

**UNIVERSITE DE NANTES**

**U.F.R D'ODONTOLOGIE**

**THESE DE DOCTORAT**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANTES**

***Discipline : Biologie Cellulaire et Ingénierie Tissulaire***

Présentée et soutenue publiquement le 22 Juin 2007

Par

**Claire VINATIER**

**THERAPIE CELLULAIRE DU CARTILAGE ARTICULAIRE :  
TRANSFERT DE CELLULES AUTOLOGUES PAR DES  
BIOMATERIAUX INJECTABLES**

Devant le jury ci-dessous

*Rapporteurs :*

**Mme Joëlle AMEDEE**

Directeur de Recherche INSERM, Bordeaux.

**Mr Cem GABAY**

Professeur, Faculté de Médecine de Genève, Suisse.

*Directeur de thèse :*

**Mr Jérôme GUICHEUX**

Chargé de Recherche INSERM, Nantes.

*Co-directeur de thèse :*

**Mr Pierre WEISS**

Maître de Conférence, Faculté de Chirurgie Dentaire, Nantes.

*Membre invité :*

**Mr Olivier GAUTHIER**

Maître de Conférence, Ecole Nationale Vétérinaire, Nantes.

Par délibération, en date du 6 décembre 1972, le Conseil de la Faculté de Chirurgie Dentaire a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'il n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation.

“Lorsqu’une question soulève des opinions violemment contradictoires on peut assurer qu’elle appartient au domaine de la croyance et non à celui de la connaissance”

(François-Marie Arouet, dit Voltaire)

“Je trouve indigne de vouloir que les autres soit de notre avis. Le prosélytisme m’étonne.”

(Paul Valéry)

“Le comble du bonheur est d’avoir compris ce qui est compréhensible et de respecter ce qui ne l’est pas.”

(Johann Wolfgang von Goethe)

## LISTE DES PUBLICATIONS

### Articles publiés :

1. .P. Weiss, **C. Vinatier**, J. Guicheux, G. Grimandi, G. Daculsi. A new-self-setting hydrogel as an extracellular matrix for tissue engineering. *Key engineering materials* (2004), 254-256:1107-1110.
2. A.Citeau, J. Guicheux, **C. Vinatier**, P. Layrolle, T.P. N'Guyen, P. Pilet, G. Daculsi. In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting. *Biomaterials*, (2004), 26(2):157-165.
3. **C. Vinatier**, D. Magne, P.Weiss, C. Trojani, N. Rochet, G. F. Carle, C. Vignes-Colombeix, C. Chadjichristos, P. Galera, G. Daculsi, J. Guicheux . A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three dimensional culture of chondrocytes *Biomaterials* 2005, 26(33):6643-51.
4. D. Magne, **C. Vinatier**, M. Julien, P. Weiss, J. Guicheux. Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. *Trends in molecular medicine*. (2005) (11):519-526.
5. D. Magne, M. Julien, **C. Vinatier**, F. Mehri-Soussi, P. Weiss, J. Guicheux. Cartilage formation and vascular calcification: from physiology to pathology. *BioEssays*, (2005), 27:708-716.
6. C. Trojani, P. Weiss, J.F. Michiels, **C. Vinatier**, J. Guicheux, G. Daculsi, P. Boileau, P. Gaudray, G. F. Carle, N. Rochet. Osteogenic differentiation in three-dimensional culture into a new Silated-HydroxyPropylMethylCellulose Hydrogel. *Biomaterials*, (2005), 26: 5509-5517 (IF:4,69)
7. **C. Vinatier**, J. Guicheux, G. Daculsi, P. Layrolle, P. Weiss. A self setting hydrogel as an extracellular synthetic matrix for tissue engineering *Biomedical materials and engineering*. 2006; 16 (4 Supplement) S107-13.
8. **C. Vinatier**, D. Magne, P. Weiss, O. Malard, O. Gauthier, A. Moreau, C. Vignes-Colombeix, J. Guicheux. Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A* (2007), 80 (1); 66-74.

**Articles soumis:**

9. **C.Vinatier** , O. Gauthier, M. Masson, , A. Moreau, F. Moreau, B. Fellah, P. weiss, J. Guicheux. Articular cartilage repair using autologous nasal chondrocytes and a cellulose-based hydrogel. Biomaterials (soumis).
  
10. **C.Vinatier** , O. Gauthier, M. Masson, O. Malard, A. Moreau, B. Fellah, M. Bilban, R. Spaethe, G. Daculsi, J. Guicheux. Nasal chondrocytes and Fibrin sealant for cartilage tissue engineering. Biomaterials (soumis).

**Brevet:**

11. **C. Vinatier**, J. Guicheux, G. Grimandi, G. Daculsi, P. Weiss. "Utilisation d'un hydrogel pour la culture de chondrocytes". WO2005044326, 2005, INSERM.

## Abréviations

BMP:	Bone morphogenetic proteins
COMP:	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
COX2:	CycloOxygenase 2
CS:	Chondroïtine sulfate
DS:	Dermantane sulfate
FGF:	Fibroblast growth factor
FGFR:	Récepteur au fibroblast growth factor
GAG:	Glycosaminoglycanes
GDF-5:	Growth and differentiation factor 5 aussi appelé BMP-14 ou CDMP1
HIF-1 $\alpha$ :	Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$
HS:	Héparane sulfate
IGF-I:	Insulin-like growth factor
IGFBPs:	IGF Binding Protein
IL-1, IL-6:	Interleukine 1, 6.
Ihh:	Indian Hedgehog
iNOS:	Inducible Nitric Oxide Synthase
KS:	kératane sulfate
MEC:	Matrice extracellulaire
MMP:	Matrix Metalloprotease ou Métalloprotéase Matricielle
NO:	Nitric Oxide
OP-1:	Osteogenic Protein 1= BMP-7
PDGF:	Platelet derived growth factor
PG:	Protéoglycanes
PTH:	Parathyroïde hormone
PTHrP:	Parathyroïde hormone related peptide
Shh:	Sonic hedgehog
Smad:	Small mother against decapentaplegic
Sox:	Sex Determining Region Y-related High mobility group box
SZP:	Superficial Zone Protein.
TNF:	Tumor Necrosis Factor
TGF- $\beta$ :	Transforming Growth Factor- $\beta$ .

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>4</b>
<b>II.</b>	<b>GÉNÉRALITÉS .....</b>	<b>8</b>
<b>1</b>	<b>LE CARTILAGE ARTICULAIRE .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>Généralités .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2</b>	<b>Composition du cartilage articulaire.....</b>	<b>9</b>
1.2.1	Le chondrocyte.....	10
1.2.2	La matrice extracellulaire du cartilage articulaire .....	11
1.2.2.1	<i>Les collagènes: synthèse et fibrillogenèse.....</i>	<i>11</i>
1.2.2.2	<i>Les collagènes du cartilage articulaire.....</i>	<i>13</i>
1.2.2.3	<i>Les protéoglycanes : .....</i>	<i>19</i>
1.2.2.4	<i>Les autres constituants .....</i>	<i>22</i>
1.2.3	Les propriétés biomécaniques du cartilage articulaire .....	23
1.2.4	Remodelage interne de la matrice extracellulaire : .....	24
<b>1.3</b>	<b>Histologie du cartilage articulaire .....</b>	<b>25</b>
1.3.1	La zone superficielle .....	25
1.3.2	La zone de transition .....	26
1.3.3	La zone radiale .....	27
1.3.4	La couche de cartilage calcifiée .....	27
1.3.5	Les zones de la matrice extracellulaire.....	27
1.3.5.1	<i>La matrice péricellulaire.....</i>	<i>27</i>
1.3.5.2	<i>La matrice territoriale.....</i>	<i>28</i>
1.3.5.3	<i>La matrice interterritoriale .....</i>	<i>29</i>
<b>1.4</b>	<b>Formation du cartilage : la chondrogenèse.....</b>	<b>29</b>
1.4.1	Condensation des cellules mésenchymateuses et orientation.....	30
1.4.2	Différenciation chondrocytaire.....	31
1.4.3	Prolifération des chondrocytes .....	32
1.4.4	Différenciations pré hypertrophique et hypertrophique des chondrocytes.....	33
1.4.5	Différenciation terminale des chondrocytes.....	34
	<i>Article 1 : Formation du cartilage dans la plaque de croissance et dans les artères : de la</i>	
	<i>physiologie à la pathologie .....</i>	<i>36</i>
<b>1.5</b>	<b>Formation des articulations.....</b>	<b>38</b>
1.5.1	Détermination du site de l'articulation.....	38
1.5.2	Formation de l'interzone .....	39
1.5.3	Cavitation et morphogenèse .....	40
1.5.4	Formation et stabilisation du cartilage articulaire .....	42
<b>2</b>	<b>LES PERTES DE SUBSTANCE ET LES PATHOLOGIES DEGENERATIVES DU CARTILAGE</b>	
	<b>ARTICULAIRE .....</b>	<b>44</b>
<b>2.1</b>	<b>Généralités .....</b>	<b>44</b>
<b>2.2</b>	<b>Les pertes de substance du cartilage articulaire .....</b>	<b>44</b>
2.2.1	Classification des pertes de substance du cartilage articulaire.....	44
2.2.2	Processus de réparation spontanée du cartilage .....	45
<b>2.3</b>	<b>Les pathologies dégénératives du cartilage articulaire : l'arthrose.....</b>	<b>47</b>
2.3.1	Physiopathogénie de l'arthrose .....	48
2.3.1.1	<i>La composante mécanique et cellulaire .....</i>	<i>48</i>
2.3.1.2	<i>La composante inflammatoire: les facteurs cataboliques .....</i>	<i>50</i>

2.3.1.3	<i>Les facteurs anaboliques</i> .....	51
2.3.2	Les facteurs de risques de l'arthrose : .....	52
<b>2.4</b>	<b>Les traitements</b> .....	<b>54</b>
2.4.1	Les traitements non pharmacologiques : .....	54
2.4.2	Les traitements pharmacologiques : .....	55
2.4.2.1	<i>Les traitements d'action rapide</i> : .....	55
2.4.2.2	<i>Les traitements d'action lente</i> .....	56
2.4.3	Les traitements chirurgicaux : .....	58
2.4.3.1	<i>Les interventions chirurgicales</i> .....	58
2.4.3.2	<i>Les greffes allogéniques</i> .....	61
2.4.3.3	<i>Les greffes de tissus autologues</i> .....	61
<b>3</b>	<b>INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE ARTICULAIRE</b> .....	<b>67</b>
<b>3.1</b>	<b>Généralité-définitions</b> .....	<b>67</b>
<b>3.2</b>	<b>Les matrices</b> .....	<b>68</b>
3.2.1	Les matrices protéiques.....	69
3.2.1.1	<i>Les matrices de collagène</i> .....	69
3.2.1.2	<i>Les colles de fibrine</i> .....	70
3.2.2	Les matrices polysaccharidiques .....	71
3.2.2.1	<i>L'agarose</i> .....	71
3.2.2.2	<i>L'alginate</i> .....	71
3.2.2.3	<i>L'acide hyaluronique</i> .....	72
3.2.2.4	<i>Le chitosan</i> .....	72
3.2.2.5	<i>La cellulose</i> .....	73
3.2.3	Les matrices artificielles.....	73
3.2.3.1	<i>L'acide poly lactique et l'acide poly glycolique</i> .....	73
3.2.3.2	<i>Les fibres de carbone</i> .....	74
3.2.3.3	<i>Le Dacron et le Téflon</i> .....	74
3.2.4	Les hydrogels .....	75
	<i>Article 2 : les hydrogels pour l'ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage</i> .....	77
<b>3.3</b>	<b>Les cellules</b> .....	<b>79</b>
3.3.1	Les Chondrocytes.....	79
3.3.2	Les cellules souches mésenchymateuses.....	80
<b>3.4</b>	<b>Modes et conditions de culture</b> .....	<b>81</b>
3.4.1	Culture en monocouche.....	81
3.4.2	Culture en 3 dimensions .....	82
3.4.3	Les bioréacteurs.....	82
3.4.4	Les morphogènes.....	83
3.4.4.1	<i>Les facteurs de croissance</i> .....	83
3.4.4.2	<i>La tension en oxygène</i> .....	85
3.4.4.3	<i>Les contraintes mécaniques</i> .....	85
<b>3.5</b>	<b>La thérapie génique</b> .....	<b>86</b>
<b>III.</b>	<b>L'HPMC-SI : UNE MATRICE EXTRACELLULAIRE ARTIFICIELLE POUR LA CULTURE TRIDIMENSIONNELLE DE CHONDROCYTES</b> .....	<b>88</b>
<b>1</b>	<b>PROBLEMATIQUE</b> .....	<b>89</b>
<b>2</b>	<b>UN HYDROGEL AUTO-RETICULANT COMME MATRICE EXTRACELLULAIRE SYNTHETIQUE POUR L'INGENIERIE TISSULAIRE. ARTICLE 3</b> .....	<b>91</b>

3	UN HYDROGEL D'HYDROXYPROPYL METHYLCELLULOSE SILANISEE POUR LA CULTURE TRIDIMENSIONNELLE DE CHONDROCYTES. ARTICLE 4 .....	93
4	DISCUSSION .....	95
IV.	L'HPMC-SILANISEE : DE L'INGENIERIE TISSULAIRE A LA REPARATION DU CARTILAGE .....	97
1	PROBLEMATIQUE .....	98
2	FORMATION DE CARTILAGE A L'AIDE D'UN HYDROGEL D'HYDROXYPROPYL METHYLCELLULOSE SILANISEE ET DE CHONDROCYTES NASAUX HUMAINS. ARTICLE 5	100
3	REPARATION DU CARTILAGE ARTICULAIRE A L'AIDE DE CHONDROCYTES NASAUX AUTOLOGUES ET D'UN HYDROGEL CELLULOSIQUE . ARTICLE 6 .....	102
4	DISCUSSION .....	104
V.	VOIES DE RECHERCHES ALTERNATIVES EN INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE ARTICULAIRE .....	107
1	PROBLEMATIQUE .....	108
2	CHONDROCYTES NASAUX ET COLLE DE FIBRINE APPLIQUES A L'INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE. ARTICLE 7. ....	110
3	CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES POUR LA THERAPIE RECONSTRUCTRICE DU CARTILAGE ARTICLE 8.....	112
4	DISCUSSION .....	114
VI.	CONCLUSIONS GENERALES-PERSPECTIVES .....	116
VII.	BIBLIOGRAPHIE .....	121
VIII.	ANNEXE .....	154

## I. INTRODUCTION GENERALE

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif de soutien spécialisé non vascularisé et non innervé. Il est constitué d'un seul type de cellules, les chondrocytes et d'une matrice extracellulaire (MEC) abondante contenant des fibres de collagène et des protéoglycanes. Le cartilage articulaire, de par sa composition et sa structure, est capable de transmettre, de distribuer et d'amortir les charges importantes transmises lors de la mobilisation des articulations.

Le cartilage articulaire peut être le siège de nombreuses altérations d'origines inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde), traumatologiques ou liées au vieillissement (arthrose). L'établissement de ces atteintes cartilagineuses conduit, à plus ou moins long terme, à une dégradation de la matrice extracellulaire et une diminution de la cellularité. L'absence de vascularisation et de prolifération des cellules qui le composent, confère au cartilage articulaire de faibles capacités de réparation spontanée. Ces faibles capacités de cicatrisation spontanée rendent ces processus cataboliques irréversibles. Les pathologies dégénératives du cartilage concernent aujourd'hui une part importante de la population et représentent donc un enjeu majeur de santé publique. Dans ce contexte, la communauté scientifique s'intéresse depuis de nombreuses années aux moyens de régénérer un tissu cartilagineux fonctionnel.

Les techniques chirurgicales développées pour tenter de réparer les lésions cartilagineuses comme la chondroplastie abrasive, la micro fracture et la spongialisation (217) conduisent à la formation d'un tissu cartilagineux qui demeure fibreux et transitoire (443). Parallèlement la transplantation de tissus possédant des propriétés chondrogéniques comme les transplants de périoste, de périchondre et les greffes ostéochondrales (mosaïcplastie) ont également été étudiées. Les nombreuses limites associées à ces techniques (instabilité de la greffe, calcifications, applications réduites aux lésions focales) ont conduit au développement de nouvelles stratégies d'ingénierie tissulaire associant les biomatériaux aux principes de la thérapie cellulaire.

Ces stratégies d'ingénierie tissulaire cherchent à utiliser des cellules ou des agents biologiques actifs pour régénérer des organes ou tissus lésés. Le cartilage articulaire, de par ses caractéristiques biologiques, est un des tissus pour lequel l'ingénierie tissulaire apparaît prometteuse. Les principes de l'ingénierie du cartilage articulaire découlent directement de la technique de transplantation de chondrocytes autologues développée il y a une quinzaine d'années par Brittberg et *al.* (53). Une biopsie de cartilage est prélevée dans une zone non portante afin d'isoler des chondrocytes. Ceux-ci sont alors multipliés *in vitro* en monocouche puis réimplantés sous un lambeau périosté au niveau de la lésion. Cette technique aboutit

malheureusement à la formation d'un tissu de réparation fibrocartilagineux dont les propriétés biomécaniques sont inférieures à celle du tissu sain. Par ailleurs, le prélèvement de cartilage en site articulaire peut entraîner une morbidité au niveau du site donneur, et ne permet d'obtenir qu'une quantité limitée de cellules. De plus, l'amplification des chondrocytes en monocouche entraîne leur dédifférenciation en cellules d'allure fibroblastique (435). Ainsi, la nécessité de surmonter ces limites a motivé les recherches en ingénierie tissulaire vers deux voies principales. L'une s'intéresse, afin d'éviter la dédifférenciation des chondrocytes, au développement de biomatériaux pouvant servir de matrice tridimensionnelle pour la culture et le transfert de chondrocytes. La seconde, afin de réduire la morbidité liée au prélèvement de cartilage en site articulaire, s'oriente vers la recherche de sources alternatives de chondrocytes ou de cellules chondrogéniques.

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail fut d'une part le développement d'un hydrogel auto réticulant à base de cellulose silanisée qui servira de matrice tridimensionnelle ou de vecteur à des cellules autologues, et d'autre part de proposer les chondrocytes nasaux comme source de cellules alternatives.

Dans une première partie, nous présenterons des généralités relatives au cartilage et à son ingénierie. Nous rappellerons comment les éléments structuraux composant le cartilage articulaire en font un tissu hautement spécialisé. Nous verrons également que la chondrogenèse classiquement décrite dans les plaques de croissance peut être transposée, dans la limite des connaissances actuelles, à la formation du cartilage articulaire et à la mise en place de tissu minéralisé dans les vaisseaux (article 1). Nous aborderons ensuite les mécanismes connus gouvernant la formation des articulations. Les lésions du cartilage articulaire, qui vont des atteintes traumatiques aux pertes de substances chondrales associées aux pathologies dégénératives seront décrites. Nous verrons ensuite que les traitements utilisés, médicamenteux ou chirurgicaux, ne permettent pas d'obtenir une réparation de qualité du cartilage articulaire lésé. Enfin, les principales matrices développées (article 2), les différentes cellules et conditions de culture utilisées en ingénierie du cartilage articulaire seront abordées.

La seconde partie de ce travail sera consacrée à la validation de l'utilisation d'un hydrogel d'hydroxypropyl méthylcellulose silanisée (HPMC-Si), développé au laboratoire, comme matrice tridimensionnelle pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Dans un premier temps une étude *in vitro* des propriétés visco-élastiques de cet hydrogel (article 3) sera présentée. Les

résultats des études de cytocompatibilité et de bioactivité de cet hydrogel vis-à-vis de chondrocytes seront ensuite rapportés (article 4).

La troisième partie s'intéressera à la possibilité de former un tissu cartilagineux *in vivo* en associant notre hydrogel d'HPMC-Si avec des chondrocytes nasaux en site sous-cutané chez la souris *nude* (article 5). L'intérêt préclinique de notre concept sera finalement démontré dans un modèle de transplantation d'HPMC-si associé à des chondrocytes nasaux autologues dans des défauts cartilagineux articulaires chez le lapin (article 6).

La dernière partie de cette thèse s'attachera à définir certaines voies de recherches alternatives dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Tout d'abord, en testant l'utilisation de chondrocytes nasaux autologues avec une matrice alternative, la colle de fibrine, pour réparer des défauts cartilagineux articulaires chez le lapin (article 7). Enfin, à l'aide d'une revue des données de la littérature, l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses comme source alternative de cellules autologues pour la thérapie cellulaire du cartilage articulaire sera discutée (article 8).

Ainsi après une revue non exhaustive de la composition et de la formation du cartilage articulaire (article 1), des pathologies articulaires et de leur traitement, puis finalement des principes et techniques d'ingénierie du cartilage (article 2), notre travail expérimental s'articulera autour de trois parties :

- l'hydrogel d'HPMC-Si : une matrice extracellulaire artificielle pour la culture 3D de chondrocytes (articles 3 et 4).
- L'hydrogel d'HPMC-Si : de l'ingénierie tissulaire à la réparation du cartilage (articles 5 et 6).
- Voies de recherches alternatives en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire (articles 7 et 8).

Pour clore ce travail, une conclusion générale permettra de résumer l'ensemble de nos travaux et d'aborder les perspectives actuelles de l'ingénierie tissulaire du cartilage.

## II. GÉNÉRALITÉS

### Article 1

#### **Cartilage formation in growth plate and arteries: from physiology to pathology**

D. Magne, M. Julien, **C. Vinatier**, F. Merhi-Soussi, P. Weiss, and J. Guicheux.

BioEssays (2005) 27: 708-716.

### Article 2

#### **Cartilage and bone tissue engineering using hydrogels**

**C. Vinatier**, J. Guicheux, G. Daculsi, P. Layrolle, P. Weiss

Biomedical materials and engineering 2006; 16 (4 Suppl) S107-S113

## **1 LE CARTILAGE ARTICULAIRE**

### **1.1 Généralités**

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif de soutien spécialisé situé à la surface des os longs en regard du liquide synovial. Le cartilage articulaire sain apparaît blanc brillant et légèrement translucide, il est dit hyalin, car il dispose d'un indice de réfraction élevé dû à sa richesse en protéoglycane qui lui permet d'absorber de grandes quantités d'eau.

Le rôle principal du cartilage articulaire est de transmettre, amortir et distribuer d'importantes charges à l'os sous-chondral. Il assure également le glissement des os les uns contre les autres. Le cartilage articulaire est considéré comme un cartilage stable par comparaison au cartilage de la plaque de croissance qui est transitoire. Par ailleurs, et contrairement au cartilage de la plaque de croissance, le cartilage articulaire possède une particularité, il résiste à l'invasion vasculaire, à la minéralisation et à son remplacement par de l'os (286).

Le cartilage articulaire est non innervé et non vascularisé. Sa nutrition s'effectue donc par diffusion à partir du liquide synovial, qui évacue également les déchets. Le liquide synovial est composé d'eau et de nutriments tels que des électrolytes, des petites molécules et du glucose, ainsi que des déchets métaboliques issus du renouvellement de la matrice comme l'oxygène et le dioxyde de carbone. L'apport nutritionnel des chondrocytes s'effectue au travers de deux systèmes de diffusion successifs, tout d'abord au travers de la membrane synoviale puis au travers de la matrice cartilagineuse. La diffusion des nutriments dépend de la taille, de la forme et de la charge des molécules, ainsi que de la concentration en protéoglycanes du cartilage. Cette concentration en protéoglycanes constitue ainsi un facteur de régulation de la diffusion. La mise en charge de l'articulation entraîne une compression qui expulse les déchets vers le liquide synovial. Le relâchement, à l'inverse, entraîne un retour du liquide nutritionnel dans le cartilage. La MEC forme comme un tamis moléculaire qui sélectionne les molécules pouvant diffuser dans le cartilage. Ainsi, les éléments d'une masse moléculaire supérieure à celle de l'hémoglobine (69KDa) ne peuvent généralement pas diffuser.

### **1.2 Composition du cartilage articulaire**

Le cartilage articulaire est composé de 70 à 80% d'eau, retenue sous la forme d'un gel macromoléculaire stable. La matrice extracellulaire et les chondrocytes représentent donc 20 à 30% du cartilage articulaire (8). La MEC est composée de protéines collagéniques et non

collagéniques mais principalement d'un réseau de fibres de collagènes II, IX et XI et de protéoglycanes dont le représentant majoritaire est l'agrécan.

### 1.2.1 Le chondrocyte

Le chondrocyte est l'unique type cellulaire qui compose le cartilage articulaire. Cependant, chez l'adulte, le cartilage articulaire n'en comporte que très peu. Les chondrocytes ont une origine embryonnaire soit mésodermique comme les éléments des membres, soit ectodermique via les crêtes neurales qui donneront le squelette facial (20). Le chondrocyte articulaire présente une morphologie normalement ronde ou polygonale, mais il peut également présenter une morphologie aplatie ou discoïde en fonction de sa localisation au sein du cartilage articulaire. Les chondrocytes présentent de nombreux lysosomes, vacuoles lipidiques et grains de glycogène.

En raison, d'une part, de la synthèse des protéoglycanes, qui nécessite la transformation de grandes quantités de glucose en glucosamine, et d'autre part de l'absence de vascularisation du cartilage articulaire, la voie métabolique majoritaire du chondrocyte est la glycolyse anaérobie (345).

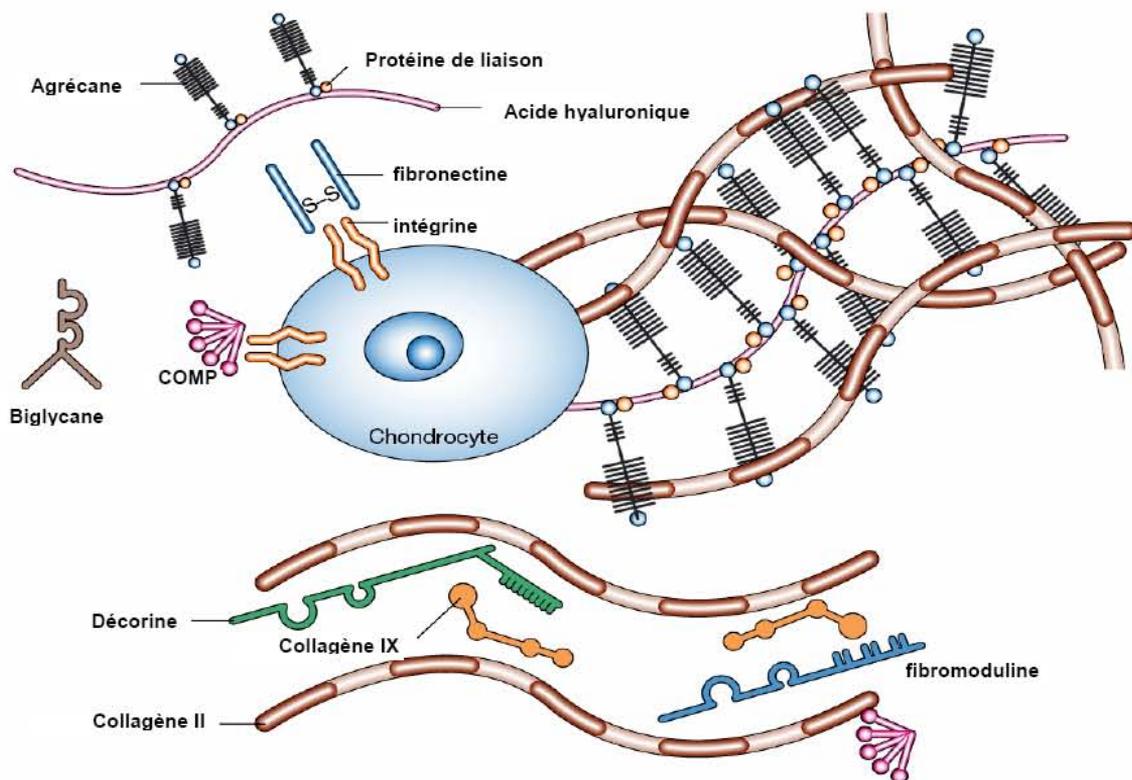
Le métabolisme des chondrocytes est en permanence influencé par les conditions physico-chimiques qui règnent dans l'espace péri-cellulaire. En effet, les forces cycliques qui s'appliquent sur le cartilage retentissent sur l'espace péri-cellulaire, et sur la forme des chondrocytes. Il en résulte une modification des filaments d'actine du cytosquelette qui peut modifier l'expression de certains gènes. Il existe donc un lien direct entre les conditions physico-chimiques entourant le chondrocyte et son activité métabolique (463).

Les chondrocytes sont responsables de la synthèse, du maintien et du renouvellement de la MEC. Ainsi, les chondrocytes produisent les composants de la MEC comme les collagènes et les protéoglycanes. Ils synthétisent également des enzymes capables de dégrader la MEC comme les métalloprotéases (448) ou les hyaluronidases (140). Enfin, les chondrocytes sont également la source de nombreuses cytokines et facteurs de croissance important dans régulation des processus anaboliques et cataboliques du cartilage.

Le phénotype chondrocytaire peut être influencé par de nombreuses cytokines, vitamines, hormones ou facteurs de croissance. Ainsi, l'insuline, le TGF- $\beta$  (transforming Growth Factor  $\beta$ ), l'IGF (insuline like growth factor), les BMP (bone morphogenetic proteins), l'acide ascorbique (liste non exhaustive) jouent un rôle soit dans la différenciation chondrocytaire, soit dans le maintien du phénotype chondrocytaire.

### 1.2.2 La matrice extracellulaire du cartilage articulaire

La MEC du cartilage articulaire se compose d'un réseau de fibres de collagène, qui constitue la trame fibrillaire, baignant dans une substance fondamentale composée essentiellement de protéoglycanes et d'eau. La MEC du cartilage est donc principalement constituée de fibres de collagène de type II, IX et XI dans lesquelles sont enchâssés des protéoglycanes comme l'agrécan. Cette MEC, contient également des protéines non collagéniques comme la COMP (cartilage oligomeric matrix protein) ou la CMP (cartilage matrix protein), des petits protéoglycanes riches en leucine et des protéoglycanes de surface (Figure 1).

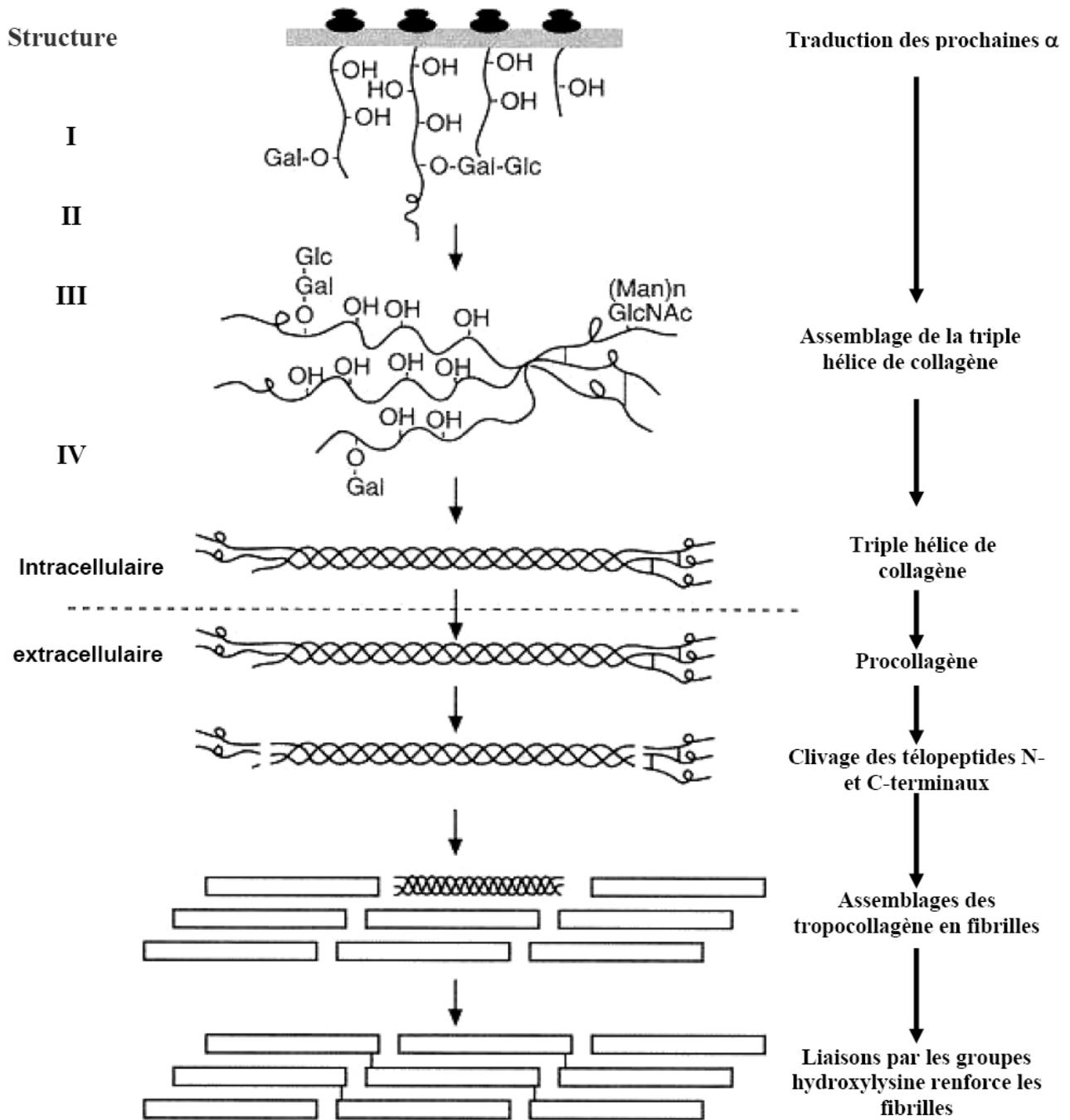


**Figure 1: La matrice extracellulaire du cartilage.** Plusieurs classes de protéines existent dans le cartilage articulaire: les collagènes (collagène II, IX et XI), les protéoglycanes (agrécan), les petits protéoglycanes (décorine, biglycane et fibromoduline) et les protéines non collagéniques (COMP=cartilage oligomeric matrix protein). Modifié d'après Chen et al. (77)

#### 1.2.2.1 Les collagènes: synthèse et fibrillogenèse

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes du corps humain. Les fibres de collagène sont, par ailleurs, la source principale des forces de tension dans les tissus animaux. Il existe actuellement 27 types différents de collagènes identifiés (68). La trame fibrillaire du cartilage articulaire est un copolymère de collagène II, IX et XI. Les autres types de collagène comme les collagènes I, III, VI, X, XIII et XIV ne sont retrouvés qu'en faible quantité (125).

Une des premières étapes de la production des protéines collagéniques consiste en la synthèse d'une chaîne  $\alpha$  de collagène. Cette chaîne est constituée d'une séquence répétitive d'acides aminés Gly-X-Y, dans laquelle X est généralement une proline et Y une hydroxyproline (492). Cette succession d'acides aminés constitue la structure primaire du collagène (figure 2). Cette structure primaire se replie sur elle-même et entraîne la formation d'une hélice à pas gauche appelée hélice  $\alpha$  qui contient 3 résidus par tour. Cette hélice  $\alpha$  constitue les structures secondaires et tertiaires du collagène. L'hélice  $\alpha$  est flanquée de deux domaines globulaires aux extrémités, les propeptides N- et C-terminaux qui restent libres. A l'extrémité N-terminale, une séquence signal composée d'acides aminés très hydrophobes permet, après clivage, à la chaîne  $\alpha$  de pénétrer dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG). Une fois dans le REG, les prolines et lysines sont hydroxylées en hydroxyproline et hydroxylysines respectivement. Il a été suggéré que l'hydroxylation des prolines stabiliserait la triple hélice, notamment en augmentant sa température de dénaturation (204, 354). L'hydroxylation des résidus lysines entraîne ensuite la glycosylation des molécules de collagène. Cette glycosylation est réalisée par deux transglycosylases qui fixent un galactose et un glycosylgalactose par liaison covalente sur des résidus d'hydroxylysines spécifiques (322, 509). Ensuite, dans la lumière de l'appareil de Golgi, 3 chaînes  $\alpha$  vont se réunir pour former la molécule de procollagène de structure tri-hélicoïdale, qui constitue la structure quaternaire du collagène (figure 2). Cette triple hélice peut être soit homotrimérique soit hétérotrimérique en fonction du type de collagène. Au sein de cette triple hélice, la glycine est le seul acide aminé à pouvoir se retrouver en position centrale de part sa petite taille. Au cours de l'assemblage de la triple hélice, l'association des 3 chaînes  $\alpha$  débute au niveau du domaine globulaire C-terminal par la formation de ponts disulfures et ensuite s'étend jusqu'à l'extrémité N-terminale. La triple hélice est stabilisée, par la présence des résidus rigides, la proline et l'hydroxyproline, ce qui limite la rotation de la triple hélice (67). Les triples hélices de collagène sont stabilisées par la protéine hsp47 spécifique du collagène, puis sécrétées dans le milieu extracellulaire. Une fois dans le milieu extracellulaire, les propeptides N- et C-terminaux sont clivés par des N-protéinases et C-protéinases permettant ainsi la libération de la molécule de tropocollagène capable de s'associer en fibrilles. La fibrillogenèse ou l'agrégation des molécules de tropocollagène se réalise spontanément dans l'espace extracellulaire (figure 2) (68). La fibrille est donc un agrégat de molécules de tropocollagène qui présente une striation périodique de 670 Å en microscopie électronique. Enfin, la fibre de collagène représente un faisceau de fibrilles, visible en microscopie optique.



