Indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) a été étudiée et les concentrations de la prostaglandine E<sub>2</sub> et de l'Hepatocyte Growth Factor ont été déterminées dans le surnageant cellulaire.

Une semaine après encapsulation dans l'alginate et l'HPMC-Si, les hASC ont été stimulées pendant 72 heures par l'IFN- $\gamma$  (Human IFN- $\gamma$ 1b premium grade, 130-096-484 *Miltenyl Biotec*) et le TNF- $\alpha$  (Human TNF- $\alpha$  premium grade, 130-094-014 *Miltenyl Biotec*) à 20 ng /ml. Pour chacune des conditions d'études, contrôle (sans stimulation) et stimulée, 20 particules d'alginate ou d'HPMC-Si de 1 mm de diamètre ont été sélectionnées.

L'activité enzymatique de l'IDO a été évaluée par la conversion du tryptophane en L-kynurenine secrété dans le surnageant cellulaire. Les kits Elisa Prostaglandine E<sub>2</sub> EIA kit (514010 *Cayman Chemical*) et Human HGF DuoSet ELISA (DY294 *R&D Systems*) ont permis de calculer respectivement les concentrations de la PGE<sub>2</sub> et de l'HGF dans le surnageant cellulaire.

- Activité enzymatique de l'IDO : détermination de la concentration de L-kynurénine

60 µL du surnageant cellulaire de chaque condition ont été transférés dans une plaque de 48 puits, puis 30µL d'acide trichloroacétique à 30% (trichloroacetic acid solution, T0699 *Sigma-Aldrich*) ont été ajoutés. L'ensemble a été incubé pendant 30 minutes à 50°C. Après une centrifugation de 10 minutes à 3 000g, 75 µL du surnageant ont été mélangés à une solution de révélation (solution d'Ehrlich's). Une lecture d'absorbance à 490 nm a été immédiatement effectuée ensuite. Pour chaque condition, la concentration en µM du L-kynurénine dans le surnageant cellulaire a été normalisée au nombre total d'hASC encapsulées dans les particules d'alginate ou d'HPMC-Si.

- Détermination de la concentration de la PGE<sub>2</sub>

Le principe du calcul de la concentration de la PGE<sub>2</sub> dans le surnageant cellulaire se base sur la compétition entre la prostaglandine E<sub>2</sub> et le conjugué PGE<sub>2</sub>-acétylcholinestérase (PGE<sub>2</sub>- AChE Tracer). La concentration du PGE<sub>2</sub>-Tracer mesurée est inversement proportionnelle à la concentration de la PGE<sub>2</sub> dans l'échantillon. Le surnageant cellulaire de chaque condition a été dilué dans un tampon fourni dans le kit (Tampon EIA) et 50 µl de ce mélange ont été transférés dans une plaque de 48 puits préalablement pré-coatée par le fabricant. Cinquante microlitres du conjugué (PGE<sub>2</sub>-AChE Tracer) puis 50 µl de l'anticorps monoclonal anti-Prostaglandine E<sub>2</sub> ont été ajoutés dans les puits. Après une incubation de 18 heures à 4°C et 5 rinçages successifs des puits à l'aide du tampon de lavage fourni, 200 µl du réactif de révélation (le réactif d'Ellman) ont été transférés dans les puits pendant 90 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Une lecture d'absorbance à 405 nm sur chaque puits a été réalisée. Pour chaque condition, la concentration en pg/ml de la PGE<sub>2</sub> dans le surnageant cellulaire a été normalisée au nombre total d'hASC encapsulées dans les particules d'alginate ou d'HPMC-Si.

- Détermination de la concentration de l'HGF

Chaque puits de la plaque de dosage a été pré-coaté par 100µl de l'anticorps monoclonal anti-HGF humain (« anticorps de capture ») la veille de chaque expérimentation. Après l'aspiration de l'anticorps anti-HGF, le surnageant cellulaire de chaque condition a été dilué dans un tampon fourni dans le kit. 100 µl de ce mélange ont été transférés dans la plaque pendant 2 heures. 100

$\mu\text{l}$  de l'anticorps de « détection » (anticorps anti-HGF biotinylé) ont été transférés dans les puits, suivi d'une étape d'incubation de 2 heures et d'une série de lavages. 100  $\mu\text{l}$  de la solution de substrat fournie ont été rajoutés dans les puits pendant 20 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Une lecture d'absorbance à 450 nm a été réalisée. Pour chaque condition, la concentration en pg/ml de l'HGF dans le surnageant cellulaire a été normalisée au nombre total d'hASC encapsulées dans les particules d'alginate ou d'HPMC-Si.

## V. Analyse statistique

Pour la génération puis la caractérisation des particules, 3 lots d'alginate et d'HPMC-Si ont été utilisés. Pour chaque lot, les expérimentations ont été réalisées au moins 3 fois. L'analyse de la viabilité et la détermination du nombre moyen de cellules encapsulées par particule ont été effectuées sur des CSM issues de 3 patients. Chaque expérimentation a été réalisée 3 fois en triplicat. L'étude de la biofonctionnalité des CSM après encapsulation a été effectuée sur des cellules issues de 2 patientes. Pour chaque patiente, l'expérimentation a été reproduite 3 fois. Pour chaque expérimentation, les conditions (avec ou sans stimulation) ont été réalisées 3 fois en triplicat.

Les résultats ont été présentés par des calculs de moyenne associés à leurs écarts types. Des études comparatives ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad® par l'intermédiaire de tests Anova. Les résultats ont été analysés et comparés avec une significativité statistique  $p < 0,05$ .

# Résultats

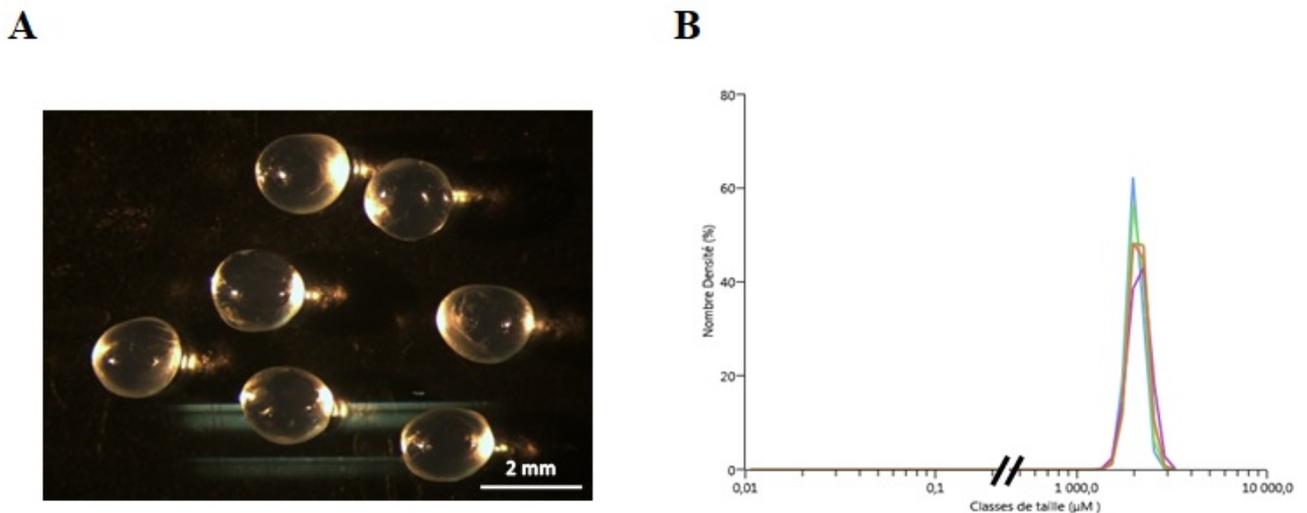
## I. Obtention des particules

### a) L'alginate

Les particules d'alginate ont été obtenues par extrusion à travers une aiguille de 0,22 mm de diamètre (31 G) de la solution polymérique dans un bain de chlorure de calcium à 100 mM. L'évaluation de la forme et de la taille des particules a été réalisée par microscopie photonique. La dispersion de la taille des particules a été étudiée par granulométrie laser

#### 1. Etude de la forme, de la taille et de la dispersion de la taille

Nous avons obtenu des particules d'alginate sphériques avec une forme homogène et une surface lisse (Figure 18A).



**Figure 18** : Particules d'alginate obtenues par extrusion dans du  $\text{CaCl}_2$ . Les particules ont été analysées par microscopie photonique (A) et la dispersion de la taille a été étudiée par granulométrie laser (B). La barre d'échelle correspond à 2 mm.

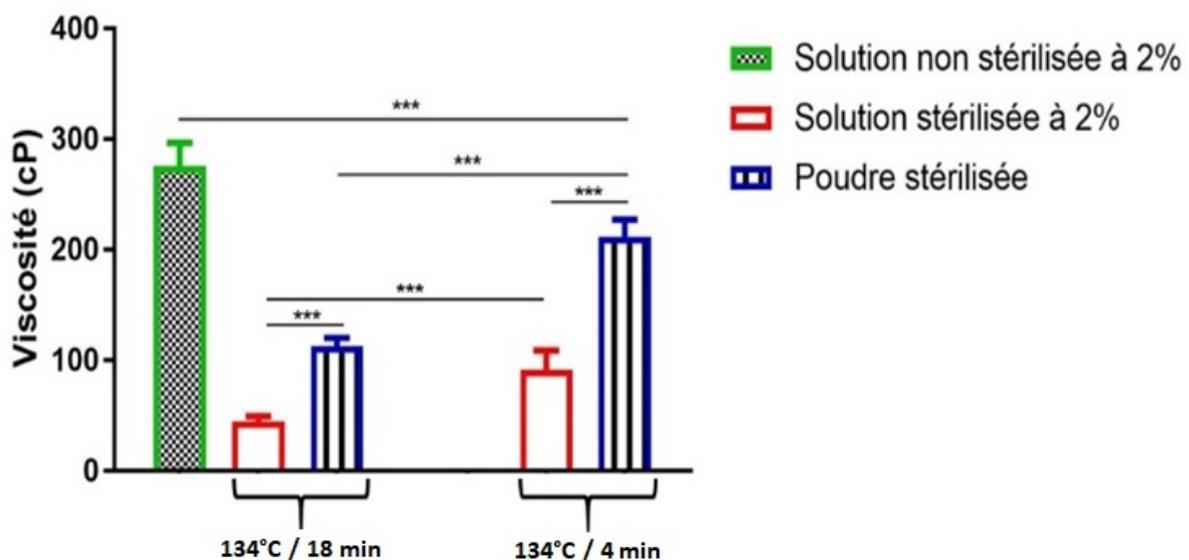
L'analyse granulométrique montre que, dans nos conditions opératoires, la génération de particules d'alginate est reproductible (Figure 18B). Nous avons observé une dispersion de la taille allant de 1 à 3 mm. Le diamètre moyen des particules est proche de 2 mm ( $1.91 \pm 0.2$  mm). L'analyse granulométrique nous a également révélé une monodispersité de la taille des

particules. En effet, plus de 80 % des particules possèdent une taille comprise entre 1,6 mm et 2,1 mm.

## 2. Effets de la stérilisation

Une stérilisation de l'alginate est nécessaire avant l'encapsulation des CSM. Par conséquent, nous avons alors stérilisé l'alginate, sous forme de poudre ou d'une solution, par la vapeur d'eau sous pression à 134°C pendant 4 ou 18 minutes. Dans le but de sélectionner la meilleure forme de stérilisation du polymère et le meilleur cycle, l'impact de la stérilisation sur la viscosité du polymère et sur sa masse moléculaire en poids a été analysé respectivement par viscosimétrie et diffusion dynamique de la lumière.

Comme le montre la figure 19, la stérilisation de l'alginate, sous forme de poudre ou de solution, réduit significativement la viscosité de la solution polymérique.



**Figure 19** : Effet de la stérilisation de l'alginate (sous forme de poudre ou de solution) sur la viscosité de la solution polymérique. \*\*\*p<0,001.

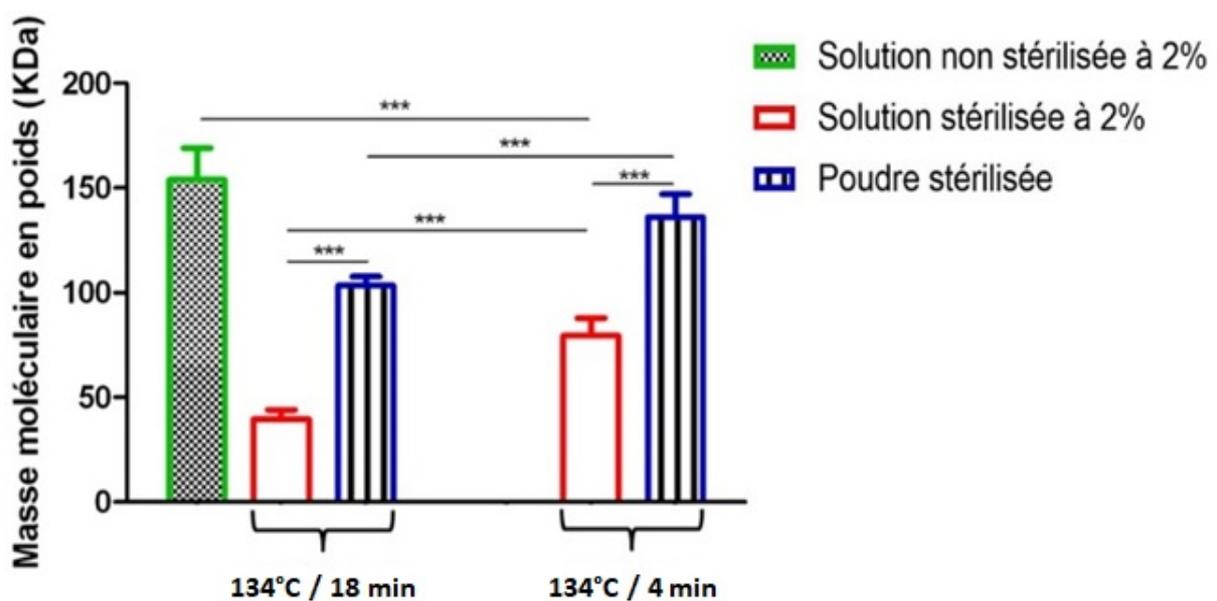
Par rapport à la condition contrôle (solution d'alginate à 2% non stérilisée), la stérilisation par la vapeur d'eau sous pression à 134°C pendant 4 minutes entraîne une baisse de la viscosité de 66,8% et de 23,1% lorsque le polysaccharide est stérilisé, respectivement, sous la forme d'une solution et d'une poudre. L'augmentation de la durée de stérilisation jusqu'à 18 minutes provoque une diminution encore plus importante que lors du cycle précédent : une chute de la

viscosité de 83,8% et 59% lorsque l'alginate est stérilisé respectivement sous la forme d'une solution et d'une poudre.

La température de la stérilisation engendre une modification des propriétés physico-chimiques de l'alginate. Le polymère stérilisé sous la forme d'une poudre et pendant 4 minutes subit moins de modifications de ses propriétés que lorsqu'il est stérilisé sous la forme d'une solution pendant 4 ou 18 minutes.

La diffusion dynamique de la lumière nous a permis d'identifier la nature des modifications subies par l'alginate lors de sa stérilisation.

Ainsi, nous avons observé que les procédés de stérilisation appliqués provoquent une diminution de la masse moléculaire en poids de l'alginate (Figure 20).



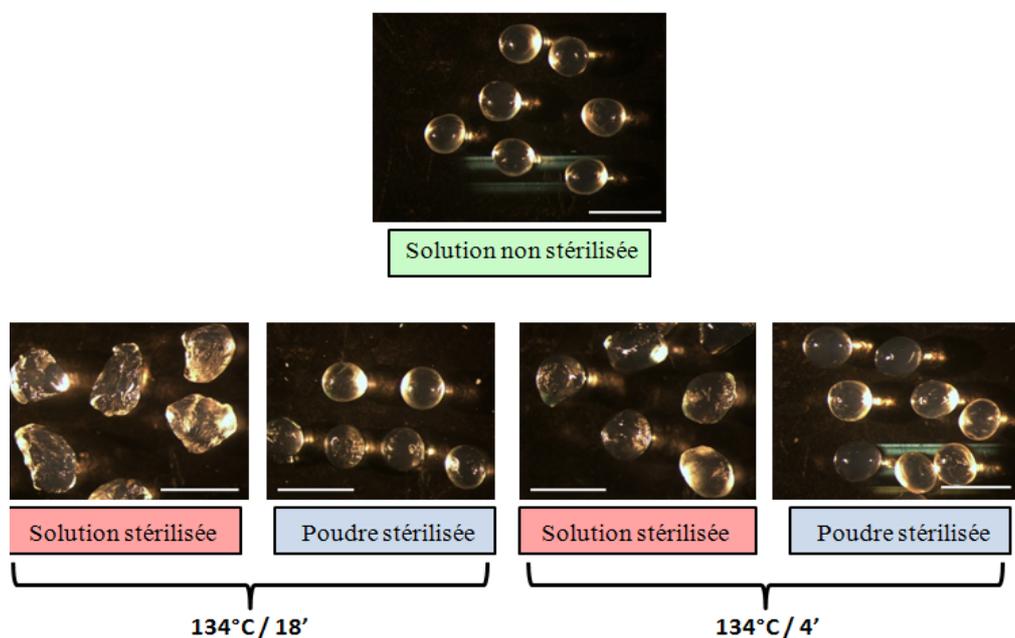
**Figure 20** : Effet de la stérilisation de l'alginate (sous la forme de poudre ou de solution) sur sa masse moléculaire. \*\*\* $p < 0.001$ .

Par rapport à la condition contrôle (solution d'alginate à 2% non stérilisée), la stérilisation à 134°C pendant 4 minutes induit une diminution de la masse moléculaire de 48,5% lorsque l'alginate est stérilisé sous la forme d'une solution. En revanche, la stérilisation de l'alginate sous la forme d'une poudre pendant 4 minutes à 134°C n'entraîne pas une diminution significative de sa masse moléculaire par rapport à celui de la condition contrôle. La stérilisation

pendant 18 minutes provoque, comme précédemment, une diminution encore plus importante de la masse moléculaire de l'alginate : une baisse de la masse moléculaire de 74,3% et 32,8% lorsque l'alginate est stérilisé respectivement sous la forme d'une solution et d'une poudre.

Dans le but de vérifier si ces modifications physico-chimiques de l'alginate affectent la qualité des particules fabriquées, des particules d'alginate ont été produites par extrusion à partir des précédentes solutions stérilisées.

Lorsque l'alginate n'a pas fait l'objet d'une stérilisation, les particules obtenues présentent une homogénéité de leur aspect, de leur forme sphérique et de leur taille (Figure 21).



**Figure 21** : Effet de la stérilisation de l'alginate sur l'aspect des particules obtenues. La condition contrôle correspond aux particules d'alginate obtenues sans la stérilisation du matériau (solution à 2% dans du PBS). Les particules ont été générées à partir de l'alginate stérilisé sous la forme d'une solution (à 2% dans du PBS) ou d'une poudre (la poudre stérilisée a ensuite été solubilisée à 2% dans du PBS). La barre d'échelle correspond à 2 mm.

Les particules les plus affectées sont celles obtenues à partir de l'alginate stérilisé sous la forme d'une solution à 134°C pendant 18 minutes. En effet, elles présentent une forme et une surface irrégulières avec une taille polydispersée. De plus, ces particules semblent instables parce que, contrairement aux autres particules, elles finissent par se désintégrer (rupture du gel) à l'air libre au cours du temps. La stérilisation par la vapeur d'eau de l'alginate sous la forme d'une poudre

à 134°C pendant 18 minutes ou sous la forme d'une solution pendant 4 minutes permet l'obtention de particules qui semblent moins altérées que précédemment mais légèrement différentes (forme relativement sphérique et surface moins lisse) que celles obtenues à partir de la condition contrôle (alginate non stérilisé). Les particules qui apparaissent les plus régulières et les plus proches des particules contrôles sont celles obtenues à partir de l'alginate stérilisé sous la forme d'une poudre à 134°C pendant 4 minutes.

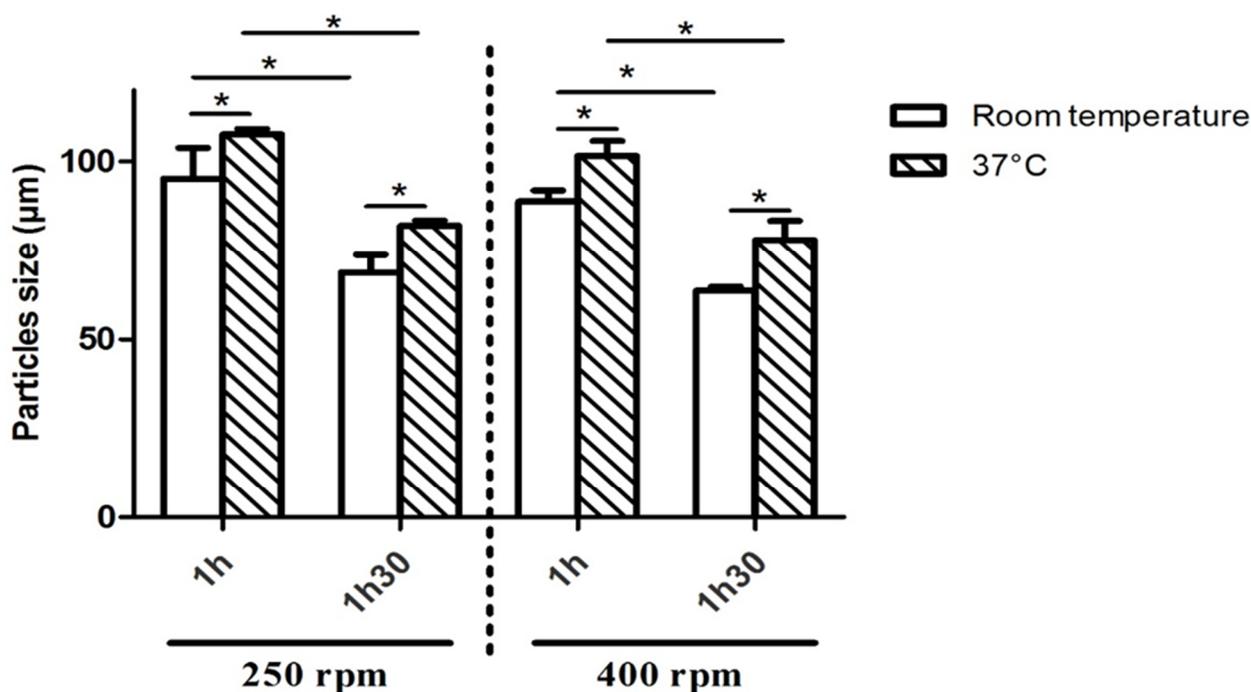
A partir de ces résultats, la stérilisation de l'alginate sous la forme d'une poudre à 134°C pendant 4 minutes a été sélectionnée pour la suite du projet.

## b) L'HPMC-Si

Les particules d'HPMC-Si ont été obtenues par extrusion et dispersion dans de l'huile d'olive.

Dans le but d'optimiser le protocole de dispersion huileuse, l'influence de 3 paramètres opératoires sur la taille des particules d'HPMC-Si a été étudiée. Ces paramètres sont : la durée de la dispersion (1 heure ou 1h30), la température (ambiante ou à 37°C) et la vitesse d'agitation (250 ou 400 rpm).

Les résultats (Figure 22) montrent que 2 paramètres influencent significativement la taille des particules d'HPMC-Si : la température de la dispersion et la durée.



**Figure 22** : Influence de la variation des paramètres opératoires de la dispersion sur la taille des particules d'HPMC-Si. \*  $p < 0,05$ .

➤ La température

Lorsque la température augmente, elle provoque une augmentation significative de la taille des particules. Pour une agitation à 250 tours par minute pendant 1h et à température ambiante, nous avons obtenu des particules de  $92 \pm 10,1 \mu\text{m}$ . En maintenant cette condition opératoire et en variant uniquement la température à  $37^\circ\text{C}$ , les particules générées sont 12 % plus grande. Pour une agitation à 250 tours par minute pendant 1h30, l'augmentation de la température provoque une augmentation de la taille moyenne de 19%. Pour une agitation à 400 tours par minute pendant une heure et à température ambiante, nous avons obtenu des particules de  $89 \pm 5,4 \mu\text{m}$ . En maintenant cette condition opératoire et en variant uniquement la température à  $37^\circ\text{C}$ , les particules obtenues sont 14 % plus grande. Enfin, à 400 tours par minute pendant 1h30, l'augmentation de la température entraîne une augmentation de la taille moyenne de 22%.

➤ La durée

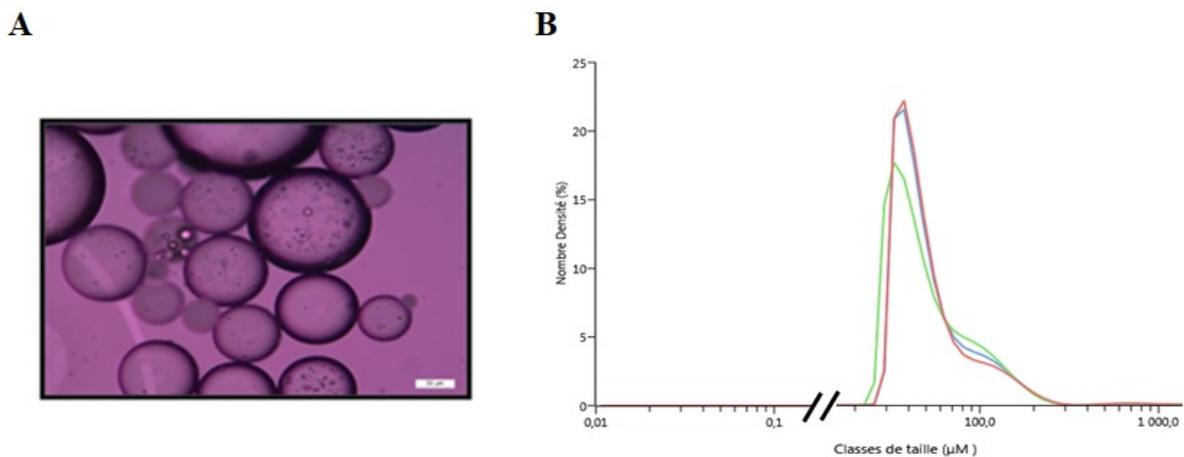
L'augmentation de la durée de la dispersion engendre une diminution de la taille moyenne des particules. Par exemple, les particules obtenues à partir d'un protocole de dispersion sous une agitation de 400 tours par minute pendant 1h30 à température ambiante sont plus petites de 22%

que celles obtenues dans les mêmes conditions mais pendant une heure. Cet effet de la variation de la durée de la dispersion sur la taille des particules d'HPMC-Si a été observé dans toutes les autres conditions : l'augmentation de la durée de la dispersion provoque une diminution d'en moyenne 25% de la taille des particules d'HPMC-Si générées.

En revanche, la variation de la vitesse d'agitation n'a aucun effet significatif sur la taille des particules d'HPMC-Si.

Pour la suite du projet, nous avons sélectionné les conditions opératoires suivantes : une durée de dispersion de 1h30 avec une vitesse d'agitation de 250 tours par minute et une température ambiante.

Dans ces conditions opératoires, nous avons obtenu des particules d'HPMC-Si sphériques, avec une forme homogène, et avec une surface apparente plus lisse que celle observée pour les particules d'alginate (Figure 23A).



**Figure 23** : Particules d'HPMC-Si obtenues par dispersion dans l'huile d'olive. Les particules ont été observées par microscopie photonique (A) et la dispersion de la taille a été étudiée par granulométrie laser (B). La barre d'échelle correspond à 50 µm.

Dans ces conditions, la taille moyenne des particules d'HPMC-Si obtenues est d'environ  $68 \pm 28$  µm de diamètre (Figure 23B).

Comparées aux particules d'alginate, ces particules d'HPMC-Si présentent une plus grande polydispersité de taille. On observe une population prédominante de  $31 \pm 18$  à  $76 \pm 11$  µm (69%) et une autre mineure de  $76 \pm 11$  à  $144 \pm 23$  µm (11%). Nous avons également détecté un

petit nombre de particules fabriquées d'une taille supérieure ou égale à 1 mm. La figure 23B révèle également que la génération des particules d'HPMC-Si est légèrement moins reproductible que celle de l'alginate (Figure 18B).

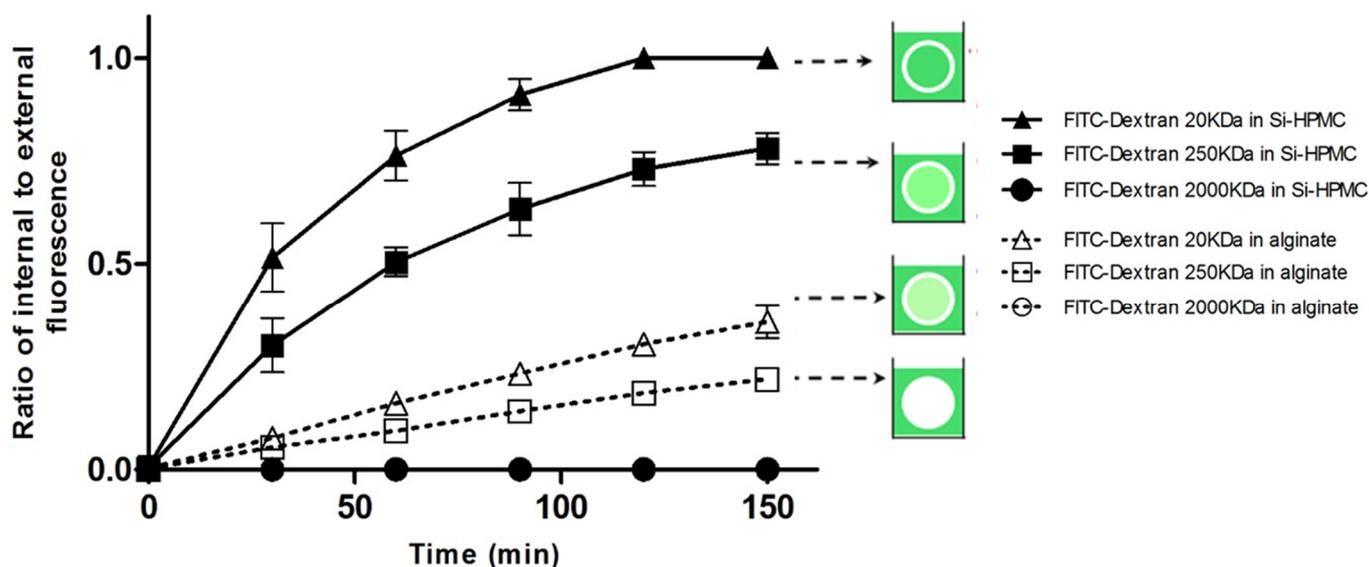
## II. Etude des propriétés de diffusion et des propriétés mécaniques des particules

Nous avons poursuivi la caractérisation des particules d'alginate et d'HPMC-Si en étudiant leurs propriétés de diffusions ainsi que leurs propriétés mécaniques.

### a) Propriétés de diffusion

Nous avons analysé la cinétique de diffusion à l'intérieur des particules de trois dextrans couplés au FITC et de masses moléculaires différentes (20 kDa, 250 kD et 2 000 kDa). Pour chaque traceur marqué nous avons suivi, par microscopie confocale, sa diffusion à l'intérieur des particules pendant 2h30.

Au début de l'expérimentation, les particules observées ne sont pas fluorescentes. Lors de l'incubation des particules dans les solutions de dextrans-FITC de 20 kDa et 250 kDa, les particules d'alginate et d'HPMC-Si deviennent fluorescentes et le ratio calculé augmente en fonction du temps (Figure 24).



**Figure 24** : Etude de la diffusion des dextrans-FITC dans les particules d'alginate et d'HPMC-Si au cours du temps.

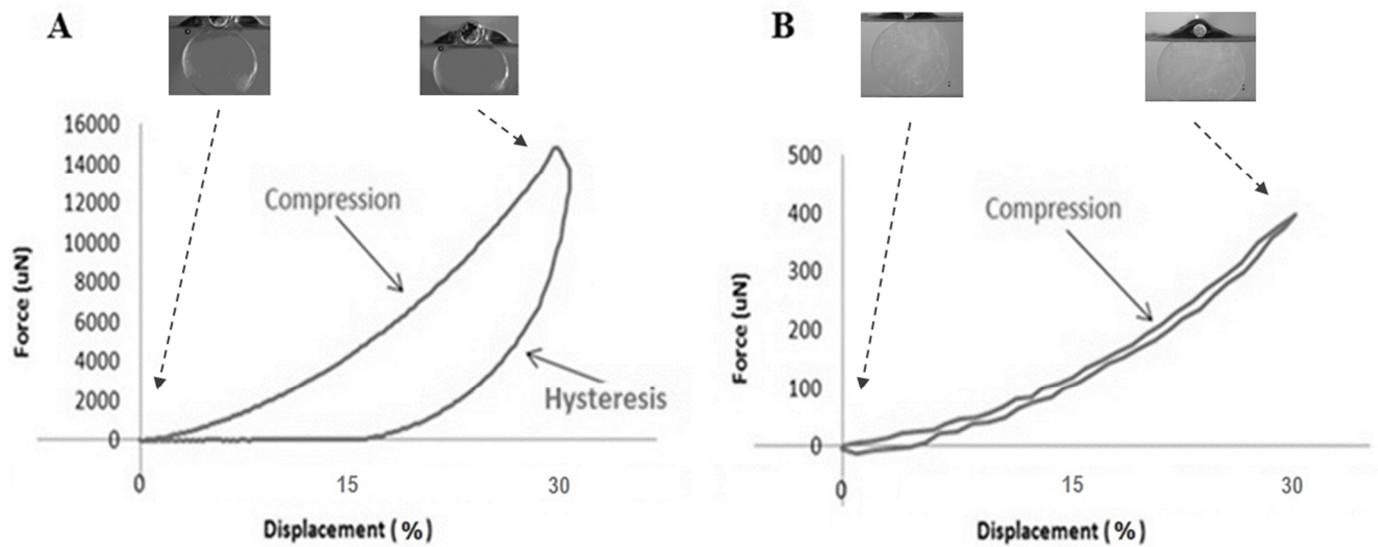
En revanche, le dextran de 2 000 kDa ne diffuse pas à l'intérieur des particules d'alginate et d'HPMC-Si et le ratio reste égal à 0.

La figure 24 nous révèle également une différence de cinétique de diffusion des dextrans-FITC (20 et 250 kDa) dans les particules d'alginate et d'HPMC-Si. Pour le dextran-FITC de 20 KDa, en moins de 2h, l'équilibre est atteint (le ratio est égal à 1) dans les particules d'HPMC-Si. Le ratio n'est que de 0,33 pour ce dextran-FITC dans l'alginate après 2h30. Le dextran-FITC de 250 KDa diffuse aussi plus rapidement dans l'HPMC-Si (ratio de 0,7 après 2h30) que dans les particules d'alginate (ratio de 0,21 après 2h30).

#### b) Propriétés mécaniques

Les particules d'alginate et d'HPMC-Si ont été soumises à des tests de compression dans le but de déterminer leurs propriétés mécaniques. La contrainte mécanique a été appliquée de manière à obtenir une déformation maximale de 30% des particules pendant 30 secondes.

La déformation de 30% des particules d'alginate nécessite une force de compression environ 35 fois supérieure (14 000  $\mu\text{N}$ , Figure 25 A) à celle des particules d'HPMC-Si (moins de 400  $\mu\text{N}$ , Figure 25 B).



**Figure 25** : Etude des propriétés mécaniques des particules d'alginate (A) et d'HPMC-Si (B) par compressions mécaniques.

Cette différence est reflétée sur le module de Young calculé qui est de  $16 \pm 0.82$  kPa pour les particules d'alginate contre  $0.22 \pm 0.06$  kPa pour les particules d'HPMC-Si. Ainsi, les particules d'alginate sont donc plus rigides que celles d'HPMC-Si.

A la fin de l'application des contraintes mécaniques, les particules d'alginate présentent une réponse viscoélastique caractérisée par une hystérésis bien marquée. Quant aux particules d'HPMC-Si, les courbes de compression et de relaxation sont quasi-identiques ; ces particules retrouvent leur taille et forme initiales dès la fin de l'application de la contrainte.

### III. Encapsulation des hASC

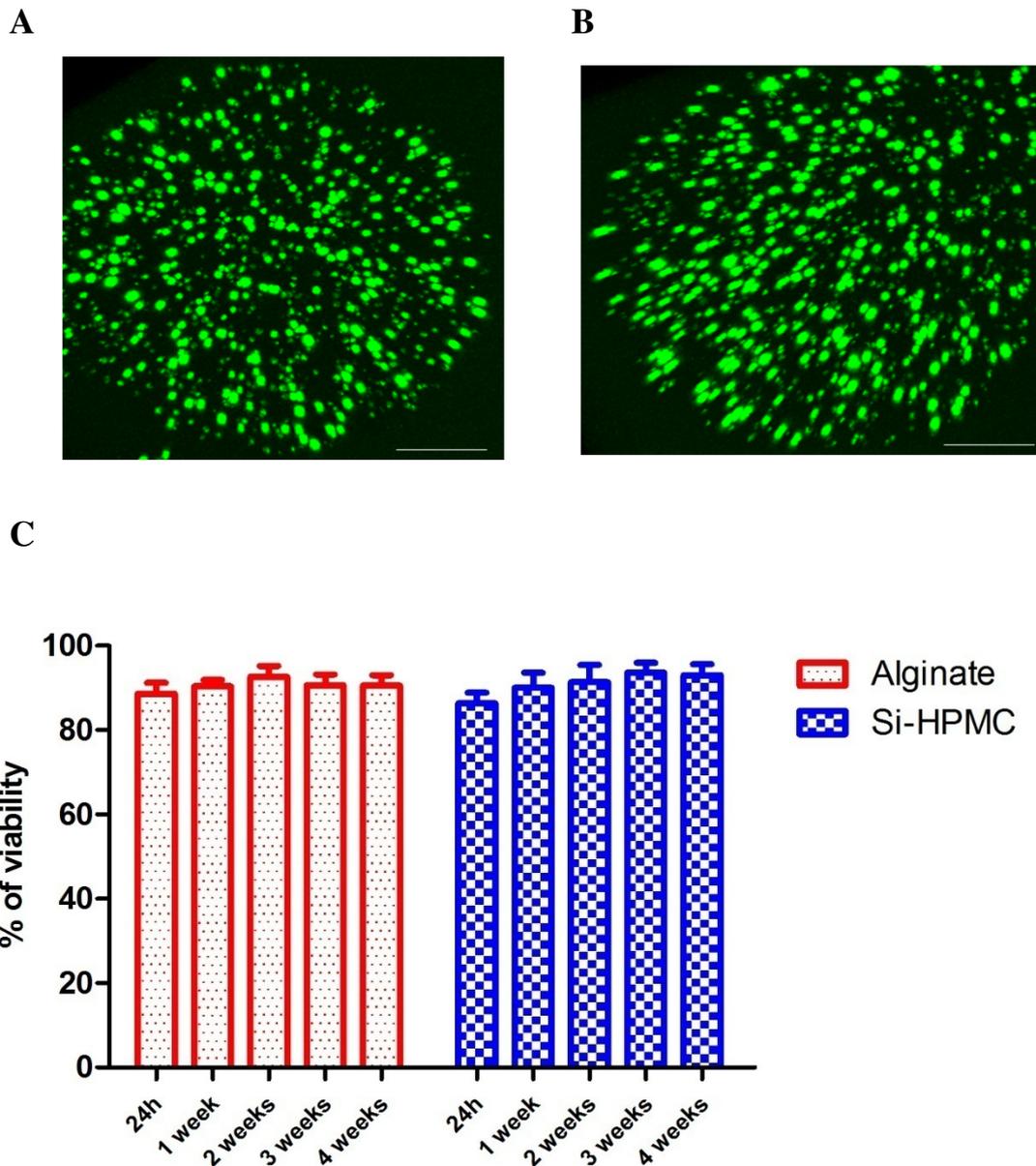
Après la caractérisation des particules, nous avons isolé des CSM issues de tissus adipeux humains (hASC). Après une étape de prolifération cellulaire, ces hASC ont été encapsulées dans les 2 matériaux. La viabilité et la prolifération de ces cellules ont été étudiées jusqu'à 1 mois après encapsulation.

#### a) Viabilité des hASC après encapsulation

Les hASC ont été encapsulées dans de l'alginate et de l'HPMC-Si, respectivement par extrusion dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  et par extrusion puis dispersion dans de l'huile d'olive, à une concentration de 2 millions de cellules par millilitre de solution polymérique.

La viabilité des hASC a été étudiée par coloration (Live/Dead Viability/Cytotoxicity kit) à partir de 24 h après encapsulation.

Les figures 26A et 26B représentent des photos des hASC colorées en vert (viables) encapsulées dans respectivement l'alginate et l'HPMC-Si à 1 mois. Nous observons que la distribution des cellules viables dans les particules d'alginate et d'HPMC-SI est uniforme et aucune accumulation de cellules mortes n'est détectée spécifiquement au centre de la particule. Par ailleurs, ces 2 figures nous montrent que les hASC encapsulées dans les 2 types de matériaux n'interagissent pas physiquement entre elles et aucun amas (« cluster ») de cellules n'a été observé.



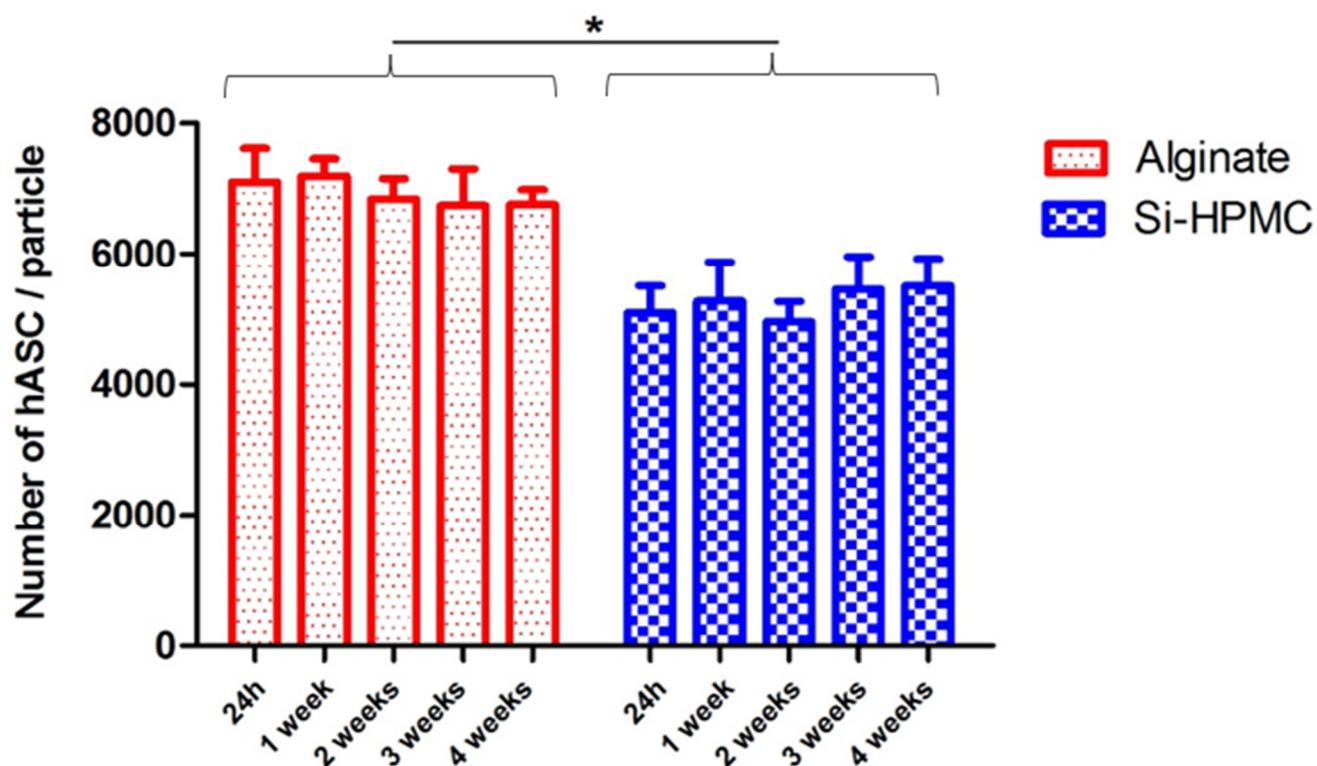
**Figure 26** : Viabilité des hASC encapsulées dans l'alginate et l'HPMC-Si. Les images A et B représentent des hASC vivantes encapsulées respectivement dans l'alginate et l'HPMC-Si à 1 mois. Observation par microscopie confocale. Le graphique C représente le pourcentage de viabilité des hASC dans l'alginate et l'HPMC-Si de 24h jusqu'à 1 mois après encapsulation. *La barre d'échelle correspond à 250  $\mu$ m.*

Pendant toute la durée de l'étude, la viabilité des hASC encapsulées a toujours été supérieure ou égale à 86% (Figure 26C). La moyenne de la viabilité des hASC encapsulées dans l'HPMC-Si et l'alginate est respectivement de  $90.8 \pm 3.8$  % et  $90.5 \pm 2.4$  % pendant 1 mois. Nous n'avons pas observé de différence significative entre la viabilité des hASC encapsulées dans l'alginate et celles encapsulées dans l'HPMC-Si pendant toute la durée de l'étude.

b) Estimation du nombre d'hASC encapsulées et évolution au cours du temps

Dans le but de déterminer le nombre moyen de cellules encapsulées et leur évolution pendant 1 mois, les hASC ont été extraites des particules d'alginate (après déréticulation des particules dans une solution de citrate de sodium à 60 mM) et des particules d'HPMC-Si (après déréticulation par ultrasonication). Pour les cellules encapsulées dans l'alginate, l'estimation du nombre moyen d'hASC par particule a été réalisée par un comptage après coloration vitale au bleu Trypan (les résultats de l'estimation ont été vérifiés par une quantification de l'ADN par PicoGreen). L'estimation a été réalisée par PicoGreen pour les hASC encapsulées dans l'HPMC-Si.

Pour des particules de taille identique ( $1 \pm 0.2$  mm de diamètre), le nombre moyen d'hASC encapsulées dans une particule d'alginate est significativement plus important que celui dans une particule d'HPMC-Si (Figure 27).



**Figure 27** : Evolution du nombre moyen de hASC par particule d'alginate et d'HPMC-Si au cours du temps. \*  $p < 0,05$ .

Nous avons compté en moyenne  $7\,102 \pm 514$  hASC par particule d'alginate 24h après l'encapsulation contre  $5\,100 \pm 407$  hASC par particule d'HPMC-Si. Cette valeur, a peu évolué après une semaine ( $7\,194 \pm 263$  hASC par particule d'alginate contre  $5\,278 \pm 596$  par particule d'HPMC-Si). La variation pendant la durée de l'étude n'est pas significative.

Les hASC après encapsulation dans l'alginate et l'HPMC-Si ne semblent pas proliférer au cours du temps. Le rendement d'encapsulation (rapport du nombre de cellules comptées sur le nombre théorique) est de 97% pour l'alginate et 70% pour l'HPMC-Si.

#### IV. Biofonctionnalité des hASC après encapsulation

La littérature a montré que les propriétés anti-inflammatoires, anti-fibrotiques, anti-hypertrophiques et chondroprotectrices des hASC s'exercent via la sécrétion de facteurs solubles. Afin de vérifier que les hASC encapsulées au sein des 2 matériaux conservent cette capacité de sécrétion, nous avons déterminé les concentrations de 3 facteurs solubles (L-kynurénine (le produit de la conversion enzymatique du tryptophane par l'IDO), PGE<sub>2</sub> et HGF) dans les surnageants de cultures.

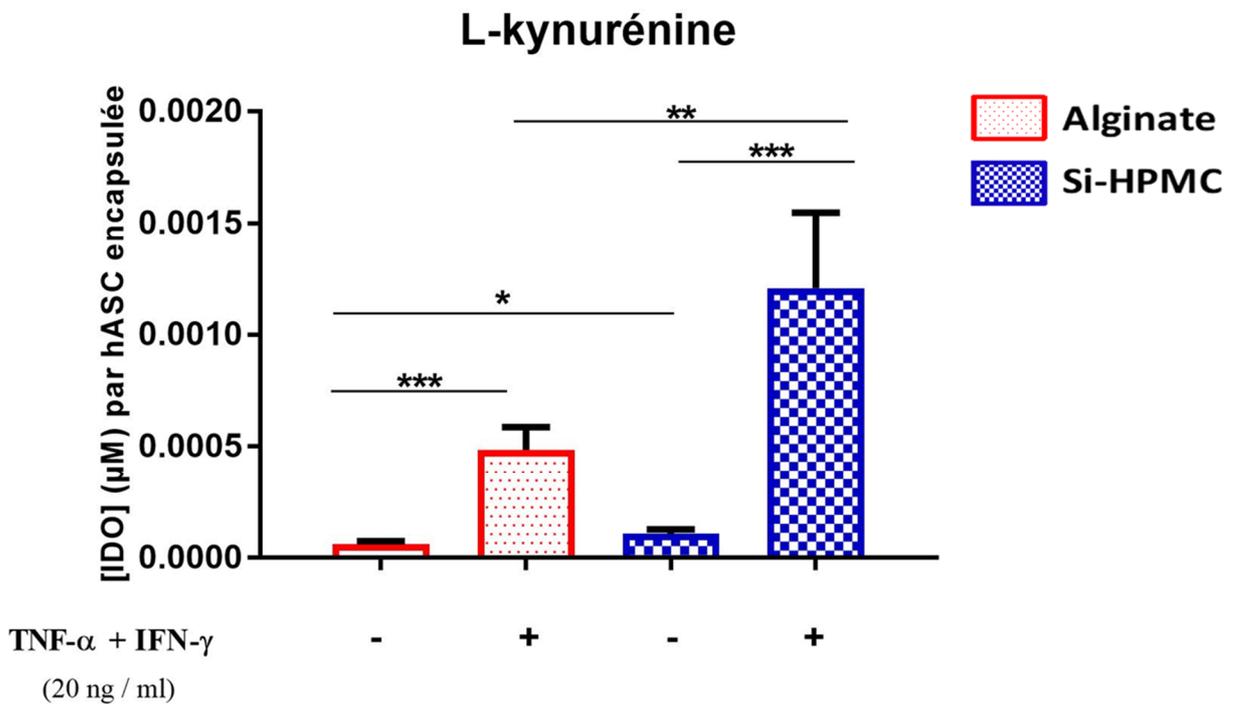
Après l'encapsulation dans l'alginate et l'HPMC-Si, les hASC ont été stimulées pendant 72 heures par 2 cytokines pro-inflammatoires (le TNF- $\alpha$  + l'IFN- $\gamma$ ) à une concentration de 20 ng/ml. Le nombre moyen d'hASC encapsulées par particule a été calculé (au bleu Trypan et par quantification de l'ADN) à la fin de la stimulation. Pour chaque condition, les concentrations des 3 facteurs solubles calculées dans le surnageant cellulaire ont été normalisées au nombre d'hASC encapsulées dans l'alginate ou l'HPMC-Si.

- Détermination de l'activité enzymatique d'IDO

L'activité enzymatique d'IDO a été déterminée indirectement par le calcul de la concentration de L-kynurénine dans le surnageant cellulaire.

Dans le cas de la condition contrôle (hASC encapsulées dans l'alginate et non stimulées), la concentration de L-kynurénine dans le surnageant cellulaire est en moyenne de  $6,08 \pm 1,4 \times 10^{-5}$   $\mu$ M par cellule encapsulée (Figure 28). Lorsque les hASC sont encapsulées

dans l'HPMC-Si, sans stimulation, la concentration est significativement plus importante ( $10,7 \pm 2 \times 10^{-5} \mu\text{M}$  par hASC encapsulée).