**Figure 2: Biosynthèse du collagène fibrillaire** (Modifié d'après (353))

### 1.2.2.2 Les collagènes du cartilage articulaire

Neuf collagènes ont été identifiés dans le cartilage articulaire, les collagènes de type I, II, III, VI, IX, X, XI, XIII, et XIV. Parmi ces collagènes, nous nous intéresserons essentiellement aux collagènes I, II, III, VI, IX, X et XI.

Les collagènes de type II et XI font partie de la famille des collagènes fibrillaires et présentent la structure décrite dans la partie fibrillogénèse des collagènes. Le collagène de type IX est un collagène associé aux fibrilles ou FACIT collagène (fibrils associated collagen with interrupted triple-helix). Les collagènes III et VI, dits mineurs, sont plus concentrés au niveau des chondrons, les logettes qui protègent les chondrocytes. Les collagènes I et III sont présents dans la fine couche superficielle

#### Collgène de type I :

Le collagène de type I est la protéine la plus abondante chez les vertébrés, constituant environ 20 à 30% des protéines totales (pour revue, voir (265)). Le collagène de type I est composé de deux chaînes polypeptidiques,  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ , associées respectivement dans le rapport 2:1 pour former une hélice triple de type I [ $2 \alpha_1(I)$  et  $1 \alpha_2(I)$ ]. L'assemblage de ces trois hélices forme une super hélice droite. Dans le cartilage articulaire, la présence de fibres de collagène de type I a été décrite dans la zone superficielle du cartilage articulaire et dans l'os sous-chondral (358).

#### Collagène de type II

Le collagène de type II est le composant structural majeur du cartilage articulaire puisqu'il constitue environ 50% de la MEC du tissu. Cependant, la présence du collagène de type II a également été retrouvée dans d'autres tissus comme le disque intervertébral (314), la notocorde, la rétine, la cornée et l'humeur vitrée (76). Le collagène de type II est le produit du gène *COL2A1*, et la protéine est un homotrimère composé de trois chaînes  $\alpha_1(II)$ . Il existe deux formes de transcrite du gène *COL2A1*, les ARNm de type IIA et IIB qui diffèrent uniquement par la présence ou non de l'exon 2 qui peut subir un épissage alternatif (424). La forme longue, le collagène de type IIA, contenant l'exon 2, est exprimée par les cellules préchondrogéniques et non chondrogéniques. Il a aussi été suggéré que l'expression de l'ARNm de type IIA délimiterait les sites potentiels d'emplacements des articulations et des cartilages de croissance (363). En revanche, la forme courte (IIB), ne contenant pas l'exon 2, est exprimée dans les chondrocytes matures et donc dans les tissus cartilagineux adultes (428).

L'épaisseur des fibrilles de collagène de type II est plus fine que celle des fibrilles de collagène de type I. Les hydroxylations des lysines ainsi que les glycosylations des hydroxylysines sont plus élevées dans le collagène de type II que dans les autres collagènes fibrillaires (369). La synthèse du collagène de type II et le niveau d'expression de son ARNm

peuvent être régulés positivement ou négativement par plusieurs cytokines et facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$ 1, l'IGF-1 ou l'IL-1. Les souris déficientes en collagène II développent une chondrodysplasie létale, caractérisée par une absence totale de chondrogenèse et de la formation des disques intervertébraux (272). Ceci démontre l'importance du collagène II dans la formation du cartilage.

### Le collagène III

Le collagène de type III est un collagène fibrillaire qui est présent dans le cartilage fœtal et est également détecté dans le cartilage articulaire adulte (38) sain et arthritique (528). Le collagène de type III co-localise avec le collagène de type II. Cependant, le rôle du collagène de type III dans l'assemblage des fibres de collagène du cartilage articulaire et dans l'évolution de l'arthrose est encore inconnu (529). Les mutations dans le gène *COL3A1* sont associées à la forme la plus sévère, le type IV, du syndrome d'Ehlers-Danlos (353). Cette forme du syndrome, peut entraîner une mort subite suite à la rupture d'une artère principale ou de tout autre organe vital.

### Le collagène VI

Le collagène de type VI est un composant matriciel mineur de bon nombre de tissu y compris les cartilages (519). Le collagène VI s'autoassemble en dimère ou tétramère, grâce à des ponts disulfures et forme ainsi un réseau filamenteux. Le réseau de collagène VI est concentré autour des chondrocytes avec lesquels il interagit, au niveau de la zone péricellulaire (75). Le rôle du collagène VI n'est pas encore très clair. Le collagène VI formerait une interface mécanique entre le réseau de collagène II de la matrice interterritoriale et le chondrocytes (8). Les mutations dans les gènes codant le collagène de type VI sont associés à la myopathie de Bethlem, un syndrome autosomal dominant entraînant une faiblesse musculaire et des contractures articulaires (353).

### Collagène de type IX

Le collagène IX représente environ 1% de la quantité totale de collagène dans le cartilage articulaire adulte, ce qui le classe parmi les collagènes dits mineurs. Le collagène de type IX est une molécule hétérotrimérique, composée de 3 chaînes  $\alpha$ :  $\alpha_1$ (IX),  $\alpha_2$ (IX) et  $\alpha_3$ (IX) génétiquement distinctes et codées respectivement par les gènes *COL9A1*, *COL9A2* et *COL9A3* (219). La molécule de collagène IX contient 4 domaines non-collagéniques (NC1 à NC4) et 3 domaines en triple hélice appelés domaines collagéniques (COL1 à COL3). Les

chaînes sont reliées intra-moléculairement par des ponts disulfures entre les résidus cystéines des domaines non-collagéniques NC1 et NC3 (107). Par ailleurs, il existe deux formes de la molécule de collagène IX, issues de l'épissage alternatif du domaine NC4 de la chaîne  $\alpha_1(\text{IX})$  (366). La forme longue, contenant le domaine NC4 est la forme majoritaire dans le cartilage, alors que la forme courte ne contenant pas le domaine NC4 est généralement trouvée dans les tissus non cartilagineux comme l'humour vitré, la cornée ou la rétine (377). Le collagène de type IX décore la surface des fibrilles de collagène II (498), interagit avec d'autres composants de la MEC (522) et pourrait, à la fois, lier (520) et séparer (295) les fibrilles de collagène II. Les domaines COL3 et NC4 de la chaîne  $\alpha_1(\text{IX})$  sont orientés vers l'espace inter fibrillaire et permettent ainsi la liaison avec des protéoglycanes comme l'agrécan (493). Le domaine NC3 de la chaîne  $\alpha_2(\text{IX})$  contient un site d'attachement aux glycosaminoglycanes (GAG) comme le dermatan sulfate (51). Le collagène de type IX jouerait donc un rôle dans l'organisation et la stabilisation de la MEC (127).

Les souris déficientes pour la chaîne  $\alpha_1(\text{IX})$  sont viables, mais développent rapidement une dégénérescence des articulations ressemblant à de l'arthrose (248). Des mutations dans le gène du collagène de type IX (*COL9A2*) ont également été identifiées dans de nombreuses dysplasies épiphysaires, qui représentent un groupe hétérogène de maladies caractérisées par une petite taille et une arthrose précoce (201, 349).

#### Le collagène X :

Le collagène de type X est un membre de la famille des collagènes à chaînes courtes. C'est un homotrimère de trois chaînes  $\alpha(\text{X})$  avec un court domaine N-terminal non hélicoïdale de 38 acides aminés (NC2), suivi d'une triple hélice de 463 acides aminés, puis d'un domaine C-terminal non collagénique (NC1) de 161 acides aminés (446). Les gènes des collagènes à chaînes courtes contiennent généralement un seul et long exon qui code presque la totalité de la chaîne polypeptidique (365). L'expression du collagène X est spécifique des chondrocytes hypertrophiques et intervient dans le processus d'ossification endochondrale (385). Dans le cartilage articulaire, son expression est localisée dans la zone calcifiée profonde du cartilage articulaire. Le collagène de type X se lie dans la MEC au collagène de type II et aux protéoglycanes. L'expression du gène du collagène X a été détectée dans les chondrocytes du cartilage articulaire arthrosique où ils semblent réinitialiser une ossification endochondrale entraînant la formation d'ostéophytes et une sclérose de l'os sous-chondral (211).

27 mutations du gène du collagène de type X ont été caractérisées chez des patients atteints de chondrodysplasie métaphysaire de Schmidt (SMCD). Les souris invalidées pour le gène du collagène de type X présentent des malformations proches de celles observées dans les cas de SMCD et des anomalies hématopoïétiques (174, 258).

### Collagène de type XI

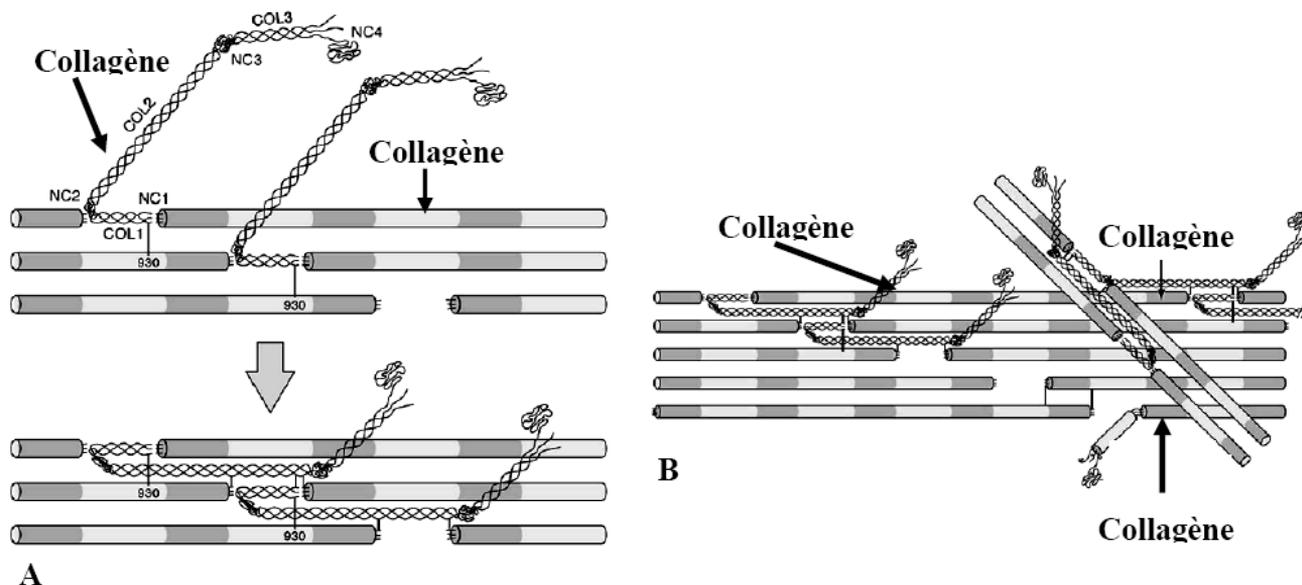
Le collagène de type XI est, également, un collagène dit mineur dans le cartilage articulaire adulte, car il ne représente que 3% de la quantité de collagène total. Le collagène de type XI est une molécule hétérotrimérique, qui consiste en 3 chaînes  $\alpha$  distinctes génétiquement, les chaînes  $\alpha_1(\text{XI})$ ,  $\alpha_2(\text{XI})$  et  $\alpha_3(\text{XI})$ . La chaîne  $\alpha_3(\text{XI})$  correspond à une version surglycosylée de la chaîne  $\alpha_1(\text{II})$ . Bien que la quantité de collagène XI soit faible dans le cartilage articulaire adulte, il y joue un rôle important dans la régulation du diamètre des fibrilles de collagène (497) ainsi que dans le maintien de l'intégrité et de la cohésion tissulaire. La structure du domaine N-terminal du collagène de type XI est modulée au cours du développement et de façon tissu-spécifique par un épissage alternatif des exons contenus dans les régions variables des différentes chaînes. Cet épissage alternatif dans les régions variables implique les exons 6A, 6B et 8 de la chaîne  $\alpha_1(\text{XI})$  (383, 532), les exons 6, 7 et 8 de la chaîne  $\alpha_2(\text{XI})$  (532) et l'exon 2 de la chaîne  $\alpha_3(\text{XI})$  (518). Au cours de la différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes, l'exon 2 de la chaîne  $\alpha_3(\text{XI})$  et les exons 6, 7 et 8 de la chaîne  $\alpha_2(\text{XI})$  sont généralement exclus (96). En revanche, en ce qui concerne la chaîne  $\alpha_1(\text{XI})$ , il y a expression de la forme 6A-7-8 dans les cellules préchondrogéniques, puis le patron d'expression devient plus complexe, incluant les formes 6A-7-8, 6B-7-8, 7-8, 6B-7 et 7 dans les chondrocytes matures (96).

Le collagène de type XI joue un rôle important dans la régulation de la fibrillogenèse du collagène de type II. Le clivage protéolytique du procollagène de type XI libère le propeptide N-terminal, mais la région variable est retenue au sein de la molécule mature et vient se localiser à la surface des fibrilles de collagène II (343). Ce domaine N-terminal ne pouvant se placer à l'intérieure des fibrilles, il crée un encombrement stérique empêchant l'ajout de nouvelles molécules de collagène de type II, ce qui limite le diamètre des fibrilles (40). Le collagène XI pourrait également lier les GAG présents à la surface des chondrocytes (497).

L'importance du collagène de type XI au sein du cartilage est également démontrée par l'identification de mutations des gènes de ce collagène dans le cadre de maladies. En effet, des mutations du gène COL11A1 ont été identifiées dans des chondrodysplasies. Des

mutations du gène COL11A2 ont également été identifiées dans le cadre de dysplasies ostéocondrales (353). Par ailleurs, les souris déficientes en collagène XI meurent à la naissance et montrent des anomalies dans le cartilage des membres, de la mandibule et de la trachée.

### Organisation fonctionnelle des collagènes dans le cartilage articulaire

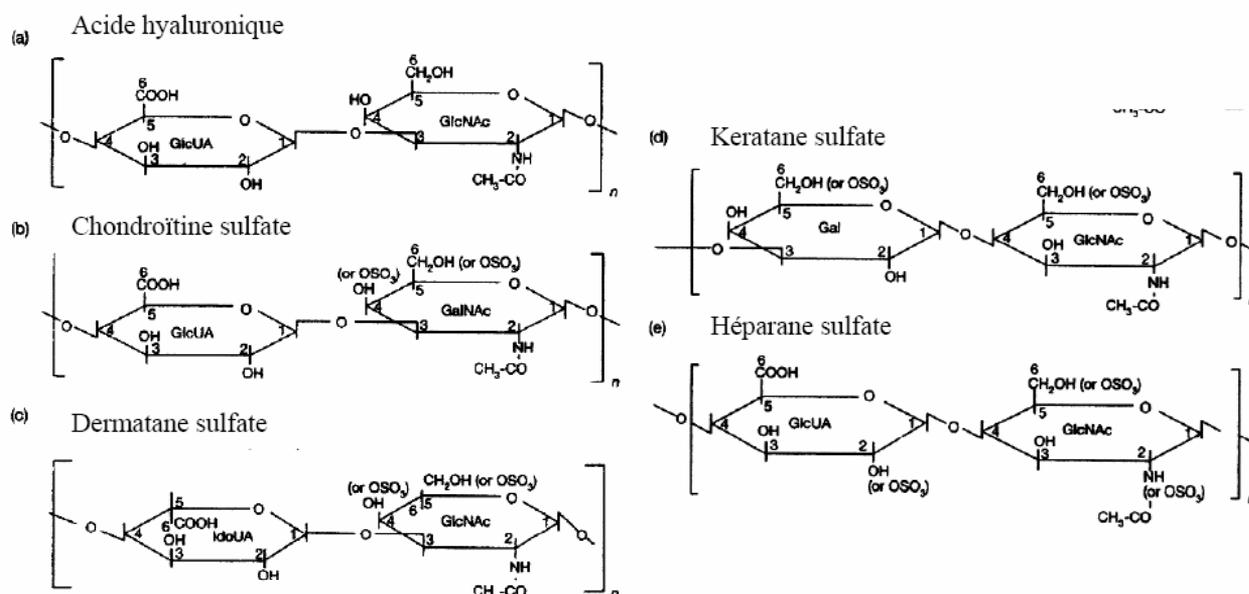


**Figure 3: L'assemblage des collagènes II/IX/XI dans le cartilage articulaire:** A) interaction entre le collagène de type IX et le collagène de type II. B) le réseau de liaisons croisées fibrilles-fibrilles de collagène II et interaction avec le collagène XI. Modifié d'après Eyre et al. (126).

Au sein du cartilage articulaire, les fibres de collagène sont organisées en un hétérotrimère de collagènes II/IX/XI (figure 3). Le collagène de type IX est lié par des liaisons covalentes au collagène de type II (figure 3, A). L'interaction débute par une liaison entre le domaine NC1 et la chaîne  $\alpha_1(\text{II})$ . Des liaisons covalentes se forment, ensuite, entre les sites de liaisons croisées des domaines COL2 des trois chaînes du collagène IX et les télopeptides N- et C-terminaux du collagène II (107) se retrouvant physiquement proches. De plus, les molécules de collagène IX peuvent être liées les unes aux autres par des liaisons entre les domaines COL1 des chaînes  $\alpha_1(\text{IX})$  et  $\alpha_3(\text{IX})$  et le domaine NC1 de la chaîne  $\alpha_3(\text{IX})$  (127). L'interaction entre le collagène de type XI et le collagène de type II (figure 3, B) se fait par des liaisons croisées entre les télopeptides C-terminaux du collagène II et un site en hélice du domaine N-terminal du collagène XI (127).

1.2.2.3 Les protéoglycanes :

Les protéoglycanes (PG) représentent 22 à 28 % du poids sec du cartilage articulaire adulte. Ce sont des macromolécules dont le poids moléculaire est compris entre  $6 \cdot 10^4$  et  $4 \cdot 10^6$  Da. Les protéoglycanes sont des glycoprotéines constituées d'une protéine axiale sur laquelle sont branchées une ou plusieurs longues chaînes polysaccharidiques très acides appelées glycosaminoglycanes. La structure des GAG est basée sur la répétition de disaccharides, dont l'un des sucres est soit un N-acétylglucosamine (GlcNAc) soit un N-acétylgalactosamine (GalNAc). L'autre sucre est souvent un sucre acide comme l'acide glucuronique ou l'acide iduronique ou encore un galactose (112). Dans la MEC du cartilage articulaire, ces sucres, à l'exception de l'acide hyaluronique, sont souvent substitués par des groupements sulfates. Il existe 5 types différents de GAG : les GAG sulfatés au nombre de 4, le chondroïtine sulfate (CS), le dermatane sulfate (DS), le kératane sulfate (KS) et l'héparane sulfate (HS) et un GAG non sulfaté l'acide hyaluronique (HA) (figure 4).



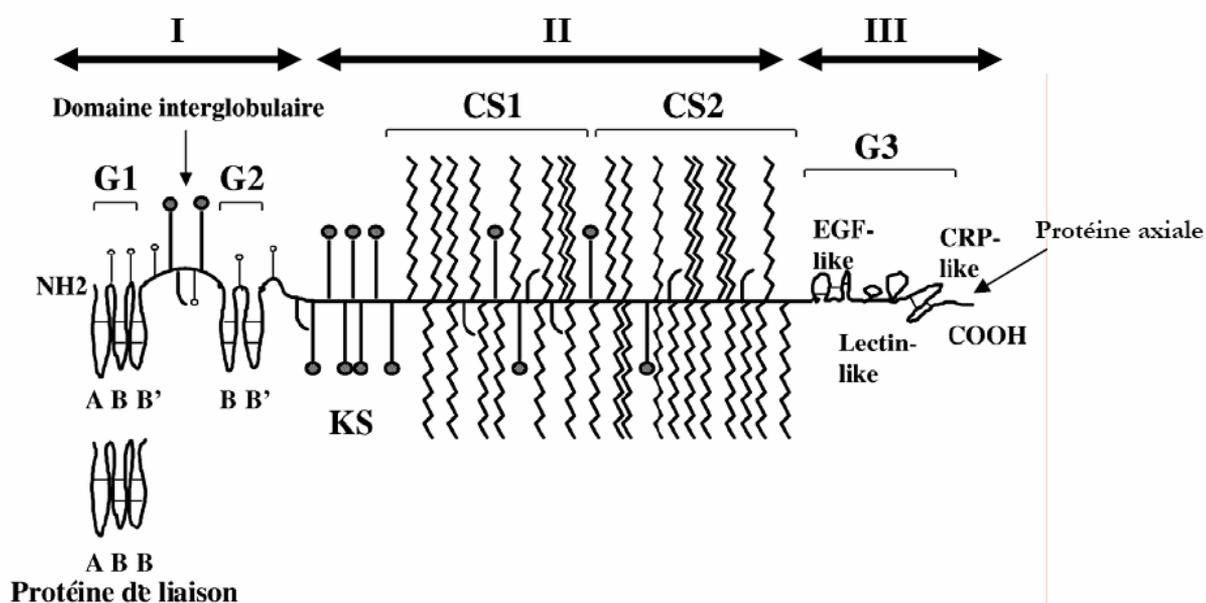
**Figure 4: Les motifs disaccharidiques des glycosaminoglycanes** d'après Dudhia et al. (112)

La synthèse des protéoglycanes débute par la synthèse de la protéine axiale dans le réticulum endoplasmique rugueux, puis est suivie de l'addition des chaînes de GAG et de leur sulfatation. L'addition et la modification des chaînes de GAG a lieu dans l'appareil de Golgi. Les chaînes de GAG sont greffées sur la protéine axiale par l'intermédiaire d'un UDP-sucres qui attache le xylose à une sérine ou une thréonine. Ensuite sont ajoutés deux galactoses, puis les motifs disaccharidiques propres à chaque GAG se mettent en place, sucre par sucre. Enfin, en dernier lieu les chaînes de GAG sont sulfatées.

L'agrécane :

L' agrécane est le PG majeur du cartilage articulaire, il représente 90% des PG du cartilage. L'agrécane est un large agrégat moléculaire contenant plus d'une centaine de chaînes de CS et 50 chaînes de KS liées de façon covalente à la protéine axiale (418). Dans le cartilage, l'agrécane est associé à l'acide hyaluronique et à une petite glycoprotéine de liaison ou "link protein" pour former de larges agrégats (112).

La protéine axiale de l'agrécane est composée de trois domaines : la partie N-terminale, la partie centrale et la partie C-terminale qui constituent respectivement les domaines I, II et III (Figure 5).



**Figure 5: Structure protéique de l'agrécane et de la protéine de liaison du cartilage articulaire**  
d'après Redini et al.(413).

**Le domaine I** ou partie N-terminale possède deux domaines globulaires G1 et G2 séparés par une zone interglobulaire. Les domaines globulaires sont riches en résidus cystéine qui permettent l'établissement de ponts disulfures et la formation de boucles répétitives. Le domaine globulaire G1 contient le site d'interaction à l'acide hyaluronique (AH), ce site est composé d'une boucle de type Immunoglobuline (Ig) et de deux boucles répétitives appelées "proteoglycan tandem repeat" (PTR1 et PTR2). Ce domaine globulaire G1 est un homologue de la protéine de liaison. Le complexe G1-AH-protéine de liaison est très stable (112). Le domaine globulaire G2, séparé du domaine G1 par une zone linéaire interglobulaire possède les deux boucles PTR1 et PTR2, mais il ne possède pas la boucle Ig (413). Le domaine globulaire G2 est incapable de lier l'AH, la protéine de liaison ou le collagène. Cependant, il a été suggéré que le domaine G2 pourrait inhiber la sécrétion d'agrécane de mauvaise qualité,

jouant ainsi un rôle de garant de la production d'une molécule d'agrécan fonctionnelle et mature (244).

**Le domaine II** ou domaine central, correspond à la région substituée par les chaînes de GAG. Ce domaine peut être divisé en deux domaines, le domaine kératane sulfate (KS) et le domaine chondroïtine sulfate (CS). Le domaine KS est substitué par environ 30 chaînes KS chez l'humain. Ce domaine KS interagirait avec les fibrilles de collagène pour permettre l'assemblage et l'intégrité des agrégats et donc contribuer au développement tissulaire (194). Le domaine KS pourrait également jouer un rôle positif dans le processus de sécrétion de l'agrécan (244). Le domaine CS, lui, est substitué par une centaine de chaînes de CS et peut être divisé en deux régions, CS1 et CS2. Ce domaine CS a pour fonction majeure de maintenir l'hydratation du cartilage (112).

**Le domaine III** ou domaine C-terminal correspond au domaine globulaire G3, contenant des analogies de séquence avec des molécules de nature différentes. On retrouve donc un module de type lectine, un ou plusieurs modules de type Epidermal Growth Factor (EGF) et un domaine de type protéine régulatrice du complément (CRP). Le module lectine pourrait jouer un rôle dans les interactions cellules-cellules ou cellules-matrice (413). Par ailleurs, il a été suggéré que le domaine G3 pourrait moduler la formation du réseau d'agrécats. Le domaine G3 serait associé, en général, à l'agrécan immature fraîchement synthétisé (113).

Les protéoglycans, à forte concentration, créent une pression osmotique élevée ce qui permet de retenir l'eau dans le cartilage articulaire (243).

#### L'acide hyaluronique :

L'acide hyaluronique (AH) est synthétisé sous la forme d'une longue chaîne polymère non branchée et chargée négativement. Il s'agit d'une répétition de disaccharides d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine reliés par des liaisons alternées de type  $\beta_{1-3}$  et  $\beta_{1-4}$ . La synthèse de l'AH est différente de celle des PG, puisqu'il n'est pas modifié, c'est-à-dire sulfaté, après sa synthèse (486). L'AH possède des caractéristiques hydrodynamiques remarquables. Il permet l'établissement d'une viscosité élevée et est capable de retenir de grandes quantités d'eau. Ainsi il joue un rôle important dans l'homéostasie et l'intégrité tissulaire (486). L'AH interagit avec les PG dans le cartilage articulaire, mais également avec d'autres molécules importantes pour l'assemblage des MEC (485). L'AH, de part ses propriétés lubrifiantes, est utilisé en injection intra-articulaire dans le traitement de la douleur associée à l'arthrose (342).

### Les petits protéoglycanes

Ce sont la décorine, la fibromoduline et le biglycane, ces trois PG appartiennent à la famille des petits protéoglycanes riches en leucine. Leur structure est composée d'un domaine central riche en leucine, encadré de part et d'autre par des domaines à cystéine (318). Les chaînes de GAG sont localisées soit au niveau N-terminal, soit sur le domaine central. Ces petits protéoglycanes peuvent intervenir dans l'adhésion cellulaire via leurs interactions avec la fibronectine ou la thrombospondine. La décorine et la fibromoduline peuvent réguler la fibrillogenèse des collagènes en organisant l'espacement entre les fibrilles de collagène II (141). Par ailleurs, la décorine en se liant aux facteurs de croissance de type TGF- $\beta$ , régule leur stabilité, leur biodisponibilité et leurs activités biologiques (439).

### Les protéoglycanes de surface

Ce sont des protéoglycanes liés à la membrane plasmique du chondrocyte. Ils sont divisés en 4 familles en fonction du type d'association avec la membrane plasmique. Les syndécanes et bétaglycanes sont liés à la membrane directement grâce à une région hydrophobe de leur axe protéique. Le glypicane est lié à la membrane plasmique, indirectement via un groupement glycosyl phosphatidyl inositol. Enfin, le perlécane interagit avec la membrane plasmique via des interactions entre ses chaînes de GAG et les intégrines de surface. Leurs rôles seraient de transduire les signaux extracellulaires vers les compartiments intracellulaires. Ils peuvent également fixer des cytokines et ainsi réguler leurs actions en contrôlant leurs biodisponibilités (432). Ces fonctions leur permettent de réguler la prolifération et la différenciation cellulaire.

#### *1.2.2.4 Les autres constituants*

La "cartilage oligomeric matrix protein" COMP est une protéine non collagénique de la MEC du cartilage articulaire. Son dosage dans le liquide synovial peut être utilisé pour diagnostiquer et évaluer précocement une polyarthrite rhumatoïde (515). Elle contribue aussi à l'intégrité structurale du cartilage hyalin en formant des ponts entre les collagènes II et IX (170). Par ailleurs, des mutations dans le gène de la COMP sont à l'origine de chondrodysplasies (434).

La lubricine est une glycoprotéine de 227 KDa présente dans le liquide synovial et qui participe à la lubrification de l'articulation (121). La lubricine est codée par le gène *PRG4* et sécrétée par les fibroblastes synoviaux. La "Superficial Zone Protein" (SZP) est une protéine de 345 KDa et est également un produit du gène *PRG4*. La SZP présente une forte homologie

avec la lubricine et est exprimée par les chondrocytes de la zone superficielle du cartilage articulaire, mais pas par les chondrocytes de la zone intermédiaire et de la zone profonde (417). La dégradation du cartilage observée dans les cas de polyarthrite rhumatoïde fait suite à une augmentation des forces de frictions dans l'articulation. Cette augmentation des forces de friction est due en partie à une diminution de la lubrification, résultant d'une diminution de la synthèse de lubricine par les fibroblastes synoviaux et de SZP par les chondrocytes de la zone superficielle (120). Les souris invalidées pour le gène *Prg4* codant la lubricine et la SZP montrent des signes d'hyperplasie synoviale, de fibrose de la subintima et un dépôt protéique à la surface du cartilage articulaire (417). Cette dysfonction articulaire est très similaire à celle observée chez l'homme dans le syndrome associant camptodactylie, arthropathie, coxa vara et péricardite (CACP) (300).

La fibronectine présente dans le cartilage articulaire semble jouer un rôle dans la structure et la fonction du cartilage normal ou dégénératif. Des études récentes montrent qu'une portion de la fibronectine cartilagineuse est substituée par des chaînes de GAG, ce qui pourrait faciliter son interaction avec les autres composants du cartilage. La fibronectine possède également des domaines de liaisons avec l'héparine, les chondrocytes et le collagène (60).

Les intégrines, qui constituent la plus grande famille des protéines d'adhésion cellulaires (CAM: Cell adhesion Molecule), sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques, composées d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  liées de façon non covalente. Il existe 18 sous unités  $\alpha$  et 8 sous unités  $\beta$  différentes (215). L'association d'une sous unité  $\alpha$  et d'une sous unité  $\beta$  détermine la spécificité de reconnaissance du récepteur (256). Dans le cartilage articulaire, l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$ , qui est le récepteur de la fibronectine, régule certaines fonctions du chondrocyte comme la différenciation, le remodelage de la MEC et les réponses aux stimuli mécaniques (282).

L'annexine V est un récepteur des collagènes de type II et X et un transporteur de calcium. L'annexine V est retrouvée au niveau de la zone superficielle du cartilage. Cependant, elle semblerait jouer un rôle dans le processus de minéralisation de la MEC cartilagineuse par les chondrocytes hypertrophiques (249).

### 1.2.3 Les propriétés biomécaniques du cartilage articulaire

Le cartilage est, de par sa constitution, considéré comme un matériau visco-élastique et perméable qui consiste en 3 phases :

- une phase solide, qui est majoritairement composée d'un réseau fibrillaire dense de collagène et d'une haute concentration d'agrégats de protéoglycanes.
- une phase d'eau fluide.
- une phase contenant des électrolytes dissout ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  etc..) pour neutraliser les charges fixées à la matrice solide (214).

Pour réaliser sa fonction d'amortissement et de distribution des charges et des pressions, le cartilage articulaire est capable de se déformer. Pour cela, il doit résister à différentes contraintes, des forces de compression, de tension et de cisaillement. Le cartilage articulaire doit donc présenter une résistance à ces trois types de forces (491).

Lorsque le cartilage articulaire est soumis à une pression, le fluide interstitiel est chassé à travers la MEC perméable, ce qui génère une force de friction au sein de cette MEC. Si la compression augmente, la taille des pores dans la matrice diminue, ce qui entraîne une diminution de la perméabilité de la MEC (516). Ce processus conduit à augmenter la résistance de la MEC à l'écoulement du fluide interstitiel et, par conséquent, à accroître les forces de friction. Cela empêche alors une évacuation trop rapide du fluide interstitiel (491). Le fluide interstitiel amortit et répartit les charges de façon à ce que seulement 15 à 40% de la pression de charge soit appliquée sur la phase solide. Cette capacité des phases solides et liquides à réguler le stress interne donne au cartilage articulaire son comportement visco-élastique.

Si le cartilage est exposé à un impact brusque, la phase fluide n'a pas le temps de sortir de la MEC et la pression appliquée sur la phase solide devient très importante. Si l'impact est suffisamment fort, il peut entraîner des lésions du réseau macromoléculaire, des cellules et de l'os sous-chondral. En conditions physiologiques, l'os sous-chondral est protégé par la fonction d'amortissement et de distribution des charges du cartilage articulaire (91).

#### 1.2.4 Remodelage interne de la matrice extracellulaire :

La mobilisation d'une articulation stimule l'activité de synthèse des chondrocytes ainsi que le remodelage de la MEC. Inversement, l'immobilisation entraîne une réduction de la synthèse des PG (391). L'environnement physico-chimique et mécanique des chondrocytes est constamment modifié, et cela influence leurs activités de synthèse et de dégradation. La mise en charge du cartilage modifie la composition intracellulaire des chondrocytes, comme le volume cellulaire, le pH, la charge ionique (184), et crée des signaux qui vont participer à la régulation du remodelage et du renouvellement de la MEC, par un remplacement continu

des composants matriciels dégradés (60). Le remodelage de la MEC est aussi influencé par les cytokines, comme les interleukines, les interférons, les TNF (tumor necrosis factors) et les facteurs de croissance. Les cytokines peuvent induire la dégradation de la MEC, via la production d'enzymes protéolytique comme les collagénases ou les protéases. L'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), libérée par les chondrocytes, ou les synoviocytes, induit l'expression de MMP comme la stromelysine qui vont dégrader l'agrecane et le collagène IX (421). Le TNF- $\alpha$  et l'interferon- $\gamma$  inhibent la synthèse et stimulent la dégradation des collagènes et PG (150). Certaines cytokines ou facteurs de croissance, comme le PDGF (platelet-derived growth factor), le FGF, l'IGF (insulin growth factor) et le TGF- $\beta$  peuvent stimuler la synthèse d'ADN et des protéines matricielles. Plusieurs hormones comme l'hormone de croissance, l'insuline, la calcitonine et les androgènes stimulent la prolifération des chondrocytes et la synthèse des macromolécules, alors que les glucocorticoïdes ont l'effet contraire (143). Ces données montrent que la biologie du cartilage dépend de façon étroite de nombreux paramètres physiques (force mécanique), chimiques (pression osmotique) et biologiques (facteurs de croissance).