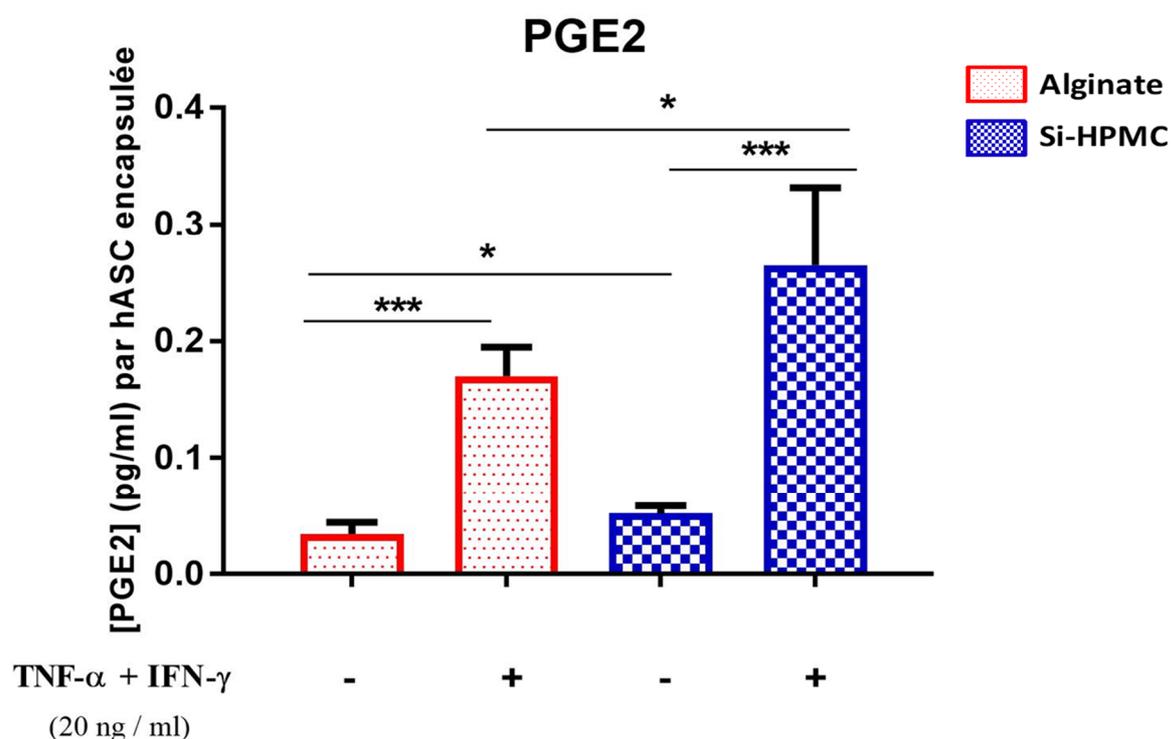
**Figure 28** : Evaluation de l'activité enzymatique d'IDO secrétée par les hASC encapsulées dans l'alginate et l'HPMC-Si à l'aide du dosage de la concentration de L-kynurénine. Les hASC encapsulées ont été stimulées ou non par le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  pendant 72h. Les résultats sont normalisés au nombre d'hASC encapsulées dans l'alginate ou l'HPMC-Si. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Par rapport à la condition contrôle, la stimulation par le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  des hASC encapsulées dans l'alginate et l'HPMC-Si augmente significativement la concentration de L-kynurénine dans le surnageant cellulaire, respectivement d'un facteur de 8 ( $46,8 \pm 10,2 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ ) et de 20 ( $120,8 \pm 34 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ ). Ainsi, l'encapsulation des hASC dans l'alginate et l'HPMC-Si maintient leur capacité à sécréter IDO. Par ailleurs, l'encapsulation des hASC dans l'HPMC-Si permet de détecter une activité enzymatique d'IDO plus importante que lors de l'encapsulation dans l'alginate.

- Détermination de la concentration de la PGE<sub>2</sub> dans le surnageant cellulaire

Le même protocole expérimental a été réalisé pour calculer la concentration de la prostaglandine E<sub>2</sub>.

Lorsque les hASC, encapsulées dans l'alginate, ne sont pas stimulées (condition contrôle), nous avons calculé  $0,035 \pm 9,8 \times 10^{-3}$  pg/ml de PGE<sub>2</sub> par hASC encapsulées dans le surnageant (Figure 29). Dans le cas de l'HPMC-Si, et comme pour la L-kynurénine, la concentration de la PGE<sub>2</sub> est significativement plus importante  $0,052 \pm 6,6 \times 10^{-3}$  pg/ml par cellule encapsulée.



**Figure 29 :** Calcul de la concentration de la prostaglandine E<sub>2</sub> secrétée par les hASC encapsulées dans l'alginate et l'HPMC-Si. Les hASC encapsulées ont été stimulées ou non par le TNF-α et l'IFN-γ pendant 72h. Les résultats sont normalisés au nombre d'hASC encapsulées dans l'alginate ou l'HPMC-Si. \* p<0,05 ; \*\*\*p<0,001.

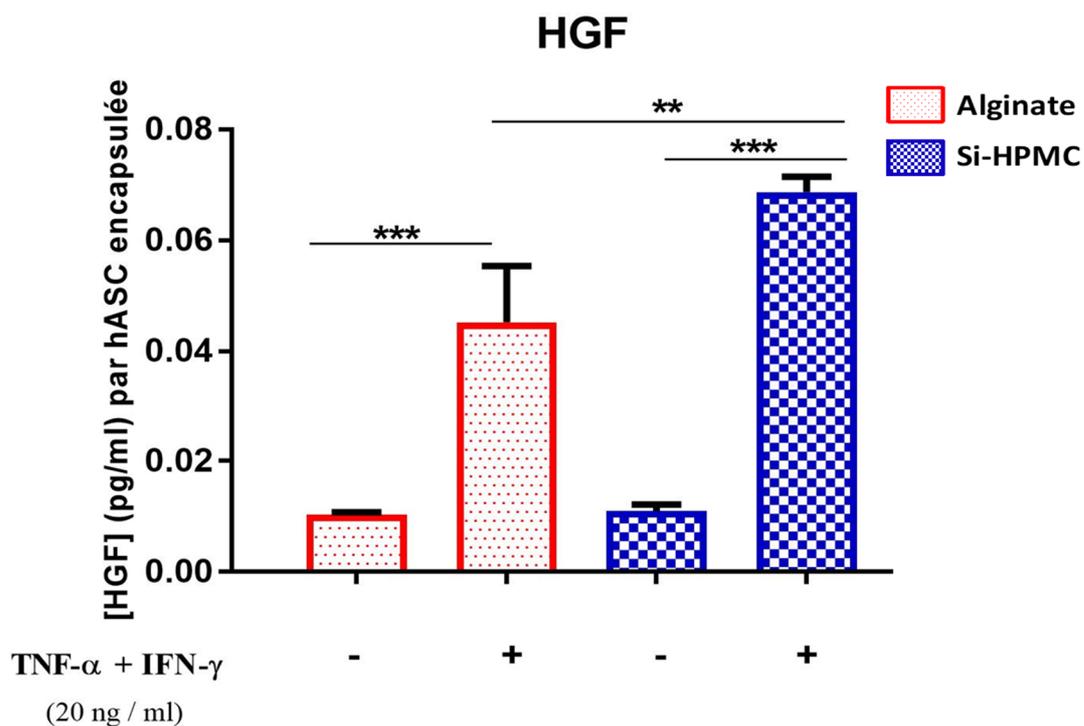
Par rapport au contrôle (hASC encapsulée dans l'alginate et sans stimulation), la stimulation des hASC encapsulées dans l'alginate provoque également une augmentation de la concentration de la prostaglandine E<sub>2</sub> d'un facteur de 4,9 ( $0,17 \pm 24,7 \times 10^{-3}$  pg/ml). Cette augmentation est significativement plus importante, facteur de 7,7 ( $0,265 \pm 66,7 \times 10^{-3}$  pg/ml), lorsque les hASC sont encapsulées dans l'HPMC-Si.

Comme observé précédemment, l'encapsulation des hASC dans l'alginate et l'HPMC-Si n'affecte pas leur capacité à sécréter la prostaglandine E<sub>2</sub> dans le surnageant. La stimulation de ces cellules par des cytokines pro-inflammatoires augmente significativement la concentration de ce facteur trophique.

- Détermination de la concentration de l'HGF dans le surnageant cellulaire

Le calcul de la concentration de l'HGF libéré dans le milieu de culture a été réalisé après avoir stimulé les hASC encapsulées pendant 72 heures par le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ .

Comme pour les 2 précédents facteurs trophiques étudiés, la stimulation des hASC encapsulées dans l'alginate et l'HPMC-Si augmente significativement la concentration de l'HGF dans le surnageant (Figure 30).



**Figure 30** : Calcul de la concentration de l'HGF secrétée par les hASC encapsulées dans l'alginate et l'HPMC-Si. Les hASC encapsulées ont été stimulées ou non par le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  pendant 72h. Les résultats sont normalisés au nombre d'hASC encapsulées dans l'alginate ou l'HPMC-Si. \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001.

Par rapport à la condition contrôle, pour laquelle la concentration du facteur de croissance dans le milieu de culture est égale à  $0,01 \pm 4,3 \times 10^{-4}$  pg/ml par hASC encapsulée dans l'alginate, la stimulation au TNF- $\alpha$  et à l'IFN- $\gamma$  augmente la concentration de l'HGF d'un facteur 4,4 ( $0,045 \pm 1 \times 10^{-2}$  pg/ml). L'augmentation de la concentration d'HGF dans le surnageant est encore plus importante, un facteur 6,7 ( $0,069 \pm 0,3 \times 10^{-2}$  pg/ml) par cellule encapsulée dans l'HPMC-Si.

Comme pour la L-kynurénine et la PGE<sub>2</sub>, la concentration de l'HGF dans le surnageant cellulaire est toujours significativement plus importante lorsque les hASC sont encapsulées dans l'HPMC-Si plutôt que dans l'alginate.

L'ensemble de ces résultats nous montre clairement que les hASC encapsulées dans l'alginate et l'HPMC-Si restent sensibles aux cytokines pro-inflammatoires. Les cellules répondent à ces stimuli par une activation de leur sécrétion de la L-kynurénine, la PGE<sub>2</sub> et l'HGF qui diffusent à l'extérieur des particules jusqu'au surnageant cellulaire. Enfin, les plus importantes concentrations de ces 3 facteurs solubles ont été calculées dans le surnageant des hASC encapsulées dans l'HPMC-Si plutôt que dans celles encapsulées dans l'alginate.

## **Discussion**

Les travaux publiés *in vitro* et *in vivo* laissent espérer une utilisation des CSM dans le traitement des pathologies du cartilage articulaire. Ces cellules exerceraient leurs actions thérapeutiques principalement par l'intermédiaire de leur sécrétion de facteurs solubles. Cependant, dans un contexte arthrosique, seules des études en rapport avec la médecine régénérative du cartilage ont été réalisées avec les CSM encapsulées. Les publications concernant l'application de l'encapsulation des CSM dans la thérapie cellulaire de l'arthrose sont inexistantes.

Dans ce contexte, nous avons sélectionné 2 matériaux pour l'encapsulation des CSM : l'alginate et l'HPMC-Si. Nous avons cherché à déterminer le meilleur matériau pour l'encapsulation des CSM pour une potentielle application dans la thérapie cellulaire de l'arthrose. Ainsi, le travail vise essentiellement à évaluer la faisabilité de la génération de particules d'alginate et d'HPMC-Si, de rechercher s'il est possible d'introduire des CSM dans ces particules et d'étudier la viabilité et la biofonctionnalité des CSM après l'encapsulation.

L'alginate est le polymère le plus utilisé pour l'encapsulation cellulaire dans différentes pathologies [294]. Ce matériau semble intéressant pour protéger les cellules lors de l'injection puis les libérer par déréliction. Quant à l'HPMC-Si, c'est un polymère hémisynthétique qui a été développé au sein de notre unité de recherche. Il s'agit d'un hydrogel présentant les avantages d'être facilement injectable, biocompatible et de réticuler en établissant des liaisons covalentes entre les différentes chaînes macromoléculaires lui conférant ainsi une stabilité mécanique (résorbabilité à long terme). Les travaux de recherches au sein de l'unité ont montré que l'HPMC-Si (préalablement stérilisé sous la forme d'une solution à 121°C pendant 18 minutes) : (i) est adéquat pour la culture tri-dimensionnelle des CSM et leur différenciation chondrogénique [295] ; (ii) permet la formation d'un néo-cartilage *in vivo*, après l'injection des CSM chez des souris nude [296] et (iii) la réparation des lésions ostéochondrales chez le lapin [296]. En dépit de ces résultats prometteurs, l'HPMC-Si n'a pas encore été appliqué en thérapie cellulaire de l'arthrose.

## I. Etudes de caractérisation des particules

### a) Effets de la stérilisation sur l'alginate

L'encapsulation cellulaire nécessite l'utilisation de matériaux stériles. Il existe différents procédés de stérilisation des biomatériaux. Selon la bibliographie, la filtration à 0,22 µm est couramment utilisée pour stériliser l'alginate sous forme d'une solution. Cependant, en raison de l'importante viscosité de notre solution d'alginate à 2%, cette méthode de stérilisation s'est avérée impossible à mettre en œuvre. L'oxyde d'éthylène étant de plus en plus non souhaité du fait de sa toxicité [297] et l'irradiation-γ provoquant la déréticulation des particules (travaux antérieurs réalisés au sein de l'unité de recherche), la stérilisation à la vapeur d'eau sous pression a donc été envisagée.

La durée de la stérilisation ainsi que la forme du matériau (sous la forme d'une poudre ou d'une solution) sont des paramètres à prendre en compte. Nous avons noté que la stérilisation du matériau sous la forme d'une solution à 134°C et pendant une durée de 18 minutes affecte la viscosité et la masse moléculaire en poids de l'alginate. De plus, la solution d'alginate stérilisée à 134°C pendant 18 minutes produit des particules réticulées instables et de formes irrégulières. Le même résultat a été observé lors de la stérilisation de l'alginate dans d'autres études [298–300]. Dans ces travaux, la diminution de la viscosité de la solution d'alginate est accompagnée d'une baisse de la rigidité de l'hydrogel réticulé. Ces résultats ont été attribués à une rupture des chaînes du polymère et à une diminution de son degré de polymérisation sous l'effet de la chaleur [301]. Nos résultats montrent une étroite corrélation entre la viscosité et la masse moléculaire en poids du polymère. La diminution de la masse moléculaire de l'alginate s'est accompagnée d'une chute de la viscosité de la solution polymérique après la stérilisation. Ce lien s'explique par la loi de Mark-Houwink :

$$[\eta] = K' M^\alpha$$

avec  $[\eta]$  la viscosité de la solution polymérique,  $M$  la masse moléculaire du polymère,  $K'$  et  $\alpha$  2 constantes qui dépendent (i) de la nature et de la température du solvant et (ii) des propriétés mécaniques du polymère.

La stérilisation du matériau sous la forme d'une poudre à 134°C pendant 4 minutes semble moins affecter les caractéristiques physico-chimiques de l'alginate. Elle permet d'obtenir des particules plus homogènes. Par conséquent, nous avons sélectionné cette condition opératoire de la stérilisation de l'alginate pour la suite du projet.

L'HPMC-Si est régulièrement stérilisé à la vapeur d'eau sous pression (sous la forme d'une solution) à 121°C pendant 18 minutes. Les résultats des différents travaux *in vitro* et *in vivo* obtenus dans ces conditions opératoires de stérilisation étant satisfaisants, nous les avons conservées pour stériliser l'HPMC-Si dans notre projet.

#### b) La taille et la forme des particules

Le choix de la taille des particules doit être compatible avec une potentielle application dans le traitement de l'arthrose. Ainsi, ce choix est gouverné par un compromis entre 3 critères : (i) la capacité d'encapsulation des CSM qui présentent une taille estimée à une douzaine de  $\mu\text{m}$ , (ii) la capacité des particules à être injectées dans l'espace intra-articulaire d'un modèle animal (iii) la capacité à encapsuler le plus grand nombre possible de cellules pour obtenir l'effet thérapeutique souhaité.

##### ➤ Particules d'alginate

Par le procédé d'extrusion à travers une aiguille de 31 G, nous obtenons des particules d'alginate d'environ 2 mm de diamètre, reproductibles et avec une faible polydispersité de taille. En raison de sa simplicité, cette méthode est intéressante pour produire une quantité importante de particules uniformes. Cependant, le principal inconvénient de la technique est la taille des particules obtenues. Ainsi, une taille des particules supérieure au millimètre limite leur éventuelle application *in vivo*, notamment dans un modèle arthrosique murin dont la taille de l'espace inter-articulaire est estimée entre 300 et 500  $\mu\text{m}$ . Par ailleurs, certaines études ont montré que plus la particule présente un diamètre importante, plus le processus de diffusion à travers sa paroi est difficile, limitant ainsi les échanges des cellules encapsulées avec l'environnement à l'extérieur de la particule [302].

D'un point de vue théorique, plusieurs paramètres influencent la taille finale des particules d'alginate obtenues par extrusion. Parmi ces paramètres, on peut citer par exemple :

- La proportion acide guluronique (G) / acide mannuronique (M)

Une forte proportion en M réduit la taille des particules fabriquées [303]. En revanche, les particules obtenues à partir d'un alginate riche en M sont caractérisées par leurs faibles propriétés mécaniques (résistance à la contrainte mécanique) et par une matrice moins poreuse affectant ainsi leurs propriétés de diffusion.

- La tension superficielle de la solution d'alginate

Il a été démontré que l'augmentation de la concentration de la solution d'alginate diminue sa tension superficielle. La diminution de cette dernière provoque la génération de particule de plus petite taille [243,304].

- La stérilisation de l'alginate

Leo *et al.*, ont observé que la stérilisation de l'alginate est un paramètre qui influence la taille des particules générées [299]. Ainsi, par comparaison à des particules obtenues à partir d'une solution d'alginate non stérilisé, la stérilisation du matériau provoque la génération de particules de plus grande taille.

- La concentration de la solution de réticulation

La concentration du chlorure de calcium par exemple est déterminante pour l'obtention de particules d'alginate. Il a été reporté que lorsque cette concentration est inférieure à 100 mM, il est difficile d'obtenir des particules d'alginate [305]. Ainsi, la concentration de la solution de chlorure de calcium a été standardisée à 100 mM pour la fabrication des particules d'alginate. Une augmentation de la concentration de la solution de chlorure de calcium se traduit par une diminution de la taille des particules d'alginate obtenues [300].

- La durée de la réticulation

Plusieurs études ont démontré que l'augmentation de la durée d'exposition des gouttelettes d'alginate dans la solution de réticulation provoque la génération de particules plus rigides et de plus petite taille [306,307]. Ce paramètre est à prendre en compte lors de l'encapsulation cellulaire : une exposition trop importante des cellules dans la solution de réticulation (et non dans un milieu de culture cellulaire) ne favoriserait pas le maintien de leur viabilité.

En pratique, il faut jouer sur tous les paramètres opératoires pour contrôler la taille moyenne des particules d'alginate. Cependant, la variation de ces paramètres reste insuffisante pour diminuer de façon significative la taille de nos particules (de diamètre initial de 2 mm) jusqu'à la taille souhaitée (200  $\mu\text{m}$  de taille finale) pour les études animales. Pour la suite du projet, cette limitation pourrait être remédiée en appliquant au protocole d'extrusion une force additionnelle à la gravité (telle qu'une force électrostatique [244]) ou en sélectionnant une autre méthode de génération de particules de tailles plus petites et monodispersées telles que les techniques fluidiques [264].

➤ Particules d'HPMC-Si

L'HPMC-Si est un polymère hémisynthétique dont la réticulation est pH dépendante. La pré-réticulation de l'hydrogel d'HPMC-Si (dont le pH est basique à l'état initial) nécessite une neutralisation de son pH par l'addition d'un tampon HEPES. Contrairement à l'alginate, dont la réticulation dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  est quasiment instantanée, la réticulation totale de l'HPMC-Si est lente et nécessite environ 10 jours à température ambiante. De ce fait, comme des essais préliminaires nous l'ont montré, la méthode d'extrusion n'est pas adaptée à la fabrication de particules d'HPMC-Si. Nous avons alors mis au point un protocole de dispersion huileuse qui est adapté aux polymères hydrophiles, tel que l'HPMC-Si, avec une pré-réticulation amorcée avant la formation des gouttelettes.

Nous avons observé que la taille des particules d'HPMC-Si est directement influencée par 2 paramètres du protocole de dispersion : la température de dispersion, qui lorsqu'elle augmente, provoque une hausse de la taille des particules ; et la durée de dispersion, qui lorsqu'elle augmente, entraîne une diminution de la taille des particules. D'autres paramètres, que nous n'avons pas testés, peuvent également influencer la taille des particules obtenues par dispersion

huileuse. Par exemple, une faible tension interfaciale et une importante viscosité de la phase huileuse permettent la génération de particules de tailles respectivement plus petites et plus grandes [308]. La distance entre les pales d'agitation est également un autre paramètre qui peut avoir une influence sur la taille des particules fabriquées. Ainsi, une étude a montré que plus cette distance entre les pales d'agitation est importante, plus la taille moyenne des particules formées est faible [174]. En revanche, et contrairement à cette dernière étude, nos essais effectués sur l'HPMC-Si n'ont pas mis en valeur un effet de la variation de la vitesse d'agitation sur la taille moyenne des particules obtenues.

Pour la suite du projet, nous avons sélectionné les conditions opératoires suivantes :

- la durée d'agitation dans le récipient de recueil : 1h30, pour permettre une plus importante réticulation des particules et ainsi éviter leur coalescence ;
- la vitesse d'agitation : 250 tours par minutes, peu influente sur la taille des particules mais qui réduirait (par comparaison à la vitesse de 400 rpm) les forces de cisaillements que subiraient les cellules lors de leur encapsulation ;
- la température : ambiante pour obtenir des particules de plus petite taille.

Dans ces conditions opératoires, des particules d'HPMC-Si ont été fabriquées puis analysées. Comparées à l'alginate, les particules d'HPMC-Si sont de plus petite taille mais nous avons observé une polydispersité de taille plus importante. L'utilisation d'un émulsifiant permettrait d'obtenir des particules d'HPMC-Si de taille moins polydisperse [309]. Cependant, les émulsifiants que nous avons testés (monolaurate de sorbitane, Span 20<sup>TM</sup> et monooléate de sorbitane, Span 80<sup>TM</sup>) se sont avérés cytotoxiques. Pour remédier à ce problème de polydispersité de taille des particules d'HPMC-Si, d'autres méthodes de génération de particules plus optimales (en terme de reproductibilité et de monodispersité en taille), telles que les techniques fluidiques, pourraient-être envisagées.

Les résultats montrent que la taille des particules d'HPMC-Si est plus appropriée que celle des particules d'alginate pour une éventuelle injection intra-articulaire dans un petit modèle animal lors de l'étude *in vivo*. Par ailleurs, nous ne pouvons pas exclure le risque que les particules d'alginate d'environ 2 mm soient plus rapidement dégradées à cause des forces de friction qu'elles subiraient dans l'espace intra-articulaire en raison de leur plus grande taille.

La géométrie des particules est aussi un paramètre ayant un impact sur l'injection d'un hydrogel. En effet, les particules non sphériques seraient plus difficilement injectables (en raison d'un faible débit d'écoulement). Nous avons observé que les particules d'alginate et d'HPMC-Si sont sphériques. En revanche, la forme des particules d'HPMC-Si paraît plus régulière. Les particules d'HPMC-Si seraient alors plus facilement injectables et, par conséquent, plus appropriées pour une potentielle application *in vivo* que les particules d'alginate.

La méthode d'extrusion ne permettant pas de générer des particules d'alginate inférieures à 1 mm de diamètre, nous avons alors décidé, pour la suite des expérimentations, de sélectionner des particules d'alginate et d'HPMC-Si de taille égale à 1 mm. Cette approche permet de comparer les 2 biomatériaux (concernant leurs propriétés, la viabilité et la biofonctionnalité des hASC encapsulées) en s'affranchissant du paramètre de taille.

### c) Propriétés de diffusion et propriétés mécaniques

#### ➤ Propriétés de diffusion

La diffusion à travers la matrice des particules d'alginate et d'HPMC-Si est une condition indispensable au succès de notre concept thérapeutique.

Nos travaux reposent sur l'étude de la diffusion des molécules d'intérêt de l'extérieur vers l'intérieur des particules (cytokines pro-inflammatoires indispensables à la stimulation des CSM encapsulées) et inversement, de l'intérieur vers l'extérieur (facteurs thérapeutiques solubles sécrétés par les CSM stimulées). Pour une obtenir une efficacité thérapeutique, l'encapsulation doit permettre une libération importante de facteurs thérapeutiques solubles et maintenir une forte concentration locale de ces facteurs dans les tissus environnant. Il a été démontré que les propriétés de diffusion d'une particule dépendent de plusieurs paramètres telles que la taille moyenne des pores et de leur distribution à la surface des particules [310–312].

En pratique, l'estimation de la taille des pores et leur densité à la surface des particules est possible par observation en microscopie à balayage électronique. Cependant, cette méthode repose sur une simple observation qualitative. Nous avons privilégié une méthode indirecte qui

consiste à déterminer la cinétique de diffusion de molécules marquées et de masses moléculaires connues à travers la matrice des particules [313]. Cette méthode présente quelques limites. En effet, la masse moléculaire d'une molécule n'est pas le seul paramètre qui détermine sa capacité à diffuser à travers la matrice d'une particule. Sa charge, sa conformation tridimensionnelle et sa concentration de chaque côté de la matrice jouent un rôle aussi important que celui de son poids moléculaire.

En raison de leur large et de leur facilité d'utilisation dans les études de diffusion [314,315], nous avons sélectionné des dextrans de différentes masses moléculaires (20 kDa, 250 kDa, 2000 kDa) et couplés au FITC. Nous avons porté un intérêt particulier sur le dextran de 20 kDa puisque les cytokines pro-inflammatoires et les facteurs thérapeutiques solubles sécrétés par les CSM ont des masses moléculaires moyennes comprises entre 10 et 40 kDa [119,316–318].

Nos résultats montrent que le dextran de 2000 kDa ne diffuse ni dans l'alginate ni dans l'HPMC-Si. Cette observation nous suggère que les molécules de fortes masses moléculaires (telles que les immunoglobulines A et M) et les cellules immunitaires ne diffuseraient pas à travers la matrice des 2 types de particules. Les particules d'alginate et d'HPMC-Si possèdent des propriétés de diffusion différentes. Nous avons observé que seuls les dextrans de 20 et de 250 kDa diffusent dans les particules d'alginate et d'HPMC-Si. En revanche, ces dextrans diffusent plus rapidement dans les particules d'HPMC-Si que dans les particules d'alginate. Cette différence pourrait être la conséquence d'une porosité plus importante des particules d'HPMC-Si que celles de l'alginate. Nous pouvons espérer de ce résultat que les CSM encapsulées dans l'HPMC-Si seront stimulées plus rapidement et d'une manière plus intense que celles encapsulées dans l'alginate dans le but de sécréter le plus tôt possible les facteurs thérapeutiques pour atteindre leur seuil d'efficacité.