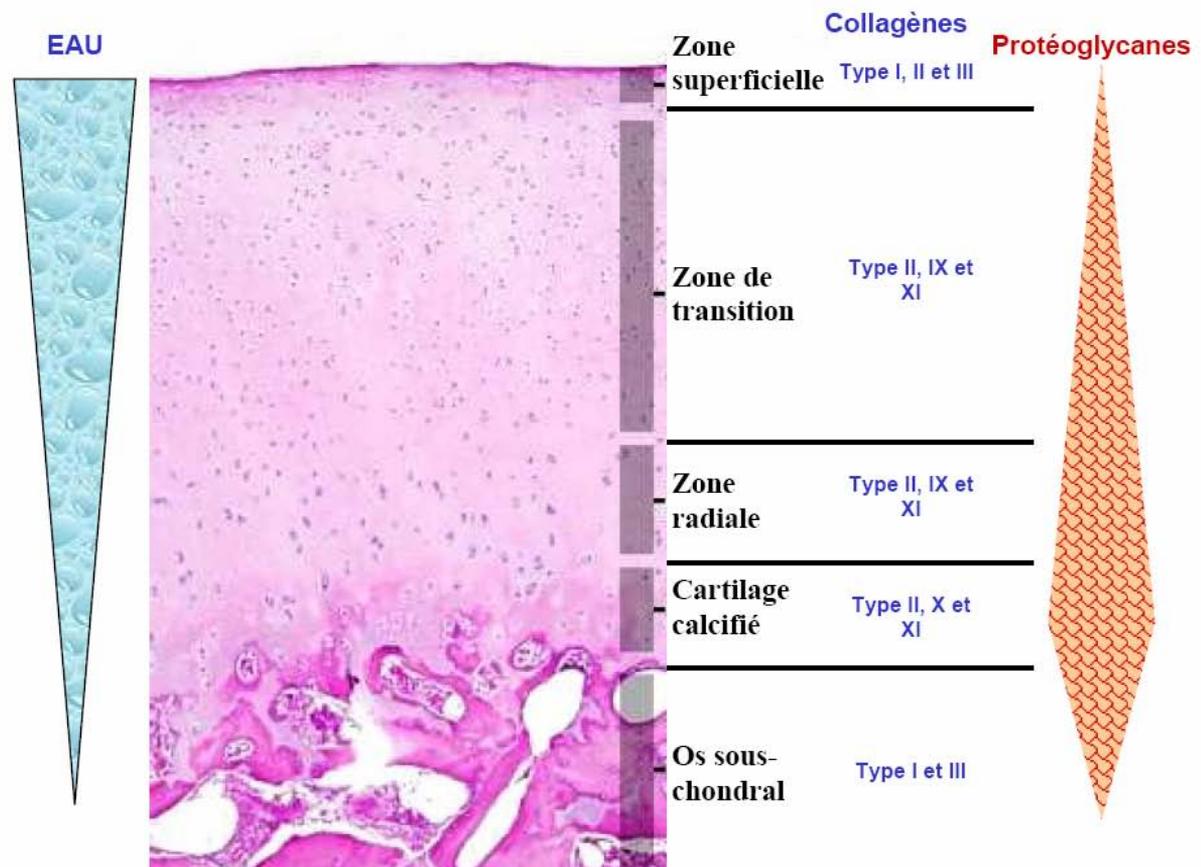
### **1.3 Histologie du cartilage articulaire**

La composition et l'organisation histologique du cartilage articulaire varie en fonction de l'âge mais également en fonction de sa position par rapport à la surface articulaire (153). En effet, les chondrocytes ainsi que les collagènes, les protéoglycanes et autres protéines sont organisés dans un ordre défini qui permet de distinguer 4 zones dans le cartilage articulaire (Figure 6)

#### **1.3.1 La zone superficielle**

Cette zone superficielle, en contact avec le liquide synovial, constitue la surface de glissement du cartilage, et représente 5 à 10 % de l'épaisseur du cartilage. Cette zone superficielle peut être divisée en deux sous-couches :

Une première couche constituée d'une matrice acellulaire, contenant de fines fibrilles de collagène I, II et III et contenant peu de protéoglycanes.



**Figure 6: Structure histologique du cartilage articulaire**

Modifié d'après Clément-Bouheddi (89)

Une couche plus profonde dans laquelle se trouve des chondrocytes plats et ellipsoïdaux orientés parallèlement à la surface articulaire. Les chondrocytes de cette zone synthétisent des petites fibres de collagène de 30nm de diamètre. Ces fibres de collagène sont disposées parallèlement à la surface articulaire. Les chondrocytes de cette zone synthétisent la lubricine. En revanche, ces chondrocytes synthétisent moins de PG que dans les autres régions. Dans cette zone, les chaînes de CS sont majoritaires par rapport aux chaînes de KS ce qui constitue une barrière imperméable à la diffusion d'hormones et de nutriments mais perméable à l'eau et à l'oxygène. L'orientation des fibres de collagène ainsi qu'une association collagène-PG plus forte permet à la zone superficielle de protéger le cartilage sous-jacent des forces de déchirements ou de cisaillements générées lors de l'activité articulaire (420).

### 1.3.2 La zone de transition

La zone de transition occupe 40 à 50% de l'épaisseur du cartilage articulaire. Dans cette zone, les chondrocytes sont de forme arrondie ou ovale et ont une taille supérieure à ceux de la

couche superficielle. Ils sont disposés de façon anarchique dans la MEC. Les chondrocytes de la zone de transition sont métaboliquement actifs et ont une forte activité de synthèse de protéoglycanes et de collagènes. Les collagènes synthétisés sont les collagènes de type II, IX et XI sous forme de fibres épaisses de 30 à 80nm de diamètre. Ces fibres s'entrecroisent obliquement et forment un réseau non orienté moins dense que dans la couche superficielle.

### 1.3.3 La zone radiale

La couche radiale occupe environ 30 à 40% de l'épaisseur du cartilage articulaire. Son nom provient de l'orientation radiale des cellules et des fibres de collagène qui constituent cette couche. Les chondrocytes sont de morphologie sphérique et disposés en colonnes perpendiculaires à la surface articulaire. Le contenu en protéoglycanes est important, alors que le contenu en eau y est le plus faible de tout le cartilage articulaire. Les fibres de collagène, toujours composées des collagènes II, IX et XI y sont les plus épaisses (environ 100 nm de diamètre). Par ailleurs, ces fibres de collagènes sont orientées verticalement par rapport à la surface articulaire et cette orientation confère au cartilage ses propriétés de résistance aux forces de compression.

### 1.3.4 La couche de cartilage calcifiée

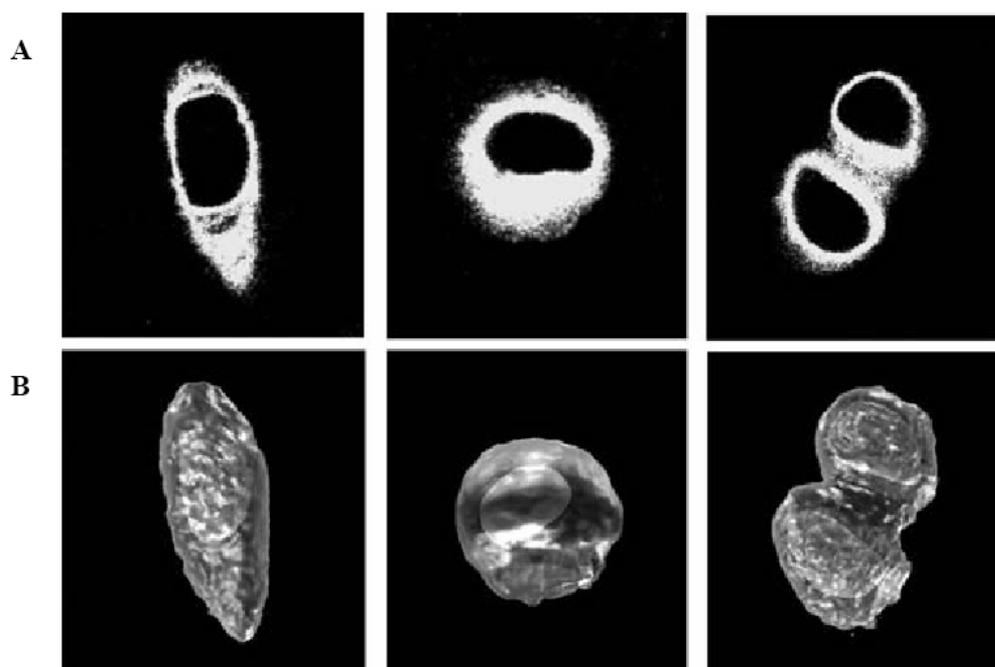
La couche calcifiée, comme la couche superficielle, ne représente que 5 à 10% de l'épaisseur du cartilage. Cette couche sépare le cartilage articulaire de l'os sous-chondral. L'agencement des protéines de la MEC dans cette zone est très proche de celle observée dans la zone radiale. Les chondrocytes en nombre limités sont hypertrophiques et synthétisent du collagène de type X en plus des collagènes II et XI. Une apatite biologique carbonatée se dépose sur les fibres de collagène qui pénètrent directement dans l'os épiphysaire permettant ainsi l'ancrage du cartilage. La couche de cartilage calcifié est séparée des couches de cartilage non minéralisé par une ligne dense appelée "tidemark". Cette ligne dense est riche en fibre de collagène et contient de l'acide hyaluronique, mais elle semble ne pas contenir de GAG (288).

### 1.3.5 Les zones de la matrice extracellulaire

La MEC présente aussi une certaine hétérogénéité en fonction de la distance par rapport aux chondrocytes enfermés dans un chondron. Ainsi, la MEC peut être classifiée en régions distinctes appelées matrice péricellulaire, matrice territoriale et matrice interterritoriale.

#### 1.3.5.1 La matrice péricellulaire

La zone péri-cellulaire est une région circonscrite entourant le chondrocyte. L'association matrice periculaire et chondrocyte constitue une entité micro-anatomique du cartilage appelée "le chondron" (Figure 7) (406). La matrice péri-cellulaire contient dans l'ensemble les mêmes constituants que les autres zones de la MEC, tels que les collagènes de type II, IX, XI, l'agrécan et la fibromoduline. C'est une zone qui se distingue par la présence unique du collagène de type VI dans le cartilage normal. Cette zone comporte également des taux de PG sulfatés élevés, notamment des concentrations élevées en agrécane, en acide hyaluronique et en protéine de liaison(405). Il a été suggéré que cette zone pourrait réguler le micro environnement biomécanique et biochimique du chondrocyte (180). Il a également été supposé que le "chondron" servirait de transducteur des signaux mécaniques (527).



**Figure 7: le chondron.** A) marquage immunofluorescent du collagène VI. B) reconstruction 3D du chondron. Des variations significatives dans la taille et la forme du chondron sont observées en fonction de sa localisation dans le cartilage. D'après Guilak et *al.* (178)

#### 1.3.5.2 *La matrice territoriale*

La matrice territoriale entoure la matrice péri-cellulaire des chondrocytes soit isolés soit organisés en îlots ou encore organisés en colonnes, comme c'est le cas dans la zone radiale. Les fibres de collagène plus épaisses de cette zone forment des paquets et semblent directement adhérentes à la matrice péri-cellulaire. Les fibres de collagène forment comme une

cage fibrillaire autour des cellules et assurent ainsi la protection mécanique des chondrocytes. Cette zone est également concentrée en PG riches en chaînes de CS.

### 1.3.5.3 La matrice interterritoriale

La matrice interterritoriale est celle qui confère les propriétés mécaniques au cartilage articulaire. Ce sont les fibres de collagène de cette matrice interterritoriale qui passent d'une orientation tangentielle dans la zone superficielle à une orientation radiale dans la zone radiale. La matrice interterritoriale constitue la fraction la plus large de la matrice cartilagineuse. La matrice interterritoriale contient des PG riches en chaînes de KS et les fibres de collagène les plus larges.

## 1.4 Formation du cartilage : la chondrogenèse

La chondrogenèse est le processus de formation du cartilage au cours duquel les chondrocytes se différencient et deviennent mature. La chondrogenèse a surtout été étudiée au niveau de la plaque de croissance et très peu dans le cartilage articulaire.

La chondrogenèse est le processus qui conduit à la formation du cartilage de la plaque de croissance, qui joue un rôle important dans l'ossification endochondrale. La chondrogenèse permet également la formation de cartilage permanent comme le cartilage articulaire (270). La chondrogenèse est initiée par la différenciation de cellules mésenchymateuses dérivant de trois sources principales :

- les cellules des crêtes neurales d'origine ectodermique, qui donneront les os du crâne et de la face,
- les cellules du sclérotome du mésoderme para axial ou des somites, qui donneront le squelette axial (côtes, vertèbres),
- les cellules de la somatopleure du mésoderme de la plaque latérale, qui donneront le squelette appendiculaire (membres),

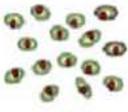
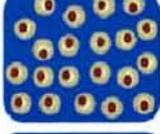
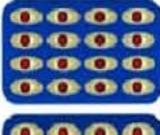
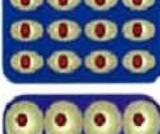
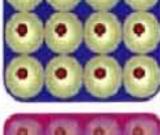
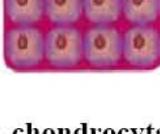
La chondrogenèse, comme décrit lors des processus d'ossification endochondrale, se déroule en plusieurs étapes:

- condensation des cellules mésenchymateuses et orientation vers le lignage chondrocytaire,
- différenciation chondrocytaire,
- prolifération des chondrocytes,
- différenciation pré hypertrophique et hypertrophique des chondrocytes,
- minéralisation de la matrice cartilagineuse et remplacement par de l'os,

#### 1.4.1 Condensation des cellules mésenchymateuses et orientation

La condensation des cellules mésenchymateuses est le résultat de l'association de 2 processus : l'augmentation de l'activité mitotique et l'agrégation des cellules à partir d'un centre (185).

Les cellules mésenchymateuses migrent sur les sites présomptifs de la squelettogénèse et vont se condenser en une masse cellulaire. Cette condensation cellulaire est initiée par une stimulation de la synthèse de molécules d'adhésions comme la N-CAM et la N-Cadherine. Par ailleurs, le TGF- $\beta$  qui est parmi les signaux précoces de la condensation, stimule la synthèse de fibronectine qui à son tour régule celle de N-CAM (101, 185). Au centre de ces condensations cellulaires, des cellules se différencient, ce qui inhibe l'expression des marqueurs mésenchymateux et stimule l'expression des marqueurs cartilagineux comme le collagène II ou le facteur de transcription Sox9. Le facteur de transcription Sox9 joue un rôle essentiel dans l'orientation des cellules mésenchymateuses vers la différenciation chondrogénique. L'expression de Sox9 est stimulée dans les cellules mésenchymateuses chondroprogénitrices avant la condensation et il reste hautement exprimée dans les préchondrocytes et chondrocytes. L'expression de Sox9 est finalement inhibée lorsque les cellules atteignent un stade préhypertrophique (364). Lorsque Sox9 est inactivé dans des embryons de souris, cela entraîne une absence des éléments cartilagineux appendiculaires (9). Sox9 est donc nécessaire à la condensation préchondrogénique et joue un rôle majeur au cours de la formation du cartilage. Cependant, d'autres facteurs contrôlent la migration, la prolifération, la survie et la condensation des cellules mésenchymateuses. Ainsi le fibroblast growth factor (FGF), sonic hedgehog (SHH), les BMP et la voie Wnt contrôlent les signaux le long des axes dorso-ventral et antéro-postérieur afin d'assurer la formation d'un modèle cartilagineux équilibré (481). Barx2, un facteur de transcription à homéodomaine, est hautement exprimé dans les condensations mésenchymateuses préchondrogéniques, et reste également exprimé dans les articulations en développement et dans le cartilage articulaire (320). Par ailleurs, Barx2 se lie au domaine activateur spécifique du cartilage sur le promoteur du gène *COL2A1 in vivo*. Barx2 pourrait coopérer avec Sox9 dans les stades précoces de développement du cartilage. Malgré tout, le rôle de Barx2 *in vivo* reste encore à élucider.

Stades de différenciation	Caractères histologiques	Marqueurs de la MEC	Marqueurs régulateurs
Cellules mésenchymateuses préchondrogéniques		<i>COL1A1</i>	<i>Sox9, Runx2</i>
Préchondrocytes		<i>Ncam1, COL2A1</i>	<i>Sox9 (sox5, sox6)</i>
Chondrocytes précoces		<i>COL2A1, Agrécan, COMP</i>	<i>sox5, sox6, Sox9 (fgfr3, Atf2, Nkx2.3)</i>
Chondrocytes prolifératifs		<i>COL2A1, Agrécan, COMP</i>	<i>sox5, sox6, Sox9 (fgfr3, Atf2, Nkx2.3)</i>
Chondrocytes préhypertrophiques		<i>COL2A1, Agrécan, COMP, COL10A1</i>	<i>Pthr1, Ihh, Runx2, Runx3</i>
Chondrocytes hypertrophiques		<i>COL10A1</i>	<i>Runx2, Runx3, Vegf, (c-Maf)</i>
Chondrocytes terminaux		<i>MMP-13, ostéopontine</i>	<i>Runx 2, c-Maf</i>

**Figure 8 : la différenciation chondrocytaire au cours de l'ossification endochondrale des os longs.** Représentation schématique des différents stades et voies de différenciation des chondrocytes, ainsi que les principales caractéristiques histologiques, les principaux marqueurs matriciels et régulateurs exprimés au cours de l'ossification endochondrale. Modifié d'après Lefebvre et *al.* (270).

#### 1.4.2 Différenciation chondrocytaire

La différenciation des chondroprogéniteurs en chondrocytes est une étape nécessaire pour la poursuite et la bonne réalisation des différents stades de la chondrogenèse. Cette différenciation en chondrocytes est essentiellement caractérisée par le dépôt d'une MEC contenant des collagènes de type II, IX et XI et de l'agrécane.

Le facteur de transcription Sox9 est nécessaire à l'expression du gène du collagène II et à l'expression de certaines autres molécules matricielles incluant le collagène XI. Deux autres membres de la famille Sox, L-Sox5 et Sox6, qui ne sont pas présents précocement lors de la condensation mésenchymateuse, sont importants voire critiques pour la différenciation chondrocytaire (268). L-Sox5 et Sox6 sont co-exprimés avec Sox9 pendant la différenciation chondrocytaire. L-Sox5 et Sox6 peuvent former des homo ou des hétéro dimères, mais

contrairement à Sox9, ils ne possèdent pas de domaine d'activation ou d'inhibition de la transcription et doivent possiblement agir en facilitant l'organisation des complexes transcriptionnels (270). Des expérimentations *in vitro* ont suggérés que Sox9 et L-Sox5/Sox6 coopèrent les uns avec les autres pour directement activer l'expression du gène *COL2A1* (33 , 269). L-Sox5 et Sox6 sont également nécessaires, à l'expression des gènes codant pour le collagène IX, l'agrécan et la protéine de liaison. *In vivo*, il a été montré que l'expression forcée de Sox9, L-Sox5 et Sox6, dans des cellules non-chondrogéniques, est suffisante pour induire l'expression des marqueurs chondrocytaires (220), et est aussi capable de supprimer l'expression des marqueurs de l'hypertrophie et du phénotype ostéoblastique. Le TGF- $\beta$  et la BMP-2 par ailleurs, augmentent les effets de la triade Sox9/L-Sox5/Sox6, ce qui suggère qu'un autre facteur de transcription encore non identifié semblerait agir avec la triade Sox pour promouvoir la différenciation chondrocytaire.

#### 1.4.3 Prolifération des chondrocytes

Les chondrocytes métaphysaires des os longs en développement commencent à s'organiser en colonnes alors que les chondrocytes diaphysaires ont déjà atteint le stade préhypertrophique et s'orientent vers la différenciation terminale.

Au départ, petits et ronds, les chondrocytes s'aplatissent et s'organisent en colonnes parallèles. Au sein de ces colonnes, les chondrocytes les plus éloignés du centre d'ossification présentent le plus fort taux de prolifération. Ce taux de prolifération diminue ensuite progressivement à l'approche du centre d'ossification (457). Puis, les chondrocytes cessent de proliférer dès qu'ils atteignent, couche par couche, le stade de différenciation préhypertrophique. En ce qui concerne l'expression des gènes, il n'y a pas de marqueur spécifique de ces cellules, mais il est bien établi que les expressions de certains gènes sont augmentées. Des gènes codant pour des protéines de la MEC tels que l'agrécan et COMP, et des gènes codant pour des régulateurs de la différenciation ou de la prolifération, tels que FGFR3 (récepteur de type 3 au FGF), Ihh (Indian hedgehog) ou PTHrP (parathyroïd hormone related peptide) sont augmentés. Durant toute la chondrogenèse, la balance des signaux BMP et FGF détermine le taux de prolifération des chondrocytes (336). En effet, la BMP-7 est exprimée dans les chondrocytes prolifératifs, alors que les chondrocytes hypertrophiques expriment la BMP-6 et la BMP-2. Par ailleurs, l'effet des signaux des FGFs dépend de leurs expressions, mais également de l'expression de leurs récepteurs (378). En effet, le FGFR2 (récepteur de type 2 au FGF) est exprimé précocement dans les condensations mésenchymateuses et tardivement en périphérie des condensations. L'expression de FGFR3

est, elle, associée aux chondrocytes prolifératifs. Dans la plaque de croissance, FGFR3 est un régulateur important de la prolifération des chondrocytes (426). L'expression du FGFR1 est augmentée dans les chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques, suggérant un rôle dans la survie, la différenciation ou la mort cellulaire (378).

D'autres facteurs de transcriptions sont importants pour réguler le maintien, la prolifération et la maturation des chondrocytes ainsi que l'organisation des colonnes prolifératives. L-Sox5 et Sox6 sont absolument nécessaires au développement et au maintien des colonnes de chondrocytes prolifératifs. Ceci a été démontré par l'absence de colonnes de chondrocytes prolifératifs dans les souris double mutants (L-Sox5 et Sox6), alors que la zone préhypertrophique est présente (458). Sox9, en revanche, semble inhiber la prolifération des chondrocytes. Les souris surexprimant Sox9 présentent, en effet, des colonnes de chondrocytes prolifératifs raccourcies (10).

Runx2 (runt domain transcriptional activator-2 ou core binding factor  $\alpha 1$  :Cbfa1) stimule la prolifération et l'organisation des chondrocytes en colonnes. Runx2 est ensuite exprimé dans les chondrocytes hypertrophiques et au cours de la différenciation terminale des chondrocytes. Les souris invalidées pour Runx2 présentent une diminution de la prolifération des chondrocytes et une maturation chondrocytaire perturbée (221). Ce rôle important de Runx2 sur les chondrocytes prolifératifs est indirect et serait réalisé via une activation de l'expression de Ihh dans les chondrocytes préhypertrophiques. En effet, Ihh a été montré stimuler la prolifération des chondrocytes en colonnes (465).

#### 1.4.4 Différenciations pré hypertrophique et hypertrophique des chondrocytes

La différenciation des chondrocytes prolifératifs en chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques représente un changement phénotypique important. En plus d'activer le cycle cellulaire, les chondrocytes augmentent leur volume cytoplasmique de plus de 10 fois. Au stade pré hypertrophique, les chondrocytes expriment plus d'ARNm codant pour le collagène II, l'agrécan et les autres protéines matricielles que les chondrocytes prolifératifs. De plus, les chondrocytes préhypertrophiques activent séquentiellement l'expression des gènes codants pour PTH, le récepteur du PTHrP, Ihh et le collagène X. Au stade hypertrophique, les chondrocytes cessent d'exprimer les gènes précoces du cartilage et expriment le récepteur de PTHrP et Ihh. Le récepteur au PTHrP et Ihh stimulent l'expression du collagène X et activent l'expression des gènes *Vegf* (vascular endothelial growth factor, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) (41).

Dans le reste de la maquette cartilagineuse, la boucle de régulation négative PTHrP/Ihh ainsi que les voies de signalisations FGF, BMP jouent un rôle important dans le contrôle du nombre de chondrocytes qui vont se différencier vers la préhypertrophie (255). Ihh, exprimé par les chondrocytes préhypertrophiques, inhibe la différenciation hypertrophique des chondrocytes et retarde la minéralisation. Ihh stimule également la synthèse de PTHrP dans les chondrocytes périarticulaires. PTHrP va alors bloquer la différenciation des chondrocytes prolifératifs, ce qui va diminuer le nombre de chondrocytes préhypertrophiques et ainsi diminuer l'expression d'Ihh, créant ainsi une boucle de régulation négative (408).

L-Sox5 et Sox6, retardent la préhypertrophie, mais sont nécessaires à l'hypertrophie. Dans les embryons de souris invalidés pour Sox5 et Sox6, les chondrocytes s'orientent prématurément vers le stade préhypertrophique (457). Ces chondrocytes expriment FGFR3 ce qui favorise leur maturation. Chez les souris invalidées pour Sox5/Sox6, les chondrocytes préhypertrophiques ne deviennent pas hypertrophiques et n'expriment pas le collagène X. Les expressions de L-Sox5, Sox6 et Sox9 sont réprimées dans les chondrocytes hypertrophiques, ce qui explique la perte d'expression des marqueurs précoces du cartilage observée lors de l'hypertrophie.

Runx2 est important dans l'induction de l'hypertrophie. En effet, les souris déficientes en Runx2 présentent une absence de cartilage hypertrophique et d'os (193). Par ailleurs, Runx2 stimule la synthèse de collagène X (531) et également l'expression d'Ihh (526). Enfin, l'expression de Runx2 est inhibée par PTHrP (273, 274). Ceci suggère fortement que Runx2 fait partie de la boucle de régulation négative PTHrP/Ihh qui contrôle la maturation des chondrocytes dans la plaque de croissance.

#### 1.4.5 Différenciation terminale des chondrocytes

Les chondrocytes hypertrophiques subissent une nouvelle fois un bouleversement phénotypique lors de leur différenciation terminale. Lors de cette transition, les chondrocytes perdent l'expression du collagène X et activent l'expression de nouveaux gènes tels que la matrice metalloproteinase-13 (MMP13), l'ostéopontine (OPN) et la phosphatase alcaline (ALP) qui sont aussi des marqueurs ostéoblastiques. Comme les ostéoblastes, les chondrocytes, lors de leur différenciation terminale, sont capables d'induire la calcification de la MEC. L'ossification endochondrale nécessite l'invasion de cette MEC calcifiée par des vaisseaux sanguins, puis l'ossification de la MEC. Ensuite, le devenir des chondrocytes est sujet à controverse; soit ils meurent par apoptose (290), soit ils se trans-différencient vers un

phénotype ostéoblastique. L'hypothèse la plus acceptée reste que la majorité des chondrocytes meurent par apoptose.

L'angiogénèse, impliquant l'invasion du périchondre et de la zone hypertrophique par les vaisseaux sanguins est nécessaire au remplacement de la matrice cartilagineuse par de l'os (41, 92). Le facteur angiogénique, VEGF-A induit l'invasion vasculaire, grâce à des récepteurs spécifiquement localisés, tels que la neuropiline 1 (Npn1) exprimée dans les chondrocytes hypertrophiques tardifs, ou encore Npn2 exprimée exclusivement dans le périchondre. Le VEGF-A est relargué de la MEC grâce aux MMP-9 et MMP-13. La MMP-13 semble coopérer avec la MMP-9 en dégradant la MEC non-minéralisée dans la zone d'hypertrophie tardive lors de l'ossification (379, 501). Un autre facteur apparaît important les plaques de croissance n'étant pas vascularisées, elles se trouvent en condition hypoxique. Cette faible tension en oxygène induit l'expression du facteur HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia Inducible factor 1  $\alpha$ ). HIF-1 $\alpha$  régule la survie des chondrocytes et participe à l'angiogénèse en induisant la sécrétion du VEGF-A (430). Ce remodelage de la MEC cartilagineuse ainsi que l'invasion vasculaire sont des prérequis à la migration et à la différenciation des ostéoblastes et ostéoclastes, qui vont remplacer la MEC cartilagineuse par de l'os.

Cette minéralisation de la MEC telle que nous vous l'avons décrite ci-dessus peut aussi être observée dans des sites anatomiques ectopiques où une calcification n'apparaît qu'en présence de conditions pathologiques. Un des sites majeurs de calcification ectopique se situe dans les vaisseaux. La minéralisation vasculaire et en particulier artérielle, reprend toute une partie des processus biologiques de formation du cartilage. Ces deux processus ont donc été comparés dans un article de revue (article 1).

*Article 1 : Formation du cartilage dans la plaque de croissance et dans les artères : de la physiologie à la pathologie*

**Résumé :**

Les calcifications vasculaires sont la conséquence de plusieurs conditions pathologiques comme l'athérosclérose, le diabète, l'hypercholestérolémie et l'insuffisance rénale chronique. Les calcifications vasculaires sont associées à des risques d'amputation, d'ischémie cardiaque, d'accident vasculaire cérébral et une augmentation de la mortalité.

Il est de plus en plus évident que les cellules musculaires lisses des vaisseaux (VSMC) s'engagent vers la voie de différenciation chondrogénique conduisant généralement à la calcification des vaisseaux par des mécanismes semblables à ceux gouvernant l'ossification de la plaque de croissance. Notre connaissance de la formation du cartilage de la plaque de croissance peut, par conséquent, nous aider à comprendre pourquoi et comment les artères se calcifient et ainsi permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Réciproquement, l'analyse des événements conduisant à une différenciation chondrocytaire ectopique apparaît importante pour améliorer notre compréhension de la formation du cartilage de la plaque de croissance. Dans ce contexte, les facteurs connus ou suspectés pour avoir un effet stimulant sur la différenciation chondrogénique dans la plaque de croissance et dans les artères seront passés en revue dans cet article.

## **Article I**

### **Cartilage formation in growth plate and arteries: from physiology to pathology**

D. Magne, M. Julien, C. Vinatier, F. Merhi-Soussi, P. Weiss, and J. Guicheux.

BioEssays (2005) 27: 708–716.

# Cartilage formation in growth plate and arteries: from physiology to pathology

D. Magne,<sup>1</sup> M. Julien,<sup>1</sup> C. Vinatier,<sup>1</sup> F. Merhi-Soussi,<sup>2</sup>  
P. Weiss,<sup>1</sup> and J. Guicheux<sup>1\*</sup>

## Summary

Vascular calcifications are the consequence of several pathological conditions such as atherosclerosis, diabetes, hypercholesterolemia and chronic renal insufficiency. They are associated with risks of amputation, ischemic heart disease, stroke and increased mortality. A growing body of evidence indicates that vascular smooth muscle cells (VSMCs) undergo chondrogenic commitment eventually leading to vascular calcification, by mechanisms similar to those governing ossification in the cartilage growth plate. Our knowledge of the formation of cartilage growth plate can therefore help us to understand why and how arteries calcify and, consequently, develop new therapeutic strategies. Reciprocally, thorough consideration of the events leading to ectopic chondrocyte differentiation appears crucial to further increase our understanding of growth plate formation. In this context, we will review the effects of known or suspected factors that promote chondrogenic differentiation in growth plate and arteries. *BioEssays* 27:708–716, 2005. © 2005 Wiley Periodicals, Inc.

## Introduction

Clavicles and some bones of the skull develop by intramembranous ossification, without a cartilage template, whereas vertebrate long bones form through a process called endochondral ossification, in which a cartilage template is replaced by a bony matrix (reviewed in Ref. 1). This process begins with the condensation of undifferentiated mesenchyme: cells from the core differentiate into chondrocytes, whereas cells at the periphery form the perichondrium (reviewed in Ref. 2). After a phase of proliferation, chondrocytes differentiate and produce collagen type II, IX and XI, and sulfated glycosaminoglycans. Then chondrocytes further differentiate and become hypertrophic, express type X collagen and their extracellular matrix (ECM) is mineralized by mechanisms that involve the release of matrix vesicles (MVs). After these phases of differentiation, a growing body of evidence indicates that chondrocytes undergo programmed cell death.<sup>(3–5)</sup> Finally, the calcified hypertrophic cartilage is invaded by capillaries and replaced by bone.

While ectopic calcifications have long been considered to result from a mere physicochemical precipitation of calcium phosphate, several recent studies have provided evidence that they may actually share many molecular and cellular features with bone and cartilage mineralization (reviewed in Ref. 6). During vascular calcification, both endochondral and intramembranous ossification may occur, depending on the pathological condition. Vascular calcifications develop in two distinct areas: in the intima and the media (reviewed in Ref. 7). Intimal calcification occurs in the context of atherosclerosis. Atherosclerosis is initially characterized by the intimal accumulation of lipid-rich macrophages and T lymphocytes (fatty streak). Subsequently, vascular smooth muscle cells (VSMCs) migrate from the media toward the intima in response to various stimuli such as chemotactic factors and mitogens possibly released from neighboring endothelium, activated macrophages within lesions and nearby VSMC.<sup>(8)</sup> VSMCs undergo proliferation, begin to accumulate lipid and initiate synthesis of ECM. Calcification then occurs in the core of the atherosclerotic plaque, in the vicinity of inflammatory cell infiltrate and cellular debris. Medial calcification occurs independently of intimal

<sup>1</sup>INSERM EM 99-03, Research Center on Osteoarticular and Dental Tissue Engineering, Nantes, France.

<sup>2</sup>Unité d'Oculogénétiq ue, Hôpital Ophtalmique Jules Gonin, Lausanne, Switzerland.

\*Correspondence to: Dr. J. Guicheux, INSERM EM 99-03, 1 place A. Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France.

E-mail: jerome.guicheux@nantes.inserm.fr

DOI 10.1002/bies.20254

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Abbreviations: AB, apoptotic bodies; ALP, alkaline phosphatase; CVC, calcifying vascular cell; ECM, extracellular matrix; glvr, gibbon ape leukemia virus receptor; GP, glycerophosphate; HIF, hypoxia inducible factor; MSC, mesenchymal stem cell; MS, Mönckeberg's sclerosis; MV, matrix vesicle; NaPiT, sodium-dependent Pi transporter; NCPs, non-collagenous proteins; OC, osteocalcin; OPN, osteopontin; PDGF, platelet-derived growth factor; Pi, inorganic phosphate; SMA, smooth muscle actin; TFs, transcription factors; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; VEGF, vascular endothelial growth factor; VSMC, vascular smooth muscle cell.

calcification and atherosclerosis. Calcification of the media in peripheral arteries is referred to as Mönckeberg's sclerosis (MS) and commonly occurs in aged and diabetic individuals.<sup>(9)</sup> Medial calcification is associated with elastin and VSMCs. Therefore, VSMCs may be associated with both intimal and medial calcifications.

The putative involvement of VSMCs in vascular calcification has been illustrated by a large number of in vitro studies indicating that, in some conditions, VSMCs are able to express osteoblast differentiation markers and induce ECM mineralization.<sup>(10–12)</sup> Because most if not all of the osteoblast markers investigated in these studies are also expressed in growth plate chondrocytes, it is not inconceivable that, in some cases, VSMCs rather undergo chondrogenic than osteogenic differentiation. In addition to most osteoblast markers, chondrocytes express several specific markers such as Sox9 transcription factor and collagen type II, IX, X and XI, which makes it possible to distinguish chondrogenic and osteogenic lineages. Investigations on these chondrocyte markers showed that VSMCs express Sox9<sup>(13)</sup> and type II and IX collagen<sup>(13,14)</sup> in vitro, which clearly indicates that they have the ability to undergo chondrogenic differentiation. In addition, human VSMCs express chondrocyte-specific markers in vivo both in intimal calcification associated with atherosclerosis<sup>(13)</sup> and in medial MS.<sup>(9)</sup> Therefore, chondrogenic differentiation of VSMCs may be more widespread than previously believed during the vascular calcification process.

Several useful review articles on the cellular regulation of vascular calcifications have recently been published.<sup>(6,7,15–17)</sup> However, none of these studies has really considered some important factors that are known to modulate either or both normal and ectopic cartilage formation such as cell condensation, hypoxia, MV-associated mineralization and apoptosis. We will therefore try to highlight some aspects of chondrogenic differentiation and tissue mineralization that have not been detailed in previous reviews. Precise knowledge of cartilage biology is essential to understand VSMC chondrogenic differentiation. Reciprocally, recent findings on vascular calcification may help us to get new insights into growth plate formation. This review will be separated in three chapters, i.e. cell differentiation, release of mineralizing matrix vesicles and cell death.

## Pathophysiological chondrogenic differentiation

### *Chondrocyte differentiation*

**Mesenchymal cell condensation and proliferation.** Endochondral ossification in the embryo is initiated with condensation of mesenchymal cells and then progresses with their commitment and differentiation into chondrogenic cells. In adult bone marrow, mesenchymal stem cells (MSCs) persist as a population of cells with the capacity to differentiate toward

the chondrogenic lineage. Among the transcription factors that control mesenchymal cell condensation leading to chondrocyte differentiation, Sox9 appears to play crucial roles (reviewed in Ref. 18). Inactivation of Sox9 in limb buds using the Cre/loxP recombination system before chondrogenic mesenchymal condensation results in the complete absence of mesenchymal condensation, subsequent cartilage and bone formation, indicating that Sox9 is required for an early step in chondrogenesis, that of mesenchymal condensations.<sup>(19)</sup> Cell–cell contacts occurring during mesenchymal condensation are likely mediated by the N-cadherin– $\beta$ -catenin–actin adhesion complex.<sup>(20)</sup> Indeed, N-cadherin is believed to be necessary in cell–cell interactions, because functional inhibition of N-cadherin homotypic binding, using a neutralizing monoclonal antibody, results in perturbed chondrogenesis in vitro and in vivo.<sup>(20)</sup>

**Chondrocyte early differentiation.** In addition to its role in cellular condensation, Sox9 also positively regulates expression of the early chondrocyte markers collagen type II,<sup>(21)</sup> IX,<sup>(22)</sup> XI,<sup>(23)</sup> and aggrecan.<sup>(24)</sup> The role of Sox9 during chondrogenesis is further illustrated by the observation that no chondrocyte-specific markers are expressed in Sox9 null cells in mouse chimeras.<sup>(25)</sup> Furthermore, ectopic expression of Sox9 in transgenic mice activates the endogenous Col2a1 gene in vivo.<sup>(21)</sup> During chondrogenesis, the environment of cells involved in condensations becomes hypoxic. Indeed, proliferative and differentiated hypertrophic chondrocytes are in hypoxia.<sup>(5)</sup> Hypoxia stimulates expression of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), which is known to play at least three main roles. First, HIF-1 $\alpha$  is necessary for chondrocyte survival during hypoxia.<sup>(5)</sup> Second, HIF-1 $\alpha$  may be required for expression of chondrocyte markers such as type II collagen.<sup>(26)</sup> Third, HIF-1 $\alpha$  induces expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), which in turn, activates metaphyseal vascular invasion.<sup>(5)</sup> Therefore, whereas Sox9 appears necessary for cell condensation and early chondrocyte differentiation, HIF-1 $\alpha$  may be required for chondrocyte survival and differentiation in hypoxic conditions.