## ➤ Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des hydrogels, notamment la rigidité et la viscoélasticité, influencent le comportement des cellules encapsulées et peuvent avoir une incidence sur leur viabilité et biofonctionnalité. Il a été reporté par exemple qu'un hydrogel fortement rigide est susceptible de défavoriser la viabilité des cellules encapsulées [319,320].

Les tests de déformations et le calcul du module de Young ont été réalisés sur les particules d'alginate et d'HPMC-Si. Nous avons remarqué que les particules d'alginate sont plus rigides que les particules d'HPMC-Si. Le module de Young des particules d'alginate (16 kPa) est similaire aux valeurs qui ont été reportées dans la littérature (entre 5 et 18 kPa, en fonction des conditions opératoires [321]). Nos résultats montrent également qu'à la fin de l'application des forces de compression, les particules d'HPMC-Si retrouvent leur taille et leur forme initiales plus rapidement que les particules d'alginate. Nous avons observé que les particules d'alginate sont également caractérisées par une importante hystérèse à la fin de l'application de la contrainte mécanique. Cette différence nous laisse supposer que les particules d'HPMC-Si permettraient une plus rapide relaxation, pendant et après l'injection, que les particules d'alginate. Cette propriété mécanique des particules d'HPMC-Si présente un avantage sur le comportement et la viabilité des cellules encapsulées selon la littérature.

## II. Encapsulation des hASC

Le succès de notre projet nécessite que les CSM encapsulées soient viables et que leur nombre moyen par particule d'alginate et d'HPMC-Si soit suffisant afin d'obtenir une production efficace des facteurs trophiques. Dans cette étude, les CSM ont été isolées à partir du tissu adipeux humain (hASC). Par comparaison avec les CSM issues de la moelle osseuse, les hASC présentent l'avantage d'être obtenues facilement et sous anesthésie locale. Par ailleurs, le tissu adipeux contient des CSM en plus grand nombre (5% des cellules nucléées du prélèvement) que la moelle osseuse (0,0001 à 0,01 % des cellules nucléées du prélèvement) [84,322].

Nos résultats montrent que pendant toute la durée de l'étude (1 mois), la viabilité des hASC encapsulées a toujours été supérieure ou égale à 86%. Nous n'avons pas observé une différence significative entre la viabilité des hASC encapsulées dans l'alginate et celle encapsulées dans

l'HPMC-Si. Ces résultats nous confirment d'une part que nos 2 polymères sélectionnés pour l'encapsulation ne sont pas cytotoxiques, et d'autre part que la matrice des particules permet la diffusion des nutriments, de l'oxygène et du glucose indispensables au maintien de la viabilité des hASC encapsulées. Du fait que le pourcentage de viabilité est resté stable pendant la durée de l'étude, nous pouvons supposer que les hASC présenteraient une forte viabilité au-delà d'un mois après encapsulation. Bien que nos travaux aient été réalisés sur des particules d'alginate et d'HPMC-Si de grande taille (1 mm), nous n'avons pas détecté d'agglomération de cellules mortes, en particulier au centre des particules. Ainsi, les éléments indispensables à la survie des cellules encapsulées diffusent jusqu'au centre des particules d'alginate et d'HPMC-Si et la taille de 1 mm de diamètre ne constitue pas un facteur limitant la viabilité cellulaire. Par ailleurs, les différences des propriétés de diffusion entre les particules d'alginate et celles d'HPMC-Si, observées lors de la caractérisation des particules, n'ont à priori aucun impact sur la viabilité des hASC encapsulées. Ces résultats sont prometteurs pour le développement d'un système permettant la libération de facteurs thérapeutiques solubles par les hASC encapsulées après injection intra-articulaire.

La déréticulation des particules cellularisées est une étape indispensable pour l'estimation du nombre moyen d'hASC encapsulées. La déréticulation de l'alginate est facile à mettre en œuvre. L'incubation de ces particules cellularisées dans une solution de citrate de sodium a provoqué la rupture de l'hydrogel d'alginate en seulement 3 minutes. Cette observation confirme les travaux démontrant que l'alginate est instable (résorbable) en milieux physiologiques [191,192]. Dans le but de récupérer les hASC encapsulées, l'incubation des particules cellularisées d'HPMC-Si dans différentes solutions enzymatiques (telles que la cellulase et la collagénase, enzymes non synthétisées dans l'organisme humain) s'est avérée inefficace pour déréticuler le polymère (résultats non représentés). La déréticulation des particules d'HPMC-Si n'a pas été possible que par ultrasonication. Ce résultat confirme les travaux déjà réalisés au sein de l'unité de recherche démontrant que la silanisation de l'HPMC lui confère, *in vitro* et *in vivo*, une stabilité mécanique (très faible résorbabilité) jusqu'à 12 semaines après l'injection [291,323–325]. Contrairement à l'HPMC-Si, l'instabilité de l'alginate nous laisse imaginer qu'il ne permettrait pas l'encapsulation des CSM le plus longtemps possible ; limitant ainsi son utilisation pour une potentielle application en thérapie cellulaire de l'arthrose.

Le nombre moyen d'hASC a été estimé à  $7102 \pm 51$  cellules par particule d'alginate et  $5100 \pm 407$  cellules par particule d'HPMC-Si de 1 mm de diamètre, 24h après l'encapsulation. Ce nombre moyen est resté constant pendant les 4 semaines de l'étude, montrant ainsi une absence de prolifération des cellules dans l'alginate et l'HPMC-Si. Cette absence de prolifération est en adéquation avec la perte d'adhésion des CSM lorsqu'elles sont encapsulées dans l'alginate et l'HPMC-Si, comme démontré dans de nombreux travaux [325–327]. L'adhésion des CSM, de charge membranaire négative, à la matrice d'un hydrogel dépend de la charge de ce dernier. A contrario d'autres polymères, l'alginate et l'HPMC-Si, polymères anioniques, n'offrent pas un environnement favorable à l'adhésion (et donc à la prolifération) des CSM encapsulées. L'absence de la prolifération des CSM encapsulées ne représente aucun inconvénient pour une application en thérapie cellulaire dans la mesure où les cellules ne meurent pas. En effet, la prolifération des CSM encapsulées est indispensable seulement pour leur différenciation chondrogénique et, par conséquent, une utilisation en ingénierie tissulaire du cartilage [328,329].

Nous avons également observé que le nombre moyen d'hASC encapsulées dans une particule d'alginate est significativement plus important que celui dans une particule d'HPMC-Si de taille identique. En prenant en compte qu'une particule de taille moyenne de  $1 \mu\text{m}$  correspond à un volume théorique  $36 \mu\text{l}$ , elle ne peut renfermer que 7 200 hASC au maximum. Le rendement d'encapsulation (rapport du nombre de cellules comptées sur le nombre théorique) est alors de 97% pour l'alginate et 70% pour l'HPMC-Si. Cette différence pourrait être la conséquence d'une perte des hASC (lors de leur incorporation dans l'HPMC-Si pré-réticulé) ou bien d'une fuite des cellules à l'extérieur des gouttelettes d'HPMC-Si lors du protocole de dispersion huileuse qui dure environ 1h30. Cette dernière hypothèse semble la plus probable car, par comparaison à l'alginate dont la réticulation est quasiment instantanée, la réticulation partielle de l'HPMC-Si à température ambiante nécessite 40 minutes.

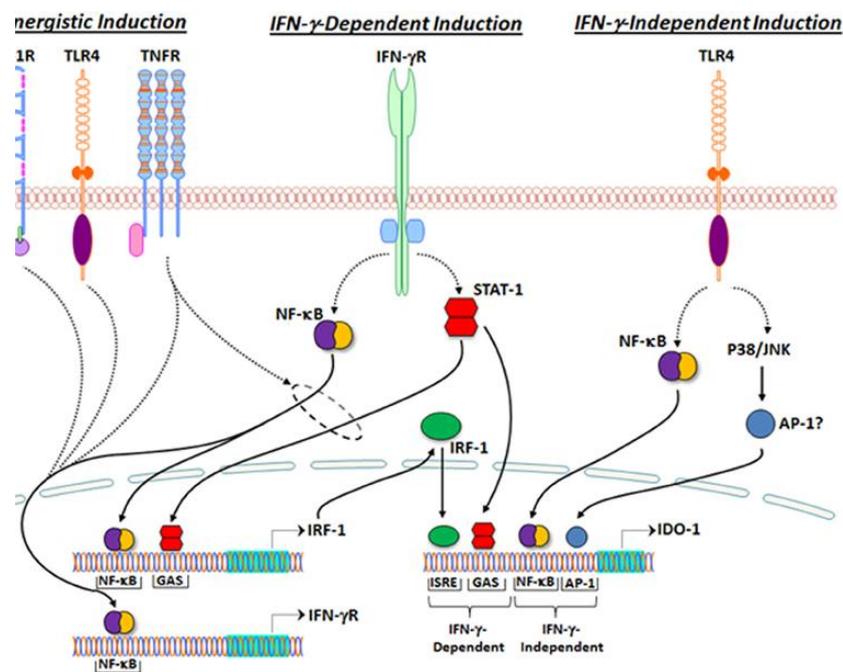
Le nombre de cellules encapsulées par particule n'est pas un critère essentiel et il devra être relativisé en fonction de la capacité des cellules à sécréter les molécules d'intérêt.

### III. Biofonctionnalité des hASC après encapsulation

Les CSM semblent efficaces dans la prévention de l'évolution de l'arthrose depuis qu'ont été découverts leurs effets anti-inflammatoires, anti-fibrotiques et chondroprotecteurs *in vitro* et sur des modèles animaux arthrosiques [135,137,138,152]. Cette efficacité thérapeutique des CSM est liée à leur capacité à sécréter des facteurs solubles lors de l'inflammation. La dernière partie de nos expérimentations a consisté à vérifier si l'encapsulation des CSM maintient leur capacité à être stimulées par des cytokines pro-inflammatoires puis à sécréter ces molécules thérapeutiques.

Dans ce contexte, nous avons étudié l'activité enzymatique d'IDO et la sécrétion de la PGE<sub>2</sub> et de l'HGF par les hASC encapsulées dans l'alginate et l'HPMC-Si.

En réponse aux stimuli pro-inflammatoires, les hASC surexpriment IDO. En effet, après sa diffusion à l'intérieur de particules, l'IFN- $\gamma$  se lierait à son récepteur à la surface des cellules. Cette liaison déclenche l'activation de 2 voies de signalisation [330–332] (Figure 31).



**Figure 31** : Mécanismes de synthèse d'IDO par les cellules impliquant différentes voies de signalisation. *Source [333].*

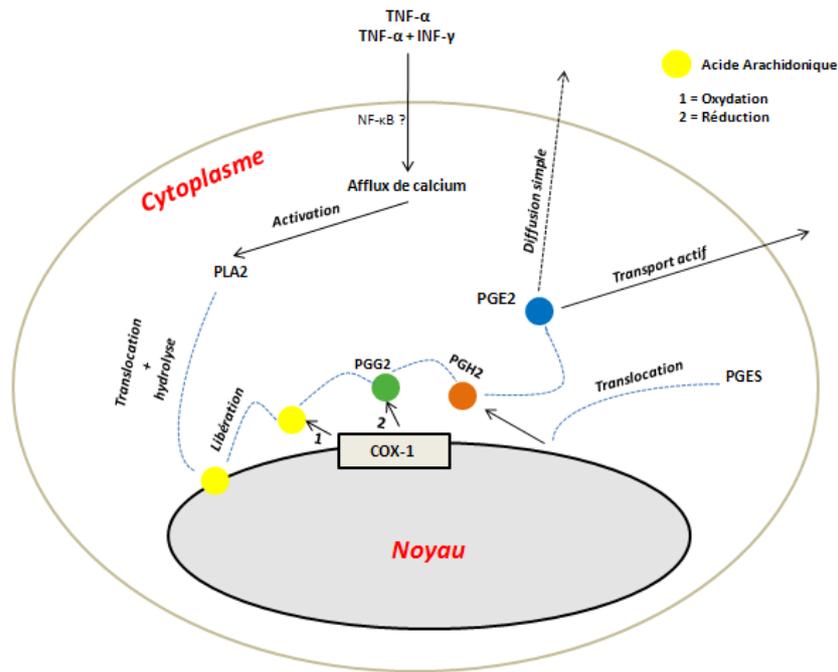
D'abord, le facteur de transcription STAT-1 (Signal Transducer and Activator of Transcription-1) subit une phosphorylation au niveau d'une tyrosine qui provoque sa dimérisation. Une fois dimérisé, STAT-1 est transloqué dans le noyau et se lie à la séquence GAS (l'un des 2 sites d'activation de l'IFN- $\gamma$ ) dans la région 5' du gène humain codant pour IDO : *INDO*. En parallèle, STAT-1 dimérisé et le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B) activent l'expression d'IRF-1 (Interferon Regulatory Factor-1) qui se lie à une ou plusieurs séquences ISRE (Interferon-Sensitive Response Element) dans la région 5' d'*INDO*. La liaison de STAT-1 et d'IRF-1 respectivement aux séquences GAS et ISRE stimule la transcription d'IDO par les hASC.

La transcription d'IDO peut être également indépendante de l'IFN- $\gamma$ . En effet il a été démontré que les polysaccharides (LPS) activent les voies de signalisation des MAP kinases, telles que p38 et JNK (c-Jun N-terminal Kinase), et NF- $\kappa$ B qui stimuleront la transcription d'IDO [334,335].

Après sa synthèse par les hASC (CSM2), IDO intervient dans le métabolisme du tryptophane en convertissant ce dernier en L-kynurénine. Ce métabolite du tryptophane provoque l'inhibition des lymphocytes T et des cellules NK. La L-kynurénine est également un agent pro-apoptotique de ces 2 types de cellules immunitaires [132,134,336].

Le mécanisme de synthèse de PGE<sub>2</sub> a été décrit pour différentes lignées cellulaires adultes tels que les chondrocytes, les synoviocytes et les adipocytes. Cependant, bien que plusieurs études ont démontré que les CSM2 sont capables de sécréter la PGE<sub>2</sub>, le mécanisme de synthèse n'est pas encore totalement élucidé [337–339].

Les stimuli inflammatoires des CSM provoqueraient, par un mécanisme pas encore totalement déterminé, un afflux de calcium dans leur cytoplasme qui engendrerait l'activation puis la translocation de PLA2 (Phospholipase A2) vers la membrane nucléaire (Figure 32).

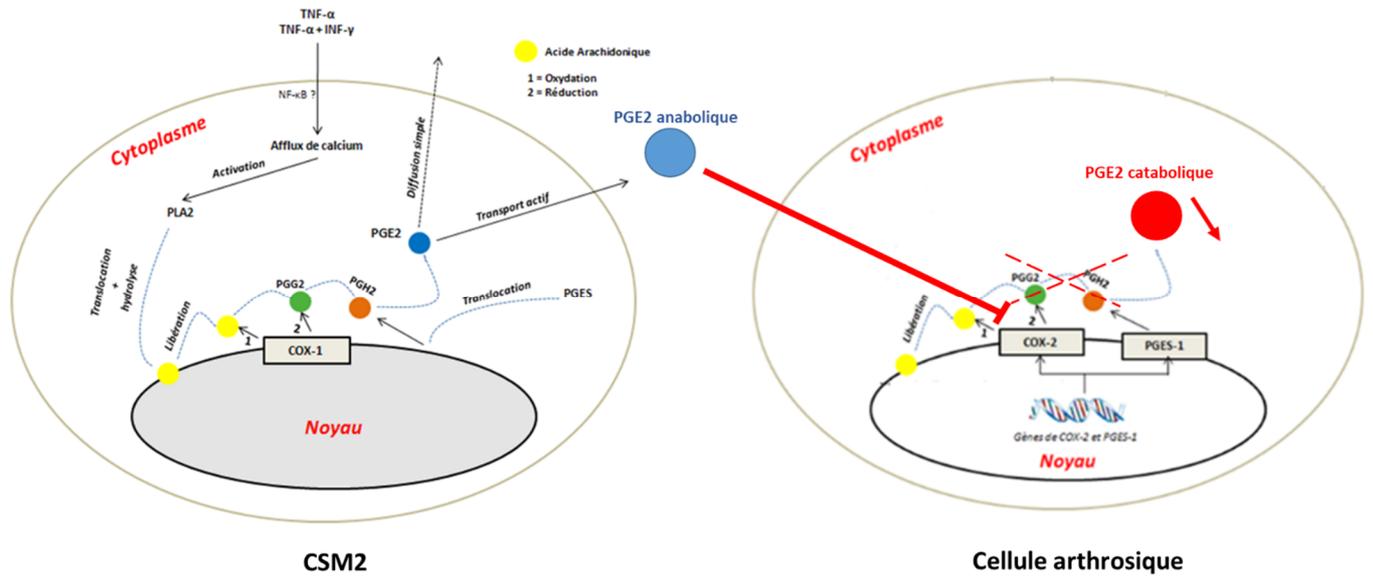


**Figure 32** : Mécanisme de la synthèse de la PGE<sub>2</sub> par COX-1 dans une CSM2.

L'acide arachidonique est alors libéré de la membrane nucléaire par hydrolyse des phospholipides membranaires sous l'action de la PLA2 [340]. La COX-1, localisée au niveau de la membrane nucléaire, transforme l'acide arachidonique en PGG<sub>2</sub> (Prostaglandine G<sub>2</sub>) puis en PGH<sub>2</sub> (Prostaglandine H<sub>2</sub>) [341]. COX-1 permet : (i) d'oxygéner l'acide arachidonique en lui rajoutant un groupement 15-hydroperoxy entraînant sa transformation en PGG<sub>2</sub> ; (ii) puis la réduction du groupement 15-hydroperoxy de PGG<sub>2</sub> pour le transformer en PGH<sub>2</sub> [342]. PGES (Prostaglandine E Synthase), transloquée vers le noyau, transforme PGH<sub>2</sub> en PGE<sub>2</sub>. Cette dernière est libérée des cellules par diffusion simple ou par transport actif via MRP4 (Multidrug Resistance Protein 4).

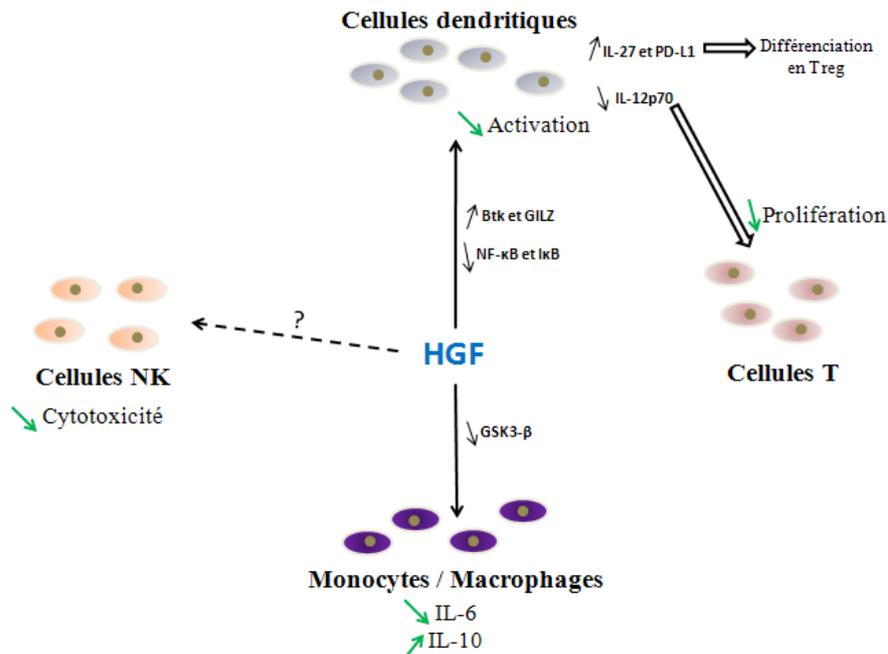
La prostaglandine E<sub>2</sub> sécrétée par les CSM est connue pour son action anti-inflammatoire. Elle inhibe l'activation, la prolifération et la cytotoxicité des cellules immunitaires : les cellules dendritiques [343,344], les cellules NK [117,122], les lymphocytes T [128,339] et les lymphocytes B [345,346]. Par ailleurs, la prostaglandine E<sub>2</sub> sécrétée par les CSM agit également sur les macrophages en activant leur programmation en phénotype anti-inflammatoire M2 qui secrètent IL-10 [120,121,347].

Dans un contexte arthrosique, le rôle anti-inflammatoire de la PGE<sub>2</sub> secrétée par les CSM a été mis en évidence par Manferdini *C. et al.* [135]. Les auteurs ont démontré que les hASC surexpriment la PGE<sub>2</sub> qui, paradoxalement, inhibe COX-2 (et donc la synthèse de la PGE<sub>2</sub> catabolique) au niveau des chondrocytes et des synoviocytes arthrosiques (Figure 33).



**Figure 33 :** Mécanisme d'action, proposé par Manferdini *et al.*, de la PGE<sub>2</sub> secrétée par les hASC sur la synthèse de la PGE<sub>2</sub> catabolique par une cellule arthrosique.

En agissant sur les cellules immunitaires, l'HGF joue un rôle anti-inflammatoire lors de l'inflammation (Figure 34).



**Figure 34** : Action anti-inflammatoire de l’HGF sur les cellules immunitaires lors de l’inflammation.

L’HGF inhibe l’inflammation en se liant à son récepteur (c-met) à la surface des monocytes et des macrophages, induisant l’inhibition de la GSK3-β. Cette inhibition se traduit par une diminution de la production d’IL-6 et une activation de l’expression d’IL-10 par ces cellules immunitaires [348,349].

L’HGF agit également sur les cellules dendritiques en induisant la synthèse de GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper) [350] qui bloque la voie NF-KB [351,352]. Le blocage de la voie NF-KB provoque l’inhibition de l’activation des cellules dendritiques [353,354]. Il a été également démontré que l’HGF entraîne une surexpression de PD-L1 (program-death ligand 1) et IL-27 par les cellules dendritiques qui favorisent leur différenciation en T reg [350,355]. De plus, l’HGF provoque une inhibition de l’expression de IL-12p70 par les cellules dendritiques, ce qui réduit la capacité des cellules T à proliférer [356,357].

Les travaux cités précédemment et d’autres études montrent que l’HGF agit indirectement sur les lymphocytes T par l’intermédiaire des cellules dendritiques [130,358] en favorisant leur différenciation en T reg et en inhibant la prolifération des lymphocytes T. L’effet de l’HGF sur les lymphocytes B et les cellules dendritiques lors de l’inflammation est également peu étudié.

En plus de sa fonction anti-inflammatoire, l'HGF possède également des propriétés anti-fibrotiques et anti-anti-hypertrophiques [359–361]. Les actions anti-inflammatoire, anti-fibrotique et anti-hypertrophique de l'HGF secrété par les CSM lors de l'arthrose a été démontré *in vitro* par Maumus M. *et al.* [138].

Nos résultats montrent que les cytokines pro-inflammatoires (le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ ) seraient capables de diffuser à l'intérieur des particules d'alginate et d'HPMC-Si pour stimuler les hASC. La stimulation des hASC encapsulées induirait une surexpression des gènes codant pour l'*IDO*, la *PGE<sub>2</sub>* et l'*HGF*. Le calcul des concentrations de l'*IDO*, la *PGE<sub>2</sub>* et l'*HGF* dans le surnageant cellulaire nous laisse supposer que ces 3 facteurs thérapeutiques seraient capables de diffuser de l'intérieur vers l'extérieur des particules. Nous ne pouvons pas écarter la probabilité que les concentrations de ces facteurs solubles à l'intérieur des particules soient différentes de celles calculées dans le surnageant cellulaire. Il est envisageable de vérifier cette hypothèse ultérieurement après une déréticulation des particules par exemple.

Par comparaison à l'alginate, le plus faible nombre d'hASC encapsulées dans l'HPMC-Si ne défavorise pas la capacité de ces cellules à sécréter les facteurs thérapeutiques. Au contraire, la concentration dans le surnageant cellulaire des 3 facteurs thérapeutiques étudiés est toujours plus importante lorsque les hASC sont encapsulées dans l'HPMC-Si. Cette différence semble confirmer l'hypothèse formulée après l'étude de la diffusion des dextrans dans les 2 types de particules. La cinétique de diffusion dans les particules d'HPMC-Si serait supérieure à celle dans les particules d'alginate. Ainsi, l'encapsulation des hASC dans l'HPMC-Si permettrait d'une part une réactivité plus rapide des hASC aux cytokines pro-inflammatoires, et d'autre part une sécrétion puis une libération plus rapide des facteurs solubles dans le surnageant.

## **Conclusions & perspectives**

Cette étude avait pour objectif d'encapsuler des CSM dans le but d'exploiter les propriétés thérapeutiques qui leur sont attribuées lors de l'arthrose. L'alginate, étant connu par sa résorbabilité en milieu physiologique, ne semble pas adapté pour l'encapsulation des CSM le plus longtemps possible pour une potentielle application en thérapie cellulaire de l'arthrose. Un polymère hémi-synthétique, l'HPMC-Si, a été développé au sein de notre unité de recherche. Dans ce projet, nous avons proposé de comparer l'HPMC-Si à l'alginate dans le but de déterminer le meilleur polymère pour une application en thérapie cellulaire.

Dans un premier temps, les particules d'alginate et d'HPMC-Si ont été caractérisées. Nous avons analysé et comparé la taille, les propriétés de diffusion et les propriétés mécaniques des particules fabriquées. Dans un second temps, les cellules ont été encapsulées dans les 2 matériaux puis caractérisées par une étude de leur viabilité et de leur prolifération pendant 1 mois. Enfin, une analyse du sécrétome des CSM encapsulées puis stimulées a permis de vérifier le maintien de leur biofonctionnalité après encapsulation.

Après avoir sélectionné les meilleures conditions opératoires de stérilisation du matériau, les particules d'alginate ont été obtenues par le procédé le plus couramment utilisé : la méthode d'extrusion à travers une aiguille dans une solution de chlorure de calcium. Les particules obtenues sont sphériques, reproductibles et monodispersées de taille. Cependant, la taille moyenne des particules obtenues (environ 2 mm de diamètre) est trop grande et inadaptée pour une éventuelle étude *in vivo* dans un modèle animal murin dont la taille de l'espace intra-articulaire est estimée à environ 400  $\mu\text{m}$ . Les différents paramètres influençant la taille des particules d'alginate ont été décrits. La variation de ces paramètres permet de réduire significativement la taille des particules d'alginate. Cependant, cette diminution ne serait pas suffisante pour atteindre la taille maximale d'environ 200  $\mu\text{m}$  nécessaire pour l'étude *in vivo*. Nous envisageons alors de nous intéresser à d'autres méthodes permettant l'obtention de particules d'alginate de plus petite taille telles que les techniques fluidiques.

Les propriétés chimiques de l'HPMC-Si, et notamment le mode de réticulation, ne sont pas compatibles avec la méthode d'obtention de particules par extrusion. Nous avons alors mis au point un procédé de fabrication de particules par extrusion puis dispersion de l'HPMC-Si dans de l'huile d'olive. Différents paramètres opératoires qui influencent la taille des particules ont été étudiés (la température, la vitesse et la durée d'agitation) dans le but de sélectionner les conditions opératoires permettant d'obtenir des particules adaptées à une étude *in vivo* sur des petits modèles animaux arthrosiques. En suivant ces conditions opératoires, les particules

d'HPMC-Si générées sont parfaitement sphériques et possèdent une taille moyenne inférieure à 100  $\mu\text{m}$ . En revanche, les particules présentent une importante polydispersité de taille qui pourrait engendrer des problèmes de reproductibilité. Nous envisageons alors de modifier la méthode de dispersion huileuse en utilisant des émulsifiants non cytotoxiques ou de nous intéresser également aux méthodes fluidiques par exemple. Des résultats préliminaires de Pierre-Gabriel Pinta et Fabien Nativel nous ont montré que la millifluidique est adaptée pour l'encapsulation des hASC dans l'HPMC-Si (résultats non représentés). Les particules fabriquées par ce procédé sont sphériques, reproductibles et présentent une taille inférieure à 200  $\mu\text{m}$  monodisperse.

Lors de l'étude de caractérisation des particules, les tests de diffusion à l'intérieure des particules des différents dextrans-FITC nous ont révélé que la matrice des 2 types de particules permettrait la diffusion (i) des éléments nécessaires à la survie et à la stimulation des CSM encapsulées, (ii) mais aussi des facteurs solubles produits par les CSM stimulées. Par ailleurs, la cinétique de diffusion des dextrans-FITC dans les particules d'HPMC-Si est plus rapide que celle dans l'alginate. Cette observation nous laisse suggérer que les CSM encapsulées dans l'HPMC-Si seraient plus réactives aux stimuli pro-inflammatoires que celles encapsulées dans l'alginate. Les tests de contraintes mécaniques appliquées aux 2 types de particules nous ont permis d'étudier leur rigidité et leur viscoélasticité. Cette étude a mis en évidence des différences entre les 2 types de particules. Ainsi, nous avons remarqué qu'après la déformation des 2 types de particules, celles d'HPMC-Si retrouvent leur taille et leur forme initiales plus rapidement que les particules d'alginate. Cette observation nous suggère que les particules d'HPMC-Si posséderaient une relaxation plus rapide que les particules d'alginate pendant et après l'injection intra-articulaire. Par conséquent, nous pouvons espérer que les cellules encapsulées dans l'HPMC-Si subiraient moins longtemps les contraintes mécaniques pendant et après l'injection intra-articulaire et présenteraient alors une meilleure viabilité que celles encapsulées dans l'alginate. L'ensemble de ces différences observées lors de l'étude de caractérisation des particules nous permettent de supposer que l'HPMC-Si serait un meilleur candidat que l'alginate pour l'encapsulation des CSM dans un projet en rapport avec la thérapie cellulaire de l'arthrose.

Les cellules d'intérêt, les hASC, ont été encapsulées dans l'alginate et l'HPMC-Si. Nous avons observé une viabilité des cellules dans les 2 matériaux proche de 90% à 1 mois après encapsulation. Ainsi, l'encapsulation des hASC au sein de l'alginate et de l'HPMC-Si permet de préserver leur viabilité. Ce résultat confirme que les propriétés de diffusion des particules d'alginate et d'HPMC-Si sont compatibles avec le maintien de la viabilité des hASC encapsulées. Cette observation confirme également que les biomatériaux ne sont pas cytotoxiques en accord avec les travaux antérieurs. Nous avons également vérifié que les hASC ne prolifèrent pas au sein de l'alginate et de l'HPMC-Si après encapsulation. En revanche, nous avons noté que le rendement d'encapsulation est meilleur dans l'alginate que l'HPMC-Si. Ce résultat est un autre critère qui nous pousse à améliorer la méthode d'encapsulation des hASC dans l'HPMC-Si dans le but d'augmenter le rendement et l'efficacité d'encapsulation.

En dernier lieu, nous nous sommes intéressés à la capacité des hASC encapsulées à sécréter 3 facteurs thérapeutiques dans un contexte pro-inflammatoire. Nos résultats nous montrent clairement que les hASC, encapsulées et stimulées avec des cytokines pro-inflammatoires, conservent leur capacité à sécréter IDO, PGE<sub>2</sub> et HGF. Ce résultat confirme également que les propriétés de diffusion des particules d'alginate et d'HPMC-Si sont également compatibles à la fois avec la diffusion à l'intérieur des particules des cytokines pro-inflammatoires qui stimuleront les CSM encapsulées, mais aussi avec la diffusion à l'extérieur des particules des 3 facteurs thérapeutiques secrétées par les hASC stimulées. Nous avons aussi remarqué que la concentration des facteurs solubles dans le surnageant est significativement plus importante lorsque les hASC ont été encapsulées dans l'HPMC-Si que lorsqu'elles ont été encapsulées dans l'alginate. Cette observation confirme que les cellules encapsulées dans l'HPMC-Si sont plus réactives que celles encapsulées dans l'alginate.

Pour les perspectives, une optimisation de la taille des particules est nécessaire avant de commencer la partie *in vivo* du projet. Cette optimisation de la taille des particules requiert la mise en œuvre d'autres méthodes d'encapsulation telle que la millifluidique. Ces méthodes devront permettre la fabrication de particules reproductibles, monodisperses et de taille adaptée aux modèles animaux envisagés (moins de 200 et de 500 µm de diamètre, respectivement pour la souris et le chien).

Quant à la partie *in vivo* du projet, afin d'évaluer la fonctionnalité de notre stratégie dans un modèle animal arthrosique, les CSM encapsulées seraient injectées dans le site intra-articulaire

de modèles murins d'arthrose. L'arthrose pourrait être induite mécaniquement, par la déstabilisation du ménisque interne ou enzymatiquement par un traitement à la collagénase chez les souris humanisées, par exemple. Cette partie du projet nous permettrait de répondre à un certain nombre de questions notamment à propos du nombre de particules nécessaire à injecter pour observer un effet thérapeutique et la détermination du stade arthrosique optimal pendant lequel les CSM encapsulées seront injectées. Cette partie du projet nous permettrait également d'analyser le devenir (stabilité), *in vivo*, des particules injectées. Le potentiel thérapeutique des CSM encapsulées pourrait aussi être évalué sur un modèle d'arthrose chez le chien, ce qui permettrait d'examiner la pertinence clinique de notre concept dans un modèle grand animal. Les effets des CSM encapsulées pour réduire l'arthrose dans ces 2 modèles animaux pourraient être évalués selon l'échelle OARSI par classement de coupes histologiques de genoux traités et non traités. L'influence des CSM encapsulées sur l'inflammation associée à l'arthrose pourrait être étudiée en mesurant l'épaississement synovial et les biomarqueurs dans le liquide synovial et la circulation systémique.

Notre objectif final et à long terme étant de traiter les patients arthrosiques par l'injection des CSM encapsulées, une dernière partie *in vitro* est envisageable dans ce projet après la validation des travaux *in vivo*. Cette partie consisterait à analyser plus en détail le sécrétome (Luminex) des CSM humaines encapsulées en réponse aux liquides synoviaux de patients arthrosiques (essai clinique validé « Arthrostem », NCT : 01879046). Ce travail est indispensable pour étudier le comportement et la biofonctionnalité des CSM humaines en réponse aux stimuli par des cytokines pro-inflammatoires à des concentrations caractéristiques de la physiopathologie de l'arthrose chez l'homme.

# **Bibliographie**

- [1] V.B. Kraus, F.J. Blanco, M. Englund, M.A. Karsdal, L.S. Lohmander, Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use, *Osteoarthritis Cartilage*. 23 (2015) 1233–1241. doi:10.1016/j.joca.2015.03.036.
- [2] Grange L., Rannou F., Bertin P., Taieb C., Osteoarthritis in France the cost of ambulatory care in 2010, *Osteoarthr. Soc. Int.* (2012) S163.
- [3] J. Auger, F. Berenbaum, *Le grand livre de l'arthrose*, 1ère édition, Eyrolles, 2016.
- [4] A.M. Valdes, E. Evangelou, H.J.M. Kerkhof, A. Tamm, S.A. Doherty, K. Kisand, A. Tamm, I. Kerna, A. Uitterlinden, A. Hofman, F. Rivadeneira, C. Cooper, E.M. Dennison, W. Zhang, K.R. Muir, J.P.A. Ioannidis, M. Wheeler, R.A. Maciewicz, J.B. van Meurs, N.K. Arden, T.D. Spector, M. Doherty, The GDF5 rs143383 polymorphism is associated with osteoarthritis of the knee with genome-wide statistical significance, *Ann. Rheum. Dis.* 70 (2011) 873–875. doi:10.1136/ard.2010.134155.
- [5] A.G. Day-Williams, L. Southam, K. Panoutsopoulou, N.W. Rayner, T. Esko, K. Estrada, H.T. Helgadottir, A. Hofman, T. Ingvarsson, H. Jonsson, A. Keis, H.J.M. Kerkhof, G. Thorleifsson, N.K. Arden, A. Carr, K. Chapman, P. Deloukas, J. Loughlin, A. McCaskie, W.E.R. Ollier, S.H. Ralston, T.D. Spector, G.A. Wallis, J.M. Wilkinson, N. Aslam, F. Birell, I. Carluke, J. Joseph, A. Rai, M. Reed, K. Walker, arcOGEN Consortium, S.A. Doherty, I. Jonsdottir, R.A. Maciewicz, K.R. Muir, A. Metspalu, F. Rivadeneira, K. Stefansson, U. Styrkarsdottir, A.G. Uitterlinden, J.B.J. van Meurs, W. Zhang, A.M. Valdes, M. Doherty, E. Zeggini, A variant in MCF2L is associated with osteoarthritis, *Am. J. Hum. Genet.* 89 (2011) 446–450. doi:10.1016/j.ajhg.2011.08.001.
- [6] F.E. Watt, Hand osteoarthritis, menopause and menopausal hormone therapy, *Maturitas*. 83 (2016) 13–18. doi:10.1016/j.maturitas.2015.09.007.
- [7] W.J. Krause, W.J. Krause, *Krause's essential human histology for medical students*, Universal Publishers, Boca Raton, 2005.
- [8] J.R. Ralphs, M. Benjamin, The joint capsule: structure, composition, ageing and disease, *J. Anat.* 184 ( Pt 3) (1994) 503–509.
- [9] Schwartz S., Cooper N., Synovial Membrane Punch Biopsy, *Arch Intern Med.*, 1961.
- [10] Smith M.D, The Normal Synovium, *Open Rheumatol J.* (2011) 100–106.
- [11] T. Iwanaga, M. Shikichi, H. Kitamura, H. Yanase, K. Nozawa-Inoue, Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint, *Arch. Histol. Cytol.* 63 (2000) 17–31.
- [12] P. Courtney, M. Doherty, Joint aspiration and injection and synovial fluid analysis, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 23 (2009) 161–192. doi:10.1016/j.berh.2009.01.003.
- [13] S.R. Brannan, D.A. Jerrard, Synovial fluid analysis, *J. Emerg. Med.* 30 (2006) 331–339. doi:10.1016/j.jemermed.2005.05.029.
- [14] J.A. Buckwalter, H.J. Mankin, A.J. Grodzinsky, Articular cartilage and osteoarthritis, *Instr. Course Lect.* 54 (2005) 465–480.
- [15] A.J. Sophia Fox, A. Bedi, S.A. Rodeo, The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function, *Sports Health*. 1 (2009) 461–468. doi:10.1177/1941738109350438.
- [16] D. Heinegård, Proteoglycans and more--from molecules to biology, *Int. J. Exp. Pathol.* 90 (2009) 575–586. doi:10.1111/j.1365-2613.2009.00695.x.
- [17] D.J. Responde, R.M. Natoli, K.A. Athanasiou, Collagens of articular cartilage: structure, function, and importance in tissue engineering, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 35 (2007) 363–411.
- [18] H. Muir, The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules, *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 17 (1995) 1039–1048. doi:10.1002/bies.950171208.
- [19] C. Gentili, R. Cancedda, Cartilage and bone extracellular matrix, *Curr. Pharm. Des.* 15 (2009) 1334–1348.
- [20] A.J. Sophia Fox, A. Bedi, S.A. Rodeo, The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function, *Sports Health*. 1 (2009) 461–468. doi:10.1177/1941738109350438.
- [21] Buckwalter J.A, Lotz M., Stoltz J.F, Osteoarthritis, Inflammation and Degradation: A Continuum, 2007.

- [22] T. Aigner, A. Sachse, P.M. Gebhard, H.I. Roach, Osteoarthritis: pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 128–149. doi:10.1016/j.addr.2006.01.020.
- [23] T. Aigner, Y. Zhu, H.H. Chansky, F.A. Matsen, W.J. Maloney, L.J. Sandell, Reexpression of type IIA procollagen by adult articular chondrocytes in osteoarthritic cartilage, *Arthritis Rheum.* 42 (1999) 1443–1450. doi:10.1002/1529-0131(199907)42:7<1443::AID-ANR18>3.0.CO;2-A.
- [24] F.A. Wollheim, Early stages of osteoarthritis: the search for sensitive predictors, *Ann. Rheum. Dis.* 62 (2003) 1031–1032.
- [25] L. Lippiello, D. Hall, H.J. Mankin, Collagen synthesis in normal and osteoarthritic human cartilage, *J. Clin. Invest.* 59 (1977) 593–600. doi:10.1172/JCI108676.
- [26] H.A. Kim, F.J. Blanco, Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage, *Curr. Drug Targets.* 8 (2007) 333–345.
- [27] S.B. Abramson, Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis, *Arthritis Res. Ther.* 10 Suppl 2 (2008) S2. doi:10.1186/ar2463.
- [28] S. Krasnokutsky, M. Attur, G. Palmer, J. Samuels, S.B. Abramson, Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis, *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 16 Suppl 3 (2008) S1-3. doi:10.1016/j.joca.2008.06.025.
- [29] M.J. Benito, D.J. Veale, O. FitzGerald, W.B. van den Berg, B. Bresnihan, Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 64 (2005) 1263–1267. doi:10.1136/ard.2004.025270.
- [30] S.R. Goldring, M.B. Goldring, The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis, *Clin. Orthop.* (2004) S27-36.
- [31] D. Lajeunesse, The role of bone in the treatment of osteoarthritis, *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 12 Suppl A (2004) S34-38.
- [32] J. Martel-Pelletier, J.-P. Pelletier, New insights into the major pathophysiological processes responsible for the development of osteoarthritis, *Semin. Arthritis Rheum.* 34 (2005) 6–8.
- [33] R.F. Loeser, Aging cartilage and osteoarthritis--what's the link?, *Sci. Aging Knowl. Environ. SAGE KE.* 2004 (2004) pe31. doi:10.1126/sageke.2004.29.pe31.
- [34] M.B. Goldring, S.R. Goldring, Osteoarthritis, *J. Cell. Physiol.* 213 (2007) 626–634. doi:10.1002/jcp.21258.
- [35] A.R. Amin, M. Dave, M. Attur, S.B. Abramson, COX-2, NO, and cartilage damage and repair, *Curr. Rheumatol. Rep.* 2 (2000) 447–453.
- [36] J.Y. Park, M.H. Pillinger, S.B. Abramson, Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases, *Clin. Immunol. Orlando Fla.* 119 (2006) 229–240. doi:10.1016/j.clim.2006.01.016.
- [37] M.H. Pillinger, P.B. Rosenthal, S.N. Tolani, B. Apsel, V. Dinsell, J. Greenberg, E.S.L. Chan, P.F. Gomez, S.B. Abramson, Cyclooxygenase-2-derived E prostaglandins down-regulate matrix metalloproteinase-1 expression in fibroblast-like synoviocytes via inhibition of extracellular signal-regulated kinase activation, *J. Immunol. Baltim. Md* 171 (2003) 6080–6089.
- [38] M. Attur, H.E. Al-Mussawir, J. Patel, A. Kitay, M. Dave, G. Palmer, M.H. Pillinger, S.B. Abramson, Prostaglandin E2 exerts catabolic effects in osteoarthritis cartilage: evidence for signaling via the EP4 receptor, *J. Immunol. Baltim. Md* 181 (2008) 5082–5088.
- [39] K. Notoya, D.V. Jovanovic, P. Reboul, J. Martel-Pelletier, F. Mineau, J.P. Pelletier, The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2, *J. Immunol. Baltim. Md* 165 (2000) 3402–3410.
- [40] G.M. Keserü, B. Volk, G.T. Balogh, Cytochrome P450 catalyzed nitric oxide synthesis: a theoretical study, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 17 (2000) 759–767. doi:10.1080/07391102.2000.10506565.
- [41] M. Lotz, The role of nitric oxide in articular cartilage damage, *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 25 (1999) 269–282.

- [42] E. Toussiro, G. Streit, D. Wendling, The contribution of adipose tissue and adipokines to inflammation in joint diseases, *Curr. Med. Chem.* 14 (2007) 1095–1100.
- [43] Kennedy S., Moran M., Pharmacological treatment of osteoarthritis of the hip and knee, *BC Med. J.* (2010) 404–409.
- [44] W. Zhang, M. Doherty, B.F. Leeb, L. Alekseeva, N.K. Arden, J.W. Bijlsma, F. Dinçer, K. Dziedzic, H.J. Häuselmann, G. Herrero-Beaumont, P. Kaklamanis, S. Lohmander, E. Maheu, E. Martín-Mola, K. Pavelka, L. Punzi, S. Reiter, J. Sautner, J. Smolen, G. Verbruggen, I. Zimmermann-Górska, EULAR evidence based recommendations for the management of hand osteoarthritis: report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT), *Ann. Rheum. Dis.* 66 (2007) 377–388. doi:10.1136/ard.2006.062091.
- [45] W. Zhang, R.W. Moskowitz, G. Nuki, S. Abramson, R.D. Altman, N. Arden, S. Bierma-Zeinstra, K.D. Brandt, P. Croft, M. Doherty, M. Dougados, M. Hochberg, D.J. Hunter, K. Kwok, L.S. Lohmander, P. Tugwell, OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines, *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 16 (2008) 137–162. doi:10.1016/j.joca.2007.12.013.
- [46] M.C. Hochberg, R.D. Altman, K.T. April, M. Benkhalti, G. Guyatt, J. McGowan, T. Towheed, V. Welch, G. Wells, P. Tugwell, American College of Rheumatology, American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee, *Arthritis Care Res.* 64 (2012) 465–474.
- [47] H. Bliddal, A.R. Leeds, L. Stigsgaard, A. Astrup, R. Christensen, Weight loss as treatment for knee osteoarthritis symptoms in obese patients: 1-year results from a randomised controlled trial, *Ann. Rheum. Dis.* 70 (2011) 1798–1803. doi:10.1136/ard.2010.142018.
- [48] R. Forestier, H. Desfour, J.-M. Tessier, A. Françon, A.M. Foote, C. Genty, C. Rolland, C.-F. Roques, J.-L. Bosson, Spa therapy in the treatment of knee osteoarthritis: a large randomised multicentre trial, *Ann. Rheum. Dis.* 69 (2010) 660–665. doi:10.1136/ard.2009.113209.
- [49] R. Forestier, F.B. Erol Forestier, A. Francon, Spa therapy and knee osteoarthritis: A systematic review, *Ann. Phys. Rehabil. Med.* 59 (2016) 216–226. doi:10.1016/j.rehab.2016.01.010.
- [50] K.L. Bennell, R.S. Hinman, A review of the clinical evidence for exercise in osteoarthritis of the hip and knee, *J. Sci. Med. Sport Sports Med. Aust.* 14 (2011) 4–9. doi:10.1016/j.jsams.2010.08.002.
- [51] Wainwright TW, Immins T, Middleton RG, A cycling and education programme for the treatment of hip osteoarthritis: a quality improvement study, *Int. J. Orthop. Trauma Nurs.* (2016).
- [52] M. van Laar, J.V. Pergolizzi, H.-U. Mellinghoff, I.M. Merchante, S. Nalamachu, J. O'Brien, S. Perrot, R.B. Raffa, Pain treatment in arthritis-related pain: beyond NSAIDs, *Open Rheumatol. J.* 6 (2012) 320–330. doi:10.2174/1874312901206010320.
- [53] Lozada CJ., Treatment of osteoarthritis., *Kelleys Textb. Rheumatol.* (2013) 1646–1659.
- [54] J. Regula, E. Butruk, C.P.M. Dekkers, S.Y. de Boer, D. Raps, L. Simon, A. Terjung, K.B. Thomas, R. Lühmann, R. Fischer, Prevention of NSAID-associated gastrointestinal lesions: a comparison study pantoprazole versus omeprazole, *Am. J. Gastroenterol.* 101 (2006) 1747–1755. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00686.x.
- [55] H.R. Barthel, D. Haselwood, S. Longley, M.S. Gold, R.D. Altman, Randomized controlled trial of diclofenac sodium gel in knee osteoarthritis, *Semin. Arthritis Rheum.* 39 (2009) 203–212. doi:10.1016/j.semarthrit.2009.09.002.
- [56] J. Rovenský, D. Miceková, Z. Gubzová, R. Fimmers, G. Lenhard, U. Vögtle-Junkert, F. Schreyger, Treatment of knee osteoarthritis with a topical non-steroidal antiinflammatory drug. Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study on the efficacy and safety of a 5% ibuprofen cream, *Drugs Exp. Clin. Res.* 27 (2001) 209–221.
- [57] S. Stanos, Osteoarthritis guidelines: a progressive role for topical NSAIDs, *J. Am. Osteopath. Assoc.* 113 (2013) 123–127.
- [58] D. Yocum, R. Fleischmann, P. Dalgin, J. Caldwell, D. Hall, P. Roszko, Safety and efficacy of meloxicam in the treatment of osteoarthritis: a 12-week, double-blind, multiple-dose, placebo-

- controlled trial. The Meloxicam Osteoarthritis Investigators, *Arch. Intern. Med.* 160 (2000) 2947–2954.
- [59] R.J. Stefanich, Intraarticular corticosteroids in treatment of osteoarthritis, *Orthop. Rev.* 15 (1986) 65–71.
- [60] E. Ayhan, H. Kesmezacar, I. Akgun, Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis, *World J. Orthop.* 5 (2014) 351–361. doi:10.5312/wjo.v5.i3.351.
- [61] D.S. Jevsevar, G.A. Brown, D.L. Jones, E.G. Matzkin, P.A. Manner, P. Mooar, J.T. Schousboe, S. Stovitz, J.O. Sanders, K.J. Bozic, M.J. Goldberg, W.R. Martin, D.S. Cummins, P. Donnelly, A. Woznica, L. Gross, American Academy of Orthopaedic Surgeons, The American Academy of Orthopaedic Surgeons evidence-based guideline on: treatment of osteoarthritis of the knee, 2nd edition, *J. Bone Joint Surg. Am.* 95 (2013) 1885–1886.
- [62] N. Bellamy, J. Campbell, V. Robinson, T. Gee, R. Bourne, G. Wells, Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee, *Cochrane Database Syst. Rev.* (2006) CD005328. doi:10.1002/14651858.CD005328.pub2.
- [63] P. Jüni, R. Hari, A.W.S. Rutjes, R. Fischer, M.G. Silleta, S. Reichenbach, B.R. da Costa, Intra-articular corticosteroid for knee osteoarthritis, *Cochrane Database Syst. Rev.* 10 (2015) CD005328. doi:10.1002/14651858.CD005328.pub3.
- [64] K. Pavelká, J. Gatterová, M. Olejarová, S. Machacek, G. Giacobelli, L.C. Rovati, Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study, *Arch. Intern. Med.* 162 (2002) 2113–2123.
- [65] T.E. McAlindon, M.P. LaValley, J.P. Gulin, D.T. Felson, Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis, *JAMA.* 283 (2000) 1469–1475.
- [66] D.O. Clegg, D.J. Reda, C.L. Harris, M.A. Klein, J.R. O’Dell, M.M. Hooper, J.D. Bradley, C.O. Bingham, M.H. Weisman, C.G. Jackson, N.E. Lane, J.J. Cush, L.W. Moreland, H.R. Schumacher, C.V. Oddis, F. Wolfe, J.A. Molitor, D.E. Yocum, T.J. Schnitzer, D.E. Furst, A.D. Sawitzke, H. Shi, K.D. Brandt, R.W. Moskowitz, H.J. Williams, Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis, *N. Engl. J. Med.* 354 (2006) 795–808. doi:10.1056/NEJMoa052771.
- [67] S. Wandel, P. Jüni, B. Tendal, E. Nüesch, P.M. Villiger, N.J. Welton, S. Reichenbach, S. Trelle, Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta-analysis, *BMJ.* 341 (2010) c4675.
- [68] R.D. Altman, C. Akermark, A.D. Beaulieu, T. Schnitzer, Durolane International Study Group, Efficacy and safety of a single intra-articular injection of non-animal stabilized hyaluronic acid (NASHA) in patients with osteoarthritis of the knee, *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 12 (2004) 642–649. doi:10.1016/j.joca.2004.04.010.
- [69] C.-T. Wang, J. Lin, C.-J. Chang, Y.-T. Lin, S.-M. Hou, Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. A meta-analysis of randomized controlled trials, *J. Bone Joint Surg. Am.* 86–A (2004) 538–545.
- [70] R.D. Altman, J.E. Rosen, D.A. Bloch, H.T. Hatoum, Safety and efficacy of retreatment with a bioengineered hyaluronate for painful osteoarthritis of the knee: results of the open-label Extension Study of the FLEXX Trial, *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 19 (2011) 1169–1175. doi:10.1016/j.joca.2011.07.001.
- [71] E.B. Hunziker, Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects, *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 10 (2002) 432–463. doi:10.1053/joca.2002.0801.
- [72] V. Bachhal, S.S. Sankhala, N. Jindal, M.S. Dhillon, High tibial osteotomy with a dynamic axial fixator: precision in achieving alignment, *J. Bone Joint Surg. Br.* 93 (2011) 897–903. doi:10.1302/0301-620X.93B7.26124.
- [73] R.W. Brouwer, S.M.A. Bierma-Zeinstra, T.M. van Raaij, J. a. N. Verhaar, Osteotomy for medial compartment arthritis of the knee using a closing wedge or an opening wedge controlled by a