**Chondrocyte hypertrophic differentiation.** While Sox9 appears particularly important in the first steps of chondrogenesis, the Cbfa1 transcription factor is involved in the control of chondrocyte terminal differentiation. Cbfa1 expression increases with maturation of chondrocytes, which is severely disturbed in Cbfa1-deficient mice.<sup>(27)</sup> Forced expression of Cbfa1 in chick immature chondrocytes induces type X collagen and matrix metalloprotease-13 expression, alkaline phosphatase (ALP) activity and extensive cartilage–matrix mineralization.<sup>(28)</sup> Factors that contribute to Cbfa1 expression and function have not fully been identified. Retinoic acid stimulates expression of Cbfa1<sup>(29)</sup> possibly by upregulating annexin V expression and increasing calcium influx.<sup>(30)</sup> In

addition, mechanical factors are suspected to modulate Cbfa1 expression.<sup>(31)</sup>

Among the factors that stimulate chondrocyte hypertrophy, inorganic phosphate (Pi) may be particularly important. Pi levels in growth plate increase from the proliferative to the hypertrophic zone.<sup>(32)</sup> Pi likely stimulates chondrocyte terminal differentiation and cartilage mineralization. Indeed Pi stimulates hypertrophic phenotype by increasing expression of type X collagen,<sup>(33,34)</sup> induces apoptosis of terminally differentiated chondrocytes<sup>(34,35)</sup> and triggers mineralization by mechanisms that may involve apoptotic processes.<sup>(34)</sup> Growth plate chondrocytes express different Pi transporters. In early differentiation steps, intracellular Pi uptake is likely mainly mediated by the sodium-dependent phosphate transporter (NaPiT) glvr-1 (Gibbon Ape Leukemia Virus Receptor 1), whose expression, however, decreases during terminal differentiation.<sup>(36,37)</sup> In contrast, Pi uptake during terminal differentiation appears to be mediated by a sodium-independent transporter that has not yet been identified.<sup>(38)</sup>

### Chondrogenic differentiation of VSMCs

**Phenotypic conversion of VSMCs.** Evidence that VSMCs are able to mimic chondrocyte behavior both in vitro and in vivo has been reported (Table 1).<sup>(9–11,13,14,39–42)</sup> Human VSMCs were shown to express Sox9 and Cbfa1 in mineralized arteries

**Table 1.** Transcription factors (TFs), collagen type and non-collagenous proteins (NCPs) expressed in chondrocytes, in VSMCs in vitro and in calcified arteries

	Chondrocytes <sup>(39)</sup>	VSMC in vitro	Calcified arteries
TFs	Sox-9	Sox-9 <sup>(13)</sup>	Sox-9 <sup>(13)</sup>
	HIF-1	?	?
	Cbfa-1	Cbfa1 <sup>(10,11)</sup>	Cbfa-1 <sup>(13)</sup>
Collagens	II	II <sup>(14)</sup>	II <sup>(9,13,40)</sup>
	IX	IX <sup>(14)</sup>	?
	X	?	X <sup>(40)</sup>
	XI	?	?
NCPs	OCN	OCN <sup>(10,11)</sup>	OCN <sup>(13,40)</sup>
	OPN	OPN <sup>(11,41)</sup>	OPN <sup>(40)</sup>
	ON	ON <sup>(42)</sup>	ON <sup>(40)</sup>
	BSP	BSP <sup>(42)</sup>	BSP <sup>(9,13,40)</sup>

Expression of Sox-9 by VSMC in vitro and in calcified arteries indicates that VSMC have the ability to undergo chondrogenic differentiation. This is further illustrated by in vitro and in vivo expression of cartilage-specific collagen type II, IX and X. However, several proteins that play important roles in chondrocyte maturation have not yet been investigated in cultured VSMCs or in calcified arteries. Their study may provide new data on the mechanisms responsible for cartilage formation in arteries. For instance, the transcription factor HIF-1, which is activated by growth plate hypoxia, and appears crucial in chondrocyte differentiation and survival, has not been studied in the context of VSMCs chondrogenic differentiation.

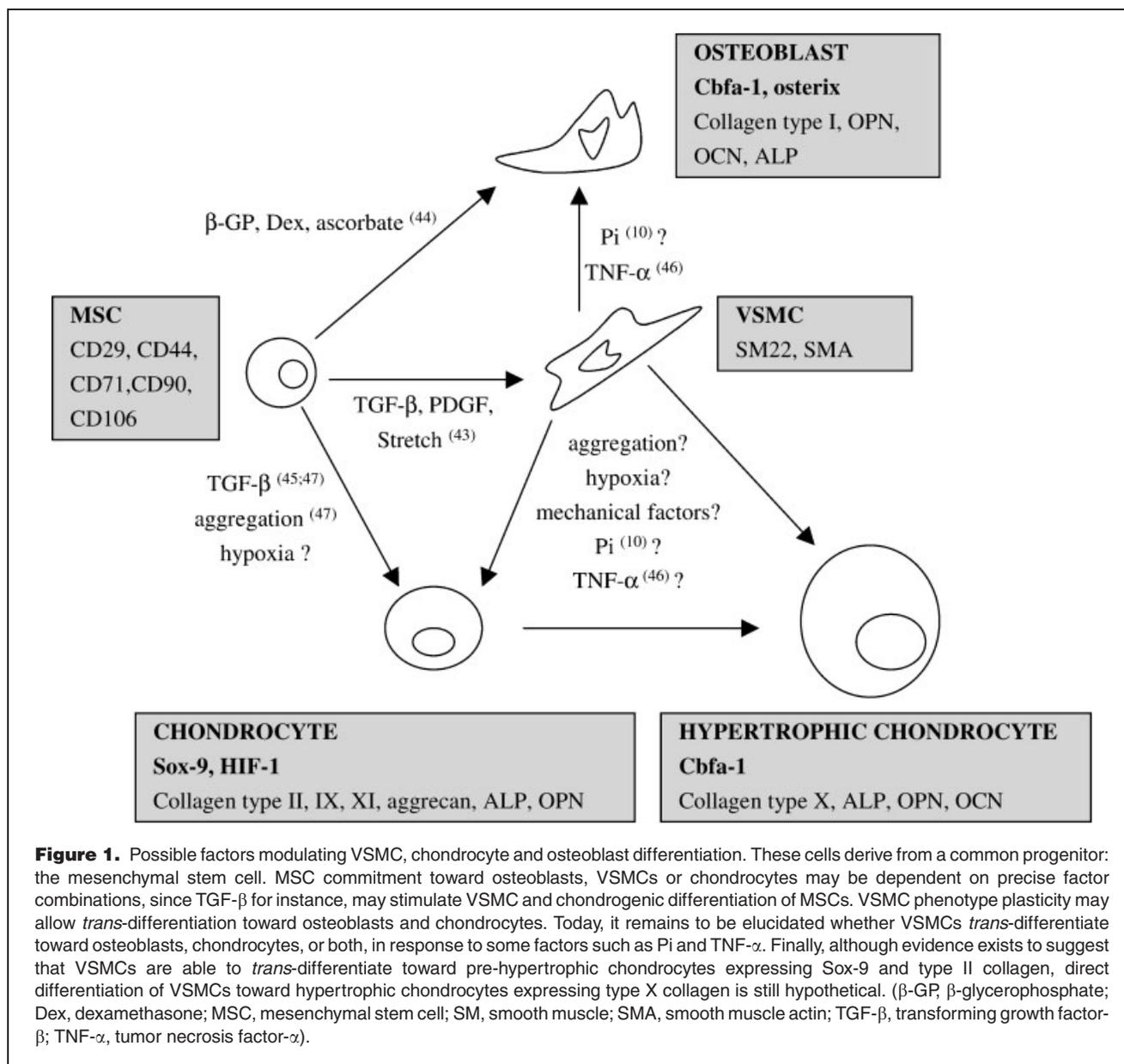
in vivo<sup>(13)</sup> and in culture.<sup>(10,11,13)</sup> Moreover, human VSMCs express type II collagen in calcifications associated with atherosclerosis<sup>(13)</sup> and MS,<sup>(9)</sup> illustrating a “chondrocyte-like” phenotype. Finally, type X collagen expression has been detected in coronary calcifications in rats.<sup>(40)</sup>

VSMCs are thought to arise from MSCs (Fig. 1).<sup>(43–46)</sup> MSCs are uniformly positive for markers such as CD29, CD44, CD71, CD90 and CD106, and negative for markers of the hematopoietic lineage, including CD14, CD4 and CD45.<sup>(47)</sup> In addition to the vascular smooth muscle lineage, MSCs are also able to give rise to other cell types such as chondrocytes, osteoblasts and adipocytes.<sup>(47)</sup> Lineages derived from MSCs, such as VSMCs<sup>(11)</sup> are not definitively delineated, but rather characterized by phenotype plasticity, allowing *trans*-differentiation (Fig. 1).<sup>(43)</sup> It is not unconceivable that VSMCs can, in some circumstances, *trans*-differentiate into chondrocytes. For instance, calcifying vascular cells (CVCs), a subpopulation of VSMCs from the artery wall and cardiac valves that have the ability to mineralize in culture, also have the capacity to differentiate into osteogenic, chondrogenic, leiomyogenic (smooth muscle) and stromogenic (marrow stroma) cells, depending on the stimuli.<sup>(14)</sup> These cells are positive for CD29 and CD44, negative for CD45 and CD14,<sup>(14)</sup> a surface marker profile shared with MSCs.<sup>(47)</sup> Interestingly, VSMCs extracted from normal human vessels are able to express Sox9 and Cbfa1 in culture after several passages.<sup>(13)</sup> The precise factors that promote VSMC *trans*-differentiation toward the chondrogenic lineage remain largely unknown, although several stimuli have been considered (Fig. 1).

### Factors modulating VSMC chondrogenic differentiation

**Mechanical factors.** Stretch and strain are important extracellular stimuli that regulate the phenotype of VSMCs and play an important role in the development of atherosclerosis. VSMC differentiation and maintenance of phenotype depends on mechanical stimulation.<sup>(48,49)</sup> Indeed, stretch stabilizes the contractile smooth muscle phenotype,<sup>(49)</sup> and cyclic strain inhibits expression of Cbfa1 and mineralization in long-term three-dimensional culture of rat VSMCs.<sup>(41)</sup> Stretch stabilizes the smooth muscle cell phenotype by a mechanism that involves actin polymerization.<sup>(49)</sup> Disruption of the actin cytoskeleton reduces expression of VSMC markers,<sup>(49,50)</sup> triggers chondrogenesis in mesenchymal cell culture<sup>(51)</sup> and prevents chondrocyte de-differentiation.<sup>(52)</sup> It is possible that alterations in the mechanical factors acting on VSMCs in the context of atherosclerosis play a role in their differentiation within atherosclerotic plaques.

**Three-dimensional environment.** CVCs undergo in vitro chondrogenic differentiation only at post-confluence, in three-dimensional nodules,<sup>(14)</sup> a property shared by MSCs, VSMCs,<sup>(41,47,53)</sup> chondrocyte primary cultures<sup>(54)</sup> and cell



lines.<sup>(34,55)</sup> Accordingly, primary chondrocytes cultured in monolayer rapidly de-differentiate, as illustrated by the loss of chondrogenic markers. Three-dimensional environment therefore seems necessary for chondrogenic commitment and maintenance of chondrogenic phenotype. This three-dimensional environment may correspond to the mesenchymal cell condensation that initiates chondrocyte differentiation in vivo. During arterial injury, proliferation and migration of VSMCs are accompanied by increased expression of N-cadherin and  $\alpha$ - and  $\beta$ -catenin.<sup>(56)</sup> Whether this increase in cadherin and catenin expression plays a role in VSMC

condensation leading to chondrogenic differentiation is highly hypothetical but deserves consideration.

**Hypoxia.** Both systemic and local hypoxia may contribute to development of atherosclerotic lesions. Recent in vivo studies found a direct correlation between local arterial wall hypoxia, VSMC proliferation and atherosclerosis.<sup>(57,58)</sup> In addition, hypoxia stimulates proliferation and osteopontin expression in cultured VSMCs.<sup>(59)</sup> No detailed study has investigated the effects of hypoxia on chondrogenic differentiation of VSMCs; however, it is not unconceivable that, in some conditions,

hypoxia plays a role in the expression of chondrocyte markers in VSMCs.

**Inorganic phosphate (Pi).** A high serum phosphate level is highly correlated with the extent of vascular calcification and vascular disease. Hyperphosphatemia is prevalent in patients with chronic renal failure and is linked to increased risks of cardiovascular mortality in these patients (reviewed in<sup>(60)</sup>). Pi enhances Cbfa1 expression and ECM mineralization<sup>(10,61)</sup> in culture of VSMCs most likely through Pi uptake via glvr-1.<sup>(10)</sup> Similarly, mineralization in cultured bovine VSMCs is associated with the dramatic loss of smooth-muscle-specific gene expression (smooth muscle lineage markers SM22 and  $\alpha$ -smooth muscle actin) in the presence of an organic phosphate donor,  $\beta$ -glycerophosphate.<sup>(62)</sup>

**Growth factors and cytokines.** Some growth factors are believed to play a role in chondrogenic differentiation of MSCs and VSMCs. For instance, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) has been shown to play such a role. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 are expressed in VSMCs in calcified atherosclerotic arteries.<sup>(63)</sup> TGF- $\beta$ 1 also stimulates mineralization in cultured VSMCs.<sup>(64)</sup> Moreover, in vivo injection of TGF- $\beta$ 1 or TGF- $\beta$ 2 in subperiosteal region of rat femurs (composed partly of MSCs) induces osteochondral ossification.<sup>(65)</sup> Local expression of TGF- $\beta$ 1 in rat aorta was also shown to induce a cartilaginous metaplasia that is reversible when treatment with TGF- $\beta$ 1 is stopped.<sup>(66)</sup> Furthermore, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 and, to a lesser extent, TGF- $\beta$ 1, promote in vitro type II collagen and aggrecan expression in MSCs.<sup>(45,47,67)</sup> The precise mechanisms through which TGF- $\beta$  modulates chondrogenic differentiation have not been fully elucidated, but may involve TGF- $\beta$ -induced N-cadherin expression, for example, addition of an exogenous neutralizing N-cadherin antibody indeed inhibits TGF- $\beta$ -stimulated chondrocyte differentiation of mesenchymal cells.<sup>(68)</sup> On the contrary, the fact that TGF- $\beta$  also inhibits chondrocyte terminal differentiation<sup>(69,70)</sup> suggests that other factors are involved in activating VSMC-mediated calcifications. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) may be a factor promoting chondrocyte terminal differentiation of VSMCs. Indeed, TNF- $\alpha$  has been detected in human atherosclerotic lesions<sup>(71)</sup> and TNF- $\alpha$  activates Cbfa1, and induces alkaline phosphatase expression and calcification by VSMCs.<sup>(46)</sup>

### Release of mineralization-competent matrix vesicles

#### Chondrocyte release of MVs

It is well recognized that initiation of cartilage mineralization is governed by cell-derived matrix vesicles (MVs) (Table 2).<sup>(36–38,61,72–79)</sup> In growth plate, their diameter ranges from 30 nm to more than one micron, with an average of approximately 200 nm.<sup>(72)</sup> It is believed that MVs initiate mineralization in cooperation with collagen fibrils, and that once the

**Table 2.** Properties of matrix vesicles, presence of apoptosis and type of crystals reported during chondrocyte- and VSMC-mediated mineralization

	Chondrocytes	VSMC/Calcified arteries
MV	30 to 1000 nm <sup>(72)</sup>	100 to 700 nm <sup>(61,74)</sup>
	Glvr-1 <sup>(36,37)</sup>	Glvr-1 <sup>(10)</sup>
	Sodium-independent <sup>(38)</sup>	?
	ALP	ALP <sup>(9,11,12)</sup>
	Annexin V <sup>(73)</sup>	?
Apoptosis	Yes <sup>(3–5)</sup>	Yes <sup>(75,76)</sup>
Mineralization	Carbonated apatite <sup>(34)</sup>	Carbonated apatite <sup>(77–79)</sup>

MVs released by chondrocytes and VSMCs appear to have a similar diameter, and a similar composition. Involvement of sodium-independent phosphate transporter and annexin V has however not been investigated in VSMCs. Finally, apoptosis has been observed both in growth plate and arteries in the vicinity of calcified areas, and mineral deposits comprise carbonated apatite in both locations.

first calcium phosphate crystals have coalesced to form the mineralization front, the next steps occur essentially by crystal multiplication, independently of MVs (reviewed in Ref. 80).

Membranes of MVs from growth plate chondrocytes contain alkaline phosphatase (ALP), which hydrolyses a great variety of substrates leading to the increase in Pi local levels. ALP activity allows inactivation of mineralization inhibitors such as ATP and pyrophosphate ions.<sup>(80)</sup> In MVs derived from growth plate chondrocytes, the increase in intravesicular Pi levels is partly mediated by NaPiTs.<sup>(37)</sup> These NaPiTs include type III transporter glvr-1. In addition, intravesicular Pi transport is also likely due to sodium-independent transporters.<sup>(38)</sup>

Calcium uptake into chondrocyte-derived MVs appears to be mediated by members of the annexin family. Annexins represent a family of at least 12 proteins that bind to acidic phospholipids in the presence of calcium. Among these, annexins II, V and VI are strongly expressed by growth plate chondrocytes.<sup>(73)</sup> Annexin V binds to type II and X collagen molecules,<sup>(73)</sup> which may allow calcium influx inside vesicles. In chondrocyte cultures, only hypertrophic chondrocytes release MVs able to mineralize the ECM. This property may be partly attributable to the presence of MV-anchored annexin V.<sup>(73)</sup> Indeed, as opposed to proliferative and pre-hypertrophic chondrocytes, only the hypertrophic cells contain calcium levels high enough to enable annexin anchorage in the cell membrane.<sup>(81,82)</sup>

Mineralization-competent MVs contain a nucleational core composed of amorphous calcium phosphate, phosphatidylserine and annexins,<sup>(83)</sup> whereas mineralization-incompetent MVs lack these components.<sup>(73)</sup> Mineralization-competent MVs are able to locally increase calcium and Pi levels, thereby permitting crystal nucleation. The precise location of crystal formation (intravesicular or extravesicular) and the nature of the first crystal formed remain a matter of debate.

Contrastingly, after the first step of crystal nucleation is accomplished, it is well known that crystals deposited in association with collagen fibrils consist, as in bone and tooth, in a non-stoichiometric, calcium-deficient, carbonated apatite, whose composition and organization vary with the age of crystals. In particular, aging of crystals is characterized by gain in crystal order, loss of acidic phosphate groups and incorporation of carbonate ions.<sup>(34)</sup>

#### *VSMC-derived MV*

MV-like structures have also been found in calcified arteries.<sup>(74,84)</sup> In atherosclerotic plaques, these structures are released by VSMCs (Table 2).<sup>(74,76)</sup> Their diameter ranges from 100 to 700 nm,<sup>(74)</sup> and is therefore roughly the same as that of chondrocytes-derived MVs.<sup>(72)</sup> In normal culture conditions, VSMCs continually release MV,<sup>(61)</sup> as do chondrocytes.<sup>(37)</sup> In presence of elevated levels of calcium and phosphate ions, release of mineralization-competent MV by VSMCs is stimulated.<sup>(61)</sup> Whether this relates to annexin anchorage in cell membrane, however, remains hypothetical, since expression of annexins in mineralizing VSMCs and their localization within MVs in calcified arteries have not been reported to date.

VSMCs express ALP during their chondrogenic differentiation,<sup>(12)</sup> and ALP has been detected in MV-like structures in atherosclerotic plaques.<sup>(74)</sup> ALP increases the local Pi levels and Pi uptake in VSMCs and VSMC-derived MVs is likely due in part to glvr-1.<sup>(10)</sup> To our knowledge however, involvement of other transporters has not yet been investigated.

Only scarce data are currently available concerning the mechanisms of mineralization and the nature of the mineral phase deposited during vascular diseases such as atherosclerosis. As in growth plate cartilage, the crystals formed in the vasculature comprise a biological carbonated apatite.<sup>(77,78)</sup> Its variable crystallinity suggests that, as in cartilage, vascular calcification is a time- and flow-dynamic-dependent process.<sup>(78)</sup> Indeed, the decreasing amount of acidic phosphate ions during crystal aging further reinforces the notion that the inorganic phase of vascular calcification is very similar, if not identical, to that in growth plate cartilage. Finally, apatite is also formed by cultured VSMCs.<sup>(79)</sup>

### **Cell death and mineralization**

#### *VSMC apoptosis and mineralization*

In contrast to the above chapters, it would seem that the concept linking mineralization to apoptosis is much more widespread in studies concerning vascular than cartilage calcification. Indeed, ectopic calcifications have been often associated with apoptotic or necrotic processes (for review see Ref. 85). It has even been proposed that, if ectopic calcifications are not more common, it is because in most situations cell debris are rapidly cleared by phagocytic cells.<sup>(85)</sup> How-

ever, clearance of VSMC debris may be inhibited in some circumstances,<sup>(12,76)</sup> thereby leading to accumulation of apoptotic bodies (ABs). In such circumstances, ABs may proceed to calcify, depending on their local environment.<sup>(7)</sup>

Such processes are especially well documented for mineralization of arteries<sup>(86,87)</sup> and, interestingly, for articular cartilage calcification.<sup>(88,89)</sup> Atherosclerotic plaques contain VSMC remnants and apoptotic bodies.<sup>(76)</sup> VSMC-derived MVs in advanced atherosclerotic plaques contain BAX protein, indicating that they may be remnants of apoptotic cells.<sup>(76)</sup> During programmed cell death, calcium and Pi ions stored in mitochondria and sarcoplasm can be incorporated in ABs or cell debris, and contribute to formation of calcium phosphate crystals. Upon induction of apoptosis *in vitro*, VSMCs were found to release such calcium-rich blebs.<sup>(7)</sup> Furthermore, inhibition of apoptosis by the broad-range caspase inhibitor ZVAD-FMK reduces the extent of mineralization in culture of VSMCs.<sup>(86)</sup> Since inhibition of caspases blocks the release of apoptotic bodies,<sup>(90)</sup> it is conceivable that ZVAD-FMK inhibits mineralization at the level of AB release.

Pathological association of apoptosis and calcification has also been documented in articular cartilage. In articular cartilage, chondrocyte differentiation normally ends before cell hypertrophy thereby preventing tissue mineralization. When apoptosis of articular chondrocytes is induced with nitric oxide or an antibody to Fas, cell-derived ABs contain ALP and have the capacity to precipitate calcium phosphate crystals.<sup>(88)</sup>

#### *Chondrocyte apoptosis and mineralization*

Despite the large body of evidence indicating a link between apoptosis and mineralization and the fact that in the growth plate the terminally differentiated chondrocyte is apoptotic,<sup>(3)</sup> the possibility that apoptotic processes might play an active role in cartilage mineralization has not been thoroughly considered. Boskey et al. stated that viable cells are necessary for *in vitro* cartilage calcification but, in their study, cell death was promoted under non-physiological conditions (water lysis, freeze-thawing, trypsinization, ethanol fixation) and certainly resulted in cell necrosis rather than apoptosis.<sup>(91)</sup> More recently, Kirsch et al. showed that MVs released from retinoic-acid-treated chondrocytes were structurally different from staurosporine-treated cells and exhibited a different composition.<sup>(92)</sup> However, it is possible that the differences observed in the composition of vesicles may have been related to treatment with retinoic acid rather than apoptosis.

During endochondral ossification, hypertrophic chondrocytes contain high intracellular calcium levels compared to proliferative chondrocytes.<sup>(82)</sup> Calcium may firstly be accumulated into mitochondria and sarcoplasmic reticulum.<sup>(93)</sup> In terminally differentiated chondrocytes, high calcium levels have been measured in the vicinity of the cellular membrane. Authors have suggested that this calcium is incorporated in the formation of MVs or apoptotic bodies.<sup>(94)</sup> It has therefore

been speculated that growth plate chondrocyte release of mineralization-competent MVs may be partly due to apoptotic processes.<sup>(95)</sup> The possible link between chondrocyte apoptosis and cartilage mineralization in the growth plate is hypothetical although we have shown that, in chondrocyte culture, an inhibition of apoptosis results in a significant decrease in matrix mineralization,<sup>(34)</sup> as observed in VSMC cultures. Further experiments appear necessary to investigate the mechanisms involved in cartilage mineralization. Finally and interestingly, odontoblasts responsible for the formation of circumpulpal dentin do not die during dentin mineralization and do not release MVs to mineralize the ECM,<sup>(96)</sup> further suggesting that MV release may be related to generation of ABs.

### Conclusion

An increasing amount of findings suggests that, in some circumstances, VSMCs promote calcification by mechanisms very similar to those occurring during growth plate mineralization. This review highlighted some aspects of chondrogenic differentiation of VSMCs, which suggest that a cartilage-like tissue forms in some types of vascular calcifications. There is, however, a lack of information concerning the mechanisms governing crystal formation during vascular calcification and a thorough understanding of cartilage mineralization may help us understand these mechanisms. The possible association between apoptosis and mineralization has been more widely considered in studies on ectopic mineralization (e.g. vascular calcification). However, the hypothesis that apoptotic processes might play an active role during endochondral bone formation has not been thoroughly investigated. Therefore, while our knowledge on cartilage biology can help us increase our understanding of vascular calcification, recent advances concerning vascular calcification may also prove useful to get new insights into chondrocyte-mediated mineralization.

### Acknowledgments

Authors acknowledge I. Brisson for critical reading of the manuscript. DM received a fellowship from the "Region des Pays de la Loire", France.

### References

1. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. 2000. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:191–220.
2. Sandell LJ, Adler P. 1999. Developmental patterns of cartilage. *Front Biosci* 4:D731–D742.
3. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, et al. 1998. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93:411–422.
4. Amling M, Neff L, Tanaka S, Inoue D, Kuida K, et al. 1997. Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J Cell Biol* 136:205–213.
5. Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, et al. 2001. Hypoxia in cartilage: HIF-1 $\alpha$  is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* 15:2865–2876.

6. Vattikuti R, Towler DA. 2004. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E686–E696.
7. Proudfoot D, Shanahan CM. 2001. Biology of calcification in vascular cells: intima versus media. *Herz* 26:245–251.
8. Ross R. 1995. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 57:791–804.
9. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, et al. 1999. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 100:2168–2176.
10. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, et al. 2000. Phosphoregulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 87:E10–E17.
11. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, et al. 2001. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 89:1147–1154.
12. Proudfoot D, Davies JD, Skepper JN, Weissberg PL, Shanahan CM. 2002. Acetylated low-density lipoprotein stimulates human vascular smooth muscle cell calcification by promoting osteoblastic differentiation and inhibiting phagocytosis. *Circulation* 106:3044–3050.
13. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, et al. 2003. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:489–494.
14. Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, et al. 2003. Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation* 108:2505–2510. Epub 2003 Oct 2527.
15. Trion A, van der Laarse A. 2004. Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. *Am Heart J* 147:808–814.
16. Speer MY, Giachelli CM. 2004. Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc Pathol* 13:63–70.
17. Demer LL, Tintut Y. 2003. Mineral exploration: search for the mechanism of vascular calcification and beyond: the 2003 Jeffrey M. Hoeg Award lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1739–1743. Epub 2003 Sep 1734.
18. de Crombrugge B, Lefebvre V, Nakashima K. 2001. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol* 13:721–727.
19. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrugge B. 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16:2813–2828.
20. Delise AM, Tuan RS. 2002. Analysis of N-cadherin function in limb mesenchymal chondrogenesis in vitro. *Dev Dyn* 225:195–204.
21. Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, et al. 1997. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* 16:174–178.
22. Zhang P, Jimenez SA, Stokes DG. 2003. Regulation of human COL9A1 gene expression. Activation of the proximal promoter region by SOX9. *J Biol Chem* 278:117–123.
23. Liu Y, Li H, Tanaka K, Tsumaki N, Yamada Y. 2000. Identification of an enhancer sequence within the first intron required for cartilage-specific transcription of the alpha2(XI) collagen gene. *J Biol Chem* 275:12712–12718.
24. Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, et al. 2000. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem* 275:10738–10744.
25. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrugge B. 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22:85–89.
26. Pfander D, Cramer T, Schipani E, Johnson RS. 2003. HIF-1 $\alpha$  controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes. *J Cell Sci* 116:1819–1826.
27. Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, et al. 1999. Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev Dyn* 214:279–290.
28. Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, et al. 2000. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem* 275:8695–8702.

29. Drissi MH, Li X, Sheu TJ, Zuscik MJ, Schwarz EM, et al. 2003. Runx2/Cbfa1 stimulation by retinoic acid is potentiated by BMP2 signaling through interaction with Smad1 on the collagen X promoter in chondrocytes. *J Cell Biochem* 90:1287–1298.
30. Wang W, Xu J, Kirsch T. 2003. Annexin-mediated Ca<sup>2+</sup> influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. *J Biol Chem* 278:3762–3769. Epub 2002 Nov 3722.
31. Wong M, Siegrist M, Goodwin K. 2003. Cyclic tensile strain and cyclic hydrostatic pressure differentially regulate expression of hypertrophic markers in primary chondrocytes. *Bone* 33:685–693.
32. Mwale F, Tchétina E, Wu CW, Poole AR. 2002. The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. *J Bone Miner Res* 17:275–283.
33. Fujita T, Meguro T, Izumo N, Yasutomi C, Fukuyama R, et al. 2001. Phosphate stimulates differentiation and mineralization of the chondroprogenitor clone ATDC5. *Jpn J Pharmacol* 85:278–281.
34. Magne D, Bluteau G, Fauchoux C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, et al. 2003. Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 18:1430–1442.
35. Adams CS, Mansfield K, Perlot RL, Shapiro IM. 2001. Matrix regulation of skeletal cell apoptosis. Role of calcium and phosphate ions. *J Biol Chem* 276:20316–20322. Epub 22001 Mar 20314.
36. Palmer G, Zhao J, Bonjour J, Hofstetter W, Caverzasio J. 1999. In vivo expression of transcripts encoding the Glvr-1 phosphate transporter/retrovirus receptor during bone development. *Bone* 24:1–7.
37. Guicheux J, Palmer G, Shukunami C, Hiraki Y, Bonjour JP, et al. 2000. A novel in vitro culture system for analysis of functional role of phosphate transport in endochondral ossification. *Bone* 27:69–74.
38. Wu LN, Guo Y, Genge BR, Ishikawa Y, Wuthier RE. 2002. Transport of inorganic phosphate in primary cultures of chondrocytes isolated from the tibial growth plate of normal adolescent chickens. *J Cell Biochem* 86:475–489.
39. Tchétina E, Mwale F, Poole AR. 2003. Distinct phases of coordinated early and late gene expression in growth plate chondrocytes in relationship to cell proliferation, matrix assembly, remodeling, and cell differentiation. *J Bone Miner Res* 18:844–851.
40. Fitzpatrick LA, Turner RT, Ritman ER. 2003. Endochondral bone formation in the heart: a possible mechanism of coronary calcification. *Endocrinology* 144:2214–2219.
41. Nikolovski J, Kim BS, Mooney DJ. 2003. Cyclic strain inhibits switching of smooth muscle cells to an osteoblast-like phenotype. *Faseb J* 17:455–457. Epub 2003 Jan 2002.
42. Severson AR, Ingram RT, Fitzpatrick LA. 1995. Matrix proteins associated with bone calcification are present in human vascular smooth muscle cells grown in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31:853–857.
43. Dennis JE, Charbord P. 2002. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* 20:205–214.
44. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64:295–312.
45. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. 2001. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 268:189–200.
46. Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL. 2000. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* 102:2636–2642.
47. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147.
48. Reusch P, Wagdy H, Reusch R, Wilson E, Ives HE. 1996. Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 79:1046–1053.
49. Zeidan A, Nordstrom I, Albinsson S, Malmqvist U, Sward K, et al. 2003. Stretch-induced contractile differentiation of vascular smooth muscle: sensitivity to actin polymerization inhibitors. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1387–C1396. Epub 2003 Jan 1329.
50. Mack CP, Somlyo AV, Hautmann M, Somlyo AP, Owens GK. 2001. Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J Biol Chem* 276:341–347.
51. Zanetti NC, Solursh M. 1984. Induction of chondrogenesis in limb mesenchymal cultures by disruption of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 99:115–123.
52. Kim SJ, Hwang SG, Kim IC, Chun JS. 2003. Actin cytoskeletal architecture regulates nitric oxide-induced apoptosis, dedifferentiation, and cyclooxygenase-2 expression in articular chondrocytes via mitogen-activated protein kinase and protein kinase C pathways. *J Biol Chem* 278:42448–42456. Epub 42003 Aug 42447.
53. Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, Weissberg PL. 1998. Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:379–388.
54. Caplan AI, Syftestad G, Osdoby P. 1983. The development of embryonic bone and cartilage in tissue culture. *Clin Orthop* 174:243–263.
55. Shukunami C, Ishizeki K, Atsumi T, Ohta Y, Suzuki F, et al. 1997. Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro. *J Bone Miner Res* 12:1174–1188.
56. Jones M, Sabatini PJ, Lee FS, Bendeck MP, Langille BL. 2002. N-cadherin upregulation and function in response of smooth muscle cells to arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1972–1977.
57. Lee ES, Bauer GE, Caldwell MP, Santilli SM. 2000. Association of artery wall hypoxia and cellular proliferation at a vascular anastomosis. *J Surg Res* 91:32–37.
58. Bjornheden T, Levin M, Evaldsson M, Wiklund O. 1999. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:870–876.
59. Sodhi CP, Phadke SA, Battle D, Sahai A. 2001. Hypoxia stimulates osteopontin expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells: potentiation by high glucose. *Diabetes* 50:1482–1490.
60. Giachelli CM. 2003. Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *J Am Soc Nephrol* 14:S300–S304.
61. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, et al. 2004. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 15:2857–2867.
62. Giachelli CM, Jono S, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, et al. 2001. Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am J Kidney Dis* 38:S34–S37.
63. Jeziorska M. 2001. Transforming growth factor- $\beta$ s and CD105 expression in calcification and bone formation in human atherosclerotic lesions. *Z Kardiol* 90(Suppl 3):23–26.
64. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, et al. 1994. TGF- $\beta$  1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest* 93:2106–2113.
65. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME. 1990. Transforming growth factor- $\beta$  and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 110:2195–2207.
66. Schulick AH, Taylor AJ, Zuo W, Qiu CB, Dong G, et al. 1998. Overexpression of transforming growth factor  $\beta$ 1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6983–6988.
67. Seyedin SM, Thompson AY, Bentz H, Rosen DM, McPherson JM, et al. 1986. Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor- $\beta$ . *J Biol Chem* 261:5693–5695.
68. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, et al. 2003. Transforming growth factor- $\beta$ -mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem* 278:41227–41236. Epub 42003 Jul 41231.
69. Zhang X, Ziran N, Goater JJ, Schwarz EM, Puzas JE, et al. 2004. Primary murine limb bud mesenchymal cells in long-term culture complete chondrocyte differentiation: TGF- $\beta$  delays hypertrophy and PGE2 inhibits terminal differentiation. *Bone* 34:809–817.
70. Yang X, Chen L, Xu X, Li C, Huang C, et al. 2001. TGF- $\beta$ /Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol* 153:35–46.

71. Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, et al. 1990. Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am J Cardiol* 65:297–302.
72. Anderson HC. 1969. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol* 41:59–72.
73. Kirsch T, Nah HD, Shapiro IM, Pacifici M. 1997. Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *J Cell Biol* 137:1149–1160.
74. Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC. 1986. Calcification in atherosclerosis. I. Human studies. *J Exp Pathol* 2:261–273.
75. Bauriedel G, Hutter R, Welsch U, Bach R, Sievert H, et al. 1999. Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc Res* 41:480–488.
76. Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J, Jacob W, Bult H, et al. 1998. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 97:2307–2315.
77. LeGeros RZ. 2001. Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification. *Z Kardiol* 90(Suppl 3):116–124.
78. Tomazic BB. 2001. Physicochemical principles of cardiovascular calcification. *Z Kardiol* 90(Suppl 3):68–80.
79. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. 1999. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res* 84:166–178.
80. Boskey AL. 1992. Mineral-matrix interactions in bone and cartilage. *Clin Orthop* 281:244–274.
81. Gunter TE, Zuscik MJ, Puzas JE, Gunter KK, Rosier RN. 1990. Cytosolic free calcium concentrations in avian growth plate chondrocytes. *Cell Calcium* 11:445–457.
82. Iannotti JP, Brighton CT, Stambough JE. 1989. Subcellular regulation of the ionized calcium pool in isolated growth-plate chondrocytes. *Clin Orthop* 242:285–293.
83. Wu LN, Genge BR, Dunkelberger DG, LeGeros RZ, Concannon B, et al. 1997. Physicochemical characterization of the nucleational core of matrix vesicles. *J Biol Chem* 272:4404–4411.
84. Kim KM. 1976. Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. *Fed Proc* 35:156–162.
85. Kim KM. 1995. Apoptosis and calcification. *Scanning Microsc* 9:1137–1175; discussion 1175–1138.
86. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, et al. 2000. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 87:1055–1062.
87. Anderson HC. 1988. Mechanisms of pathologic calcification. *Rheum Dis Clin North Am* 14:303–319.
88. Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, Quach J, McCabe G, et al. 1998. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3094–3099.
89. Johnson K, Pritzker K, Goding J, Terkeltaub R. 2001. The nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase isozyme PC-1 directly promotes cartilage calcification through chondrocyte apoptosis and increased calcium precipitation by mineralizing vesicles. *J Rheumatol* 28:2681–2691.
90. Zhang J, Reedy MC, Hannun YA, Obeid LM. 1999. Inhibition of caspases inhibits the release of apoptotic bodies: Bcl-2 inhibits the initiation of formation of apoptotic bodies in chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *J Cell Biol* 145:99–108.
91. Boskey AL, Doty SB, Stiner D, Binderman I. 1996. Viable cells are a requirement for in vitro cartilage calcification. *Calcif Tissue Int* 58:177–185.
92. Kirsch T, Wang W, Pfander D. 2003. Functional differences between growth plate apoptotic bodies and matrix vesicles. *J Bone Miner Res* 18:1872–1881.
93. Brighton CT, Hunt RM. 1976. Histochemical localization of calcium in growth plate mitochondria and matrix vesicles. *Fed Proc* 35:143–147.
94. Wu LN, Wuthier MG, Genge BR, Wuthier RE. 1997. In situ levels of intracellular Ca<sup>2+</sup> and pH in avian growth plate cartilage. *Clin Orthop* 335:310–324.
95. Anderson HC. 1995. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop* 314:266–280.
96. Takano Y, Sakai H, Baba O, Terashima T. 2000. Differential involvement of matrix vesicles during the initial and appositional mineralization processes in bone, dentin, and cementum. *Bone* 26:333–339.

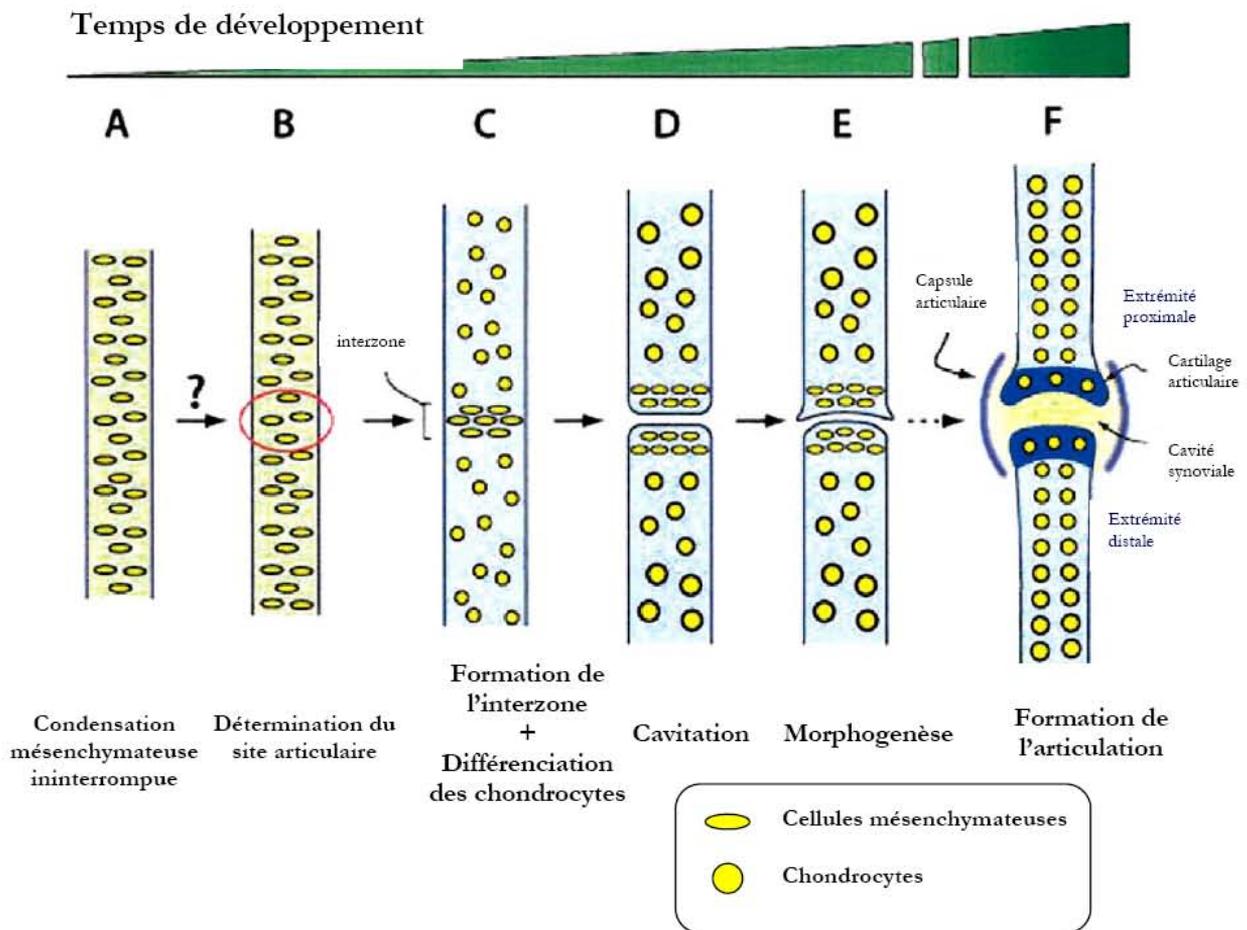
## 1.5 Formation des articulations

Une articulation synoviale comprend un cartilage articulaire qui couvre la surface des pièces osseuses opposées, un liquide synovial qui lubrifie et nourrit les tissus, des ligaments qui joignent les éléments osseux entre eux et une capsule fibreuse qui isole les articulations des tissus environnants(387). Le développement des articulations est divisé en deux événements morphologiques : la formation du cartilage et des maquettes cartilagineuse qui donneront les éléments du squelette (confère paragraphe 1.4), et la formation de l'articulation.

La formation des articulations commence au sein des condensations mésenchymateuses qui vont former une maquette ininterrompue d'un futur membre (figure 9, A). Le premier signe de développement d'une articulation est la formation de l'interzone sur le site de la future articulation (202, 338). L'interzone consiste en une zone très compacte de cellules mésenchymateuses, et forme une démarcation entre deux éléments cartilagineux adjacents. La séparation physique des éléments squelettiques se déroule ensuite grâce à d'autres événements et implique le processus de cavitation au sein de l'interzone qui conduit à la formation d'un espace rempli de liquide synovial. Les processus de morphogenèse et de cytodifférenciation conduisent ensuite, à la maturation de l'articulation qui devient capable d'exercer son rôle physiologique (figure 9).

### 1.5.1 Détermination du site de l'articulation.

La détermination du site de l'articulation commence une fois la condensation mésenchymateuse effectuée. Au sein de cette condensation mésenchymateuse ininterrompue (figure 9, A), un mécanisme mal défini dicte la localisation précise de l'interruption de cette condensation, mais également le lieu de formation de l'interzone puis de l'articulation (figure 9, B). Les gènes Hox (homeobox) ont été suggérés jouer un rôle dans le schéma global de l'embryon des vertébrés. Les gènes Hox9 à 13 jouent un rôle dans la mise en place des membres. L'expression de Hoxa semble liée aux signaux de position et à la segmentation proximo-distale de l'axe squelettique, alors que l'expression de Hoxd serait liée à la détermination des embranchements dans les condensations mésenchymateuses le long de l'axe antéropostérieur (524). La détermination du site articulaire serait indiquée par le point d'intersection des deux patrons d'expression (387). Cependant, cette hypothèse ainsi que le rôle critique des gènes Hox dans la formation des articulations reste encore à déterminer.



**Figure 9 : schéma représentant les étapes majeures de la formation des articulations**

Modifié d'après Pacifici et *al.* 2005.(386)

### 1.5.2 Formation de l'interzone

L'interzone (figure 9, C) est composée de cellules mésoenchymateuses regroupées ou condensées en paquets très serrés. Au sein de l'interzone, les cellules sont interconnectées par des jonctions communicantes (19). Bien que nécessaire pour la formation d'une articulation, le rôle de l'interzone dans ce processus est loin d'être clair. Il est clairement établi que les cellules de l'interzone sont responsables de la formation du cartilage articulaire, des ligaments et de la membrane synoviale alors que la capsule articulaire dériverait d'une autre condensation bien distincte. L'interzone présente une structure en 3 couches : deux couches périphériques contiguës aux têtes épiphysaires et une zone intermédiaire centrale très fine (225). Les cellules des zones périphériques se différencient très précocement en chondrocytes et s'incorporent dans les épiphyses pour participer à la formation des os. Les cellules de la zone intermédiaire centrale restent localisées dans l'articulation et forment le cartilage articulaire (386). En revanche, les mécanismes aboutissant à la formation des ligaments et de

la membrane synoviale à partir des cellules de l'interzone sont encore peu connus. Au niveau moléculaire, de nombreuses protéines (facteurs de croissance, facteurs de transcription) jouent un rôle dans la formation de l'articulation.

Le GDF-5 (BMP-14/ CDMP-1) semble jouer au moins deux rôles dans la squelettogenèse. Au cours de la phase de condensation mésenchymateuse, l'expression de GDF-5 stimulerait le recrutement et la différenciation des cellules chondrogéniques. Plus tard, lorsque son expression est restreinte à l'interzone, le GDF-5 favoriserait les fonctions des cellules de l'interzone et le développement de l'articulation (470).

La protéine Wnt-14 est exprimée très précocement pendant la formation de l'interzone, elle agirait *via* la voie de signalisation  $\beta$ -caténine et régulerait la formation des articulations ainsi que le comportement des cellules de l'interzone. En effet, l'inhibition de  $\beta$ -caténine entraîne une absence d'articulation. En revanche, une expression ectopique de  $\beta$ -catenin ou de Wnt-14 aboutit à la formation d'articulations ectopiques (182).

Les souris invalidées pour le gène codant la protéine Noggin présentent une absence complète de formation des articulations, ce qui suggère que les antagonistes des BMP comme Noggin et Chordin sont nécessaires pour réguler la formation de l'articulation. Ces facteurs permettraient de maintenir le caractère mésenchymateux de l'interzone et favoriseraient ainsi la progression normale de l'interzone vers la formation de l'articulation (185).

L'ablation du gène *Ihh* chez la souris entraîne d'importants défauts voir l'absence complète d'articulation (465). La protéine *Ihh*, exprimée par les cellules de la diaphyse, diffuserait jusqu'à l'épiphyse où elle régulerait la formation de l'interzone.

L'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  est également un composant critique dans le mécanisme conduisant les cellules à devenir des cellules de l'interzone. En effet, le blocage de l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  conduit à la formation ectopique d'une interzone et d'une articulation (152). Cependant, ces résultats restent à être confirmés et doivent être intégrés dans la biologie complexe de l'interzone.

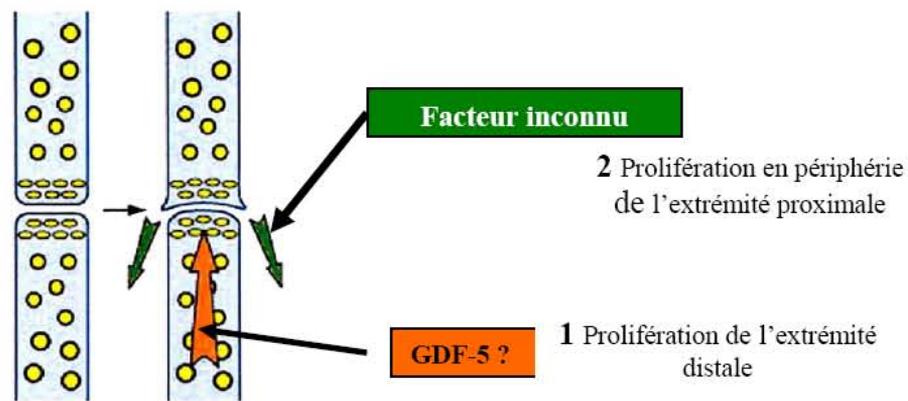
### 1.5.3 Cavitation et morphogenèse

Le processus de cavitation correspond à la séparation physique de deux segments opposés (figure 9, D et E). Au fur et à mesure de l'avancée de ce processus, les deux segments opposés doivent être moulés en deux structures morphologiquement compatibles. La morphologie des articulations est à la fois diverse et spécifique du site anatomique. Il existe quelques

informations concernant la cavitation, mais le processus de morphogenèse est très peu documenté.

Les premières études concernant la cavitation se sont focalisées sur la mort cellulaire. En effet, certaines études ont montré que les cellules de la zone intermédiaire de l'interzone présentaient des signes d'apoptose (1, 247, 357). Cependant, d'autres études rapportent que l'apoptose ne serait observée que dans l'articulation phalangienne et pas dans l'interzone de l'articulation du genou (225). La cavitation serait en partie due au réarrangement des fibrilles de collagène le long de la future articulation ainsi qu'à une augmentation de la synthèse et de l'accumulation d'AH dans cette zone. En effet, la synthèse et l'accumulation d'AH contribuent à la perte de l'intégrité tissulaire de la zone intermédiaire de l'interzone, conduisant ainsi à la séparation physique des cotés opposés de l'articulation, et à la formation d'une cavité remplie de liquide. Cependant, le rôle de la mort cellulaire dans le processus de cavitation ne peut être exclu. En effet, au tout début de la cavitation un faible nombre de cellules de l'interzone meurent par différents mécanismes (apoptose, nécrose ou autophagie). Cette mort pourrait être très rapide et intervenir à différents temps dans les différentes articulations ceci en fonction du schéma de développement.

En même temps que se déroule la cavitation et la formation de l'espace synovial, les cotés opposés de l'articulation entament le processus de morphogenèse par lequel leur forme, leur organisation et leur configuration tridimensionnelle s'établissent. Le processus de morphogenèse aboutit à la formation de cotés articulaires de formes complémentaires, un côté convexe et l'autre concave. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour la mise en forme d'une articulation. La plus aboutie indique qu'il y aurait une croissance préférentielle au niveau distal formant ainsi une protubérance dans la cavité synoviale, mais il y aurait également une croissance des portions latérales de l'extrémité proximale entourant de ce fait l'extrémité distale (figure 10).



**Figure 10: schéma représentant le mécanisme possible de la morphogenèse articulaire.**  
Modifié d'après Pacifici et al. (386)

Il a été rapporté que l'expression de GDF-5, qui est répartie dans toute l'interzone au début de sa formation, est ensuite restreinte à la zone distale convexe des interzones plus âgées et est indétectable dans le côté concave (387). Comme le GDF-5 est un facteur chondrogénique, il est possible que le déplacement de son expression stimule la différenciation chondrogénique du côté distal permettant ainsi à ce côté de proliférer et de devenir convexe. Simultanément, les cellules périphériques de l'extrémité proximale pourraient proliférer activement entraînant la croissance de la portion périphérique qui ainsi s'enroulerait autour du côté distal et deviendrait concave. La combinaison de ces deux événements permettrait la mise en forme précoce des deux côtés de l'articulation (figure 10).

#### 1.5.4 Formation et stabilisation du cartilage articulaire.

Les chondrocytes articulaires maintiennent les fonctions de l'articulation durant toute la vie. Ceci en conservant un phénotype stable et en produisant tous les composants macromoléculaires du cartilage articulaire, lui conférant ainsi ses propriétés de résistance mécanique. Les chondrocytes articulaires sont, par conséquent, très différents des chondrocytes de la plaque de croissance qui sont eux transitoires. Ainsi plusieurs études ont déterminé quels facteurs pouvaient potentiellement être impliqués dans la différenciation et le maintien du phénotype des chondrocytes articulaires.

Lorsque la voie de signalisation du TGF- $\beta$  est bloquée par l'utilisation d'un récepteur au TGF- $\beta$  de type II tronqué, cela entraîne la désorganisation de l'articulation et le cartilage articulaire est remplacé par du cartilage hypertrophique voir par de l'os (441). La surexpression de Runx2 entraîne la différenciation de tous les chondrocytes, y compris des chondrocytes articulaires, en chondrocytes hypertrophiques (122). En revanche, dans les

souris transgéniques exprimant un dominant négatif Runx2, les chondrocytes sont bloqués à un stade immature ressemblant au phénotype des chondrocytes articulaires. Ainsi, afin de rester fonctionnels durant la vie d'un individu, les chondrocytes articulaires doivent maintenir leur phénotype. Les mécanismes par lesquels les chondrocytes articulaires maintiennent leur phénotype impliquent probablement des voies de signalisation dépendantes du TGF- $\beta$ , mais impliquent aussi le maintien d'un niveau d'expression de Runx2 faible (386).

Le facteur de transcription ERG est exprimé sur le site des futures articulations et reste exprimé après le développement de la couche cartilagineuse articulaire (227). Par ailleurs, un des variants issu de l'épissage alternatif de ERG, appelé C-1-1 est exprimé exclusivement dans les chondrocytes épiphysaire. L'absence d'expression de C-1-1 bloque l'ossification endochondrale et maintient les chondrocytes à un stade immature proche du phénotype des chondrocytes articulaires (226). Ceci suggère que l'action de C-1-1 peut être nécessaire précocement, pendant la formation des articulations, pour rapidement établir le statut permanent des chondrocytes articulaires. Par ailleurs, les chondrocytes ont besoin d'une expression basale de Runx2 pour conserver leur phénotype différencié. Cependant, une augmentation de l'expression de Runx2 entraîne la maturation et l'hypertrophie des chondrocytes. Il semble que C-1-1 et Runx2 exercent une influence réciproque sur leurs expressions ou activités respectives afin de jouer un rôle dans l'établissement et le maintien du phénotype particulier des chondrocytes articulaires. En effet, une surexpression de Runx2 dans des chondrocytes de poulet a entraîné une diminution de l'expression de C-1-1. Cette diminution de C-1-1 a ensuite été accompagnée d'une diminution de la prolifération, de l'expression des marqueurs du cartilage articulaire et d'une augmentation du collagène X (228). En revanche, la surexpression de C-1-1 a empêché la maturation des chondrocytes et les a maintenus à un stade immature, alors que l'expression endogène de Runx2 n'a pas été diminuée.

D'importantes questions restent encore en suspend, notamment concernant les mécanismes par lesquels les chondrocytes articulaires parviennent à échapper à leur maturation vers l'hypertrophie et expriment les marqueurs spécifiques des articulations.

## **2 LES PERTES DE SUBSTANCE ET LES PATHOLOGIES DÉGÉNÉRATIVES DU CARTILAGE ARTICULAIRE**

### **2.1 Généralités**

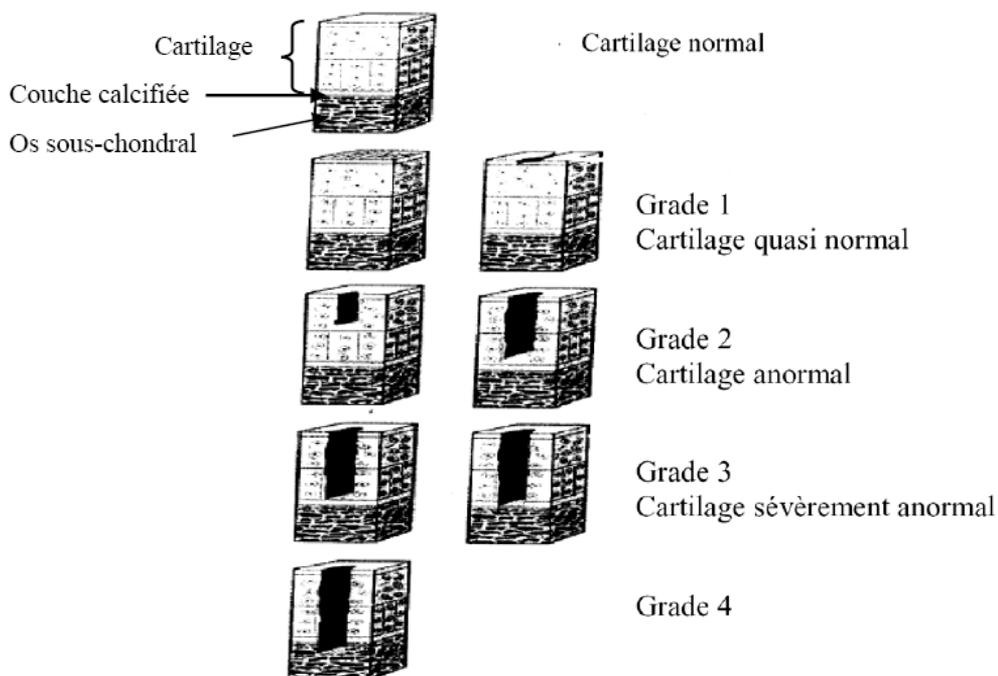
La réparation spontanée des lésions du cartilage articulaire n'est possible que dans certaines conditions, étant donné sa non-vascularisation. Les pathologies du genou, en zones portantes, sont très handicapantes et entraînent des douleurs et une altération de la fonction articulaire (31, 217). Ces pathologies sont fréquemment associées dans un premier temps, à une lésion traumatique du cartilage articulaire. Elles vont d'une simple contusion cartilagineuse à un défaut ostéocondral. Ces lésions cartilagineuses, si elles sont prises en charge de façon précoce, présentent une évolution favorable. En revanche, elles peuvent évoluer vers des formes sévères d'arthrose en cas d'absence de prise en charge précoce (58). Les dommages cartilagineux sont généralement causés par des processus dégénératifs faisant suite à une instabilité post traumatique (164). L'incidence des lésions chondrales est estimée à 63%, au sein d'une population américaine, sur 31516 arthroscopies, quelle que soit l'indication, avec pas plus de 5% de lésions condyliennes profondes (94).

### **2.2 Les pertes de substance du cartilage articulaire**

#### **2.2.1 Classification des pertes de substance du cartilage articulaire.**

Les lésions du cartilage articulaire se produisent suite à des impacts traumatiques répétitifs, ou une dégénération mécanique progressive due à une activité spécifique. Ces lésions sont la cause de nombreux symptômes handicapants comme la douleur et une perturbation fonctionnelle de l'articulation affectée.

Les lésions du cartilage articulaire peuvent être classées selon leur profondeur. L'ICRS ("International Cartilage Repair Society") a établi une classification des lésions cartilagineuses, ce qui a permis d'homogénéiser la description des lésions focales du cartilage (figure 11):



**Figure 11: Classification des lésions cartilagineuses selon l'ICRS**  
(www.cartilage.org)

Le grade 0 correspond au cartilage normal ou sain. Le grade 1, où le cartilage est considéré comme presque normal, peut être subdivisé en deux. Le grade 1A où la surface articulaire présente un aspect mou et contient des éléments fibrillaires, et le grade 1B où la surface articulaire comporte des fissures ou des déchirures superficielles. Le grade 2, considéré comme anormal correspond à une atteinte plus profonde que le grade 1, mais sa profondeur n'atteint pas 50% de l'épaisseur du cartilage articulaire. Dans le grade 3A, la profondeur de l'atteinte cartilagineuse est supérieure à 50% de l'épaisseur du cartilage articulaire, mais ne va pas jusqu'à la couche calcifiée. Le grade 3B atteint la couche calcifiée et le grade 3C atteint l'os sous-chondral sans le traverser. Le grade 3D correspond au grade 3C mais accompagné de renflements à la surface du cartilage. Enfin, dans le grade 4, la lésion s'étend jusqu'au travers de l'os sous-chondral.

D'autres classifications des lésions cartilagineuses existent, mais la classification ICRS est une des plus pertinentes.

### 2.2.2 Processus de réparation spontanée du cartilage

L'absence de vascularisation du cartilage articulaire empêche la mise en place d'une réponse de type inflammatoire. Cette caractéristique limite fortement ses capacités de réparation

spontanée. Seules les lésions pénétrant l'os sous-chondral, vascularisé, sont capables de déclencher le processus de réparation (56, 57).

Une lésion de grade 1, où la surface articulaire reste intègre, se traduit au niveau macromoléculaire par une diminution du contenu en PG du cartilage. Cette diminution en PG diminue la résistance du cartilage articulaire et augmente sa perméabilité. La réparation ou la non réparation de ces lésions n'est pas encore bien définie. L'hypothèse émise sur la possible réparation de ces lésions de grade 1 est dépendante de plusieurs conditions. La perte en PG ne doit pas excéder ce que les chondrocytes peuvent produire. Le réseau fibrillaire des collagènes doit rester intact. Finalement, le nombre de chondrocytes capables de répondre à ces lésions doit être suffisant (58). Cependant, cette hypothèse nécessite d'être validée afin de déterminer dans quelles mesures ces lésions de grade 1 peuvent évoluer vers des pertes de substance plus importantes.

Les lésions de grade 2 et 3, qui interrompent le cartilage articulaire, entraînent immédiatement après leurs formation, une prolifération des chondrocytes et une augmentation de la synthèse des molécules matricielles. Cependant, cette matrice nouvellement formée ne comble pas le défaut et, très tôt après le traumatisme, cette augmentation d'activité et de prolifération cesse (59). Le défaut devient permanent ce qui altère la fonction mécanique de l'articulation et augmente les risques de dégénération du cartilage. Ce type de lésion, n'atteignant pas l'os sous-chondral, ne se répare pas spontanément.

Lorsque la lésion cartilagineuse traverse l'os sous-chondral, lésion de grade 4, elle atteint la moelle osseuse, ce qui déclenche un flux de cellules et de sang dans le défaut. En deux jours, il se crée un caillot sanguin, riche en cellules et polynucléaires neutrophiles, qui va combler le défaut (230). Ensuite se déroule la phase d'inflammation, celle-ci se caractérise par une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité de la membrane des vaisseaux de l'os sous-chondral, qui initie le processus de transudation et d'exsudation. Cela aboutit à la formation d'un réseau dense de fibrine contenant des cellules inflammatoires et des cellules souches capables de se différencier en cellules réparatrices. Dans le cas de lésions cartilagineuses traversant l'os sous-chondral, les cellules qui vont remodeler le caillot sanguin et participer au processus de réparation sont les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse (443). La phase finale de ce processus spontané correspond à la phase de réparation. Les vaisseaux sanguins, sous l'influence de facteurs angiogéniques, vont envahir le réseau de fibrine et les fibroblastes vont produire une matrice de réparation fibreuse qui deviendra un tissu cicatriciel (491). Dans les mois suivants, la zone articulaire va former un tissu de

réparation intermédiaire entre du cartilage hyalin et du fibrocartilage (297 , 443). Ce tissu de réparation a cependant des propriétés mécaniques inférieures à celles du cartilage articulaire sain. Les quantités de PG, collagène II et autres marqueurs biochimiques du cartilage articulaire sont inférieures à celles du cartilage articulaire normal. De plus, après environ 1 an, ce tissu de réparation montre souvent des signes de détériorations comme des fibrillations, des fragmentations et des irrégularités, ce qui favorise sa dégénérescence(230).

Les données présentées soulignent que les lésions traumatiques du cartilage articulaire ne se réparent pas lorsqu'elles affectent uniquement la partie cartilagineuse de l'articulation. Lors de lésions plus profondes affectant l'os sous-chondral, l'organisme tente de réparer la lésion par la formation d'un tissu de réparation pseudo cartilagino-fibreux qui demeure transitoire. Les lésions du cartilage articulaire évoluent donc très souvent vers des lésions plus étendues de type arthrosiques.

### **2.3 Les pathologies dégénératives du cartilage articulaire : l'arthrose**

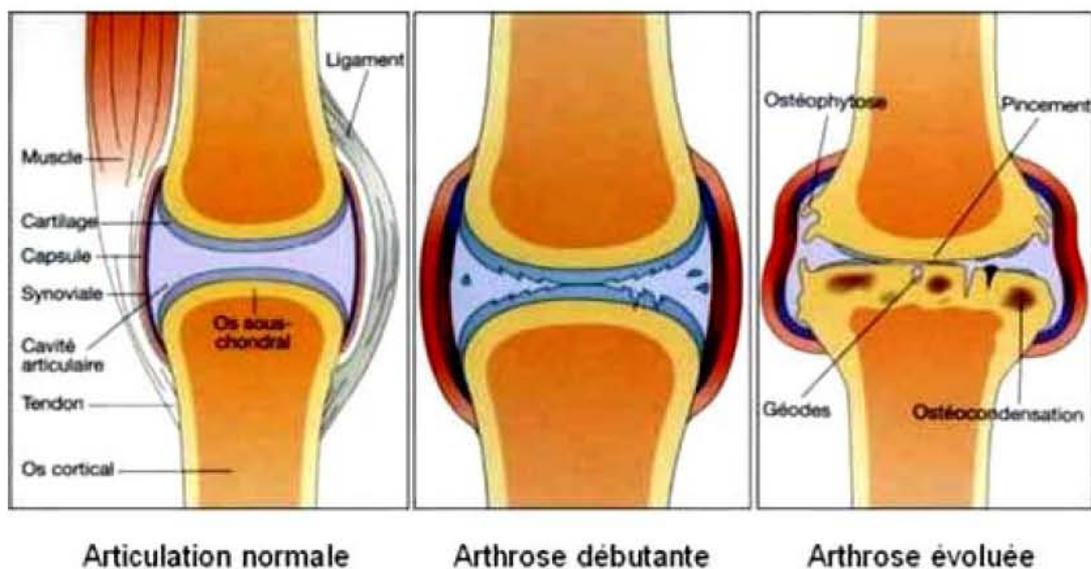
Parmi les nombreuses pathologies dégénératives du cartilage articulaire, nous ne traiterons ici que de l'arthrose. Les maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrite juvénile ou la spondylarthrite ankylosante ne seront pas abordées. Ces pathologies inflammatoires ne font en effet pas partie des cibles privilégiées de l'ingénierie tissulaire en raison des processus inflammatoires sous-jacents à l'atteinte dégénérative du cartilage.

L'arthrose est la plus fréquente des affections rhumatologiques. Avec plus de 8,7 millions de consultations et de visite par an en France, elle représente le premier motif de consultation du médecin généraliste dans les pays d'Europe de l'ouest, et la seconde cause d'invalidité après les maladies cardio-vasculaires (259). L'arthrose représente aujourd'hui la principale cause de morbidité dans tous les pays développés. En 1995, l'estimation du nombre de cas aux Etats-Unis était de 20 millions. Le vieillissement de la population américaine entraînera une augmentation de ce nombre à 60 millions en 2020 (264).

Selon l'OMS, 10% des plus de 60 ans souffrent d'arthrose, dont 80% présentent des mouvements limités et 25% se trouvent dans l'incapacité de réaliser leurs activités quotidiennes. L'arthrose constitue la cause la plus fréquente d'incapacité à long terme chez les plus de 65 ans (137).

Deux types d'arthroses peuvent être distingués : l'arthrose primaire ou idiopathique, qui n'a pas de cause précise, et l'arthrose secondaire apparaissant suite à une lésion traumatique ou autres (hérédité, inflammation ou désordres métaboliques) (155).

Le symptôme le plus typique de l'arthrose est une augmentation graduelle de la douleur et de la rigidité, dans et autour de l'articulation, associée à une altération fonctionnelle de l'articulation (162). Différentes articulations peuvent être atteintes par l'arthrose : la hanche, les vertèbres cervicales et lombaires, la première articulation métatarso-phalangienne du pied, les articulations inter-phalangiennes distales et proximales, la première articulation carpo-métacarpienne de la main et l'articulation du genou. Cependant, l'arthrose idiopathique atteint rarement l'articulation de l'épaule, du coude ou de la cheville. Elle touche préférentiellement la main, le pied, le genou ou la hanche (134). L'arthrose est la résultante d'une dégénérescence de l'articulation, un processus qui implique une perte progressive du cartilage articulaire accompagnée d'une tentative de réparation du cartilage articulaire, d'un remodelage et d'une sclérose de l'os sous-chondral, et de la formation d'ostéophytes (59, 61 ) (figure 12).



**Figure 12: Représentation schématique de l'évolution de l'arthrose**  
([www.rhumatologie.asso.fr/.../arthrose/arta14.jpg](http://www.rhumatologie.asso.fr/.../arthrose/arta14.jpg))

### 2.3.1 Physiopathogénie de l'arthrose

#### 2.3.1.1 La composante mécanique et cellulaire

Les changements macroscopiques les plus visibles dans le cartilage articulaire lors du développement de l'arthrose sont sa couleur jaunâtre ou brunâtre, l'assouplissement du cartilage ou chondromalacie, l'apparition de fibrillations et d'ulcérations du cartilage jusqu'à ce que l'os sous-chondral soit visible (7). Cela se traduit également au niveau supramoléculaire par une déstabilisation du réseau de collagène et au niveau moléculaire par une diminution du contenu en PG. Cette diminution du contenu en PG et le clivage du

collagène II se produisent à la surface du cartilage et entraîne une augmentation du contenu en eau du cartilage et une diminution de sa résistance aux tensions (166). Une fois la capacité de résistance de la MEC altérée, la lésion cartilagineuse va progresser, d'une lésion focale et superficielle elle peut atteindre l'os sous-chondral et s'étendre sur toute la surface articulaire (figure 12). Des changements importants interviennent également dans l'os sous-chondral au cours de l'arthrose. Cependant, il n'est pas encore défini si certains de ces changements précèdent les atteintes du cartilage, ou en résultent (136). Lors de stades précoces d'arthrose, il a été observé une augmentation de l'épaisseur de la plaque sous-chondrale et de l'os trabéculaire. Une augmentation de la formation osseuse, dans de multiples sites, a également été observée (16). Dans les stades plus tardifs, un remodelage excessif de l'os sous-chondral a été observé dans les zones où la couche de cartilage articulaire a disparu (7). Un épaississement de la capsule articulaire est également décrit chez de nombreux patients atteints d'arthrose, et à un stade tardif cela réduit significativement les propriétés et les mouvements de l'articulation. La fibrose de la capsule articulaire semble être largement responsable de la rigidité de l'articulation, qui après la douleur, représente le deuxième symptôme important de l'arthrose.

Le chondrocyte participe à la physiopathogénie de l'arthrose. En effet, l'arthrose peut être considérée comme la conséquence d'un échec du chondrocyte à maintenir la balance entre la dégradation de la MEC et sa synthèse. Les lésions arthrosiques du cartilage sont associées à l'augmentation de la production de métallo protéinases matricielles telles que les MMP-1, MMP-3, MMP-8 et MMP-13, les agrécanases et les ADAMTS-4 et ADAMTS-5 (A Disintegrin And Metalloproteinases with Thrombospondine) (7, 166). Ainsi, il a été supposé que la réponse métabolique du chondrocyte serait altérée suite au déséquilibre de l'intégrité matricielle entraînant une rupture entre les chondrocytes et leur matrice (179).

Dans les stades précoces d'arthrose, une augmentation transitoire de la prolifération des chondrocytes est associée à une augmentation de synthèse des protéines matricielles (279). En effet, l'expression du collagène de type II est stimulée dans les chondrocytes issus d'arthrose précoce (197), et de façon similaire à ce qui est observé dans le cartilage ostéophytique (3). Malgré l'augmentation de l'activité synthétique du chondrocyte, tous les stades de l'arthrose, ainsi que la dégénération du cartilage articulaire, sont caractérisés par une nette perte du contenu en PG (298). Les chondrocytes arthrosiques synthétisent des PG plus fragiles présentant une capacité d'agrégation moindre. Ces PG sont donc plus aisément extractibles du cartilage articulaire (499). Le phénotype des chondrocytes est modifié au niveau de la zone

superficielle au cours de l'arthrose. Ces chondrocytes expriment, en plus des gènes non chondrogéniques, les gènes codant pour les enzymes de dégradation de la MEC : les MMP-3, -9 et -13 et les ADAMTS. Ce changement phénotypique des chondrocytes a été bien étudié *in vitro* et appelé processus de dédifférenciation des chondrocytes (4). Lors de ce processus, les chondrocytes arrêtent d'exprimer l'agrécan et le collagène II, mais restent cependant actifs, et synthétisent les collagènes I, III et V. Des chondrocytes dédifférenciés vont ensuite également être retrouvés dans les zones intermédiaires et profondes du cartilage. L'activité synthétique de ces chondrocytes entraîne la formation d'une MEC de composition différente. En effet, des molécules comme le collagène III et le variant A du collagène II (collagène IIA), normalement non présents ou en faible quantité, sont détectés soit à certains stades de l'arthrose soit dans des sites inhabituels au sein du cartilage arthrosique (2). Le collagène de type X devient, au sein du cartilage arthrosique, un composant majeur de la couche profonde et de la couche calcifiée (161), où il est directement impliqué dans les calcifications caractéristiques de l'arthrose. Ceci est d'ailleurs en accord avec l'évolution phénotypique des chondrocytes vers l'hypertrophie décrite au cours de l'arthrose (402). Enfin, le stress engendré par les modifications environnementales peut entraîner une perte du contenu en cellules viables, soit par apoptose, soit par sénescence (5, 6). Ces changements participent à une diminution du contenu en PG et à une altération du réseau de collagène de la MEC cartilagineuse.