- Puddu plate. A one-year randomised, controlled study, *J. Bone Joint Surg. Br.* 88 (2006) 1454–1459. doi:10.1302/0301-620X.88B11.17743.
- [74] R.L. Barrack, M.W. Wolfe, D.A. Waldman, M. Milicic, A.J. Bertot, L. Myers, Resurfacing of the patella in total knee arthroplasty. A prospective, randomized, double-blind study, *J. Bone Joint Surg. Am.* 79 (1997) 1121–1131.
- [75] O. Ethgen, O. Bruyère, F. Richy, C. Dardennes, J.-Y. Reginster, Health-related quality of life in total hip and total knee arthroplasty. A qualitative and systematic review of the literature, *J. Bone Joint Surg. Am.* 86–A (2004) 963–974.
- [76] S. Gidwani, A. Fairbank, The orthopaedic approach to managing osteoarthritis of the knee, *BMJ.* 329 (2004) 1220–1224. doi:10.1136/bmj.329.7476.1220.
- [77] Y. Takakura, Y. Tanaka, K. Sugimoto, K. Akiyama, S. Tamai, Long-term results of arthrodesis for osteoarthritis of the ankle, *Clin. Orthop.* (1999) 178–185.
- [78] C.K. Lee, N.A. Langrana, A review of spinal fusion for degenerative disc disease: need for alternative treatment approach of disc arthroplasty?, *Spine J. Off. J. North Am. Spine Soc.* 4 (2004) 173S–176S. doi:10.1016/j.spinee.2004.07.002.
- [79] J.J. Minguell, A. Erices, P. Conget, Mesenchymal stem cells, *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ. 226 (2001) 507–520.
- [80] Friedenstein AJ., Gorskaja JF., Kulagina NN., Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs., *Exp Hematol.* (1976) 267–274.
- [81] Caplan AI., Bruder SP., Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century, *Trends Mol. Med.* (2001) 259–264.
- [82] A.J. Friedenstein, K.V. Petrakova, A.I. Kurolesova, G.P. Frolova, Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues, *Transplantation.* 6 (1968) 230–247.
- [83] A.J. Friedenstein, I.I. Piatetzky-Shapiro, K.V. Petrakova, Osteogenesis in transplants of bone marrow cells, *J. Embryol. Exp. Morphol.* 16 (1966) 381–390.
- [84] C. Vinatier, D. Mrugala, C. Jorgensen, J. Guicheux, D. Noël, Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors, *Trends Biotechnol.* 27 (2009) 307–314. doi:10.1016/j.tibtech.2009.02.005.
- [85] H.E. Young, T.A. Steele, R.A. Bray, J. Hudson, J.A. Floyd, K. Hawkins, K. Thomas, T. Austin, C. Edwards, J. Cuzzourt, M. Duenzl, P.A. Lucas, A.C. Black, Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors, *Anat. Rec.* 264 (2001) 51–62.
- [86] Y. Hu, Q. Wang, L. Ma, G. Ma, X. Jiang, C. Zhao, [Identification and isolation of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas], *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 24 (2002) 45–49.
- [87] Abedin M., Tintut Y., Demer LL., Mesenchymal stem cells and the artery wall, *Cir Res.* (2004) 671–6.
- [88] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science.* 284 (1999) 143–147.
- [89] D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti, I. Jakoniuk, S.M. Anderson, B. Li, J. Pickel, R. McKay, B. Nadal-Ginard, D.M. Bodine, A. Leri, P. Anversa, Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium, *Nature.* 410 (2001) 701–705. doi:10.1038/35070587.
- [90] A. Dicker, K. Le Blanc, G. Aström, V. van Harmelen, C. Götherström, L. Blomqvist, P. Arner, M. Rydén, Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue, *Exp. Cell Res.* 308 (2005) 283–290. doi:10.1016/j.yexcr.2005.04.029.
- [91] N.C. Direkze, S.J. Forbes, M. Brittan, T. Hunt, R. Jeffery, S.L. Preston, R. Poulson, K. Hodivala-Dilke, M.R. Alison, N.A. Wright, Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice, *Stem Cells Dayt. Ohio.* 21 (2003) 514–520. doi:10.1634/stemcells.21-5-514.

- [92] M. Pittenger, P. Vanguri, D. Simonetti, R. Young, Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy, *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 2 (2002) 309–320.
- [93] M. Tomita, Y. Adachi, H. Yamada, K. Takahashi, K. Kiuchi, H. Oyaizu, K. Ikebukuro, H. Kaneda, M. Matsumura, S. Ikehara, Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina, *Stem Cells Dayt. Ohio.* 20 (2002) 279–283. doi:10.1634/stemcells.20-4-279.
- [94] S. Wislet-Gendebien, G. Hans, P. Leprince, J.-M. Rigo, G. Moonen, B. Rogister, Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype, *Stem Cells Dayt. Ohio.* 23 (2005) 392–402. doi:10.1634/stemcells.2004-0149.
- [95] L.-B. Chen, X.-B. Jiang, L. Yang, Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells, *World J. Gastroenterol.* 10 (2004) 3016–3020.
- [96] X. Long, M. Olszewski, W. Huang, M. Kletzel, Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells, *Stem Cells Dev.* 14 (2005) 65–69. doi:10.1089/scd.2005.14.65.
- [97] B.K. Hall, T. Miyake, All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development, *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 22 (2000) 138–147. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<138::AID-BIES5>3.0.CO;2-4.
- [98] A. Derfoul, G.L. Perkins, D.J. Hall, R.S. Tuan, Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes, *Stem Cells Dayt. Ohio.* 24 (2006) 1487–1495. doi:10.1634/stemcells.2005-0415.
- [99] B. Johnstone, M. Alini, M. Cucchiari, G.R. Dodge, D. Eglin, F. Guilak, H. Madry, A. Mata, R.L. Mauck, C.E. Semino, M.J. Stoddart, Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art, *Eur. Cell. Mater.* 25 (2013) 248–267.
- [100] C. Baugé, N. Girard, E. Lhuissier, C. Bazille, K. Boumediene, Regulation and Role of TGF $\beta$  Signaling Pathway in Aging and Osteoarthritis Joints, *Aging Dis.* 5 (2014) 394–405. doi:10.14336/AD.2014.0500394.
- [101] C.M. Leonard, H.M. Fuld, D.A. Frenz, S.A. Downie, J. Massagué, S.A. Newman, Role of transforming growth factor-beta in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF-beta and evidence for endogenous TGF-beta-like activity, *Dev. Biol.* 145 (1991) 99–109.
- [102] T. Kameda, C. Koike, K. Saitoh, A. Kuroiwa, H. Iba, Analysis of cartilage maturation using micromass cultures of primary chondrocytes, *Dev. Growth Differ.* 42 (2000) 229–236.
- [103] A. Haaijman, E.H. Burger, S.W. Goei, L. Nelles, P. ten Dijke, D. Huylebroeck, A.L. Bronckers, Correlation between ALK-6 (BMP-1B) distribution and responsiveness to osteogenic protein-1 (BMP-7) in embryonic mouse bone rudiments, *Growth Factors Chur Switz.* 17 (2000) 177–192.
- [104] X. Bai, Z. Xiao, Y. Pan, J. Hu, J. Pohl, J. Wen, L. Li, Cartilage-derived morphogenetic protein-1 promotes the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 (2004) 453–460. doi:10.1016/j.bbrc.2004.10.055.
- [105] M.F. Pittenger, B.J. Martin, Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics, *Circ. Res.* 95 (2004) 9–20. doi:10.1161/01.RES.0000135902.99383.6f.
- [106] M.K. Majumdar, M. Keane-Moore, D. Buyaner, W.B. Hardy, M.A. Moorman, K.R. McIntosh, J.D. Mosca, Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells, *J. Biomed. Sci.* 10 (2003) 228–241. doi:68710.
- [107] A. Keating, Mesenchymal stromal cells: new directions, *Cell Stem Cell.* 10 (2012) 709–716. doi:10.1016/j.stem.2012.05.015.
- [108] K. Le Blanc, D. Mougiakakos, Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 12 (2012) 383–396. doi:10.1038/nri3209.
- [109] D.J. Prockop, J.Y. Oh, Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20 (2012) 14–20. doi:10.1038/mt.2011.211.

- [110] W. Li, G. Ren, Y. Huang, J. Su, Y. Han, J. Li, X. Chen, K. Cao, Q. Chen, P. Shou, L. Zhang, Z.-R. Yuan, A.I. Roberts, S. Shi, A.D. Le, Y. Shi, Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses, *Cell Death Differ.* 19 (2012) 1505–1513. doi:10.1038/cdd.2012.26.
- [111] G. Ren, L. Zhang, X. Zhao, G. Xu, Y. Zhang, A.I. Roberts, R.C. Zhao, Y. Shi, Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide, *Cell Stem Cell.* 2 (2008) 141–150. doi:10.1016/j.stem.2007.11.014.
- [112] S. Glennie, I. Soeiro, P.J. Dyson, E.W.-F. Lam, F. Dazzi, Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells, *Blood.* 105 (2005) 2821–2827. doi:10.1182/blood-2004-09-3696.
- [113] A. Corcione, F. Benvenuto, E. Ferretti, D. Giunti, V. Cappiello, F. Cazzanti, M. Risso, F. Gualandi, G.L. Mancardi, V. Pistoia, A. Uccelli, Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions, *Blood.* 107 (2006) 367–372. doi:10.1182/blood-2005-07-2657.
- [114] G.M. Spaggiari, A. Capobianco, S. Becchetti, M.C. Mingari, L. Moretta, Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation, *Blood.* 107 (2006) 1484–1490. doi:10.1182/blood-2005-07-2775.
- [115] D.H. Kim, K.H. Yoo, K.S. Choi, J. Choi, S.-Y. Choi, S.-E. Yang, Y.-S. Yang, H.J. Im, K.H. Kim, H.L. Jung, K.W. Sung, H.H. Koo, Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell, *Cytokine.* 31 (2005) 119–126. doi:10.1016/j.cyto.2005.04.004.
- [116] J.A. Kode, S. Mukherjee, M.V. Joglekar, A.A. Hardikar, Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration, *Cytotherapy.* 11 (2009) 377–391. doi:10.1080/14653240903080367.
- [117] P.A. Sotiropoulou, S.A. Perez, A.D. Gritzapis, C.N. Baxevanis, M. Papamichail, Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells, *Stem Cells Dayt. Ohio.* 24 (2006) 74–85. doi:10.1634/stemcells.2004-0359.
- [118] F. Djouad, L.-M. Charbonnier, C. Bouffi, P. Louis-Pence, C. Bony, F. Apparailly, C. Cantos, C. Jorgensen, D. Noël, Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism, *Stem Cells Dayt. Ohio.* 25 (2007) 2025–2032. doi:10.1634/stemcells.2006-0548.
- [119] M. Maumus, C. Jorgensen, D. Noël, Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes, *Biochimie.* 95 (2013) 2229–2234. doi:10.1016/j.biochi.2013.04.017.
- [120] P. Luz-Crawford, C. Jorgensen, F. Djouad, Mesenchymal Stem Cells Direct the Immunological Fate of Macrophages, *Results Probl. Cell Differ.* 62 (2017) 61–72. doi:10.1007/978-3-319-54090-0\_4.
- [121] K. Németh, A. Leelahavanichkul, P.S.T. Yuen, B. Mayer, A. Parmelee, K. Doi, P.G. Robey, K. Leelahavanichkul, B.H. Koller, J.M. Brown, X. Hu, I. Jelinek, R.A. Star, E. Mezey, Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production, *Nat. Med.* 15 (2009) 42–49. doi:10.1038/nm.1905.
- [122] I. Rasmusson, O. Ringdén, B. Sundberg, K. Le Blanc, Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells, *Transplantation.* 76 (2003) 1208–1213. doi:10.1097/01.TP.0000082540.43730.80.
- [123] S. Aggarwal, M.F. Pittenger, Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses, *Blood.* 105 (2005) 1815–1822. doi:10.1182/blood-2004-04-1559.
- [124] X.-X. Jiang, Y. Zhang, B. Liu, S.-X. Zhang, Y. Wu, X.-D. Yu, N. Mao, Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells, *Blood.* 105 (2005) 4120–4126. doi:10.1182/blood-2004-02-0586.
- [125] A.J. Nauta, A.B. Kruisselbrink, E. Lurvink, R. Willemze, W.E. Fibbe, Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+ -derived and monocyte-derived dendritic cells, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 177 (2006) 2080–2087.

- [126] W. Zhang, W. Ge, C. Li, S. You, L. Liao, Q. Han, W. Deng, R.C.H. Zhao, Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells, *Stem Cells Dev.* 13 (2004) 263–271. doi:10.1089/154732804323099190.
- [127] R. Ramasamy, H. Fazekasova, E.W.-F. Lam, I. Soeiro, G. Lombardi, F. Dazzi, Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle, *Transplantation.* 83 (2007) 71–76. doi:10.1097/01.tp.0000244572.24780.54.
- [128] M.E. Bernardo, W.E. Fibbe, Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation, *Cell Stem Cell.* 13 (2013) 392–402. doi:10.1016/j.stem.2013.09.006.
- [129] S. Beyth, Z. Borovsky, D. Mevorach, M. Liebergall, Z. Gazit, H. Aslan, E. Galun, J. Rachmilewitz, Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness, *Blood.* 105 (2005) 2214–2219. doi:10.1182/blood-2004-07-2921.
- [130] M. Di Nicola, C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanese, P.D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti, A.M. Gianni, Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli, *Blood.* 99 (2002) 3838–3843.
- [131] W.T. Tse, J.D. Pendleton, W.M. Beyer, M.C. Egalka, E.C. Guinan, Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation, *Transplantation.* 75 (2003) 389–397. doi:10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9.
- [132] G. Frumento, R. Rotondo, M. Tonetti, G. Damonte, U. Benatti, G.B. Ferrara, Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 459–468.
- [133] U. Grohmann, F. Fallarino, P. Puccetti, Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO, *Trends Immunol.* 24 (2003) 242–248.
- [134] R. Meisel, A. Zibert, M. Laryea, U. Göbel, W. Däubener, D. Dilloo, Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation, *Blood.* 103 (2004) 4619–4621. doi:10.1182/blood-2003-11-3909.
- [135] C. Manferdini, M. Maumus, E. Gabusi, A. Piacentini, G. Filardo, J.-A. Peyrafitte, C. Jorgensen, P. Bourin, S. Fleury-Cappellesso, A. Facchini, D. Noël, G. Lisignoli, Adipose-derived mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin E<sub>2</sub>, *Arthritis Rheum.* 65 (2013) 1271–1281. doi:10.1002/art.37908.
- [136] T.L. Bonfield, M.T. Nolan Koloze, D.P. Lennon, A.I. Caplan, Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo, *J. Inflamm. Lond. Engl.* 7 (2010) 51. doi:10.1186/1476-9255-7-51.
- [137] G. Desando, C. Cavallo, F. Sartoni, L. Martini, A. Parrilli, F. Veronesi, M. Fini, R. Giardino, A. Facchini, B. Grigolo, Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model, *Arthritis Res. Ther.* 15 (2013) R22. doi:10.1186/ar4156.
- [138] M. Maumus, C. Manferdini, K. Toupet, J.-A. Peyrafitte, R. Ferreira, A. Facchini, E. Gabusi, P. Bourin, C. Jorgensen, G. Lisignoli, D. Noël, Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis, *Stem Cell Res.* 11 (2013) 834–844. doi:10.1016/j.scr.2013.05.008.
- [139] T. Inoue, H. Okada, T. Kobayashi, Y. Watanabe, Y. Kanno, J.B. Kopp, T. Nishida, M. Takigawa, M. Ueno, T. Nakamura, H. Suzuki, Hepatocyte growth factor counteracts transforming growth factor-beta1, through attenuation of connective tissue growth factor induction, and prevents renal fibrogenesis in 5/6 nephrectomized mice, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17 (2003) 268–270. doi:10.1096/fj.02-0442fje.
- [140] A. Barbero, S. Grogan, D. Schäfer, M. Heberer, P. Mainil-Varlet, I. Martin, Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity, *Osteoarthritis Cartilage.* 12 (2004) 476–484. doi:10.1016/j.joca.2004.02.010.
- [141] M.W. Kessler, D.A. Grande, Tissue engineering and cartilage, *Organogenesis.* 4 (2008) 28–32.
- [142] H. Nejadnik, J.H. Hui, E.P. Feng Choong, B.-C. Tai, E.H. Lee, Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study, *Am. J. Sports Med.* 38 (2010) 1110–1116. doi:10.1177/0363546509359067.

- [143] J. Michalek, R. Moster, L. Lukac, K. Proefrock, M. Petrasovic, J. Rybar, M. Capkova, A. Chaloupka, A. Darinskas, J. Michalek, J. Kristek, J. Travník, P. Jabandziev, M. Cibulka, M. Holec, M. Jurik, J. Skopalik, Z. Kristkova, Z. Dudasova, Autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells application in patients with osteoarthritis, *Cell Transplant.* (2015). doi:10.3727/096368915X686760.
- [144] J.I. Wolfstadt, B.J. Cole, D.J. Ogilvie-Harris, S. Viswanathan, J. Chahal, Current concepts: the role of mesenchymal stem cells in the management of knee osteoarthritis, *Sports Health.* 7 (2015) 38–44. doi:10.1177/1941738114529727.
- [145] K. Uth, D. Trifonov, Stem cell application for osteoarthritis in the knee joint: A minireview, *World J. Stem Cells.* 6 (2014) 629–636. doi:10.4252/wjsc.v6.i5.629.
- [146] C.J. Centeno, D. Busse, J. Kisiday, C. Keohan, M. Freeman, D. Karli, Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells, *Pain Physician.* 11 (2008) 343–353.
- [147] L. Orozco, A. Munar, R. Soler, M. Alberca, F. Soler, M. Huguet, J. Sentís, A. Sánchez, J. García-Sancho, Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study, *Transplantation.* 95 (2013) 1535–1541. doi:10.1097/TP.0b013e318291a2da.
- [148] Y.-M. Pers, L. Rackwitz, R. Ferreira, O. Pullig, C. Delfour, F. Barry, L. Sensebe, L. Casteilla, S. Fleury, P. Bourin, D. Noël, F. Canovas, C. Cyteval, G. Lisignoli, J. Schrauth, D. Haddad, S. Domergue, U. Noeth, C. Jorgensen, ADIPOA Consortium, Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial, *Stem Cells Transl. Med.* 5 (2016) 847–856. doi:10.5966/sctm.2015-0245.
- [149] N. Kim, S.-G. Cho, Clinical applications of mesenchymal stem cells, *Korean J. Intern. Med.* 28 (2013) 387–402. doi:10.3904/kjim.2013.28.4.387.
- [150] T. Squillaro, G. Peluso, U. Galderisi, Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update, *Cell Transplant.* 25 (2016) 829–848. doi:10.3727/096368915X689622.
- [151] B.A. Aguado, W. Mulyasmita, J. Su, K.J. Lampe, S.C. Heilshorn, Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers, *Tissue Eng. Part A.* 18 (2012) 806–815. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0391.
- [152] M. ter Huurne, R. Schelbergen, R. Blattes, A. Blom, W. de Munter, L.C. Grevers, J. Jeanson, D. Noël, L. Casteilla, C. Jorgensen, W. van den Berg, P.L.E.M. van Lent, Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* 64 (2012) 3604–3613. doi:10.1002/art.34626.
- [153] K. Toupet, M. Maumus, J.-A. Peyrafitte, P. Bourin, P.L.E.M. van Lent, R. Ferreira, B. Orsetti, N. Pirot, L. Casteilla, C. Jorgensen, D. Noël, Long-term detection of human adipose-derived mesenchymal stem cells after intraarticular injection in SCID mice, *Arthritis Rheum.* 65 (2013) 1786–1794. doi:10.1002/art.37960.
- [154] O. Detante, A. Moisan, J. Dimastromatteo, M.-J. Richard, L. Riou, E. Grillon, E. Barbier, M.-D. Desruet, F. De Fraipont, C. Segebarth, A. Jaillard, M. Hommel, C. Ghezzi, C. Remy, Intravenous administration of 99mTc-HMPAO-labeled human mesenchymal stem cells after stroke: in vivo imaging and biodistribution, *Cell Transplant.* 18 (2009) 1369–1379. doi:10.3727/096368909X474230.
- [155] R.M. Olabisi, Z.W. Lazard, C.L. Franco, M.A. Hall, S.K. Kwon, E.M. Sevick-Muraca, J.A. Hipp, A.R. Davis, E.A. Olmsted-Davis, J.L. West, Hydrogel microsphere encapsulation of a cell-based gene therapy system increases cell survival of injected cells, transgene expression, and bone volume in a model of heterotopic ossification, *Tissue Eng. Part A.* 16 (2010) 3727–3736. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0234.
- [156] W.C. Mak, B. Magne, K.Y. Cheung, D. Atanasova, M. Griffith, Thermo-rheological responsive microcapsules for time-dependent controlled release of human mesenchymal stromal cells, *Biomater. Sci.* (2017). doi:10.1039/c7bm00663b.
- [157] A. Blocki, S. Beyer, J.-Y. Dewavrin, A. Goralczyk, Y. Wang, P. Peh, M. Ng, S.S. Moonshi, S. Vuddagiri, M. Raghunath, E.C. Martinez, K.K. Bhakoo, Microcapsules engineered to support

- mesenchymal stem cell (MSC) survival and proliferation enable long-term retention of MSCs in infarcted myocardium, *Biomaterials*. 53 (2015) 12–24. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.02.075.
- [158] N. Attia, E. Santos, H. Abdelmouty, S. Arafa, N. Zohdy, R.M. Hernández, G. Orive, J.L. Pedraz, Behaviour and ultrastructure of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells immobilised in alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules, *J. Microencapsul.* 31 (2014) 579–589. doi:10.3109/02652048.2014.898706.
- [159] N. Landázuri, R.D. Levit, G. Joseph, J.M. Ortega-Legaspi, C.A. Flores, D. Weiss, A. Sambanis, C.J. Weber, S.A. Safley, W.R. Taylor, Alginate microencapsulation of human mesenchymal stem cells as a strategy to enhance paracrine-mediated vascular recovery after hindlimb ischaemia, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 10 (2016) 222–232. doi:10.1002/term.1680.
- [160] L. Penolazzi, E. Tavanti, R. Vecchiadini, E. Lambertini, F. Vesce, R. Gambari, S. Mazzitelli, F. Mancuso, G. Luca, C. Nastruzzi, R. Piva, Encapsulation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in alginate microbeads, *Tissue Eng. Part C Methods*. 16 (2010) 141–155. doi:10.1089/ten.TEC.2008.0582.
- [161] S.-F. Chong, J.H. Lee, A.N. Zelikin, F. Caruso, Tuning the permeability of polymer hydrogel capsules: an investigation of cross-linking density, membrane thickness, and cross-linkers, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids*. 27 (2011) 1724–1730. doi:10.1021/la104510e.
- [162] W.-C. Jeong, S.-H. Kim, S.-M. Yang, Photothermal control of membrane permeability of microcapsules for on-demand release, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 6 (2014) 826–832. doi:10.1021/am4037993.
- [163] F. Lim, A.M. Sun, Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas, *Science*. 210 (1980) 908–910.
- [164] K. Flégeau, R. Pace, H. Gautier, G. Rethore, J. Guicheux, C. Le Visage, P. Weiss, Toward the development of biomimetic injectable and macroporous biohydrogels for regenerative medicine, *Adv. Colloid Interface Sci.* 247 (2017) 589–609. doi:10.1016/j.cis.2017.07.012.
- [165] J.-M. Rabanel, X. Banquy, H. Zouaoui, M. Mokhtar, P. Hildgen, Progress technology in microencapsulation methods for cell therapy, *Biotechnol. Prog.* 25 (2009) 946–963. doi:10.1002/btpr.226.
- [166] G.A. Paredes Juárez, M. Spasojevic, M.M. Faas, P. de Vos, Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2 (2014) 26. doi:10.3389/fbioe.2014.00026.
- [167] J.J. Schmidt, J. Rowley, H.J. Kong, Hydrogels used for cell-based drug delivery, *J. Biomed. Mater. Res. A*. 87 (2008) 1113–1122. doi:10.1002/jbm.a.32287.
- [168] A. Bartkowiak, L. Canaple, I. Ceausoglu, N. Nurdin, A. Renken, L. Rindisbacher, C. Wandrey, B. Desvergne, D. Hunkeler, New multicomponent capsules for immunoisolation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 875 (1999) 135–145.
- [169] P. de Vos, M. Bucko, P. Gemeiner, M. Navrátil, J. Svitel, M. Faas, B.L. Strand, G. Skjak-Braek, Y.A. Morch, A. Vikartovská, I. Lacík, G. Kolláriková, G. Orive, D. Poncelet, J.L. Pedraz, M.B. Ansoerge-Schumacher, Multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnology, *Biomaterials*. 30 (2009) 2559–2570. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.01.014.
- [170] H.-F. Lu, E.D. Targonsky, M.B. Wheeler, Y.-L. Cheng, Thermally induced gelable polymer networks for living cell encapsulation, *Biotechnol. Bioeng.* 96 (2007) 146–155. doi:10.1002/bit.21121.
- [171] S. Cohen, M.C. Baño, L.G. Cima, H.R. Allcock, J.P. Vacanti, C.A. Vacanti, R. Langer, Design of synthetic polymeric structures for cell transplantation and tissue engineering, *Clin. Mater.* 13 (1993) 3–10.
- [172] M.C. Darnell, J.-Y. Sun, M. Mehta, C. Johnson, P.R. Arany, Z. Suo, D.J. Mooney, Performance and biocompatibility of extremely tough alginate/polyacrylamide hydrogels, *Biomaterials*. 34 (2013) 8042–8048. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.06.061.
- [173] R. Tiruvannamalai Annamalai, D.R. Mertz, E.L.H. Daley, J.P. Stegemann, Collagen Type II enhances chondrogenic differentiation in agarose-based modular microtissues, *Cytotherapy*. 18 (2016) 263–277. doi:10.1016/j.jcyt.2015.10.015.

- [174] A. Batorsky, J. Liao, A.W. Lund, G.E. Plopper, J.P. Stegemann, Encapsulation of adult human mesenchymal stem cells within collagen-agarose microenvironments, *Biotechnol. Bioeng.* 92 (2005) 492–500. doi:10.1002/bit.20614.
- [175] J.K. Wise, A.I. Alford, S.A. Goldstein, J.P. Stegemann, Comparison of uncultured marrow mononuclear cells and culture-expanded mesenchymal stem cells in 3D collagen-chitosan microbeads for orthopedic tissue engineering, *Tissue Eng. Part A.* 20 (2014) 210–224. doi:10.1089/ten.TEA.2013.0151.
- [176] H. Zhou, H.H.K. Xu, The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials.* 32 (2011) 7503–7513. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.06.045.
- [177] M. Endres, N. Wenda, H. Woehlecke, K. Neumann, J. Ringe, C. Erggelet, D. Lerche, C. Kaps, Microencapsulation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal progenitor cells from subchondral bone marrow in Ca-alginate for cell injection, *Acta Biomater.* 6 (2010) 436–444. doi:10.1016/j.actbio.2009.07.022.
- [178] D. Raghothaman, M.F. Leong, T.C. Lim, J.K.C. Toh, A.C.A. Wan, Z. Yang, E.H. Lee, Engineering cell matrix interactions in assembled polyelectrolyte fiber hydrogels for mesenchymal stem cell chondrogenesis, *Biomaterials.* 35 (2014) 2607–2616. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.12.008.
- [179] L. Wang, R.R. Rao, J.P. Stegemann, Delivery of mesenchymal stem cells in chitosan/collagen microbeads for orthopedic tissue repair, *Cells Tissues Organs.* 197 (2013) 333–343. doi:10.1159/000348359.
- [180] H. Naderi-Meshkin, K. Andreas, M.M. Matin, M. Sittinger, H.R. Bidkhorri, N. Ahmadiankia, A.R. Bahrami, J. Ringe, Chitosan-based injectable hydrogel as a promising in situ forming scaffold for cartilage tissue engineering, *Cell Biol. Int.* 38 (2014) 72–84. doi:10.1002/cbin.10181.
- [181] H.J. Lee, C. Yu, T. Chansakul, N.S. Hwang, S. Varghese, S.M. Yu, J.H. Elisseeff, Enhanced chondrogenesis of mesenchymal stem cells in collagen mimetic peptide-mediated microenvironment, *Tissue Eng. Part A.* 14 (2008) 1843–1851. doi:10.1089/ten.tea.2007.0204.
- [182] B.P. Chan, T.Y. Hui, M.Y. Wong, K.H.K. Yip, G.C.F. Chan, Mesenchymal stem cell-encapsulated collagen microspheres for bone tissue engineering, *Tissue Eng. Part C Methods.* 16 (2010) 225–235. doi:10.1089/ten.tec.2008.0709.
- [183] G. Karoubi, M.L. Ormiston, D.J. Stewart, D.W. Courtman, Single-cell hydrogel encapsulation for enhanced survival of human marrow stromal cells, *Biomaterials.* 30 (2009) 5445–5455. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.06.035.
- [184] C. Chung, J.A. Burdick, Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis, *Tissue Eng. Part A.* 15 (2009) 243–254. doi:10.1089/ten.tea.2008.0067.
- [185] A. Eddhahak, M. Zidi, Influence of viscoelastic properties of an hyaluronic acid-based hydrogel on viability of mesenchymal stem cells, *Biomed. Mater. Eng.* 26 (2015) 103–114. doi:10.3233/BME-151557.
- [186] D. Poncelet, Production of alginate beads by emulsification/internal gelation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 944 (2001) 74–82.
- [187] J.L. Drury, R.G. Dennis, D.J. Mooney, The tensile properties of alginate hydrogels, *Biomaterials.* 25 (2004) 3187–3199. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.10.002.
- [188] O. Smidsrød, G. Skjåk-Braek, Alginate as immobilization matrix for cells, *Trends Biotechnol.* 8 (1990) 71–78.
- [189] B. Thu, P. Bruheim, T. Espevik, O. Smidsrød, P. Soon-Shiong, G. Skjåk-Braek, Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation, *Biomaterials.* 17 (1996) 1031–1040.
- [190] Kühbeck D., Mayr J., Häring M., Hofmann M., Quignard F., Diaz DD., Evaluation of the nitroaldol reaction in the presence of metal ion-crosslinked alginates, *New J Chem.* (2015) 2306–2315.
- [191] D. Serp, E. Cantana, C. Heinzen, U. Von Stockar, I.W. Marison, Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization, *Biotechnol. Bioeng.* 70 (2000) 41–53.

- [192] H. Zhou, H.H.K. Xu, The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*. 32 (2011) 7503–7513. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.06.045.
- [193] D.A. Swann, Studies on the structure of hyaluronic acid. Characterization of the product formed when hyaluronic acid is treated with ascorbic acid, *Biochem. J.* 114 (1969) 819–825.
- [194] H. Oxlund, T.T. Andreassen, The roles of hyaluronic acid, collagen and elastin in the mechanical properties of connective tissues, *J. Anat.* 131 (1980) 611–620.
- [195] Burdick JA., Prestwich GD., Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications, in: *Adv. Mater.*, n.d.: pp. H41–H56.
- [196] C.B. Highley, G.D. Prestwich, J.A. Burdick, Recent advances in hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications, *Curr. Opin. Biotechnol.* 40 (2016) 35–40. doi:10.1016/j.copbio.2016.02.008.
- [197] S.A. Bencherif, A. Srinivasan, F. Horkay, J.O. Hollinger, K. Matyjaszewski, N.R. Washburn, Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties, *Biomaterials*. 29 (2008) 1739–1749. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.11.047.
- [198] S.K. Seidlits, Z.Z. Khaing, R.R. Petersen, J.D. Nickels, J.E. Vanscoy, J.B. Shear, C.E. Schmidt, The effects of hyaluronic acid hydrogels with tunable mechanical properties on neural progenitor cell differentiation, *Biomaterials*. 31 (2010) 3930–3940. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.125.
- [199] L. Bian, D.Y. Zhai, E. Tous, R. Rai, R.L. Mauck, J.A. Burdick, Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF- $\beta$ 3 from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels in vitro and in vivo, *Biomaterials*. 32 (2011) 6425–6434. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.033.
- [200] C. Chung, J.A. Burdick, Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis, *Tissue Eng. Part A*. 15 (2009) 243–254. doi:10.1089/ten.tea.2008.0067.
- [201] I.L. Kim, R.L. Mauck, J.A. Burdick, Hydrogel design for cartilage tissue engineering: a case study with hyaluronic acid, *Biomaterials*. 32 (2011) 8771–8782. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.08.073.
- [202] S. Khetan, M. Guvendiren, W.R. Legant, D.M. Cohen, C.S. Chen, J.A. Burdick, Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels, *Nat. Mater.* 12 (2013) 458–465. doi:10.1038/nmat3586.
- [203] X.T. Fu, S.M. Kim, Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications, *Mar. Drugs*. 8 (2010) 200–218. doi:10.3390/md8010200.
- [204] Lahaye M., Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry, *J. Appl. Phycol.* (2001) 173–184.
- [205] Lahaye M., Rochas C., Chemical structure and physico-chemical properties of agar, *Int. Workshop Gelidium*. 68 (1991) 137–148.
- [206] P. Aymard, D.R. Martin, K. Plucknett, T.J. Foster, A.H. Clark, I.T. Norton, Influence of thermal history on the structural and mechanical properties of agarose gels, *Biopolymers*. 59 (2001) 131–144. doi:10.1002/1097-0282(200109)59:3<131::AID-BIP1013>3.0.CO;2-8.
- [207] Narayanan J., Xiong JY., Liu XY., Determination of agarose gel pore size: absorbance measurements vis a vis other techniques, *J. Phys. Conf. Ser.* 28 (2006) 83–86.
- [208] W.-J. Chi, Y.-K. Chang, S.-K. Hong, Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94 (2012) 917–930. doi:10.1007/s00253-012-4023-2.
- [209] I. Younes, M. Rinaudo, Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications, *Mar. Drugs*. 13 (2015) 1133–1174. doi:10.3390/md13031133.
- [210] J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, R. Gurny, Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV*. 57 (2004) 35–52.
- [211] A.V. Il'ina, V.P. Varlamov, [Chitosan-based polyelectrolyte complexes: a review], *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 41 (2005) 9–16.

- [212] T. Freier, H.S. Koh, K. Kazazian, M.S. Shoichet, Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation, *Biomaterials*. 26 (2005) 5872–5878. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.033.
- [213] A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M.D. Buschmann, C.D. Hoemann, J.C. Leroux, B.L. Atkinson, F. Binette, A. Selmani, Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ, *Biomaterials*. 21 (2000) 2155–2161.
- [214] H. Chajra, C.F. Rousseau, D. Cortial, M.C. Ronzière, D. Herbage, F. Mallein-Gerin, A.M. Freyria, Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects, *Biomed. Mater. Eng.* 18 (2008) 533-45.
- [215] T. Xu, P. Molnar, C. Gregory, M. Das, T. Boland, J.J. Hickman, Electrophysiological characterization of embryonic hippocampal neurons cultured in a 3D collagen hydrogel, *Biomaterials*. 30 (2009) 4377–4383. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.047.
- [216] W. Lee, J.C. Debasitis, V.K. Lee, J.-H. Lee, K. Fischer, K. Edminster, J.-K. Park, S.-S. Yoo, Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication, *Biomaterials*. 30 (2009) 1587–1595. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.009.
- [217] H. Schoof, J. Apel, I. Heschel, G. Rau, Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges, *J. Biomed. Mater. Res.* 58 (2001) 352–357.
- [218] C.R. Lee, A.J. Grodzinsky, M. Spector, The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis, *Biomaterials*. 22 (2001) 3145–3154.
- [219] K.S. Weadock, E.J. Miller, E.L. Keuffel, M.G. Dunn, Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions, *J. Biomed. Mater. Res.* 32 (1996) 221–226. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199610)32:2<221::AID-JBM11>3.0.CO;2-M.
- [220] P.A. Smethurst, D.J. Onley, G.E. Jarvis, M.N. O’Connor, C.G. Knight, A.B. Herr, W.H. Ouwehand, R.W. Farndale, Structural basis for the platelet-collagen interaction: the smallest motif within collagen that recognizes and activates platelet Glycoprotein VI contains two glycine-proline-hydroxyproline triplets, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 1296–1304. doi:10.1074/jbc.M606479200.
- [221] J. Zhu, Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering, *Biomaterials*. 31 (2010) 4639–4656. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.02.044.
- [222] A.N. Buxton, J. Zhu, R. Marchant, J.L. West, J.U. Yoo, B. Johnstone, Design and characterization of poly(ethylene glycol) photopolymerizable semi-interpenetrating networks for chondrogenesis of human mesenchymal stem cells, *Tissue Eng.* 13 (2007) 2549–2560. doi:10.1089/ten.2007.0075.
- [223] B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, *Biomaterials Science an Introduction to Materials in Medicine.*, Elsevier Science, Burlington, 1997. [http://www.123library.org/book\\_details/?id=102058](http://www.123library.org/book_details/?id=102058) (accessed April 22, 2016).
- [224] C.R. Nuttelman, M.C. Tripodi, K.S. Anseth, Synthetic hydrogel niches that promote hMSC viability, *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 24 (2005) 208–218. doi:10.1016/j.matbio.2005.03.004.
- [225] C.-C. Lin, Recent advances in crosslinking chemistry of biomimetic poly(ethylene glycol) hydrogels, *RSC Adv.* 5 (2015) 39844–398583. doi:10.1039/C5RA05734E.
- [226] A.X. Chen, M.D. Hoffman, C.S. Chen, A.D. Shubin, D.S. Reynolds, D.S.W. Benoit, 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.* 103 (2015) 1291–1302. doi:10.1002/jbm.a.35383.
- [227] S.Q. Liu, Q. Tian, L. Wang, J.L. Hedrick, J.H.P. Hui, Y.Y. Yang, P.L.R. Ee, Injectable Biodegradable Poly(ethylene glycol)/RGD Peptide Hybrid Hydrogels for in vitro Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells, *Macromol. Rapid Commun.* 31 (2010) 1148–1154. doi:10.1002/marc.200900818.

- [228] S.Q. Liu, Q. Tian, J.L. Hedrick, J.H. Po Hui, P.L.R. Ee, Y.Y. Yang, Biomimetic hydrogels for chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells to neocartilage, *Biomaterials*. 31 (2010) 7298–7307. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.06.001.
- [229] G.D. Nicodemus, S.J. Bryant, Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications, *Tissue Eng. Part B Rev.* 14 (2008) 149–165. doi:10.1089/ten.teb.2007.0332.
- [230] C.J. Connon, I.W. Hamley, Royal Society of Chemistry (Great Britain), eds., *Hydrogels in cell-based therapies*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2014.
- [231] D. Kumar, I. Gerges, M. Tamplenizza, C. Lenardi, N.R. Forsyth, Y. Liu, Three-dimensional hypoxic culture of human mesenchymal stem cells encapsulated in a photocurable, biodegradable polymer hydrogel: a potential injectable cellular product for nucleus pulposus regeneration, *Acta Biomater.* 10 (2014) 3463–3474. doi:10.1016/j.actbio.2014.04.027.
- [232] M. Bhamidipati, B. Sridharan, A.M. Scurto, M.S. Detamore, Subcritical CO<sub>2</sub> sintering of microspheres of different polymeric materials to fabricate scaffolds for tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 33 (2013) 4892–4899. doi:10.1016/j.msec.2013.08.010.
- [233] H. Oda, T. Konno, K. Ishihara, Efficient differentiation of stem cells encapsulated in a cytocompatible phospholipid polymer hydrogel with tunable physical properties, *Biomaterials*. 56 (2015) 86–91. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.03.051.
- [234] J.D. Green, V. Tollemar, M. Dougherty, Z. Yan, L. Yin, J. Ye, Z. Collier, M.K. Mohammed, R.C. Haydon, H.H. Luu, R. Kang, M.J. Lee, S.H. Ho, T.-C. He, L.L. Shi, A. Athiviraham, Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering, *Genes Dis.* 2 (2015) 307–327. doi:10.1016/j.gendis.2015.09.003.
- [235] M.B. Goldring, K. Tsuchimochi, K. Ijiri, The control of chondrogenesis, *J. Cell. Biochem.* 97 (2006) 33–44. doi:10.1002/jcb.20652.
- [236] T. Guo, L. Yu, C.G. Lim, A.S. Goodley, X. Xiao, J.K. Placone, K.M. Ferlin, B.-N.B. Nguyen, A.H. Hsieh, J.P. Fisher, Effect of Dynamic Culture and Periodic Compression on Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Chondrogenesis, *Ann. Biomed. Eng.* (2015). doi:10.1007/s10439-015-1510-5.
- [237] Y. Zeng, C. Chen, W. Liu, Q. Fu, Z. Han, Y. Li, S. Feng, X. Li, C. Qi, J. Wu, D. Wang, C. Corbett, B.P. Chan, D. Ruan, Y. Du, Injectable microcryogels reinforced alginate encapsulation of mesenchymal stromal cells for leak-proof delivery and alleviation of canine disc degeneration, *Biomaterials*. 59 (2015) 53–65. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.04.029.
- [238] B. Jeong, S.W. Kim, Y.H. Bae, Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 37–51.
- [239] D. Roy, W.L.A. Brooks, B.S. Sumerlin, New directions in thermoresponsive polymers, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 7214–7243. doi:10.1039/c3cs35499g.
- [240] Bekturov EA., Bimedina LA., *Interpolymer complexes*, *Adv Polym Sci.* 41 (1981) 99–147.
- [241] Ferreira P., Coelho JFJ., Almeida JF., Gil MH., *Photocrosslinkable Polymers for Biomedical Applications*, *Biomed. Eng. - Front. Chall.* (2011).
- [242] Poncelet D., Neufeld R.J., Goosen M.F.A, Burgarski B., Babak V.G, *Formation of microgel beads by electric dispersion of polymer solutions* Formation of microgel beads by electric dispersion of polymer solutions, *Am. Inst. Chem. Eng. AIChE J.* (1999).
- [243] Lee B.B, Ravindra P., Chan E.S, *Size and Shape of Calcium Alginate Beads Produced by Extrusion Dripping*, *Chem. Eng. Technol.* (2013) 1627–1642.
- [244] V. Manojlovic, J. Djonlagic, B. Obradovic, V. Nedovic, B. Bugarski, *Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: a model system for potential application in medicine*, *Int. J. Nanomedicine.* 1 (2006) 163–171.
- [245] C. Schwinger, S. Koch, U. Jahnz, P. Wittlich, N.G. Rainov, J. Kressler, *High throughput encapsulation of murine fibroblasts in alginate using the JetCutter technology*, *J. Microencapsul.* 19 (2002) 273–280. doi:10.1080/02652040110105328.
- [246] Lasheras JC., Hopfinger EJ., *Liquid Jet Instability and Atomization in a Coaxial Gas Stream*, *Annu. Rev. Fluid Mech.* (2000) 275–308.

- [247] O. Gryshkov, D. Pogozykh, N. Hofmann, O. Pogozykh, T. Mueller, B. Glasmacher, Encapsulating non-human primate multipotent stromal cells in alginate via high voltage for cell-based therapies and cryopreservation, *PLoS One*. 9 (2014) e107911. doi:10.1371/journal.pone.0107911.
- [248] S.T.B. Ho, S.M. Cool, J.H. Hui, D.W. Huttmacher, The influence of fibrin based hydrogels on the chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells, *Biomaterials*. 31 (2010) 38–47. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.021.
- [249] H. Dashtdar, M.R. Murali, L. Selvaratnam, H. Balaji Raghavendran, A.M. Suhaeb, T.S. Ahmad, T. Kamarul, Ultra-structural changes and expression of chondrogenic and hypertrophic genes during chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in alginate beads, *PeerJ*. 4 (2016) e1650. doi:10.7717/peerj.1650.
- [250] F.R. Maia, A.H. Lourenço, P.L. Granja, R.M. Gonçalves, C.C. Barrias, Effect of cell density on mesenchymal stem cells aggregation in RGD-alginate 3D matrices under osteoinductive conditions, *Macromol. Biosci*. 14 (2014) 759–771. doi:10.1002/mabi.201300567.
- [251] P. Perrot, D. Heymann, C. Charrier, S. Couillaud, F. Rédini, F. Duteille, Extraosseous bone formation obtained by association of mesenchymal stem cells with a periosteal flap in the rat, *Ann. Plast. Surg*. 59 (2007) 201–206. doi:10.1097/SAP.0b013e31802c1ff2.
- [252] X.-L. Shi, Y. Zhang, J.-Y. Gu, Y.-T. Ding, Coencapsulation of hepatocytes with bone marrow mesenchymal stem cells improves hepatocyte-specific functions, *Transplantation*. 88 (2009) 1178–1185. doi:10.1097/TP.0b013e3181bc288b.
- [253] P.M. Klinge, K. Harmening, M.C. Miller, A. Heile, C. Wallrapp, P. Geigle, T. Brinker, Encapsulated native and glucagon-like peptide-1 transfected human mesenchymal stem cells in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett*. 497 (2011) 6–10. doi:10.1016/j.neulet.2011.03.092.
- [254] E.G. Popa, M.E. Gomes, R.L. Reis, Cell delivery systems using alginate--carrageenan hydrogel beads and fibers for regenerative medicine applications, *Biomacromolecules*. 12 (2011) 3952–3961. doi:10.1021/bm200965x.
- [255] H. Gin, B. Dupuy, C. Baquey, D. Ducassou, J. Aubertin, Agarose encapsulation of islets of Langerhans: reduced toxicity in vitro, *J. Microencapsul*. 4 (1987) 239–242. doi:10.3109/02652048709021817.
- [256] D.R. Pereira, J. Silva-Correia, S.G. Caridade, J.T. Oliveira, R.A. Sousa, A.J. Salgado, J.M. Oliveira, J.F. Mano, N. Sousa, R.L. Reis, Development of gellan gum-based microparticles/hydrogel matrices for application in the intervertebral disc regeneration, *Tissue Eng. Part C Methods*. 17 (2011) 961–972. doi:10.1089/ten.TEC.2011.0115.
- [257] Y.F. Tian, J.M. Devgun, J.H. Collier, Fibrillized peptide microgels for cell encapsulation and 3D cell culture, *Soft Matter*. 7 (2011) 6005. doi:10.1039/c1sm05504f.
- [258] A. Leung, Y. Ramaswamy, P. Munro, G. Lawrie, L. Nielsen, M. Trau, Emulsion strategies in the microencapsulation of cells: pathways to thin coherent membranes, *Biotechnol. Bioeng*. 92 (2005) 45–53. doi:10.1002/bit.20597.
- [259] Chávarri M., Marañón I., Villarán MC., Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria, *Immunol. Microbiol.* (2012).
- [260] D.L. Elbert, Liquid-liquid two-phase systems for the production of porous hydrogels and hydrogel microspheres for biomedical applications: A tutorial review, *Acta Biomater*. 7 (2011) 31–56. doi:10.1016/j.actbio.2010.07.028.
- [261] E.L. Daley, R.M. Coleman, J.P. Stegemann, Biomimetic microbeads containing a chondroitin sulfate/chitosan polyelectrolyte complex for cell-based cartilage therapy, *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med*. 3 (2015) 7920–7929. doi:10.1039/C5TB00934K.
- [262] A.W. Lund, J.A. Bush, G.E. Plopper, J.P. Stegemann, Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in defined protein beads, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater*. 87 (2008) 213–221. doi:10.1002/jbm.b.31098.

- [263] A.C. Jayasuriya, K.J. Mauch, N.A. Ebraheim, Fabrication and Characterization of Injectable Biomaterials for Biomedical Applications, *Adv. Mater. Res.* 383–390 (2011) 4065–4069. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.383-390.4065.
- [264] Wan J., Microfluidic-Based Synthesis of Hydrogel Particles for Cell Microencapsulation and Cell-Based Drug Delivery, *Polymers.* (2012) 1084–1108.
- [265] D.M. Headen, G. Aubry, H. Lu, A.J. García, Microfluidic-based generation of size-controlled, biofunctionalized synthetic polymer microgels for cell encapsulation, *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla.* 26 (2014) 3003–3008. doi:10.1002/adma.201304880.
- [266] H.F. Chan, Y. Zhang, Y.-P. Ho, Y.-L. Chiu, Y. Jung, K.W. Leong, Rapid formation of multicellular spheroids in double-emulsion droplets with controllable microenvironment, *Sci. Rep.* 3 (2013) 3462. doi:10.1038/srep03462.
- [267] A. Moshaverinia, C. Chen, X. Xu, K. Akiyama, S. Ansari, H.H. Zadeh, S. Shi, Bone regeneration potential of stem cells derived from periodontal ligament or gingival tissue sources encapsulated in RGD-modified alginate scaffold, *Tissue Eng. Part A.* 20 (2014) 611–621. doi:10.1089/ten.TEA.2013.0229.
- [268] S. Sakai, S. Ito, H. Inagaki, K. Hirose, T. Matsuyama, M. Taya, K. Kawakami, Cell-enclosing gelatin-based microcapsule production for tissue engineering using a microfluidic flow-focusing system, *Biomicrofluidics.* 5 (2011) 13402. doi:10.1063/1.3516657.
- [269] R. Levato, J. Visser, J.A. Planell, E. Engel, J. Malda, M.A. Mateos-Timoneda, Biofabrication of tissue constructs by 3D bioprinting of cell-laden microcarriers, *Biofabrication.* 6 (2014) 035020. doi:10.1088/1758-5082/6/3/035020.
- [270] S. Selimović, J. Oh, H. Bae, M. Dokmeci, A. Khademhosseini, Microscale Strategies for Generating Cell-Encapsulating Hydrogels, *Polymers.* 4 (2012) 1554.
- [271] T.J. Kieffer, K. Woltjen, K. Osafune, D. Yabe, N. Inagaki, Beta cell replacement strategies for diabetes, *J. Diabetes Investig.* (2017). doi:10.1111/jdi.12758.
- [272] P.K. Ngoc, P.V. Phuc, T.H. Nhung, D.T. Thuy, N.T.M. Nguyet, Improving the efficacy of type 1 diabetes therapy by transplantation of immunoisolated insulin-producing cells, *Hum. Cell.* 24 (2011) 86–95. doi:10.1007/s13577-011-0018-z.
- [273] N.E. Davis, L.N. Beenken-Rothkopf, A. Mirsoian, N. Kojic, D.L. Kaplan, A.E. Barron, M.J. Fontaine, Enhanced function of pancreatic islets co-encapsulated with ECM proteins and mesenchymal stromal cells in a silk hydrogel, *Biomaterials.* 33 (2012) 6691–6697. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.015.
- [274] D.C. Hamilton, H.H. Shih, R.A. Schubert, S.A. Michie, P.N. Staats, D.L. Kaplan, M.J. Fontaine, A silk-based encapsulation platform for pancreatic islet transplantation improves islet function in vivo, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* (2015). doi:10.1002/term.1990.
- [275] V. Vaithilingam, M.D. Evans, A. Rowe, P.A. Bean, B.E. Tuch, Co-encapsulation of target effector cells with mesenchymal stem cells reduces pericapsular fibrosis and improves graft survival in a xenotransplanted animal model, *Cell Transplant.* (2015). doi:10.3727/096368915X688975.
- [276] A.F.G. Godier-Furnémont, Y. Tekabe, M. Kollaros, G. Eng, A. Morales, G. Vunjak-Novakovic, L.L. Johnson, Noninvasive imaging of myocyte apoptosis following application of a stem cell-engineered delivery platform to acutely infarcted myocardium, *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 54 (2013) 977–983. doi:10.2967/jnumed.112.112979.
- [277] R.D. Levit, N. Landázuri, E.A. Phelps, M.E. Brown, A.J. García, M.E. Davis, G. Joseph, R. Long, S.A. Safley, J.D. Suever, A.N. Lyle, C.J. Weber, W.R. Taylor, Cellular encapsulation enhances cardiac repair, *J. Am. Heart Assoc.* 2 (2013) e000367. doi:10.1161/JAHA.113.000367.
- [278] F. Mohand-Kaci, N. Assoul, I. Martelly, E. Allaire, M. Zidi, Optimized hyaluronic acid-hydrogel design and culture conditions for preservation of mesenchymal stem cell properties, *Tissue Eng. Part C Methods.* 19 (2013) 288–298. doi:10.1089/ten.TEC.2012.0144.
- [279] A. Goren, N. Dahan, E. Goren, L. Baruch, M. Machluf, Encapsulated human mesenchymal stem cells: a unique hypoimmunogenic platform for long-term cellular therapy, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24 (2010) 22–31. doi:10.1096/fj.09-131888.