#### 2.3.1.2 *La composante inflammatoire: les facteurs cataboliques*

En plus des altérations de la fonction des chondrocytes, l'inflammation et la dérégulation des cytokines qui en découle prennent part activement au développement de l'arthrose (165, 169). Une inflammation de la synovie est souvent retrouvée dans les arthroses avancées (374). Cependant, la membrane synoviale intervient secondairement dans le processus de destruction du cartilage. Deux types de synovites sont principalement retrouvés, l'hyperplasie synoviale, et la synovite riche en déchets généralement associées aux stades tardifs de l'arthrose (416). La seconde est due aux déchets macromoléculaires du cartilage et de l'os. Les synovites, qu'elles soient de stade précoce ou tardif, entraînent la surexpression de molécules pro inflammatoires (34). Les cytokines pro inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  (interleukine -1 $\beta$ ) et le TNF- $\alpha$  ont un effet catabolique (138) important sur le cartilage. Ces cytokines stimulent la production d'enzymes de dégradation et suppriment la synthèse protéique (130, 131). Le chondrocyte lui-même participe à l'entretien de cette inflammation, d'une part en répondant aux cytokines cataboliques libérées par les autres tissus, et d'autre

part, en devenant lui même source de cytokines inflammatoires (169). Les chondrocytes sont ainsi continuellement exposés à l'effet paracrine et autocrine de fortes concentrations d'IL-1 et autres cytokines. L'IL-1 produite par les chondrocytes induit l'expression des MMP et des agrécanases responsables du clivage du collagène II dans les zones de destructions du cartilage arthrosique (479 , 521).

L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  augmentent la synthèse de prostaglandine E2 via une stimulation de l'expression et de l'activité de la COX2 (Cyclo-Oxygénase 2). Elles augmentent aussi la production de NO (Nitric oxide) en stimulant la synthèse de iNOS (inducible Nitric oxide synthase), et d'autres cytokines pro inflammatoires comme l'IL-6, le LIF (leukemia inhibitory factor), l'IL-17 et l'IL-18 ainsi que des chemokines (169). La plupart de ces molécules peuvent agir en synergie les unes avec les autres afin de favoriser la réponse catabolique du chondrocyte.

### 2.3.1.3 *Les facteurs anaboliques*

Les facteurs de croissance qui régulent le développement du cartilage articulaire sont des médiateurs anaboliques connus pour stimuler la synthèse de la MEC du cartilage articulaire (132). Parmi ces facteurs, les mieux connus pour leur action dans le cartilage articulaire sont l'IGF-1, le TGF- $\beta$ , les BMPs (BMP-2, la BMP-7ou OP-1 et BMP-14 ou GDF5), et les FGFs. Ces facteurs anaboliques voient leurs niveaux d'expression décliner avec l'âge (284).

L'IGF-1 est, dans le cartilage articulaire sain, capable de stimuler la synthèse des PG, de favoriser la survie du chondrocyte et de s'opposer à l'effet délétère de certaines cytokines. Les chondrocytes issus de cartilage arthrosique répondent moins à l'IGF-1, et ce malgré un niveau d'expression des récepteurs à l'IGF-1 normal. Ceci pourrait être dû aux IGFbps (IGF Binding Protein), molécules capables d'interférer avec l'action de l'IGF, dont l'expression est stimulée par l'IL-1 au cours de l'arthrose (229).

Les TGF- $\beta$  1, 2 et 3 sont des stimulants de la synthèse des PG et du collagène II. Les TGF- $\beta$  sont capables de contrecarrer les expressions de nombreux gènes induits par l'IL-1 au cours du développement des lésions cartilagineuses (474). Cependant, des injections intra-articulaires de TGF- $\beta$  ont entraîné la formation d'ostéophytes, un gonflement de la MEC et une hyperplasie synoviale. De plus, une étude récente a montré que le TGF- $\beta$  via la stimulation de l'expression d'ADAMTS-4 favoriserait la destruction de l'agrécane (344). Par ailleurs, l'IL-1 est capable de réguler les Smads, qui sont les médiateurs intracellulaires de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  et des BMP (235). Ainsi, au cours de l'arthrose, la voie de

signalisation du TGF- $\beta$  est inhibée, ce qui entraîne une perte de l'effet protecteur du TGF- $\beta$  (39).

Les BMP, font partie de la superfamille du TGF et sont essentielles à la chondrogenèse (168). Les BMP jouent également un rôle important dans l'homéostasie articulaire (pour revue voir (286)). Les BMP telles que la BMP-2, la BMP-7 et la BMP-14 peuvent stimuler la différenciation des précurseurs mésenchymateux en chondrocytes ainsi que la différenciation terminale hypertrophique de cellules chondroprogénitrices dérivées de périoste (175). Par ailleurs, certaines BMP comme la BMP-2 sont capables d'augmenter la synthèse de collagène II et d'agrécane dans les chondrocytes articulaires (176). La BMP-7 est, quant à elle, capable de contrecarrer certains processus cataboliques induits par l'IL-1 comme l'induction des métalloprotéases (MMP-1 et MMP-13) et la diminution de la synthèse des PG (85, 86). En effet, la BMP-7 via la voie de signalisation Smad (Small Mother Against Decapentaplegic) stimule la synthèse des protéines matricielles comme le collagène de type II et l'agrécane (425) et l'accumulation de lubricine (242).

Les FGF (FGF-2, -4, -8, -9, -10 et -18) et les récepteurs aux FGF (FGFR-1, -2 et -3) coordonnent la croissance et le développement des os longs (378). Le FGF-2 qui est un agent mitotique des chondrocytes articulaires est stocké dans la MEC du cartilage chez l'adulte. Lors de l'apparition d'une lésion cartilagineuse, ce FGF-2 est libéré et va participer au remodelage de la MEC endommagée (500). Cependant, à forte dose, il peut inhiber l'activité anabolique de l'IGF-1 et de la BMP-7 dans les chondrocytes (283). Les FGF-9 et -18 augmentent la synthèse matricielle des chondrocytes matures (119), et le FGF-18 a été montré favoriser la réparation dans un modèle de rats arthrosiques (340). Ces deux FGF peuvent être des candidats intéressants pour promouvoir la réparation du cartilage.

### 2.3.2 Les facteurs de risques de l'arthrose :

Une des causes post traumatiques de l'arthrose est un stress mécanique excessif entraînant une diminution en PG et des ruptures dans le réseau de collagène (334 , 394). Cela comprend tous les facteurs entraînant une vulnérabilité de l'articulation comme un mauvais alignement des segments osseux, une faiblesse musculaire, des prédisposition génétiques et l'âge. L'action de facteurs compromettant l'articulation ou engendrant une charge excessive sur l'articulation représente une autre cause (319). Cela implique l'obésité, certaines activités physiques et les traumatismes aigus.

### Facteurs de risques systémiques :

**L'âge** constitue le facteur de risque le plus important dans toutes les populations. Plus celui-ci augmente, plus l'incidence de l'arthrose est élevée. En effet, le pourcentage de personnes présentant une arthrose passe de 25 à 30% pour les personnes entre 45 et 64 ans à plus de 60% pour les personnes de plus de 65 ans (114). Par ailleurs, la capacité des chondrocytes à maintenir la balance métabolique diminue avec l'âge (307), ce qui altère sa fonction de réparation du cartilage articulaire (6, 307, 308). Cela se traduit par une altération de la composition et de l'organisation des PG et des collagènes (62). De plus, les chondrocytes perdent, avec l'âge, leur capacité mitotique et expriment des marqueurs de la sénescence, ce qui expliquerait leur perte de fonction (309). Le risque de développer une arthrose post-traumatique, suite à une fracture articulaire par exemple, est aussi augmenté par l'âge (306).

**Le sexe** représente également un facteur de risque, en effet, l'incidence des atteintes arthrosiques est supérieure chez la femme. Nous pouvons d'ailleurs y associer **le statut hormonal**, puisque la ménopause augmente les risques d'arthrose chez la femme (315). En revanche, le développement de l'ostéoporose protégerait de l'arthrose (262).

**L'hérédité ou le facteur de risque génétique** existe aussi. La transmission génétique s'effectue sur un mode multi-génique. Plusieurs anomalies génétiques ont été montrées associées au développement de l'arthrose. Les facteurs de risque génétiques de l'arthrose impliquent des mutations dans les gènes codants pour des protéines structurales comme les collagènes, ou pour des molécules du métabolisme de l'os et du cartilage (87). D'autres gènes candidats sont les gènes codant pour le récepteur de la vitamine D, pour l'IGF-1, la COMP et la région HLA. Des mutations dans le gène COL2A1 sur le chromosome 12 ont été retrouvées dans des familles présentant de multiples cas d'arthrose (12). En 2000, 11 gènes ont été analysés et indiquent une susceptibilité en fonction du loci (352). Par ailleurs, un lien a été suggéré entre une mutation du gène COL9A1 et une famille où les femmes sont atteintes d'arthrose de la hanche (87).

#### Facteurs de risques mécaniques :

**L'obésité** ou le surpoids est un facteur de risque majeur de l'arthrose. En entraînant des surpressions articulaires importantes, le surpoids peut être à l'origine de défaillance du cartilage articulaire (135). Par ailleurs, l'obésité augmenterait la rigidité articulaire, ce qui aurait pour conséquence d'accroître les contraintes subies par le cartilage (445). Une étude a d'ailleurs montré que le risque de gonarthrose est significativement augmenté en fonction de l'indice de masse corporelle ( $IMC = \text{poids}/\text{taille}^2$ ) (90).

**La répétition de mouvements** avec des charges lourdes pendant une dizaine d'années ou plus, comme ce peut être le cas dans *certains métiers*, augmente le risque de développer une arthrose (437).

**La déformation des articulations** comme le "*genu varum*" ou "*genu valgum*", qui crée un déséquilibre dans la répartition des pressions, peut favoriser l'apparition d'une arthrose (135).

Certaines *activités sportives* comme le football, le basket-ball, le handball et le volley-ball impliquent des efforts et des contraintes importantes au niveau des articulations. Cela crée un terrain propice à l'apparition d'arthrose (271, 456). **Les ruptures du ligament croisé antérieur** sont également souvent associées au développement de l'arthrose. (360)

## 2.4 **Les traitements**

### 2.4.1 Les traitements non pharmacologiques :

Les traitements non pharmacologiques ont été déclarés comme traitements de première intention de l'arthrose par le congrès de "l'American Collège of Rheumatology" de l'année 2000 (ACR) (177). Cependant, l'intérêt de ces traitements non pharmacologiques est limité au traitement de la gonarthrose (162).

**Exercice physique et perte de poids** sont recommandés et peuvent diminuer les risques d'arthrose ou en diminuer les symptômes. Une étude a montré qu'une femme présentant une diminution de 2 unités de son IMC sur une période de 10 ans réduisait de 50% ses risques de développer une nouvelle arthrose ou de nouveaux symptômes arthrosiques (133). Par ailleurs, une étude plus récente associant l'exercice physique et la perte de poids chez des sujets âgés et obèses a montré qu'une perte de 5,7% de la masse corporelle était associée à une diminution significative de la douleur (325, 326).

Dans le cadre des exercices physiques il faut réaliser des *mouvements continus*. En effet, le mouvement est indispensable à l'imbibition et au maintien de l'épaisseur du cartilage (351) alors que l'immobilisation complète d'un membre provoque son amincissement et une diminution de son contenu en PG. Par ailleurs le mouvement passif continu semble également avoir des effets anti-inflammatoires (139).

**Les mouvements intermittents** ont également montré un effet positif sur la réparation de lésions du cartilage. Une étude sur des genoux de singes a montré une augmentation du volume de réparation de défauts ostéochondraux suite à la réalisation de mouvements passifs

intermittents (63). Ces mouvements stimulent plus fortement la synthèse du collagène II qu'une immobilisation de l'articulation.

**Le traitement par le froid** semble soulager la douleur et la fonction de l'articulation notamment pour les arthroses de genou. Le froid réduit entre autre l'œdème de l'articulation (162).

#### 2.4.2 Les traitements pharmacologiques :

Chez beaucoup de patients arthrosiques, les traitements non pharmacologiques ne sont pas adaptés pour limiter la douleur ou améliorer la fonction articulaire. Ainsi de nombreuses thérapies ont été mises au point pour le traitement de l'arthrose. Les traitements doivent permettre de réduire la douleur, mais également d'améliorer la mobilité articulaire et de ralentir la progression du processus dégénératif. Les traitements actuellement mis en place ne permettent pas de ralentir le processus dégénératif de l'arthrose, mais les recherches s'orientent vers le développement de nouveaux traitements capables de ralentir la dégénération liée à l'arthrose.

##### 2.4.2.1 Les traitements d'action rapide :

Ce sont des molécules thérapeutiques essentiellement utilisées pour leurs propriétés antalgiques : le paracétamol (acetaminophène), les Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS), les anti-Cox2 et les opioïdes. L'ensemble des traitements pharmacologiques sont repris dans un article de synthèse de Glass (162).

**Le paracétamol** sous la forme d'acetaminophène permet de significativement réduire la douleur et augmente le bien-être des patients atteints d'arthrose (530). Cependant les doses thérapeutiques d'acetaminophène utilisées peuvent entraîner des dommages hépatiques chez les personnes présentant déjà une insuffisance hépatique (438).

**Les AINS et les anti-COX2** possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, bien que l'arthrose ne présente pas systématiquement une inflammation, ces médicaments sont indispensables et permettent une réduction de la douleur (487, 512). Cependant, les AINS non sélectifs et les anti-Cox2 présentent des effets secondaires comme des risques d'ulcère ou de troubles rénaux et une toxicité cardiovasculaire (162 , 346 , 461).

**Les glucocorticoïdes** injectés par voie intra-articulaires (IA), ont démontré leur efficacité depuis de nombreuses années et sont quotidiennement utilisés (157). Cependant, leurs effets sont de courte durée (26). Quelques effets secondaires sont observés, des rougeurs au niveau

du visage, des déséquilibres de la glycémie, une hypertension artérielle et des réactions d'immunosuppression. Des études ont même suggéré la possibilité d'une dégradation du cartilage suite à une utilisation excessive des glucocorticoïdes en IA. L'"American College of Rheumatology" (ACR) a donc recommandé de limiter à 3 ou 4 injections IA par an. Une étude récente semble cependant indiquer que ces risques de destruction cartilagineuse sont minimales (26). Les glucocorticoïdes semblent bien indiqués pour traiter les épisodes inflammatoires et réduire l'épanchement synovial, mais leur utilisation doit être de courte durée.

*Les opioïdes* sont envisagés dans le traitement de l'arthrose uniquement lorsque les autres stratégies ne permettent pas de contrôler la douleur, ou lorsque les patients ne tolèrent pas les autres traitements pharmacologiques (162). Les effets secondaires sont importants, comme le développement d'une tolérance et les risques de dépendance.

#### 2.4.2.2 *Les traitements d'action lente*

*La glucosamine* est un précurseur naturel des GAG et stimule leur synthèse, ainsi que celle des PG et du collagène (103, 496). Un effet partiel a d'ailleurs été détecté après l'injection de glucosamine à des lapins arthrosiques (447). Cependant, la glucosamine ne prévient pas l'apparition de fibrillations et d'érosion du cartilage articulaire (482). Une seule étude montre que la glucosamine, sur 3 ans, réduit de façon significative l'encombrement de l'espace articulaire (395). Cette étude est la première à mettre en lumière un éventuel effet dans le traitement de l'arthrose.

*La chondroïtine sulfate* entraîne une diminution de l'activité enzymatique catabolique du cartilage arthrosique et stimule la synthèse des GAG et du collagène. Cependant aucune étude chez l'homme ne confirme ce rôle théorique dans le cartilage articulaire. Une revue systématique évaluant les effets de la chondroïtine sulfate dans le traitement de l'arthrose rapporte un effet bénéfique qui va de modéré à large (316). L'essai clinique GAIT (Glucosamine/chondroitin Arthritis Intervention Trial) n'a cependant pas conclu à un effet analgésique significatif par comparaison au *placebo*, que ce soit lorsque la chondroïtine sulfate est administrée seule ou en combinaison avec la glucosamine (88).

*La S-adenosylmethionine (SAME)* est un composant naturel retrouvé dans tous le corps humain. L'effet *in vitro* de la SAME est une augmentation de la synthèse des PG dans le cartilage articulaire, suggérant une capacité à réparer le cartilage endommagé. D'autres mécanismes d'actions comme une diminution de l'inflammation et un effet antalgique ont été

proposés (355, 459). Une étude clinique semble montrer un effet bénéfique, du même ordre que les AINS, sur la douleur et une amélioration de la fonction articulaire. Cependant, le manque de données à long terme n'exclut pas que l'efficacité apparente de la SAME peut être liée à son effet anti-dépresseur (460).

**L'acide hyaluronique**, de par ses propriétés visco-élastiques, est indispensable à l'homéostasie articulaire. L'acide hyaluronique se comporte comme un liquide visqueux à faible pression et comme un solide élastique à forte pression. Le fluide synovial se comporte également comme un lubrifiant ou comme un absorbeur de chocs (157). Le concept de visco-supplémentation suggère que les injections intra articulaires d'acide hyaluronique peuvent aider à rétablir les propriétés visco-élastiques du fluide synovial. Cependant, l'acide hyaluronique produit une multitude d'effets biologiques *in vitro*. Par exemple, il inhibe la synthèse de prostaglandine E2 induite par l'IL-1 dans les cellules synoviales humaines, mais également la synthèse de bradykinine dans les tissus articulaires. L'acide hyaluronique présente aussi des effets anti-inflammatoires en influençant l'adhérence, la prolifération et la migration des leucocytes (50). L'effet chondroprotecteur de l'acide hyaluronique *in vitro* passe par la stimulation des TIMPs (Tissue Inhibitors of MMP) dans les chondrocytes (302). L'acide hyaluronique agit lentement, son efficacité se met en place 2 à 5 semaines après l'injection et peut persister jusqu'à 12 mois (26). De nombreux essais cliniques, bien que réalisés avec des préparations d'acide hyaluronique très variables, concluent tous à une efficacité de l'acide hyaluronique par rapport au *placebo* en terme de réduction de la douleur (510). Ces traitements de visco-supplémentation ne sont pas indiqués pour les patients présentant un stade avancé d'arthrose, ni pour les patients présentant un mauvais alignement articulaire (451). Les effets secondaires bien que rares, consistent en une douleur local au point d'injection, des réponses inflammatoires et une sensibilisation à certains composants.

Malgré des études montrant une toxicité des **inhibiteurs des MMP**, des études plus récentes sur des inhibiteurs sélectifs des MMP (47, 350) ainsi que sur la doxycycline (49) suggèrent que cette voie de recherche doit être poursuivie.

**Les inhibiteurs de cytokines** tel que l'IL-1Ra peuvent être utilisés dans le traitement de l'arthrose. Plusieurs études *in vitro* et quelques études *in vivo* dans des modèles animaux indiquent que l'IL-1Ra, le récepteur antagoniste de l'IL-1 est une cible prometteuse dans la thérapie de l'arthrose. Une étude préliminaire sur l'IL-1Ra injecté dans des genoux arthrosiques a montré une amélioration clinique (82). D'autres molécules ont également été testées pour bloquer l'action de l'IL-1 comme le Pralnacasan, un inhibiteur de l'IL-1 $\beta$

converting enzyme, qui inhibe aussi l'activation d'IL-18 et réduit significativement les dommages articulaires (423).

Il n'existe pas, à notre connaissance, de données publiées concernant les anti-TNF- $\alpha$  dans le cas de l'arthrose.

*Les facteurs de croissance* comme le basic-FGF, qui injecté en intra articulaire, stimule la formation du cartilage au cours de la réparation d'une lésion cartilagineuse chez le lapin (381). Les BMP sont connues pour induire la formation osseuse en site ectopique. La BMP-2 est capable de provoquer la différenciation terminale des chondrocytes. Le traitement de défaut cartilagineux par la BMP-2 a permis la formation d'un tissu de réparation exprimant le collagène II (440), ce qui suggère une nature cartilagineuse hyaline pour ce tissu.

Le TGF- $\beta$ 2 présente des effets supprimeurs sur la dégradation du collagène et la différenciation chondrocytaire (477). *In vivo*, le TGF- $\beta$  joue un rôle important en facilitant la synthèse de la MEC, la prolifération cellulaire et la différenciation chondrogénique (260).

Les facteurs de croissance sont majoritairement étudiés dans le cadre d'association avec des biomatériaux pouvant leur servir de système de libération ou bien dans le cadre de la thérapie génique.

#### 2.4.3 Les traitements chirurgicaux :

Les traitements chirurgicaux ne sont envisagés que lorsque la thérapie conservatrice n'a pas permis de soulager efficacement le patient, ni de restaurer une fonctionnalité articulaire.

Plusieurs interventions chirurgicales ont été développées pour traiter les pertes de substance cartilagineuse d'origine arthrosique ou non.

##### 2.4.3.1 Les interventions chirurgicales

###### Le lavage :

Ce procédé consiste à laver l'articulation par irrigation à l'aide d'une solution de sérum physiologique ou une solution de Ringer ou de Ringer lactate. Le lavage a montré des effets bénéfiques sur la douleur chez des patients présentant une articulation arthrosique ou traumatique. Cependant, le lavage était au départ une approche empirique dans le traitement de la douleur articulaire résultant d'une lésion structurale. Plusieurs théories sont avancées pour expliquer les effets bénéfiques du lavage. Le lavage enlèverait de l'articulation une grande partie des molécules de signalisation de la douleur. Il pourrait également extraire les

protéoglycanes de la couche superficielle du cartilage, permettant ainsi l'adhésion transitoire des cellules de réparation. (218). Certaines études indiquent un effet bénéfique jusqu'à un an (281), tandis que d'autres n'ont observé aucune amélioration de la douleur (159).

#### Le shaving

Ce traitement consiste à diminuer les frictions en enlevant le cartilage fibrillaire par rasage de la surface. Cette technique est généralement réalisée sous arthroscopie et indiquée principalement dans les chondromalacie rotulienne ou les douleurs patello-fémorales (375). Le rationnel de cette technique est aujourd'hui largement discuté. Un rasage réalisé chez le lapin adulte n'a montré aucun signe de formation d'un tissu de réparation même après 12 semaines (245). De plus, le cartilage articulaire restant dégénère ce qui est probablement attribué à une apoptose cellulaire (480).

#### Le débridement

Le débridement est une version encore plus drastique du "shaving" et combine le lavage, la chondroplastie, la méniscectomie, l'ablation de corps étrangers et l'ostéophyctomie. Cette technique allie donc les désavantages du rasage, qui déclenche une mort cellulaire, aux désavantages de la méniscectomie, qui provoque un mauvais alignement articulaire. Ainsi, sur le long terme cette technique aboutit à une aggravation de l'arthrose (362, 412).

#### Les techniques de stimulation des cellules souches

Toutes ces techniques visent à déclencher ou améliorer la réparation spontanée de lésions cartilagineuses en accédant à l'os sous-chondral et à la moelle osseuse. La moelle osseuse et l'os sous-chondral sont ainsi stimulés et vont permettre la réalisation du processus de réparation spontanée (voir paragraphe 2.2.2). La réparation spontanée du cartilage est bien décrite chez l'animal et donne des résultats très variables. Dans certains cas, elle aboutit à la formation de fibrocartilage, et dans certains cas elle échoue à restaurer la surface articulaire (63).

***Perforation de Pridie ("Pridie drilling").*** Cette idée de réaliser des perforations thérapeutiques du cartilage articulaire endommagé a été développée par Pridie en 1959 (222). Le but est, comme nous l'avons décrit, de stimuler la réparation spontanée. Cette technique est réalisée en majorité chez les patients atteints d'ostéochondrite disséquante (347). Cette technique permet la formation d'un tissu de réparation de type fibrocartilage et est bénéfique

pour les patients atteints d'arthrose généralisée (397). Cependant, le bénéfice apporté par cette technique chirurgicale est de courte durée (433).

**La technique de microfracture.** Cette technique est en fait une modification de la technique de Pridie, elle a été développée par Steadman et consiste en des perforations de petite taille de 4 mm de profondeur et réalisées tous les 3 à 4 mm (467). Cette technique présente plusieurs avantages, les trous de petite taille sont moins perturbants au niveau biomécanique et cette technique est mini-invasive (217). La technique de microfracture a été majoritairement appliquée à des patients jeunes et sur des athlètes, chez lesquels elle a montré de bons résultats. En effet une amélioration fonctionnelle ainsi qu'une diminution de 75% de la douleur sont décrits (455). L'équipe de Steadman a suivi 435 cas de grade IV sur une durée de 2 à 12 ans et montre une amélioration de la douleur dans 75% des cas, un état stationnaire dans 20% des cas et 5% de cas d'aggravation (466). Cette technique a montré, sur la base du contrôle arthroscopique sur 26 patients, la formation d'un tissu cartilagineux de type fibro-hyalin (466)

### L'ostéotomie

C'est une technique utilisée pour diminuer les douleurs arthrosiques lorsque l'arthrose est due à certaines déformations articulaires, comme le *valgus* ou le *varus*. Cette technique consiste à redresser l'articulation afin d'alléger les douleurs et corriger l'alignement articulaire. Elle n'induit pas la réparation du cartilage articulaire.

D'un point de vue biologique, cette technique est considérée comme délétère pour le cartilage et exacerbe la dégénération du cartilage (217, 392). Pour ces raisons, l'ostéotomie est souvent associée à d'autres techniques comme le rasage ou la chondroplastie abrasive (11). Par conséquent, l'ostéotomie est rarement recommandée lorsque l'arthrose n'est pas associée à une déformation articulaire. Par ailleurs, elle est réservée au cas de gonarthrose uni-compartmentale ou aux importantes déformations du genou (93). Le pronostic des ostéotomies dépend pour beaucoup du degré de correction de l'axe du genou. Ainsi, un degré faible de correction permet d'obtenir une bonne stabilité du genou et permet de réduire dans presque 90% des cas les symptômes douloureux (454). Les effets secondaires de l'ostéotomie sont des hémorragies au sein de l'articulation, des réactions inflammatoires du tissu articulaire et des dommages nerveux.

### Les arthroplasties et arthrodèses

Ces interventions consistent en un remplacement complet de l'articulation. Elles ne peuvent donc pas être considérées "stricto-sensu" comme des techniques de réparation du cartilage articulaire. Ce remplacement de l'articulation n'intervient que dans les cas d'arthrose hautement dégénérative.

#### 2.4.3.2 Les greffes allogéniques

Les greffes allogéniques ont été utilisées pendant plusieurs décennies pour combler des défauts cartilagineux. Leur but n'était pas de tenter de déclencher une réparation du cartilage articulaire, mais uniquement de combler les défauts avec du cartilage articulaire sain provenant généralement de cadavre (384). Un des inconvénients majeurs de cette technique est lié au prélèvement sur cadavre ce qui peut entraîner des réactions immunologiques (469). Le cartilage articulaire est pourtant considéré comme un espace immunologiquement privilégié. Ainsi, de nombreuses études réalisées chez le rat ont montré, en condition immunosuppressive et lorsque la compatibilité est optimisée, une survie du transplant sur un temps relativement long (198, 468). Les expériences cliniques chez l'homme se sont révélées particulièrement bonnes, les réactions immunologiques étant peu étendues. De plus, chez l'homme, les greffes ostéocondrales survivent plusieurs années même après congélation ou lyophilisation (29, 84, 301). Le taux de succès avec les allogreffes fraîches est de 75% à 5 ans, 64% à 10 ans, et 63% à 14 ans (154). Cette technique est maintenant utilisée préférentiellement chez les patients âgés où elle présente l'avantage d'éviter le risque de morbidité du site donneur et permet de prélever un implant provenant d'un même site anatomique (451). Cependant cette technique reste peu employée en raison du moratoire actuel qui frappe les protocoles chirurgicaux à haut risque de transmission de maladies virales ou d'agents transmissibles non conventionnels (ATNC).

#### 2.4.3.3 Les greffes de tissus autologues

##### Grefe de péricondre

Le péricondre est un tissu voisin du périoste retrouvé dans l'oreille, la trachée ou les côtes de l'adulte. Le potentiel chondrogénique et les propriétés de réparation du péricondre ont été décrits en premier par Haebler et *al.* en 1925. Mais ce n'est qu'en 1990 que Homminga a développé une technique de greffe de péricondre (205, 206). Le péricondre est fixé dans le défaut cartilagineux à l'aide d'une colle biologique. Les premiers résultats, au bout d'un an, sur 25 patients, semblaient satisfaisants du point de vue clinique, radiologique et histologique. Mais après 4 ans, les résultats se sont révélés décevants. Sur 88 patients, 55% présentent de

mauvais résultats, 8% des résultats moyens et seulement 38% de résultats bons à excellents. De plus, 53% des patients montrent des calcifications du tissu de réparation(205).

### Grefe de périoste

Les propriétés chondrogéniques du périoste, sont connues depuis de nombreuses années (371). La couche profonde (cambium layer) du périoste conserve une activité chondrogénique tout au long de la vie (356). Un pool de cellules souches adultes réside dans cette couche germinative et est capable de réactiver la néoformation du tissu. Le principe consiste dans un premier temps à préparer la lésion cartilagineuse par débridement et microfracture. Ensuite un lambeau de périoste est prélevé, d'une taille légèrement supérieure au défaut. Ce lambeau est plaqué sur le fond du défaut articulaire, la couche cambiale tournée vers la surface articulaire (285, 370 ). Le lambeau de périoste est maintenu grâce à une colle biologique, la plus utilisée étant la colle de fibrine (Tissucol<sup>®</sup>, Baxter Bioscience Biosurgery).

Les études *in vivo* ont montré le comblement du défaut cartilagineux par un tissu de type hyalin en 4 semaines chez le lapin (422). L'étude de ce néo cartilage a montré un pourcentage très élevé (93%) de collagène de type II et des taux de protéoglycane très similaires à ceux du cartilage normal.

Les expériences cliniques sont cependant quelque peu décevantes, la réparation complète d'un cartilage hyalin et la stabilité à long terme n'ont jamais été obtenues (18). Des cas de détachement de la greffe, ont également été observés. De plus, des calcifications incontrôlées ont été rapportées, ce qui a certainement contribué au haut taux d'échec. Par ailleurs, cette calcification peut s'expliquer par le fait que le lambeau de périoste est placé au fond du défaut, la couche profonde en regard de la surface articulaire. Donc, la maturation chondrocytaire va se dérouler en direction de la surface articulaire. Ainsi, les cellules hypertrophiques se retrouvent au niveau de la surface articulaire et vont minéraliser la matrice environnante (217).

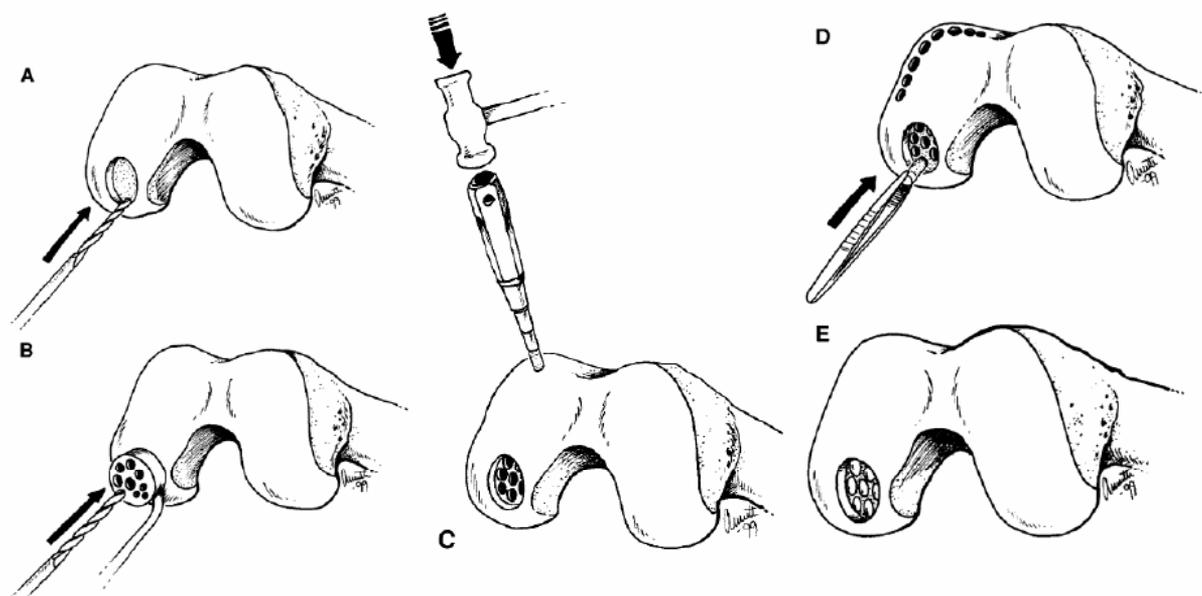
### Grefe ostéochondrale :

**Les greffes ostéochondrales, de première génération (greffe unique)** ont été développées par Lane et *al.* en 1977 (261). Les transferts ostéochondraux sur le lapin se sont révélés fiables, après un an, le cartilage transféré présente un aspect macroscopique et histologique normal. Une autre étude a utilisé le tiers externe de la rotule en un seul bloc pour combler de larges pertes de substance en zone portante. L'effet s'est révélé bénéfique chez les 10 patients traités

par cette technique (382). Malheureusement cela a entraîné l'apparition de 5 syndromes fémoropatellaires.

Les inconvénients de ces greffes massives sont que le prélèvement entraîne une importante morbidité du site donneur et que la forme est imposée. C'est pourquoi les greffes de seconde génération (greffe multiple) ont été développées et sont les seules utilisées aujourd'hui.

**La technique de greffe ostéochondrale multiple, ou mosaïcplastie** est développée depuis le début des années 1990. La greffe ostéochondrale multiple a été décrite pour la première fois par Matusue et *al.* en 1993 sur un seul cas (312). Au milieu des années 1990, Hangody et *al.* ont présenté une technique de greffe ostéochondrale multiple se déroulant en un temps, qui est référencée comme la mosaïcplastie (189). L'intérêt des greffes ostéochondrales est représenté par l'intégration de la partie spongieuse de la greffe qui fusionne avec le lit spongieux receveur, et par l'intégration du cartilage transplanté avec le cartilage hyalin adjacent par l'intermédiaire d'un fibrocartilage se formant entre les différents greffons à partir de l'os sous-chondral mis à nu.



**Figure 13 : la technique de Mopsaïcplastie.** A, le défaut est nettoyé et mesuré. B, à l'aide d'un guide, des trous sont percés dans le défaut et recevront les greffons. C, les greffons sont prélevés sur une zone moins portante de l'articulation. D, les greffons sont mis en place dans le défaut par pression. E, les greffons sont tous mis en place dans les trous. D'après Tyyni et *al.* (491)

Cette technique se déroule en un temps. Des greffes ostéochondrales cylindriques sont prélevées au niveau d'un site donneur en zone faiblement portante de l'articulation. Ces greffons sont ensuite transférés dans des puits receveurs préalablement percés au niveau de la

lésion (figure 13). La lésion chondrale est préparée avant la transplantation, par un rasage du cartilage dégénéré bordant la lésion, et par une abrasion de la base du défaut afin de mettre à nu l'os sous-chondral (491).

Les indications majeures de cette technique sont les ostéochondrites disséchantes, les traumatismes aigus, les lésions post-traumatiques de l'articulation fémorotibiale, les luxations chroniques de la rotule et l'arthrose de l'articulation fémoropatellaire (231). Actuellement, les mosaïcplasties sont réservées à des sujets de moins de 50 ans, ayant une lésion condylienne localisée, inférieure à 4 cm<sup>2</sup> nécessitant moins de 6 greffons, sans lésion en miroir et sans désaxation du genou.