- [280] T.M. Kauer, J.-L. Figueiredo, S. Hingtgen, K. Shah, Encapsulated therapeutic stem cells implanted in the tumor resection cavity induce cell death in gliomas, *Nat. Neurosci.* 15 (2012) 197–204. doi:10.1038/nn.3019.
- [281] Y. Han, R. Tao, Y. Han, T. Sun, J. Chai, G. Xu, J. Liu, Microencapsulated VEGF gene-modified umbilical cord mesenchymal stromal cells promote the vascularization of tissue-engineered dermis: an experimental study, *Cytotherapy*. 16 (2014) 160–169. doi:10.1016/j.jcyt.2013.10.014.
- [282] K. Xu, D.A. Cantu, Y. Fu, J. Kim, X. Zheng, P. Hematti, W.J. Kao, Thiol-ene Michael-type formation of gelatin/poly(ethylene glycol) biomatrices for three-dimensional mesenchymal stromal/stem cell administration to cutaneous wounds, *Acta Biomater.* 9 (2013) 8802–8814. doi:10.1016/j.actbio.2013.06.021.
- [283] A. Paul, A. Cantor, D. Shum-Tim, S. Prakash, Superior cell delivery features of genipin crosslinked polymeric microcapsules: preparation, in vitro characterization and pro-angiogenic applications using human adipose stem cells, *Mol. Biotechnol.* 48 (2011) 116–127. doi:10.1007/s12033-010-9352-8.
- [284] Y. Deng, H. Zhou, C. Yan, Y. Wang, C. Xiao, P. Gu, X. Fan, In vitro osteogenic induction of bone marrow stromal cells with encapsulated gene-modified bone marrow stromal cells and in vivo implantation for orbital bone repair, *Tissue Eng. Part A*. 20 (2014) 2019–2029. doi:10.1089/ten.TEA.2013.0604.
- [285] H.F. Ding, R. Liu, B.G. Li, J.R. Lou, K.R. Dai, T.T. Tang, Biologic effect and immunisolating behavior of BMP-2 gene-transfected bone marrow-derived mesenchymal stem cells in APA microcapsules, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362 (2007) 923–927. doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.094.
- [286] A. Moshaverinia, S. Ansari, C. Chen, X. Xu, K. Akiyama, M.L. Snead, H.H. Zadeh, S. Shi, Co-encapsulation of anti-BMP2 monoclonal antibody and mesenchymal stem cells in alginate microspheres for bone tissue engineering, *Biomaterials*. 34 (2013) 6572–6579. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.05.048.
- [287] M. Soleimani, L. Khorsandi, A. Atashi, F. Nejaddehbashi, Chondrogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Blood-Derived Unrestricted Somatic Stem Cells on A 3D Beta-Tricalcium Phosphate-Alginate-Gelatin Scaffold, *Cell J.* 16 (2014) 43–52.
- [288] K.-H. Park, W. Park, K. Na, Synthetic matrix containing glucocorticoid and growth factor for chondrogenic differentiation of stem cells, *J. Biosci. Bioeng.* 108 (2009) 168–173. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.03.008.
- [289] X. Bourges, P. Weiss, G. Daculsi, G. Legeay, Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use, *Adv. Colloid Interface Sci.* 99 (2002) 215–228.
- [290] A. Fatimi, J.F. Tassin, S. Quillard, M.A.V. Axelos, P. Weiss, The rheological properties of silylated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices, *Biomaterials*. 29 (2008) 533–543. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.10.032.
- [291] X. Bourges, P. Weiss, G. Daculsi, G. Legeay, Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use, *Adv. Colloid Interface Sci.* 99 (2002) 215–228.
- [292] L.A. Bosworth, S.R. Rathbone, S.H. Cartmell, Optimizing Attachment of Human Mesenchymal Stem Cells on Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Electrospun Yarns, *J. Vis. Exp. JoVE.* (2015). doi:10.3791/52135.
- [293] R.A. Thibault, L. Scott Baggett, A.G. Mikos, F.K. Kasper, Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on pregenerated extracellular matrix scaffolds in the absence of osteogenic cell culture supplements, *Tissue Eng. Part A*. 16 (2010) 431–440. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0583.
- [294] G. Orive, E. Santos, D. Poncelet, R.M. Hernández, J.L. Pedraz, L.U. Wahlberg, P. De Vos, D. Emerich, Cell encapsulation: technical and clinical advances, *Trends Pharmacol. Sci.* 36 (2015) 537–546. doi:10.1016/j.tips.2015.05.003.

- [295] C. Merceron, S. Portron, M. Masson, J. Lesoeur, B.H. Fellah, O. Gauthier, O. Geffroy, P. Weiss, J. Guicheux, C. Vinatier, The effect of two- and three-dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel, *Cell Transplant.* 20 (2011) 1575–1588. doi:10.3727/096368910X557191.
- [296] S. Portron, C. Merceron, O. Gauthier, J. Lesoeur, S. Sourice, M. Masson, B.H. Fellah, O. Geffroy, E. Lallemand, P. Weiss, J. Guicheux, C. Vinatier, Effects of in vitro low oxygen tension preconditioning of adipose stromal cells on their in vivo chondrogenic potential: application in cartilage tissue repair, *PLoS One.* 8 (2013) e62368. doi:10.1371/journal.pone.0062368.
- [297] G.C. da Cunha Mendes, T.R. da Silva Brandão, C.L. Miranda Silva, Ethylene oxide potential toxicity, *Expert Rev. Med. Devices.* 5 (2008) 323–328. doi:10.1586/17434440.5.3.323.
- [298] A.W. Hartman, R.U. Nesbitt, F.M. Smith, N.O. Nuessle, Viscosities of acacia and sodium alginate after sterilization by cobalt-60, *J. Pharm. Sci.* 64 (1975) 802–805.
- [299] W.J. Leo, A.J. McLoughlin, D.M. Malone, Effects of sterilization treatments on some properties of alginate solutions and gels, *Biotechnol. Prog.* 6 (1990) 51–53. doi:10.1021/bp00001a008.
- [300] A. Martinsen, G. Skjåk-Braek, O. Smidsrød, Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads, *Biotechnol. Bioeng.* 33 (1989) 79–89. doi:10.1002/bit.260330111.
- [301] Daigle D.J., Cotty P.J., The Effect of Sterilization, pH, Filler and Spore Inoculum Concentration on the Preparation of Alginate Pellets, *Biocontrol Sci. Technol.* (1997) 3–10.
- [302] Nedovic Viktor, Willaert Ronnie, *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology*, 2004.
- [303] W.F. Kendall, M.D. Darrabie, H.M. El-Shewy, E.C. Opara, Effect of alginate composition and purity on alginate microspheres, *J. Microencapsul.* 21 (2004) 821–828. doi:10.1080/02652040400015452.
- [304] E.-S. Chan, B.-B. Lee, P. Ravindra, D. Poncelet, Prediction models for shape and size of calcium alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method, *J. Colloid Interface Sci.* 338 (2009) 63–72. doi:10.1016/j.jcis.2009.05.027.
- [305] Ouwerx C., Velings N., Mestdagh M.M., Axelos M.A.V., *Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations*, 1998.
- [306] A. Gautier, B. Carpentier, M. Dufresne, Q. Vu Dinh, P. Paullier, C. Legallais, Impact of alginate type and bead diameter on mass transfers and the metabolic activities of encapsulated C3A cells in bioartificial liver applications, *Eur. Cell. Mater.* 21 (2011) 94–106.
- [307] Smerdel P., Bogataj M., Mrhar A., The Influence of Selected Parameters on the Size and Shape of Alginate Beads Prepared by Ionotropic Gelation, *Sci. Pharm.* (2008) 77–89.
- [308] Bachtzi A.R., Boutris C.J., Kiparissides C., Production of oil-containing crosslinked poly(vinyl alcohol) microcapsules by phase separation: Effect of process parameters on the capsule size distribution, in: *Appl. Polym.*, 1996: pp. 9–20.
- [309] T.F. Tadros, *An introduction to surfactants*, de Gruyter, Berlin, 2014.
- [310] B. Bhatt, V. Kumar, Regenerated Cellulose Capsules for Controlled Drug Delivery, Part 2: Modulating Membrane Permeability by Incorporation of Depolymerized Cellulose and Altering Membrane Thickness, *J. Pharm. Sci.* 104 (2015) 4266–4275. doi:10.1002/jps.24664.
- [311] H.-X. Fu, H. Li, F.-Z. Zhang, Y.-Z. Zhao, C.-W. Wan, M.-T. Chen, X.-C. Jia, L. Yan, C.-C. Sun, Y.-Y. Xu, Experiment on formulation and drug release behavior of porosity asymmetric membrane capsules in vitro, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 38 (2012) 670–678. doi:10.3109/03639045.2011.611809.
- [312] N. Angelova, D. Hunkeler, Effect of preparation conditions on properties and permeability of chitosan-sodium hexametaphosphate capsules, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 12 (2001) 1317–1337.
- [313] R. Robitaille, F.A. Leblond, Y. Bourgeois, N. Henley, M. Loignon, J.P. Hallé, Studies on small (<350 microm) alginate-poly-L-lysine microcapsules. V. Determination of carbohydrate and protein permeation through microcapsules by reverse-size exclusion chromatography, *J. Biomed. Mater. Res.* 50 (2000) 420–427.

- [314] A.G. Lee, C.P. Arena, D.J. Beebe, S.P. Palecek, Development of macroporous poly(ethylene glycol) hydrogel arrays within microfluidic channels, *Biomacromolecules*. 11 (2010) 3316–3324. doi:10.1021/bm100792y.
- [315] D. Mawad, R. Odell, L.A. Poole-Warren, Network structure and macromolecular drug release from poly(vinyl alcohol) hydrogels fabricated via two crosslinking strategies, *Int. J. Pharm.* 366 (2009) 31–37. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.08.038.
- [316] C.A. Feghali, T.M. Wright, Cytokines in acute and chronic inflammation, *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 2 (1997) d12-26.
- [317] S.M. Opal, V.A. DePalo, Anti-inflammatory cytokines, *Chest*. 117 (2000) 1162–1172.
- [318] J.M. Ziebell, M.C. Morganti-Kossmann, Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury, *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 7 (2010) 22–30. doi:10.1016/j.nurt.2009.10.016.
- [319] O. Chaudhuri, L. Gu, D. Klumpers, M. Darnell, S.A. Bencherif, J.C. Weaver, N. Huebsch, H.-P. Lee, E. Lippens, G.N. Duda, D.J. Mooney, Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity, *Nat. Mater.* 15 (2016) 326–334. doi:10.1038/nmat4489.
- [320] B. Wright, R.A. Cave, J.P. Cook, V.V. Khutoryanskiy, S. Mi, B. Chen, M. Leyland, C.J. Connon, Enhanced viability of corneal epithelial cells for efficient transport/storage using a structurally modified calcium alginate hydrogel, *Regen. Med.* 7 (2012) 295–307. doi:10.2217/rme.12.7.
- [321] J.L. Wilson, M.A. Najia, R. Saeed, T.C. McDevitt, Alginate encapsulation parameters influence the differentiation of microencapsulated embryonic stem cell aggregates, *Biotechnol. Bioeng.* 111 (2014) 618–631. doi:10.1002/bit.25121.
- [322] B. Puissant, C. Barreau, P. Bourin, C. Clavel, J. Corre, C. Bousquet, C. Taureau, B. Cousin, M. Abbal, P. Laharrague, L. Penicaud, L. Casteilla, A. Blancher, Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells, *Br. J. Haematol.* 129 (2005) 118–129. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x.
- [323] X. Bourges, P. Weiss, A. Coudreuse, G. Daculsi, G. Legeay, General properties of silylated hydroxyethylcellulose for potential biomedical applications, *Biopolymers*. 63 (2002) 232–238. doi:10.1002/bip.10053.
- [324] A. Fatimi, J.F. Tassin, S. Quillard, M.A.V. Axelos, P. Weiss, The rheological properties of silylated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices, *Biomaterials*. 29 (2008) 533–543. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.10.032.
- [325] L. Moussa, G. Pattappa, B. Doix, S.-L. Benselama, C. Demarquay, M. Benderitter, A. Sémont, R. Tamarat, J. Guicheux, P. Weiss, G. Réthoré, N. Mathieu, A biomaterial-assisted mesenchymal stromal cell therapy alleviates colonic radiation-induced damage, *Biomaterials*. 115 (2017) 40–52. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.11.017.
- [326] C. Ceccaldi, S.G. Fullana, C. Alfarano, O. Lairez, D. Calise, D. Cussac, A. Parini, B. Sallerin, Alginate scaffolds for mesenchymal stem cell cardiac therapy: influence of alginate composition, *Cell Transplant.* 21 (2012) 1969–1984. doi:10.3727/096368912X647252.
- [327] J. Yu, K.T. Du, Q. Fang, Y. Gu, S.S. Mihardja, R.E. Sievers, J.C. Wu, R.J. Lee, The use of human mesenchymal stem cells encapsulated in RGD modified alginate microspheres in the repair of myocardial infarction in the rat, *Biomaterials*. 31 (2010) 7012–7020. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.078.
- [328] J.D. Green, V. Tollemar, M. Dougherty, Z. Yan, L. Yin, J. Ye, Z. Collier, M.K. Mohammed, R.C. Haydon, H.H. Luu, R. Kang, M.J. Lee, S.H. Ho, T.-C. He, L.L. Shi, A. Athiviraham, Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering, *Genes Dis.* 2 (2015) 307–327. doi:10.1016/j.gendis.2015.09.003.
- [329] M.B. Goldring, K. Tsuchimochi, K. Ijiri, The control of chondrogenesis, *J. Cell. Biochem.* 97 (2006) 33–44. doi:10.1002/jcb.20652.
- [330] S.Y. Chon, H.H. Hassanain, R. Pine, S.L. Gupta, Involvement of two regulatory elements in interferon-gamma-regulated expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene, *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 15 (1995) 517–526. doi:10.1089/jir.1995.15.517.

- [331] J.E. Darnell, I.M. Kerr, G.R. Stark, Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins, *Science*. 264 (1994) 1415–1421.
- [332] K.V. Konan, M.W. Taylor, Importance of the two interferon-stimulated response element (ISRE) sequences in the regulation of the human indoleamine 2,3-dioxygenase gene, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 19140–19145.
- [333] B.M. Campbell, E. Charych, A.W. Lee, T. Möller, Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines, *Front. Neurosci.* 8 (2014) 12. doi:10.3389/fnins.2014.00012.
- [334] T.J. Connor, N. Starr, J.B. O’Sullivan, A. Harkin, Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: a role for IFN-gamma?, *Neurosci. Lett.* 441 (2008) 29–34. doi:10.1016/j.neulet.2008.06.007.
- [335] H. Fujigaki, K. Saito, S. Fujigaki, M. Takemura, K. Sudo, H. Ishiguro, M. Seishima, The signal transducer and activator of transcription 1 $\alpha$  and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines, *J. Biochem. (Tokyo)*. 139 (2006) 655–662. doi:10.1093/jb/mvj072.
- [336] G.K. Lee, H.J. Park, M. Macleod, P. Chandler, D.H. Munn, A.L. Mellor, Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division, *Immunology*. 107 (2002) 452–460.
- [337] J.E. Foraker, J.Y. Oh, J.H. Ylostalo, R.H. Lee, J. Watanabe, D.J. Prockop, Cross-talk between human mesenchymal stem/progenitor cells (MSCs) and rat hippocampal slices in LPS-stimulated cocultures: the MSCs are activated to secrete prostaglandin E2, *J. Neurochem.* 119 (2011) 1052–1063. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07511.x.
- [338] B. Hegyi, G. Kudlik, E. Monostori, F. Uher, Activated T-cells and pro-inflammatory cytokines differentially regulate prostaglandin E2 secretion by mesenchymal stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419 (2012) 215–220. doi:10.1016/j.bbrc.2012.01.150.
- [339] R. Yañez, A. Oviedo, M. Aldea, J.A. Bueren, M.L. Lamana, Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells, *Exp. Cell Res.* 316 (2010) 3109–3123. doi:10.1016/j.yexcr.2010.08.008.
- [340] C.D. Funk, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science*. 294 (2001) 1871–1875. doi:10.1126/science.294.5548.1871.
- [341] W.L. Smith, D.L. DeWitt, R.M. Garavito, Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology, *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000) 145–182. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.145.
- [342] W.L. Smith, Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells, *Annu. Rev. Physiol.* 48 (1986) 251–262. doi:10.1146/annurev.ph.48.030186.001343.
- [343] Y. Son, T. Ito, Y. Ozaki, T. Tanijiri, T. Yokoi, K. Nakamura, M. Takebayashi, R. Amakawa, S. Fukuhara, Prostaglandin E2 is a negative regulator on human plasmacytoid dendritic cells, *Immunology*. 119 (2006) 36–42. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02402.x.
- [344] G.M. Spaggiari, H. Abdelrazik, F. Becchetti, L. Moretta, MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2, *Blood*. 113 (2009) 6576–6583. doi:10.1182/blood-2009-02-203943.
- [345] J. Murn, O. Alibert, N. Wu, S. Tendil, X. Gidrol, Prostaglandin E2 regulates B cell proliferation through a candidate tumor suppressor, *Ptger4*, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 3091–3103. doi:10.1084/jem.20081163.
- [346] S. Tabera, J.A. Pérez-Simón, M. Díez-Campelo, L.I. Sánchez-Abarca, B. Blanco, A. López, A. Benito, E. Ocio, F.M. Sánchez-Guijo, C. Cañizo, J.F. San Miguel, The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes, *Haematologica*. 93 (2008) 1301–1309. doi:10.3324/haematol.12857.
- [347] A. Mantovani, S.K. Biswas, M.R. Galdiero, A. Sica, M. Locati, Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling, *J. Pathol.* 229 (2013) 176–185. doi:10.1002/path.4133.

- [348] G.M. Coudriet, J. He, M. Trucco, W.M. Mars, J.D. Piganelli, Hepatocyte growth factor modulates interleukin-6 production in bone marrow derived macrophages: implications for inflammatory mediated diseases, *PLoS One*. 5 (2010) e15384. doi:10.1371/journal.pone.0015384.
- [349] H. Kusunoki, Y. Taniyama, R. Otsu, H. Rakugi, R. Morishita, Anti-inflammatory effects of hepatocyte growth factor on the vicious cycle of macrophages and adipocytes, *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* 37 (2014) 500–506. doi:10.1038/hr.2014.41.
- [350] M. Benkhoucha, N. Molnarfi, I. Dunand-Sauthier, D. Merkler, G. Schneiter, S. Bruscoli, C. Riccardi, Y. Tabata, H. Funakoshi, T. Nakamura, W. Reith, M.-L. Santiago-Raber, P.H. Lalive, Hepatocyte growth factor limits autoimmune neuroinflammation via glucocorticoid-induced leucine zipper expression in dendritic cells, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 193 (2014) 2743–2752. doi:10.4049/jimmunol.1302338.
- [351] E. Ayroldi, G. Migliorati, S. Bruscoli, C. Marchetti, O. Zollo, L. Cannarile, F. D’Adamio, C. Riccardi, Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB, *Blood.* 98 (2001) 743–753.
- [352] D. Berrebi, S. Bruscoli, N. Cohen, A. Foussat, G. Migliorati, L. Bouchet-Delbos, M.-C. Maillot, A. Portier, J. Couderc, P. Galanaud, M. Peuchmaur, C. Riccardi, D. Emilie, Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10, *Blood.* 101 (2003) 729–738. doi:10.1182/blood-2002-02-0538.
- [353] K. Okunishi, M. Dohi, K. Nakagome, R. Tanaka, S. Mizuno, K. Matsumoto, J.-I. Miyazaki, T. Nakamura, K. Yamamoto, A novel role of hepatocyte growth factor as an immune regulator through suppressing dendritic cell function, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 175 (2005) 4745–4753.
- [354] E. Singhal, P. Sen, Hepatocyte growth factor-induced c-Src-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway inhibits dendritic cell activation by blocking IκB kinase activity, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43 (2011) 1134–1146. doi:10.1016/j.biocel.2011.04.006.
- [355] N. Molnarfi, M. Benkhoucha, C. Juillard, K. Bjarnadóttir, P.H. Lalive, The neurotrophic hepatocyte growth factor induces protolerogenic human dendritic cells, *J. Neuroimmunol.* 267 (2014) 105–110. doi:10.1016/j.jneuroim.2013.12.004.
- [356] M. Benkhoucha, M.-L. Santiago-Raber, G. Schneiter, M. Chofflon, H. Funakoshi, T. Nakamura, P.H. Lalive, Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 6424–6429. doi:10.1073/pnas.0912437107.
- [357] S. Rutella, G. Bonanno, A. Procoli, A. Mariotti, D.G. de Ritis, A. Curti, S. Danese, G. Pessina, S. Pandolfi, F. Natoni, A. Di Febo, G. Scambia, R. Manfredini, S. Salati, S. Ferrari, L. Pierelli, G. Leone, R.M. Lemoli, Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10<sup>++</sup>IL-12<sup>low</sup>/neg accessory cells with dendritic-cell features, *Blood.* 108 (2006) 218–227. doi:10.1182/blood-2005-08-3141.
- [358] M. Benkhoucha, N. Molnarfi, G. Schneiter, P.R. Walker, P.H. Lalive, The neurotrophic hepatocyte growth factor attenuates CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-lymphocyte activity, *J. Neuroinflammation.* 10 (2013) 154. doi:10.1186/1742-2094-10-154.
- [359] X. Liu, W. Shen, Y. Yang, G. Liu, Therapeutic implications of mesenchymal stem cells transfected with hepatocyte growth factor transplanted in rat kidney with unilateral ureteral obstruction, *J. Pediatr. Surg.* 46 (2011) 537–545. doi:10.1016/j.jpedsurg.2010.09.040.
- [360] A. Shabbir, D. Zisa, G. Suzuki, T. Lee, Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296 (2009) H1888–1897. doi:10.1152/ajpheart.00186.2009.
- [361] Y.S. Song, H.J. Lee, S.H. Doo, S.J. Lee, I. Lim, K.-T. Chang, S.U. Kim, Mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor (HGF) inhibit collagen deposit and improve bladder function in rat model of bladder outlet obstruction, *Cell Transplant.* 21 (2012) 1641–1650. doi:10.3727/096368912X637488.

# Thèse de Doctorat

Fahd HACHED

## Encapsulation de Cellules Stromales Mésenchymateuses humaines dans des hydrogels polysaccharidiques : potentielle application dans le traitement de l'arthrose

Encapsulation of Human Mesenchymal Stromal Cells in polysaccharide hydrogels for a potential application in osteoarthritis treatment

### Résumé

Les traitements actuels de l'arthrose ne sont pas étiologiques. Il est alors nécessaire de développer de nouveaux axes thérapeutiques. L'utilisation des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) est prometteuse notamment en raison de leurs capacités immunomodulatrices. L'injection intra-articulaire des CSM présente quelques limites majeures qui pourraient être contournées par leur incorporation dans des biomatériaux. Cependant, le maintien des capacités immunomodulatrices des CSM après encapsulation n'a jamais été vérifié. Dans ce contexte, ce travail de thèse a consisté à encapsuler les CSM dans l'alginate et l'hydroxypropyl méthylcellulose silanisée (HPMC-Si) puis à étudier leur biofonctionnalité. Dans un premier temps, une méthode de génération de particules d'HPMC-Si a été mise au point. Les particules d'alginate et d'HPMC-Si ont été caractérisées. La taille, les propriétés de diffusion et les propriétés mécaniques des particules fabriquées ont été analysées et comparées. Dans un second temps, les cellules ont été encapsulées dans les 2 matériaux puis caractérisées par une étude de leur viabilité et de leur prolifération pendant 1 mois. Enfin, le maintien des capacités immunomodulatrices des CSM après encapsulation a été investigué. Ces travaux de thèse ont permis de démontrer que : (i) les particules d'alginate et d'HPMC-Si possèdent des propriétés différentes ; (ii) les CSM encapsulées dans les 2 matériaux restent viables et (iii) l'encapsulation des CSM n'altère pas leurs capacités immunomodulatrices. Ces travaux de thèse sont ainsi encourageants pour une potentielle application des CSM encapsulées dans le traitement de l'arthrose.

### Mots clés

**Cellules Stromales Mésenchymateuses, Encapsulation, Caractérisation des particules, Inflammation, Facteurs solubles, Thérapie cellulaire**

### Abstract

Existing drug therapies for osteoarthritis (OA) provide, at best, symptomatic relief from pain and fail to prevent cartilage damage. Mesenchymal Stromal Cells (MSC) have generated interest since they secrete immunomodulatory factors. Direct injection of MSCs in OA suffers major limitations. To overcome these limitations, several studies have proposed to entrap MSC within biomaterials. However, their immunomodulatory properties after encapsulation have not been investigated. In this context, this work aimed to entrap MSC within spherical particles derived from alginate or from silanized hydroxypropyl methylcellulose (Si-HPMC) and to investigate their biofunctionality. First, a protocol of Si-HPMC particles generation was assessed. Alginate and Si-HPMC particles were characterized. Size, diffusion and mechanical properties of generated particles were studied and compared. Secondly, MSC were entrapped within alginate or Si-HPMC. Their viability and their ability to proliferate were evaluated for up to one month after encapsulation. Lastly, the biofunctionality of encapsulated MSC was investigated in order to harness their therapeutic properties for the treatment of OA. In summary, we have shown that: (i) alginate and Si-HPMC particles exhibit different properties; (ii) both alginate and Si-HPMC particles support MSC survival and (iii) MSC encapsulated in alginate or Si-HPMC are sensitive to pro-inflammatory cytokines and respond to this stimulation by increasing their secretion of bioactive factors. These findings are promising for a potential application of encapsulated MSC to OA treatment.

### Key Words

**Mesenchymal Stromal Cells, Encapsulation, Particles characterization, Inflammation, Soluble bioactive factors, Cell therapy**