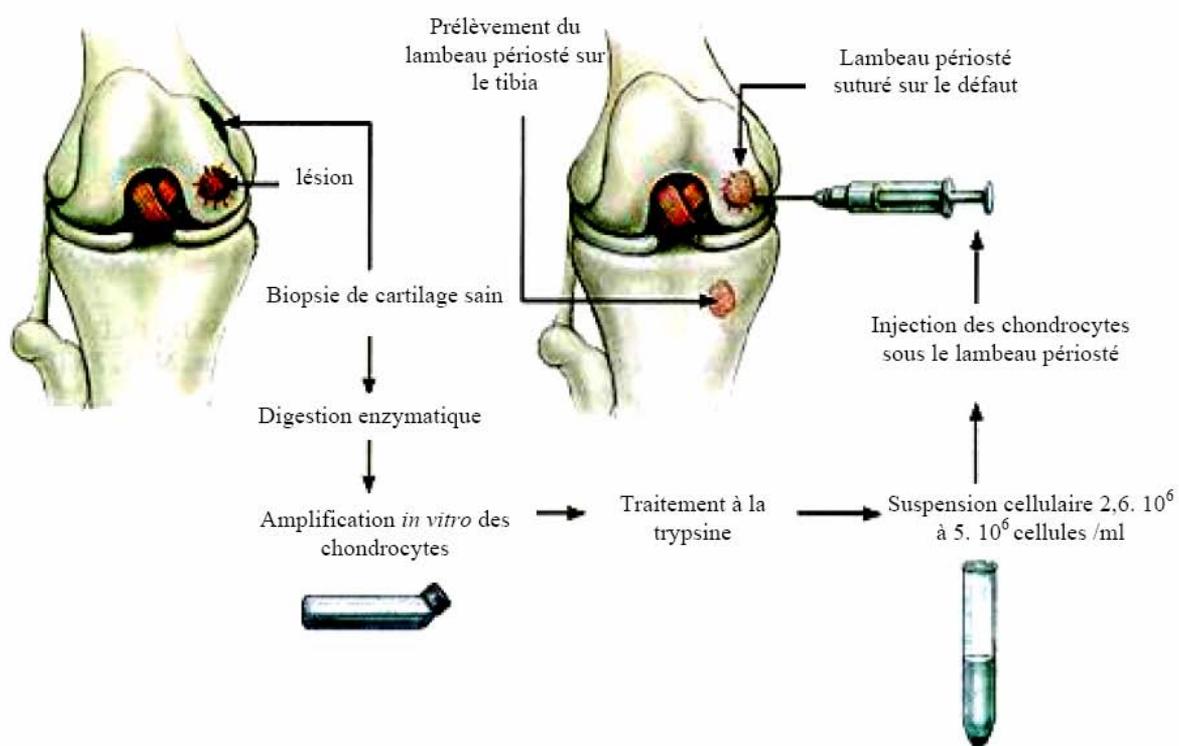
Hangody et Fules ont obtenu de bons résultats avec un recul clinique de 10 ans (188). Sur 597 lésions condyliennes, ils ont obtenu 92% de bons résultats, et sur 118 lésions fémoropatellaire, ils ont observé 79% de bons résultats. De plus 83% des biopsies présentent un cartilage hyalin et une parfaite continuité entre le tissu réparé et le cartilage sain. Des résultats similaires ont été obtenus par Jakob et *al.*, mais cette fois-ci avec un recul de seulement 2 ans (231). Cette étude montre une amélioration fonctionnelle dans 88% des cas. Après 2 ans, il persiste un fin sillon entre les greffons visible lors du contrôle arthroscopique. 5 échecs sont rapportés dans cette étude et semblent liés à la large étendue des lésions (> 5 cm<sup>2</sup>) (231).

Cette technique de mosaïcplastie présente cependant des inconvénients. L'inconvénient majeur demeure la difficulté à couvrir de larges pertes de substance (>3 cm<sup>2</sup>). Il reste également une incertitude sur l'avenir des greffons à long terme, car le site donneur ne présente pas les mêmes propriétés mécaniques que le site receveur. Par ailleurs, la technique de mosaïcplastie est souvent associée à des compressions tissulaires non physiologiques et délétères, notamment lors du prélèvement et de la mise en place des greffons(217).

#### Grefe de chondrocytes autologues

Une des voies de recherche explorée pour tenter de réparer des lésions du cartilage articulaire consiste à transplanter des cellules isolées capables de reproduire la chondrogenèse au sein du défaut cartilagineux. Ainsi en 1989, Grande et *al.* ont démontré, chez le lapin, que l'ajout de chondrocytes cultivés sous le transplant de périoste augmentait la réparation cartilagineuse obtenue comparativement au périoste seul (173). Brittberg et *al.* furent les premiers à publier des résultats cliniques de transplantation de chondrocytes autologues (ACI : autologous chondrocyte implantation) chez l'homme (53).

L'ACI se déroule en trois temps, une phase de prélèvement, une phase de culture des chondrocytes *in vitro* et une phase de transplantation (figure 14). Le prélèvement de cartilage sain est réalisé par une biopsie sous arthroscopie dans une zone non portante de l'articulation. Cette biopsie est ensuite soumise à un traitement enzymatique permettant d'isoler les chondrocytes de leur matrice. Ces chondrocytes isolés sont ensuite multipliés *in vitro*, par une culture classique en monocouche, pour obtenir une quantité suffisante de cellules. Enfin, dans un troisième temps, les chondrocytes sont réimplantés sous un lambeau de périoste. Cette troisième étape est réalisée sous arthrotomie, car elle nécessite le prélèvement du lambeau de périoste et sa suture sur le cartilage au dessus de la lésion (54).



**Figure 14 Transplantation de chondrocytes autologues, technique de Brittberg.** D'après Brittberg et al. (53)

Cette technique n'est pour l'instant appliquée qu'aux Etats-Unis où la FDA (Food and Drug Administration) lui a délivré en 1997 une première autorisation. Cet accord concernait la culture de chondrocytes autologues, dans l'indication de réparation des pertes de substance chondrale cliniquement significatives et symptomatiques du condyle fémoral dues à des traumatismes aigus ou répétés avec une contre-indication dans le cas de l'arthrose. En 2000, cet accord a été renouvelé mais son indication a été restreinte aux cas d'échecs à une autre technique chirurgicale de réparation du cartilage.

En 2005, un rapport de la Haute Autorité de Santé (190) a évalué la technique de transplantation de chondrocytes autologues. A partir de 70 documents, 12 études cliniques ont été retenues :

- 3 études randomisées comparatives dont deux avec la mosaïcplatie (35 , 208) et une avec la technique de microfracture (252).
- 6 études prospectives (52 , 81 , 195 , 332 , 335 , 373).
- 3 études rétrospectives (396 , 400 , 401)

Les études cliniques montrent une amélioration encourageante des signes cliniques, amélioration estimée à 87% un an après la greffe, 84% après trois ans lors d'une étude prospective et 89% après 5 ans lors d'une autre étude. Les échecs varient de 5 à 16% et surviennent précocement dans les 2 années suivant la greffe. Les complications rapportées sont des hypertrophies du périoste, des adhérences, une hypertrophie du tissu de réparation dans 20% des cas et une arthrofibrose dans 5% des cas. Cependant, des biais méthodologiques sont retrouvés dans toutes les études et les données sur les évènements indésirables sont souvent parcellaires, voire manquantes.

Ainsi cette technique de transplantation de chondrocytes autologues est indiquée pour des patients jeunes (< 50 ans), et pour des pertes de substance chondrale inférieure à 8 cm<sup>2</sup>. Par ailleurs, l'environnement mécanique doit être correcte (pas de mauvais alignement).

En revanche, cette technique est contre-indiquée pour toutes les pathologies inflammatoires et synoviales, l'arthrose, les lésions en miroir, les ménisectomies totales et les lésions inférieures à 1 cm<sup>2</sup>. Elle est également fortement déconseillée en cas de surpoids et de tabagisme.

D'autres inconvénients sont liés à cette technique de transplantation de chondrocytes autologues. Le prélèvement est difficile à réaliser et entraîne une morbidité importante au niveau du site donneur (217). Le lambeau de périoste n'est pas toujours étanche, ce qui entraîne une fuite des cellules dans la cavité articulaire. Par ailleurs, des cas de calcifications du cartilage ont été rapportés avec l'utilisation de ce lambeau de périoste.

Finalement, les chondrocytes lorsqu'ils sont amplifiés en monocouche perdent leur phénotype. Ils se dédifférencient (435). Ces chondrocytes, une fois dédifférenciés, ne peuvent pas réacquérir un phénotype chondrocytaire en culture monocouche (36 , 462). Ces chondrocytes dédifférenciés une fois implantés vont alors former un fibrocartilage dont les

propriétés mécaniques et biologiques sont inférieures à celles du cartilage articulaire normal. Ce fibrocartilage finira, d'ailleurs, par dégénérer (217).

Malgré tout, l'ACI est un succès dans le domaine de la réparation du cartilage articulaire. En effet, outre les résultats cliniques satisfaisants, cette technique a permis l'essor de nouvelles voies de recherche. La technique MACI (matrix-induced autologous chondrocytes implantation) dérive directement de l'ACI. Dans la MACI, le lambeau de périoste est remplacé par une membrane à base d'un mélange de collagène I et III. Cette membrane est stabilisée sur le défaut par de la colle de fibrine (27). Ces techniques de transplantations de chondrocytes autologues (ACI et MACI) sont considérées comme les premières thérapies cellulaires du cartilage faisant appel au principe de l'ingénierie tissulaire (115, 361).

### **3    INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE ARTICULAIRE**

#### **3.1   Généralité-définitions**

Les lésions ou pertes d'organes ou tissus provoquent des changements structuraux et métaboliques entraînant une importante morbidité voire même, en fonction de l'organe affecté, la mort (115). Les thérapies existantes pour traiter les pertes de tissus ou d'organes consistent en la pose de prothèses pour remplacer, dans certaines limites, la structure et la fonction de l'organe lésé. L'ingénierie tissulaire associe les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie pour développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus (263). Le principe de l'ingénierie tissulaire est donc d'utiliser une matrice biocompatibleensemencée avec des cellules appropriées, ou chargée avec des molécules biologiquement actives afin de favoriser la différenciation et la maturation cellulaire (489). Deux approches simples sont développées en ingénierie tissulaire. La première approche est de fabriquer entièrement *in vitro* un tissu fonctionnel avant son implantation. La deuxième approche est, au contraire, d'implanter un greffon immature, c'est-à-dire ayant été cultivé peu de temps *in vitro*, puis de permettre sa maturation *in vivo* (77).

Avec sa faible cellularité et sa matrice avasculaire, le cartilage articulaire est considéré comme un bon candidat pour l'ingénierie tissulaire, notamment parce qu'il demande moins d'apport métabolique (23). Trois composants sont importants dans l'ingénierie tissulaire du cartilage, les matrices, les cellules et les morphogènes. L'une des voies de recherche concerne donc le développement de matrices capables de répondre aux attentes de l'ingénierie tissulaire du cartilage. L'autre voie tente de déterminer la source de cellule idéale. Enfin, le dernier volet de cette recherche est orienté vers l'optimisation des conditions de culture permettant de

stimuler la chondrogenèse *in vitro* ou *in vivo* (à l'aide de bioréacteur par exemple). Finalement, le récent développement et la maîtrise des techniques de biologie moléculaire et de thérapie génique, permettent d'envisager des approches utilisant le génie génétique pour l'ingénierie du cartilage articulaire.

### 3.2 Les matrices

De nombreuses matrices ont été testées *in vitro* et *in vivo* lors d'études précliniques et cliniques. Ces matrices peuvent être classées selon leurs natures, protéiques, polysaccharidiques, synthétiques ou naturelles ou selon leurs formes (massives, massives poreuses, mousses, liquides visqueux et hydrogels). Il faut aussi noter que de nombreuses associations entre des matrices de différentes natures ont été testées. Parmi les matrices en cours de développement, les hydrogels représentent, de par leur structure et leurs propriétés, des matériaux attractifs pour l'ingénierie du cartilage.

La matrice idéale doit être biocompatible, elle doit prévenir les réactions inflammatoires et immunologiques liées à son implantation, afin de préserver le tissu receveur. Elle doit offrir un environnement tridimensionnel favorable à la prolifération et la différenciation cellulaire. La matrice doit présenter une certaine porosité pour permettre la migration des cellules et la diffusion des molécules, des nutriments et de l'oxygène. La matrice doit également permettre la fixation des cellules pour les maintenir dans l'implant et sur le site d'implantation. Elle peut aussi être bioactive et permettre la libération homogène et contrôlée de facteurs de croissance ou de morphogènes. Enfin, la matrice doit adhérer aux tissus, posséder une certaine résistance et conserver son intégrité mécanique afin d'éviter son écoulement ou sa fuite après implantation. La matrice doit être, de préférence, applicable par chirurgie mini-invasive donc si possible injectable. Dans le cas contraire, sa forme et sa taille doivent pouvoir être adaptées à la forme et la taille de la lésion. Elle doit, bien sûr, pouvoir être stérilisée afin d'éviter les contaminations par des agents pathogènes, et ce sans subir de modification de ses propriétés physiques, chimiques ou biologiques. Enfin, elle doit être dégradable pour s'intégrer dans les processus physiologiques de remodelage tissulaire.

Les principales matrices utilisées en ingénierie tissulaire du cartilage sont référencées dans le tableau 1. Ces différentes matrices sont, par ailleurs, à la base de la formation de nombreuses autres matrices mixtes. Ces matrices mixtes sont obtenues soit par une association de deux ou plusieurs des matrices décrites dans le tableau 1, soit modifiées chimiquement ou

structurellement (361). Seules les matrices les plus couramment utilisées en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire seront décrites plus en détail.

Type de matrice	référence	
Matrice à base de protéine	Collagène*	(257, 373, 436, 504, 505)
	Fibrine*	(196, 452, 494, 513)
	Laminine (Matrigel™)	(48, 65)
	Gélatine	(73, 129, 280)
Matrices à base de polymères polysaccharidiques	Agarose*	(25, 108, 411)
	Alginate*	(14, 142, 333, 389)
	Acide hyaluronique*	(128)
	Chitosan*	(339)
	Cellulose*	(348, 409, 472)
Matrices à base de Polymères artificiels	Acide poly lactique*	(110, 523)
	Acide poly glycolique*	(144)
	Fibres de carbone*	(24, 71)
	Dacron (polyéthylène téréphtalate)*	(327, 331)
	Téflon (polytetrafluoroéthylène)*	(328-330)
	polyestherurethane	(171)
	Acide polybutyrique	(253)
	polyéthyléméthacrylate	(124)
	Phosphates de calcium	(73, 212, 348)

**Tableau 1 : Types de matrices utilisées en ingénierie tissulaire du cartilage** (\* matrices décrites dans les paragraphes suivants)

### 3.2.1 Les matrices protéiques

#### 3.2.1.1 Les matrices de collagène

Les matrices de collagène ou éponges de collagène sont parmi les matrices les plus utilisées dans l'ingénierie du cartilage. Ce sont les collagènes de type I et II qui sont principalement utilisés pour la conception de ces biomatériaux. Le collagène est naturellement dégradé par des collagénases et sérines protéases. Sa dégradation peut être ainsi contrôlée localement par les cellules présentes dans le tissu (111). Ces matrices de collagène implantées seules améliorent le processus de réparation spontanée des défauts ostéocondraux chez le lapin (287). Ces matrices de collagène ont le plus souvent été associées à des chondrocytes (505) ou

des cellules souches mésenchymateuses (CSM) pour réparer des défauts ostéochondraux (266). Des CSM ensemencées dans des gels de collagène I et III puis implantées dans des défauts ostéochondraux chez le lapin ont permis la formation de cartilage et d'os sous-chondral (504). Cependant, le tissu de réparation s'est révélé mécaniquement inférieur au cartilage articulaire sain et a montré des signes de dégénérescence après 24 semaines. De plus, l'utilisation de collagène I d'origine bovine a entraîné, chez certains patients, la production d'anticorps dirigés contre le collagène I (317).

Les gels de collagène comme l'atelocollagène, sont des supports favorables à la culture de chondrocytes et à la synthèse de la MEC. Ces gels de collagène ont été utilisés comme support tridimensionnel pour la culture de chondrocytes autologues *in vitro*. Ces greffons réalisés *in vitro* ont ensuite été implantés dans des lésions ostéochondrales chez l'homme (373). Les résultats obtenus sont très encourageants, puisque lors du contrôle arthroscopique le cartilage paraît sain dans 93% des cas. Par ailleurs, les tests biomécaniques indiquent une réponse équivalente entre le tissu réparé et le cartilage sain. En immunohistochimie, le tissu réparé contient également du collagène II.

Une autre étude clinique multicentrique montre des résultats préliminaires positifs. Des greffons de gels de collagène contenant des chondrocytes autologues ont été implantés, après culture tridimensionnelle *in vitro*, dans des lésions focales du cartilage articulaire (436). Des CSM dérivées de la moelle osseuse ont également été implantées dans un gel de collagène dans des lésions cartilagineuses chez l'homme (257). Après 7 mois, le tissu formé semble être de type hyalin, et après 1 an les patients ont récupéré une activité normale.

### 3.2.1.2 Les colles de fibrine

La colle de fibrine est obtenue par polymérisation du fibrinogène en présence de thrombine (452). Le fibrinogène est physiologiquement à l'état liquide dans le sang. Il est activé et polymérise en cas de lésions vasculaires ou dans certaines situations pathologiques (217). Le rôle physiologique de la fibrine est de promouvoir l'activité de réparation. La fibrine présente aussi une activité pro inflammatoire, elle induit sa propre dégradation et sa substitution par les composants de la MEC. Par ailleurs ses produits de dégradation ne sont pas toxiques.

Plusieurs études ont utilisé la colle de fibrine comme matrice pour augmenter la réparation du cartilage (149, 399, 494). La colle de fibrine a, par ailleurs, été utilisée comme support de chondrocytes dans des défauts cartilagineux chez le cheval (196). Ceci a permis la formation d'un tissu cartilagineux de type hyalin présentant un contenu élevé en PG et en collagène II.

La colle de fibrine a également été utilisée pour implanter des CSM dérivées de la moelle osseuse dans des défauts cartilagineux chez le cheval (514). Après 30 jours, les défauts comblés par la fibrine contenant les MSC présentaient un score arthroscopique amélioré par rapport à celui de la fibrine seule. Certains des implants fibrine-MSc contenaient majoritairement du collagène de type II. Cependant, après 6 mois aucune différence significative n'a été observée entre les défauts traités par la fibrine contenant les MSC ou la fibrine seule (514). L'utilisation de la fibrine reste cependant limitée par son manque de stabilité mécanique. Chez l'homme, elle est utilisée dans la technique de transplantation de chondrocytes autologues pour étanchéifier le lambeau de périoste (400).

### 3.2.2 Les matrices polysaccharidiques

#### 3.2.2.1 L'agarose

L'agarose est un polysaccharide isolé d'algues chinoises qui contient des résidus de L- et D-galactose. L'agarose a été très utilisé *in vitro* en tant que matrice pour la culture 3D des chondrocytes, notamment pour des études fondamentales. Il a été utilisé pour étudier la différenciation chondrogénique des cellules souches (25). Cependant, lorsqu'il est implanté seul, l'agarose inhibe le processus de réparation spontanée (411). L'implantation d'agarose, renfermant des chondrocytes ou des cellules souches, dans des défauts ostéochondraux a permis de former un tissu de réparation contenant des collagènes et des protéoglycanes (108). Cependant, compte tenu de sa faible dégradation, l'agarose a été très peu étudié *in vivo* et n'a par conséquent jamais été utilisé chez l'homme à notre connaissance.

#### 3.2.2.2 L'alginate

L'alginate est un dérivé polysaccharidique linéaire composé d'acide D-manuronique et d'acide L-guluronique purifié à partir d'algues brunes. L'alginate peut subir une gélification réversible en milieu aqueux. Cette réticulation est dépendante du calcium et sa dissolution peut être obtenue très rapidement en utilisant des chélateurs du calcium comme l'EDTA. *In vivo*, l'alginate n'est pas spécifiquement dégradé mais subit une lente dissolution (111). L'alginate a été très utilisé *in vitro* comme système de culture tridimensionnelle de chondrocytes (43, 70). Ces études indiquent que l'alginate permet le maintien du phénotype chondrocytaire et la synthèse des protéines de la MEC cartilagineuse (14). L'implantation en sous-cutané chez la souris *nude* de constructions d'alginate contenant des CSM du tissu adipeux différenciées vers un phénotype chondrocytaire *in vitro* a permis la production de protéines matricielles cartilagineuses (123).

Cependant, les études *in vivo* ont montré des résultats décevants. Implanté seul, l'alginate a inhibé la réparation spontanée (142). L'alginate associé à des chondrocytes et implanté *in vivo* dans des défauts ostéochondraux ne permet pas la formation d'un tissu de réparation et entraîne des réactions immunologiques sévères (333, 388). Par conséquent, l'alginate n'a, à notre connaissance, pas été testé chez l'homme dans le cadre de réparation de défauts cartilagineux (217).

### 3.2.2.3 L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique, est un composant physiologique de la MEC cartilagineuse (cf. chapitre I. 1.2.2.3). Il forme des macromolécules de taille importante, qui sont parfaitement biocompatibles. L'acide hyaluronique est dégradé naturellement par des hyaluronidases (111). Sa dégradation peut cependant conduire à la formation de produits pouvant entraîner une chondrolyse (251).

Les matrices à base d'acide hyaluronique sont utilisées comme support ou vecteur de chondrocytes. Ces matrices associées à des chondrocytes sont capables d'augmenter la formation de MEC cartilagineuse *in vitro* et *in vivo* (483). L'acide hyaluronique peut également être associé à d'autres matrices, un tri polymère de gélatine/ chondroïtine sulfate/ acide hyaluronique a permis le maintien du phénotype chondrocytaire et la synthèse de collagène II *in vitro* (74). Une étude clinique sur 141 patients avec 3 ans de recul a montré de bons résultats (299). Une autre étude réalisée avec le Hyalograft<sup>®</sup> (Fidia Advanced Biopolymers, Italie) associé à des chondrocytes autologues et implantés dans des défauts ostéochondraux a permis d'améliorer la fonction articulaire des 8 patients traités (404). Après 1 an, sept patients présentent un tissu mixte composé de fibrocartilage et de cartilage hyalin, un seul présente un tissu de nature totalement hyaline.

### 3.2.2.4 Le chitosan

Le chitosan est un polymère naturel appartenant à la famille des GAG. C'est un copolymère linéaire de N acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) et D glucosamine (GlcN) liés par des liaisons  $\beta_{1-4}$  (339). Le chitosan est principalement retrouvé dans les cuticules des arthropodes, l'endosquelette des céphalopodes et des champignons. Le chitosan peut être associé avec la chondroïtine sulfate pour former des hydrogels (217). Les matrices à base de chitosan sont biocompatibles et très utilisées, que ce soit pour l'encapsulation cellulaire, la libération de principes actifs et la culture cellulaire (339). La dégradation du chitosan est réalisée par le lysosome (111).

Plusieurs études *in vitro* indiquent que les matrices à base de chitosan sont capables de faciliter la réparation cartilagineuse, de promouvoir l'activité chondrogénique et l'expression des protéines de la MEC par des chondrocytes humains (217). Le chitosan a, par ailleurs, été associé à différents autres polymères, comme l'alginate ou l'acide hyaluronique (106). Les études animales de réparation de défauts cartilagineux articulaires, à l'aide de matrices à base de chitosan montrent la formation d'un tissu de réparation de type hyalin (200). Cependant, les matrices à base de chitosan n'ont pas encore été évaluées chez l'homme à notre connaissance.

#### 3.2.2.5 La cellulose

La cellulose est un polymère semi-cristallin de glucose de formule générale  $(C_6H_{10}O_5)_n$  avec  $n$  pouvant aller de 500 à 5000 résidus. C'est, de plus, le polymère naturel le plus répandu dans la nature, on le trouve sous forme semi-cristalline dans les végétaux comme le coton ou le bois. La cellulose est dégradable par des enzymes, les cellulases, et sa solubilité dans l'eau dépend de la longueur de sa chaîne (348). La biocompatibilité de la cellulose et de ses dérivés est bien établie (310). La cellulose et ses dérivés ont été employés sous forme de membranes ou de gels adhésifs (17). La cellulose a également été utilisée en ingénierie osseuse (146, 310) et du cartilage (472).

*In vitro*, un polymère à base de cellulose a permis la prolifération de chondrocytes et montre une bonne biocompatibilité (348). De la cellulose bactérienne a également été testée, et a permis la prolifération de chondrocytes fonctionnels (472). Cependant, peu d'études *in vivo* ont été réalisées dans le domaine de la réparation du cartilage articulaire.

### 3.2.3 Les matrices artificielles

#### 3.2.3.1 L'acide poly lactique et l'acide poly glycolique

L'acide poly lactique (PLA) et l'acide poly glycolique (PGA) sont obtenus à partir d'hydroxypolyesters alpha. Ils ont été élaborés pour former des fils de suture résorbables (vicryl™), et des dispositifs médicaux résorbables (vis, plaques). Depuis une vingtaine d'années, ils sont testés, seuls ou mélangés, dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage (151, 511). Ces polymères peuvent se présenter sous différentes formes, qui vont de la fine couche fibrillaire à la forme d'éponge. Le PGA est celui qui présente les meilleurs résultats *in vitro*, avec l'obtention d'une densité cellulaire proche de celle retrouvée *in vivo* et une production continue de collagène II (372). Les études *in vivo* ont été réalisées pour la plupart

chez le lapin (144). Le PLA et le PGA sont dégradés soit par une réaction chimique d'hydrolyse, soit par des enzymes clivant spécifiquement les oligopeptides (111). Cependant, leurs produits de dégradation sont partiellement cytotoxiques (361). De plus, ces polymères ont entraîné des réactions immunologiques importantes (217). Ces polymères ont été utilisés, sous forme de microsphères chargées avec un principe actif, pour la libération intra-articulaire de principe actif (236, 237). Une étude clinique d'implantation de BioSeed<sup>®</sup> (BioTissue technologie, Fribourg Allemagne) contenant des chondrocytes articulaires autologues, sur deux ans, montre la formation d'un cartilage de type hyalin et une amélioration clinique significative (380). Les résultats à long terme permettront de conclure sur l'efficacité ou non de cette technique en comparaison avec la mosaïcplastie.

### *3.2.3.2 Les fibres de carbone*

Les fibres de carbone sont utilisées depuis plus de 20 ans en orthopédie. C'est un composé inerte chimiquement, qui ne déclenche pas de réponse biologique spécifique. Les fibres de carbone ont été utilisées pour combler des lésions cartilagineuses chez le lapin dans le but d'augmenter la réparation spontanée. Les résultats ont montré une augmentation de la réponse spontanée. Cependant aucune amélioration dans la nature du tissu formé n'a été observée. Il s'agit d'un tissu fibreux vascularisé présentant de faibles propriétés mécaniques (71). Malgré ces résultats peu encourageants, les matrices en fibres de carbone ont été appliquées chez l'homme avec des résultats très variables. Une étude clinique a été réalisée en 2005 sur 12 patients, où des implants en fibres de carbone ont été utilisés pour combler des défauts cartilagineux (24). Les patients ont montré une amélioration précoce des signes cliniques, mais les résultats du suivi à long terme demeurent incertains.

### *3.2.3.3 Le Dacron et le Téflon*

Le Dacron (polyéthylène terephthalate) et le Téflon (polytétrafluoroéthylène) ont été utilisés en expérimentation animale dans le but d'améliorer la réparation spontanée du cartilage articulaire chez le lapin. Les résultats ont montré la formation d'un tissu de réparation, cependant, la nature du tissu néoformé varie entre un tissu fibreux très vascularisé et un fibrocartilage (330, 331). Une seule étude rapporte l'utilisation de ce matériel chez l'homme. Les résultats ont montré une amélioration de la douleur et une amélioration de la fonction articulaire dans 70 à 80% des cas. Cependant, un effet délétère sur la rigidité articulaire a été observé (100). Les études chez l'homme dans le cadre de la réparation du cartilage articulaire n'ont donc pas été poursuivies. Par ailleurs, lors de l'utilisation de ces matériaux comme fil de

suture, ou en tant que ligament artificiel des réactions immunologiques plus ou moins importantes ont été rapportées (217).

### 3.2.4 Les hydrogels

Une autre façon de classer ces matrices est réalisée à partir de leur formulation chimique. Dans ce paragraphe, nous n'évoquerons que la plus pertinente pour l'ingénierie tissulaire : les hydrogels.

La médecine régénérative s'oriente aujourd'hui vers le développement de techniques chirurgicales de moins en moins invasives. Ceci dans le but de réduire la morbidité et la durée d'hospitalisation. Cette recherche d'une chirurgie mini-invasive a motivé le développement de matrices injectables pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Ces matrices injectables doivent également pouvoir prendre en masse une fois implantées, acquérir la forme désirée et présenter des propriétés mécaniques en relation avec le tissu à réparer(361).

Des polymères ayant un fort pouvoir viscosifiant dans l'eau peuvent servir à réaliser des hydrogels par réticulation physique, ionique ou covalente. Dans ce cas, ils forment de véritables réseaux macromoléculaires en 3D comparables à la MEC. Les hydrogels sont une nouvelle classe de biomatériaux capables de satisfaire ces prérequis. Les hydrogels sont composés de chaînes de macromolécules hydrophiles synthétiques ou naturelles. Des modifications chimiques ou physiques de leurs structures sous l'influence d'agents de gélification (glutaraldéhyde), d'irradiation, de variation de température ou pH conduisent à la formation de structures gélifiées appelées hydrogels (111). Le réseau de polymère présente une maille contenant de grandes quantités d'eau et mime ainsi l'environnement tridimensionnel des cellules dans le cartilage (464). La porosité des hydrogels peut être modifiée par modulation de la densité et de la taille de la maille (115). Ces polymères capables de former des hydrogels sont d'origine naturelle ou synthétique et sont décrits dans le tableau 2.

Type de matrices		Références
<b>Naturelles</b>	Acide hyaluronique	(30, 276, 444)
	Alginate	(15, 22, 118)
	Chitosan	(471)
	Chondroïtine sulfate	(495)
	Collagène	(473)
	Colle de fibrine	(419, 450)
<b>synthétiques</b>	Poly lactide-co-glycolique	(323, 324)
	Polyéthylèneglycol	(116, 117, 246)
	Polyvinyl alcool	(66)
	Polyporpylène fumarate	(478)

**Tableau 2 : matrices injectables pour l'ingénierie tissulaire du cartilage**

Compte tenu du rôle prépondérant que jouent actuellement les hydrogels en ingénierie tissulaire du cartilage mais aussi de l'os, nous avons contribué à la rédaction d'un article de revue sur ce sujet (article 2).

*Article 2 : les hydrogels pour l'ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage*

Résumé :

L'ingénierie tissulaire est un domaine émergent de la médecine régénérative et prometteur pour la restauration des tissus et organes affectés par des maladies chroniques, des dégénérescences liées à l'âge, des déformations congénitales ou des traumatismes. Durant la dernière décennie, l'ingénierie tissulaire a évolué depuis l'utilisation des biomatériaux seuls, qui ne font que remplacer une petite surface lésionnelle, vers l'utilisation de matrices tridimensionnelles contrôlables dans lesquelles des cellules peuvent êtreensemencées avant implantation. Ces implants cellularisés sont destinés à devenir l'équivalent fonctionnel du tissu sain, rendant ainsi possible la régénération de défauts de grande taille. Parmi les matrices récemment développées pour l'ingénierie tissulaire, les polymères sous forme d'hydrogels se sont révélés satisfaisants pour la réparation du cartilage et de l'os. Des avancées et progrès en physiologie et biologie fondamentale sont maintenant nécessaires afin de transférer cette preuve de concept vers une réalité clinique. Cet article résume les récentes avancées de l'ingénierie tissulaire concernant les matrices à base d'hydrogel utilisées en médecine régénérative de l'os et du cartilage.

## Article 2

### **Cartilage and bone tissue engineering using hydrogels**

C. Vinatier, J. Guicheux, G. Daculsi, P. Layrolle, P. Weiss

Biomedical materials and engineering 2006; 16 (4 Suppl) S107-13

# Cartilage and bone tissue engineering using hydrogels

C. Vinatier<sup>a,b</sup>, J. Guicheux<sup>a,b,\*</sup>, G. Daculsi<sup>a,b</sup>, P. Layrolle<sup>a,b</sup> and P. Weiss<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> *Inserm 791, Nantes, France*

<sup>b</sup> *University of Nantes, Faculté de chirurgie dentaire, 1 place Alexis Ricordeau, F-44042 Nantes cedex, France*

**Abstract.** Tissue engineering is an emerging field of regenerative medicine which holds promise for the restoration of tissues and organs affected by chronic diseases, age-linked degeneration, congenital deformity and trauma. During the past decade, tissue engineering has evolved from the use of naked biomaterials, which may just replace small area of damaged tissue, to the use of controlled three-dimensional scaffolds in which cells can be seeded before implantation. These cellularized constructs aims at being functionally equal to the unaffected tissue and could make possible the regeneration of large tissue defects. Among the recently developed scaffolds for tissue engineering, polymeric hydrogels have proven satisfactory in cartilage and bone repair. Major technological progress and advances in basic knowledge (physiology and developmental biology) are today necessary to bring this proof of concept to clinical reality. The present review focuses on the recent advances in hydrogel-based tissue engineered constructs potentially utilizable in bone and cartilage regenerative medicine.

## 1. Introduction

Tissue engineering is an emerging field of regenerative medicine which holds promise for the restoration of tissues and organs affected by chronic diseases, age-linked degeneration, congenital deformity and trauma. Tissue engineering consists of building tissue and organ using cells grown on natural or artificial biomaterials outside the body. Bone and cartilage tissues have taken advantage of the recent efforts in tissue engineering and have shown proof of concept in clinical situations [1,2].

The physiological process of bone remodelling confers to this connective tissue a strong self-healing capacity. With respect to this property, a great variety of natural and synthetic bone substitutes have been considered as means to repair bone loss. Among these substitutes, calcium phosphate (CaP) biomaterials, which display biocompatibility, bioactivity and excellent osteoconductive properties have frequently been used for bone replacement and reconstruction in many different clinical applications, such as repair of bone defects [3], spinal bone augmentation [4], periodontal treatment [5], or coatings for metallic implants [6]. CaP ceramics, are commercially available as granules or blocks. The macroporosity of CaP blocks facilitates the penetration of cells and biological growth factors into the implant [7], allowing the osteogenic process [8] to occur within the inner surface of pores in order to achieve bone neoformation.

Percutaneous techniques have also been developed in radiology, orthopaedics and especially spine surgery. Filling of vertebral body and bone cysts have been reported using acrylic bone cement [9]. These hardening and injectable biomaterials make possible the repair of small bone losses but without osteoconduction process. In parallel, suspension of calcium phosphate granules in a polymeric solution

---

\*Corresponding author. Fax: +33 2 40 08 37 12; E-mail: jerome.guicheux@nantes.inserm.fr.

have also been reported to be a convenient mean for filling bone cysts and alveolar sockets [10–12]. Contrarily to the acrylic bone cement, the injectable bone substitute (IBS) is bioactive, resorbable and osteoconductive. Despite the large body of evidence indicating that the above mentioned materials are suitable matrices for bone filling, neither CaP ceramics, bone cements, nor IBS have osteogenic properties still too limited for large osseous reconstruction, particularly in territory with limited repair capacity (irradiated area).

Cartilage is an avascular and aneural tissue with poor capacity for self-healing. This poor spontaneous repair of cartilage strongly depends on the depth of articular lesion. On the one hand, partial thickness defects, which affect only the superficial cartilage layer does not heal spontaneously. On the other hand, injuries that affect not only the cartilage but also the subchondral bone, exhibit a repair process leading to the formation of a fibrocartilage. This fibrocartilage however does not display the mechanical properties of native articular cartilage [13,14] and degrades rapidly following injury. For these reasons, we can likely rule out the possibility of using cell-free scaffolds for cartilage repair. The above mentioned data strongly highlights the necessity of developing innovative therapeutic approaches for the treatment of bone and cartilage. Tissue engineering which combines the disciplines of cell biology and biomedical engineering could open new therapeutic windows in bone and cartilage-applied regenerative medicine.

## 2. Organic synthetic matrix for tissue engineering

Tissue engineering aims at using autologous cells that are harvested, amplified and associated to a synthetic matrix in order to carry out an autologous bone or cartilage graft. This synthetic matrix should provide with a three-dimensional environment allowing cell culture and tissue growth. Macroporous biodegradable polymers have been used for this purpose [15]. However, uniform cell seeding and culturing within these macroporous polymers remains difficult due to limited penetration of cells and diffusion of nutrients. Furthermore, these bulk macroporous polymers are not suitable for percutaneous surgery.

Another approach is to mix cells with a viscous aqueous solution made of a hydrophilic polymer. This mixture of cells and polymer solution could be injected in the surgical site. By chemical modification, the polymer is then cross-linked and harden *in situ*. Hydrogels are highly valuable scaffolds for three-dimensional culture of cells due to their biomimetic nature. Indeed, hydrogels like cartilage and bone tissues contain high amount of physiological fluids hold by macromolecular matrix. Hydrogels are produced from natural polymers (proteins or polysaccharides) or from synthetic polymers (polylactic acid, polyethylene oxide, polyvinyl alcohols). Hydrogels replace many functions of the native extracellular matrix, organizing cells into three dimensions, providing with a mechanical integrity to the new tissue, and allowing the diffusion of nutrients and metabolites to and from the cells. The development of hydrogels offers new opportunities for tissue engineering but also for setting up culture systems *in vitro* that recapitulate the 3D organization and the differentiated function of these tissues. The mixture of the cells with the gel is done either prior to the implantation at various times of differentiation of cells or at the time of surgery. One of the key features of these hydrogels is related to the uniformity of cells seeding within the whole material.

Physic or covalent hydrogels have been used [16–18]. Properties of hydrogels may be also adapted to those of host tissues. For instance, mechanical strength, degradation kinetics, visco-elastic and mass transfer (diffusion) properties as well as cellular and tissue adhesion may be adjusted to the clinical indication. Numerous hydrogels are already used for osteo-articular tissue engineering in particular for cartilage, but none of these materials address the demand for regenerating tissues. Many different types

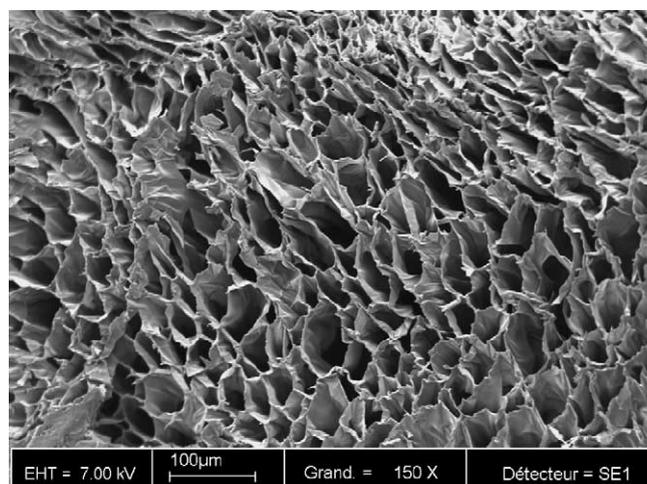


Fig. 1. Scanning electron microscopy observation of the surface of freeze dried hydrogel made of silanized hydroxypropyl methylcellulose (Sil-HPMC). Bar = 100  $\mu$ M.

of matrices have therefore been evaluated including natural polymers like hyaluronic acid [19–21], alginate [22–24], collagen [25–27], fibrin glue [28] and chitosan. However, some of these matrices elicit foreign body giant cell reaction and inflammatory responses [29] and obviously have not been applied in human articular cartilage repair. Alternatively, in an attempt to limit the use of products from biological origin, synthetic matrices were developed including polyglycolic acid, polylactic acid, polyvinyl alcohol, polyhydroxyethyl methacrylate. Most of these polymers are however known to induce inflammatory responses due to their degradation products.

A self-setting hydrogel has recently been developed by our group. It consists of a silanized hydroxypropyl methylcellulose (Si-HPMC). The chemical grafting of silicon groups on the cellulose hydrogel backbone allows the cross-linking reaction in function of pH [30–32]. This cross-linking reaction occurs when the pH solution decreases without any adjuvant or catalytic agent. In alkaline media, the silanol groups are ionized and cellulose chains are not linked. With a decrease of pH, R–Si–O–Na<sup>+</sup> groups turned into R–Si–OH groups which are very reactive. Polycondensation occurs via R–Si–O–Si–R covalent bridges forming a three-dimensional network. The parameters such as pH, swelling and quantity of grafted silanol may be adjusted and properties of the self-setting hydrogels are controlled using oscillatory rheological measurements. The quantity of water in hydrogels determines partly their mechanical and biological properties. The challenge with hydrogels is to obtain optimal mechanical strength without decreasing cell viability and function. Hydrogels containing high water level (>95% wt.) have usually a compressive strength lower than 0.01 Pa.

In order to improve their mechanical strength, several groups have removed water from hydrogels by freeze-drying making foams. As shown in Fig. 1, foams with 3-dimensional alveolar structures are produced using this method [33,34]. These foams have similar drawbacks than the macroporous polymers namely, low cell penetration and non-injectable materials.

### 3. Cartilage engineering

The field of tissue engineering has offered promising strategies for the replacement of damaged cartilage. In 1994, autologous chondrocyte transplantation has been introduced into clinical use as a novel bi-

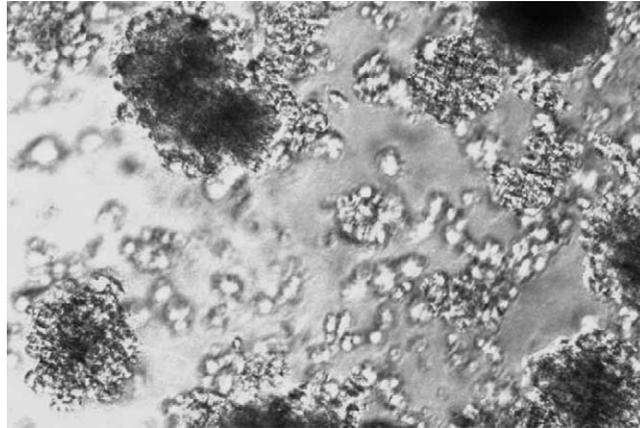


Fig. 2. Light microscopy observation of osteosarcoma-derived human osteoblasts SaOS2 seeded on the surface of hydrogel after 11 days of culture. The cells cannot spread on the surface and self organise like clusters. Original magnification  $\times 200$ .

ological approach [2]. Human articular chondrocytes are harvested from healthy and non-weight-bearing areas of the joint. Chondrocytes are subsequently expanded in monolayer culture in order to achieve sufficient amounts of cells to fill the defect. In a second operation, chondrocytes are placed in the defect under a periosteal flap [2]. Despite encouraging results (lower pain), this method presents some limitations and often leads to the formation of a fibrocartilaginous tissue biochemically and biomechanically inferior to the original hyaline cartilage [35]. In the development of cartilage tissue engineering strategies, implants should include reparative cells able to synthesize hyaline cartilage. Articular chondrocytes from little load bearing regions are commonly used as a chondrocyte source. With respect to the donor site morbidity occurring after harvesting articular cartilage, the use of alternative chondrocyte sources has been also considered. Harvest of nasal cartilage requires less invasive surgery than harvest of articular cartilage and the resulting morbidity is significantly reduced [36]. MSC are stromal cells that support hematopoiesis, and have the ability to give rise to many lineage such as adipocytes, osteoblasts and chondrocytes [37]. MSC are therefore considered to be a promising alternative cell source for cartilage engineering [38].

Many different organic synthetic matrices have been evaluated but most of these polymers are however known to induce immune and/or inflammatory response after *in vivo* implantation. The innovative self-setting hydrogel scaffold Si-HPMC mentioned above is cytocompatible and permit growth of chondrocytes, inside its volume, in nodule forms. The chondrocytes remains phenotypically stable and able to synthesise cartilage-like ECM [39]. Furthermore, hybrid construct associating Si-HPMC to human nasal chondrocytes implanted subcutaneously in nude mice leads to the formation of a cartilaginous tissue *in vivo* [40].

#### 4. Bone engineering

The majority of polymers used for hydrogels are too hydrophilic and does not allow cellular adhesion (Fig. 2). These hydrogels may be suitable for non-adherent cells (Fig. 3) but not adapted to osteoblasts which need to adhere to develop and produce the extracellular bone matrix. Some research groups have grafted Arg–Gly–Asp (RGD) sequences on the macromolecule backbone in order to promote the adhesion of cells [41–43]. The attachment and spreading of cells have been related to the peptide con-

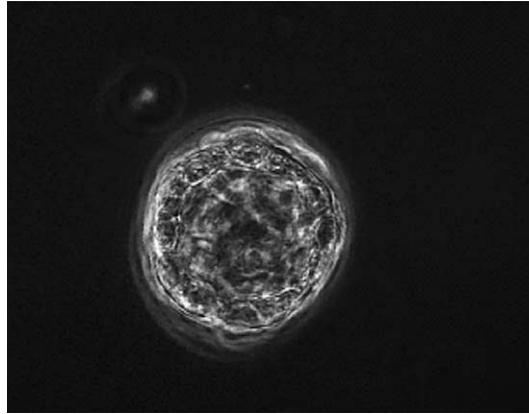


Fig. 3. Confocal microscopy observation of human nasal chondrocytes three-dimensionally cultured in Si-HPMC hydrogel for 4 weeks. Original magnification  $\times 163$ .

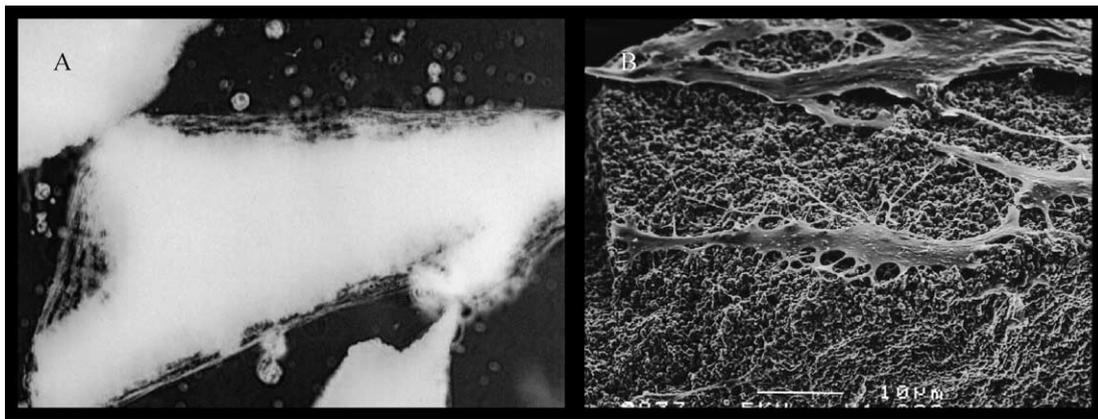


Fig. 4. Light microscopy (A) observation of rat total bone marrow cells and scanning electron microscopy (B) observation of SaOS2 cells cultured into Si-HPMC hydrogel blended with BCP granules. (A) Original magnification  $\times 100$ ; (B) Bar =  $10\mu\text{M}$ .

centration grafted onto the polymer. Cell adhesion directly influences cell growth, differentiation and migration as well as morphogenesis, integrity and repair.

Another approach is to add a matrix to the hydrogels allowing the adhesion and growth of cells. This matrix could be made of calcium phosphates which are bioactive and osteoconductive. Combining hydrogels and calcium phosphate ceramics could lead to new scaffolds for bone tissue engineering with a synergy between the properties of the two biomaterials. We have developed a new composite made of biphasic calcium phosphate (BCP) particles suspended into a Si-HPMC hydrogel [44,45]. The BCP/hydrogel composite can be seeded with cells and injected through a needle before hardening. The hydrophilic polymeric phase makes the composite injectable and maintains inter granular spaces for uniform cells and bone tissue growth. As shown in Fig. 4, the BCP granules allow the bone cells adhesion and growth. Other granules of calcium phosphate like anorganic bone mineral (ABM) coated with peptides like P-15 have been used to improve cell attachment and activity in the hydrogel [46].

## 5. Conclusion

Different materials with specific presentations and properties may be used to mimic the extra cellular matrix of bone or cartilage. They may be associated with cells and/or proteins or ADNC for obtaining hybrid bone or cartilage functional autografts. Biotherapy is a new tool for regenerative medicine and this wide field of investigation would be developed during the next decade for addressing the increasing demand of bone and cartilage grafts.

## References

- [1] R. Quarto, M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, S.M. Kutepov, V. Mukhachev, A. Lavroukov, E. Kon and M. Marcacci, *N. Engl. J. Med.* **344** (2001), 385–386.
- [2] M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson and L. Peterson, *N. Engl. J. Med.* **331** (1994), 889–895.
- [3] G. Daculsi, N. Passuti, S. Martin, C. Deudon, R.Z. Legeros and S. Raheer, *J. Biomed. Mater. Res.* **24** (1990), 379–396.
- [4] N. Passuti, G. Daculsi, J.M. Rogez, S. Martin and J.V. Bainvel, *Clin. Orthop.* (1989), 169–176.
- [5] K. De Groot, *Bioceramics of Calcium Phosphate*, Boca Raton, CRC Press, 1983.
- [6] J. Delecrin, G. Daculsi, N. Passuti and B. Duquet, *Cells and Materials* **4** (1994), 51–62.
- [7] G. Daculsi and N. Passuti, *Biomaterials* **11** (1990), 86–87.
- [8] J. Toquet, R. Rohanizadeh, J. Guicheux, S. Couillaud, N. Passuti, G. Daculsi and D. Heymann, *J. Biomed. Mater. Res.* **44** (1999), 98–108.
- [9] P. Kaemmerlen, P. Thiesse, P. Jonas, C.L. Berard, J. Duquesnel, Y. Bascoulergue and C. Lapras, *New England J. Med.* **321** (1989), 121.
- [10] O. Gauthier, D. Boix, G. Grimandi, E. Aguado, J.M. Bouler, P. Weiss and G. Daculsi, *J. Periodontol.* **70** (1999), 375–383.
- [11] P. Weiss et al., *Biomaterials* **24** (2003), 4591–4601.
- [12] O. Gauthier, R. Muller, D. von Stechow, B. Lamy, P. Weiss, J.-M. Bouler, E. Aguado and G. Daculsi, *Biomaterials* **26** (2005), 5444–5453.
- [13] C.T. Vangsness, Jr., P.R. Kurzweil and J.R. Lieberman, *Am. J. Orthop.* **33** (2004), 29–34.
- [14] J.A. Buckwalter, *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* **28** (1998), 192–202.
- [15] M. Hacker, J. Tessmar, M. Neubauer, A. Blaimer, T. Blunk, A. Gopferich and M.B. Schulz, *Biomaterials* **24** (2003), 4459–4473.
- [16] K.Y. Lee and D.J. Mooney, *Chem. Rev.* **101** (2001), 1869–1879.
- [17] J.L. Drury and D.J. Mooney, *Biomaterials* **24** (2003), 4337–4351.
- [18] Q. Hou, P.A. De Bank and K.M. Shakesheff, *J. Mater. Chem.* **14** (2004), 1915–1923.
- [19] L.A. Solchaga, J.E. Dennis, V.M. Goldberg and A.I. Caplan, *J. Orthop. Res.* **17** (1999), 205–213.
- [20] A. Pavesio, G. Abatangelo, A. Borriore, D. Brocchetta, A.P. Hollander, E. Kon, F. Torasso, S. Zanasi and M. Marcacci, *Novartis Found Symp.* **249** (2003), 203–217; discussion 229–233, 234–238, 239–241.
- [21] J.M. Williams, V. Rayan, D.R. Sumner and E.J. Thonar, *J. Orthop. Res.* **21** (2003), 305–311.
- [22] W.J. Marijnissen, G.J. van Osch, J. Aigner, S.W. van der Veen, A.P. Hollander, H.L. Verwoerd-Verhoef and J.A. Verhaar, *Biomaterials* **23** (2002), 1511–1517.
- [23] J. Bonaventure, N. Kadhom, L. Cohen-Solal, K.H. Ng, J. Bourguignon, C. Lasselin and P. Freisinger, *Exp. Cell Res.* **212** (1994), 97–104.
- [24] S.B. Cohen, C.M. Meirisch, H.A. Wilson and D.R. Diduch, *Biomaterials* **24** (2003) 2653–2660.
- [25] J.S. Temenoff and A.G. Mikos, *Biomaterials* **21** (2000), 431–440.
- [26] K. Chaipinyo, B.W. Oakes and M.P. van Damme, *J. Orthop. Res.* **20** (2002), 1070–1078.
- [27] L. Galois, A.M. Freyria, L. Grossin, P. Hubert, D. Mainard, D. Herbage, J.F. Stoltz, P. Netter, E. Dellacherie and E. Payan, *Biorheology* **41** (2004), 433–443.
- [28] D. Passaretti, R.P. Silverman, W. Huang, C.H. Kirshhoff, S. Ashiku, M.A. Randolph and M.J. Yaremchuk, *Tissue Eng.* **7** (2001), 805–815.
- [29] E.B. Hunziker, *Osteoarthritis Cartilage* **10** (2002), 432–463.
- [30] M. Lapkowski, P. Weiss, G. Daculsi and A. Dupraz, WO 97/05911 0 (1995), 0–0.
- [31] X. Bourges, P. Weiss, A. Coudreuse, G. Daculsi and G. Legeay, *Biopolymers* **63** (2002), 232–238.
- [32] X. Bourges, P. Weiss, G. Daculsi and G. Legeay, *Adv. Colloid Interface Sci.* **99** (2002), 215–228.
- [33] L. Ren, K. Tsuru, S. Hayakawa and A. Osaka, *Biomaterials* **23** (2002), 4765–4773.
- [34] P.O. Bagnaninchi, M. Dikeakos, T. Veres and M. Tabrizian, *Biotechnol. Bioeng.* **84** (2003), 343–350.
- [35] H.J. Mankin, *J. Bone Joint Surg. Am.* **64** (1982), 460–466.

- [36] W. Kafienah, M. Jakob, O. Demarteau, A. Frazer, M.D. Barker, I. Martin and A.P. Hollander, *Tissue Eng.* **8** (2002), 817–826.
- [37] 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 and D.R. Marshak, *Science* **284** (1999), 143–147.
- [38] D. Magne, C. Vinatier, M. Julien, P. Weiss and G. Guicheux, *Trends in Molecular Medicine* (2005), in press.
- [39] C. Vinatier et al., *Biomaterials* **26** (2005), 6643–6651.
- [40] C. Vinatier, D. Magne, A. Moreau, O. Gauthier, O. Malard, C. Vignes-Colombeix, G. Daculsi, P. Weiss and J. Guicheux, *Osteoarthritis and Cartilage* (submitted).
- [41] S. Verrier, S. Pallu, R. Bareille, A. Jonczyk, J. Meyer, M. Dard and J. Amedee, *Biomaterials* **23** (2002), 585–596.
- [42] G.B. Schneider, A. English, M. Abraham, R. Zaharias, C. Stanford and J. Keller, *Biomaterials* **25** (2004), 3023–3028.
- [43] J.A. Rowley, G. Madlambayan and D.J. Mooney, *Biomaterials* **20** (1999), 45–53.
- [44] P. Weiss, C. Vinatier, J. Guicheux, G. Grimandi and G. Daculsi, *Key Engineering Material* **254–256** (2004), 1107–1110.
- [45] C. Trojani, P. Weiss, J.F. Michiels, C. Vinatier, J. Guicheux, G. Daculsi, P. Gaudray, G.F. Carle and N. Rochet, *Biomaterials* **26** (2005), 5509–5517.
- [46] H. Nguyen, J.J. Qian, R.S. Bhatnagar and S. Li, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **311** (2003), 179–186.

### 3.3 Les cellules

Les cellules constituent la deuxième composante de l'ingénierie tissulaire. A ce jour, plusieurs sources de cellules ont été étudiées. Ces différentes sources incluent des chondrocytes d'origines diverses et des cellules chondroprogénitrices comme les cellules souches mésenchymateuses (CSM) issues de la moelle osseuse, du périoste, du périchondre ou du tissu adipeux.

#### 3.3.1 Les Chondrocytes

Les chondrocytes sont à priori les cellules de choix pour l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. Des chondrocytes adultes possédant la capacité de former une MEC ont été isolés à partir de différentes sources comme le cartilage articulaire, le septum nasal, les cartilages des côtes et le cartilage auriculaire (223, 234). Cependant les chondrocytes auriculaires sont issus d'un cartilage de type élastique, qui ne présente pas les propriétés mécaniques du cartilage hyalin (articulation, septum nasal). Une étude a comparé la capacité des chondrocytes, de différents sites anatomiques, à former un tissu cartilagineux *in vitro* et *in vivo* (223). Cette étude révèle que chaque type de chondrocytes forme un tissu présentant les caractéristiques de son tissu d'origine. Ainsi un chondrocyte provenant d'un cartilage élastique formera un cartilage élastique. Dans l'optique d'une application à la réparation du cartilage articulaire, il faudra donc préférer un prélèvement de cartilage hyalin comme source de chondrocytes. La comparaison rapportée aux chondrocytes hyalins (nasaux, costaux, et articulaires) montrent une supériorité des chondrocytes costaux et nasaux sur les chondrocytes articulaires en terme de quantité de cartilage formé en sites sous-cutanés. Cependant une des limites importantes à l'utilisation des chondrocytes, quelle que soit leur origine, est relative à l'instabilité de leur phénotype en culture monocouche. En effet, les chondrocytes cultivés en monocouche perdent leur phénotype. Cela se traduit par une perte de l'expression des marqueurs du phénotype chondrocytaire que sont le collagène II et l'agrécan principalement, mais également de la SZP (superficial zone protein) (95). Cette perte du phénotype chondrocytaire s'accompagne de l'orientation des cellules vers un phénotype fibroblastique. L'acquisition de ce phénotype fibroblastique est caractérisée par une augmentation de l'expression du collagène I et l'adoption d'une forme en fuseau caractéristique des fibroblastes (435). Ce processus de dédifférenciation est néanmoins réversible. En effet, si des chondrocytes dédifférenciés sont replacés dans un environnement tridimensionnel, ils réacquièrent leur phénotype différencié (109, 292). Cette culture en 3D des chondrocytes

peut être réalisée de plusieurs façons que nous détaillerons dans la partie 3.4 (modes et conditions de culture).

Certaines études ont utilisé des chondrocytes isolés à partir de cartilage arthrosique. Cependant, les chondrocytes arthrosiques subissent des modifications métaboliques, telle que le dérèglement de leur balance entre l'anabolisme et le catabolisme, qui peuvent entraîner une altération de la réponse cellulaire (147, 427). Les chondrocytes arthrosiques semblent donc inappropriés pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Il a cependant été suggéré que ces chondrocytes arthrosiques sont capables de récupérer un phénotype chondrocytaire normal, après isolation et mise en culture tridimensionnelle *in vitro* (475). Ces chondrocytes retrouvent un niveau d'expression du collagène II et une production de PG comparable aux chondrocytes normaux. Ceci suggère que les chondrocytes arthrosiques pourraient être une source de chondrocytes pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Malgré ces données positives, les articulations arthrosiques présentent souvent une perte, en quantité, du cartilage articulaire, ce qui limite d'autant la quantité de tissu prélevable.

### 3.3.2 Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules pluripotentes, caractérisées par leurs capacités de prolifération et de différenciation. En effet, les CSM sont capables, d'une part d'auto renouvellement et, d'autre part, de s'orienter vers un phénotype chondrocytaire, adipocytaire, ostéoblastique, myogénique et neurogénique (69, 403). La découverte de ces cellules a ouvert la voie pour de nouvelles stratégies thérapeutiques, en partie grâce à leur facilité d'accès.

La source de CSM la plus utilisée est la moelle osseuse, mais des CSM ont également été isolées à partir d'autres tissus comme les muscles (213), le tissu adipeux (160, 533), le périoste ou le périchondre (97). Par ailleurs, la pluripotentialité des CSM isolées de la moelle osseuse, du tissu adipeux (534), du muscle ainsi que de la membrane synoviale a été démontrée (98).

Ces CSM pourraient être d'un intérêt majeur pour l'ingénierie tissulaire. En effet, elles peuvent être utilisées comme des cellules autologues ou non. Ces cellules ne semblent en effet pas posséder de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, responsables du rejet immunitaire. Il est maintenant bien établi que les CSM possèdent des propriétés immunomodulatrices. Les CSM sont capables d'inhiber la fonction des cellules T matures suites à leur activation par des antigènes non spécifiques. Elles sont aussi capables de

diminuer la réponse des cellules T mémoires et naïves. Elles peuvent également prolonger la survie de greffe présentant une mauvaise histocompatibilité. Elles réduisent ainsi les réactions du greffon contre l'hôte (254). Les CSM pourraient donc potentiellement être utilisées comme source allogénique (104) de cellules pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.

Contrairement aux chondrocytes autologues, les CSM peuvent être facilement manipulées pour devenir des chondrocytes (488). Cependant, la différenciation chondrogénique des CSM en culture tridimensionnelle aboutit souvent à une hypertrophie des chondrocytes et à la minéralisation de la MEC (359, 398). Il semble que les CSM, dans ces conditions de culture, suivent une différenciation de type endochondrale entraînant une hypertrophie précoce. Cette hypertrophie se traduit par l'expression du collagène X, de la MMP13 et de la phosphatase alcaline ainsi que par la minéralisation de la MEC. La différenciation chondrogénique des CSM devra donc être contrôlée avant leur utilisation dans la réparation du cartilage afin de prévenir tout risque de minéralisation du tissu néoformé (187, 398).

### **3.4 Modes et conditions de culture**

Les prélèvements de cartilage sont limités en quantité et donnent après isolement peu de chondrocytes. Ainsi, l'utilisation des chondrocytes en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire nécessite une étape de multiplication des cellules *in vitro*. Par ailleurs, l'utilisation des CSM en ingénierie tissulaire nécessite dans certains cas une différenciation vers un phénotype adapté nécessitant une étape d'orientation *in vitro*. Les techniques de culture nécessaire à la multiplication ou l'orientation des cellules peuvent être divisées en 3 types principaux, la culture en monocouche ou 2 dimensions (2D), la culture en 3 dimensions (3D) et la culture en conditions multifactorielles dans des bioréacteurs. Des morphogènes regroupant des facteurs de croissance mais aussi des facteurs environnementaux comme la tension en oxygène et des contraintes mécaniques ont également été décrits.

#### **3.4.1 Culture en monocouche**

La culture en monocouche est la méthode de culture de référence permettant d'amplifier les cellules rapidement. En effet, les chondrocytes qui physiologiquement prolifèrent très peu, deviennent prolifératifs en culture monocouche (296). Cependant, ces chondrocytes, dans ces conditions d'amplification, perdent leur phénotype après plusieurs passages (36). Cela se traduit par une perte de leur capacité de synthèse de PG et le changement de la synthèse du collagène de type II en synthèse du collagène de type I (36).

La culture monocouche à haute densité est capable de ralentir la dédifférenciation. Tout comme la culture en monocouche sous une interface constituée d'un film soit de collagène, d'agarose ou de méthacrylate. Cependant, ces techniques ne font que ralentir la dédifférenciation des chondrocytes (32). Par ailleurs, ces systèmes de culture en monocouche ne semblent pas favorables à l'amplification et à la différenciation des CSM vers un phénotype chondrocytaire. En effet, la différenciation chondrogénique des CSM nécessite entre autre de cultiver les cellules dans un environnement tridimensionnel.

#### 3.4.2 Culture en 3 dimensions

Les chondrocytes lorsqu'ils sont cultivés en 3D conservent leur phénotype différencié (232, 414). De plus, des chondrocytes dédifférenciés par une culture en monocouche, récupèrent leur phénotype lorsqu'ils sont placés en culture tridimensionnelle (36, 43). Les mécanismes moléculaires régissant ces phénomènes de dédifférenciation et redifférenciation sont encore aujourd'hui mal connus. Il semble cependant que les molécules impliquées dans l'adhésion et les communications cellules-matrice, comme les intégrines, participent à ces phénomènes. En effet, les intégrines  $\alpha3\beta1$  et  $\alpha5\beta1$  médiant les interactions avec la fibronectine sont exprimées par les chondrocytes articulaires normaux, alors que les intégrines  $\alpha1\beta1$  et  $\alpha2\beta1$ , médiant les interactions avec le collagène de type VI sont caractéristiques des chondrocytes dédifférenciés (405).

Plusieurs techniques de culture ont été développées, la culture d'organe, par exemple, où des morceaux de cartilage sont mis en culture. Cependant, sous cette forme, les cellules ne peuvent pas être amplifiées ni manipulées. La culture en suspension place les cellules dans un environnement tridimensionnel, mais ce système de culture ne reflète pas la situation des chondrocytes *in vivo* qui sont isolés et entourés d'une abondante matrice. Les systèmes de culture en 3D au sein de biomatériaux poreux ou matrices de polymère représentent des systèmes de culture plus proche de la physiologie (13, 502). L'utilisation de polymères (alginate, agarose (216) ou PGA (305)) pour la culture 3D des chondrocytes a donc été largement décrite.

#### 3.4.3 Les bioréacteurs

Les bioréacteurs constituent des systèmes de culture mécaniquement actifs et contrôlables pouvant être utilisés pour étudier et potentiellement améliorer la structure, l'intégrité et les propriétés des tissus générés (145). Les paramètres physicochimiques spécifiques peuvent, grâce aux bioréacteurs, être maintenus à des niveaux définis de façon reproductible (361). Le

bioréacteur idéal doit apporter au tissu une stimulation mécanique proche des conditions *in vivo*. Ceci s'effectue grâce à des charges mécaniques ou hydrodynamiques améliorant la chondrogenèse, la synthèse de la MEC, et offrant une oxygénation et nutrition du tissu meilleures que celles observées en culture statique (64, 78). En ce qui concerne la production de tissu *in vitro*, les bioréacteurs peuvent augmenter la taille du tissu néoformé et sa cellularité (503). Ces systèmes de culture augmentent l'agrégation des chondrocytes, la formation de la MEC et l'établissement rapide des interactions cellules-cellules (64). Différents bioréacteurs sont capables de fournir différents environnements dynamiques conduisant à une variété de propriétés des tissus formés. Les cultures de cartilage en bioréacteurs ont été développées pour produire des composés hybrides cellules-biomatériaux prêts à être transposés dans l'environnement dynamique *in vivo*. De plus, les bioréacteurs offrent un système de culture permettant d'étudier la biologie tissulaire sous des conditions contrôlées pouvant être physiologiques ou pathologiques (278).

#### 3.4.4 Les morphogènes

##### 3.4.4.1 Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont utilisés pour maintenir le phénotype chondrocytaire ou différencier les CSM vers un phénotype chondrocytaire. Il a été montré qu'un certain nombre de facteurs de croissance sont impliqués dans la maturation des chondrocytes et la formation du cartilage (99). Ces facteurs incluent de façon non exhaustive les TGF- $\beta$ , les BMP, les CDMP (cartilage derived morphogenetic protein), les FGF et l'IGF-1.

Les TGF- $\beta$ 1, -2 et -3 sont des peptides multifonctionnels détectés dans beaucoup de tissus de l'organisme. L'expression du TGF- $\beta$ 1 est restreinte à la zone proliférative et préhypertrophique du cartilage. Le TGF- $\beta$ 2 est exprimé dans tout le cartilage de la plaque de croissance, mais plus fortement dans la zone hypertrophique et la zone minéralisée (209). Le TGF- $\beta$ 3 est plus fortement exprimé dans la zone hypertrophique et la zone minéralisée. Le TGF- $\beta$ 1 induit la chondrogenèse d'une lignée cellulaire de CSM, les C3H10T1/2. Cela se traduit par une augmentation du niveau d'expression du gène *Col2a1* (102). Le TGF- $\beta$ 1 induit la différenciation précoce d'une lignée de cellules préchondrogéniques. Les productions d'agrécan et de collagène II sont augmentées, mais le TGF- $\beta$ 1 semble inhiber la différenciation terminale des chondrocytes (186). L'ajout de TGF- $\beta$ 1 au cours de la différenciation chondrogénique des CSM entraîne 100% de différenciation par comparaison

aux 25% obtenus avec les cellules non traitées par le TGF- $\beta$ 1 (233). De plus, le TGF- $\beta$ 1 a été montré augmenter l'expression du collagène II dans des CSM isolées de moelle osseuse de cheval (517).

Les BMP favorisent plusieurs étapes de la chondrogenèse (525). Les BMP stimulent l'expression des gènes Sox *in vitro* et *in vivo* (191). Une augmentation des protéines Sox a aussi été observée dans le cartilage *in vivo* après implantation de BMP-2 (83). Cependant, l'ajout de BMP augmente l'expression des marqueurs spécifiques de l'hypertrophie, comme le collagène X. Le traitement de chondrocytes isolés de périoste de rat, cultivés en agrégats, par la BMP-2 a également conduit à l'hypertrophie des chondrocytes. En revanche, si le TGF- $\beta$ 1 est associé au traitement par la BMP-2, cela entraîne la formation d'une MEC abondante (187) et une inhibition de l'hypertrophie. La BMP-7 (OP-1) semble être la plus efficace pour stimuler la synthèse de matrice et supprimer l'infiltration fibroblastique, ce qui prévient la destruction du tissu implanté (238).

D'autres membres de la superfamille du TGF- $\beta$ , les CDMP-1,-2 et -3 (cartilage derived morphogenetic protein) aussi appelés GDF-5, -6 et -7 (growth differentiation factors) sont impliqués dans la chondrogenèse. GDF-5 est exprimé au stade des condensations précartilagineuses et au cours de la formation des articulations (386). Le GDF5, à faibles ou fortes doses, associé au TGF- $\beta$ 1 améliore la différenciation des CSM en chondrocytes (28). De plus, en présence de TGF- $\beta$ 3, les CSM de lapin transfectées par le GDF5 améliorent la réparation de défauts cartilagineux articulaires chez le lapin (239). Le GDF5 semble stimuler la production d'agrécan et de GAG *in vitro* et *in vivo* (210).

Le bFGF (basic fibroblast growth factor) est un agent mitogène qui stimule la prolifération des chondrocytes (278). Le bFGF favorise la confluence de chondrocytes de lapins et la synthèse d'une MEC cartilagineuse *in vitro*. Il pourrait également avoir un effet inhibiteur sur la différenciation terminale des chondrocytes et sur l'ossification (240).

Les FGF-2, -4 et -9 stimulent fortement la prolifération des chondrocytes, les FGF-6 et -8 stimulent également la prolifération, mais moins fortement (407). De plus, FGF-2 favorise la prolifération de chondrocytes humains et empêche la dédifférenciation des chondrocytes en culture monocouche. Par ailleurs, des chondrocytes surexprimant FGF-2 et implantés dans un défaut de cartilage articulaire en améliore la réparation via une stimulation de la chondrogenèse (241).

L'IGF-1 appartient à la famille des IGF (insulin-like growth factor), qui sont des peptides hormonaux, comme la relaxine et l'insuline (303). L'expression d'IGF-1 a une influence positive sur le développement du cartilage et sur le cartilage mature (278). L'IGF-1 induit la différenciation chondrocytaire des CSM et leur prolifération (376). L'IGF-1 participe à l'anabolisme de la MEC en augmentant la synthèse de PG et de collagène II *in vivo* et *in vitro* (303).

#### 3.4.4.2 La tension en oxygène

Le cartilage articulaire étant non vascularisé, il se trouve physiologiquement en condition hypoxique. Ses apports en oxygène sont limités et se font soit par le liquide synovial en surface, soit par les vaisseaux sanguins de l'os sous-chondral. La tension en oxygène dans la zone profonde du cartilage articulaire a été estimée entre 1 et 6% (199). L'hypoxie a été montrée capable de stimuler la redifférenciation de chondrocytes nasaux dédifférenciés (109, 293). De plus, l'hypoxie participe à la survie des chondrocytes *in vivo* via une voie de signalisation activant le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor 1  $\alpha$ ) (431). En revanche, en ce qui concerne la différenciation chondrocytaire des CSM, il semble que l'effet de l'hypoxie varie en fonction de la teneur en oxygène. En effet, une tension en oxygène de 2% a été montrée diminuer la différenciation chondrocytaire de CSM par comparaison aux CSM cultivées en normoxie (294). Cependant, une tension en oxygène de 5% a été montrée stimuler la différenciation chondrocytaire de CSM (37). Il semble que l'hypoxie puisse, de plus, inhiber l'expression du collagène X, un marqueur des chondrocytes hypertrophiques (79, 80). Ceci suggère que l'hypoxie pourrait être un facteur important pour le contrôle de l'hypertrophie et de la minéralisation induite par les chondrocytes (199). Dans l'optique d'utiliser les chondrocytes ou les CSM comme source de cellules pour la réparation du cartilage articulaire, ces données font de l'hypoxie un facteur qui mérite d'être considéré avec intérêt.

#### 3.4.4.3 Les contraintes mécaniques

La charge physiologique qui s'exerce sur l'articulation est essentielle au développement et au maintien du cartilage articulaire normal. Au cours du développement, les mouvements et les contraintes mécaniques jouent un rôle critique dans la différenciation des cellules souches embryonnaires en chondrocytes conduisant à la formation des surfaces articulaires (21).

Etant donné l'importance des contraintes mécaniques dans le développement et le maintien du cartilage articulaire sain, il n'est pas surprenant que les stimuli mécaniques aient un impact

sur le comportement *in vivo* des chondrocytes et du cartilage généré *in vitro* (313). Une augmentation de la synthèse du collagène de type II, des protéoglycanes et autres protéines matricielles a été obtenue suite au pré conditionnement mécanique d'implants de cartilage (313). Par ailleurs, les propriétés mécaniques des implants ont également augmenté suite à leur pré conditionnement (181). La stimulation mécanique à l'aide de bioréacteurs adaptés (275) pourrait être un moyen d'améliorer les propriétés des tissus générés *in vitro* (304, 372).

### 3.5 La thérapie génique

Alors que la plupart des recherches s'orientent vers le développement de systèmes à libération contrôlée capables de libérer des facteurs de croissance, la thérapie génique cherche à convertir les cellules en réacteurs biologiques capables de produire des protéines ou facteurs de croissance d'intérêt (429). Les approches d'ingénierie tissulaire offrent l'opportunité de combiner plusieurs stratégies de thérapie génique et de créer ainsi un système cohésif capable de cibler la dégénérescence et la synthèse d'un néotissu de façon concomitante. Dans le contexte de l'ingénierie tissulaire du cartilage, ce type de thérapie vise à forcer l'expression d'un ou plusieurs gènes dans les cellules du patient pour améliorer les processus de régénération (158).

Les gènes de la superfamille du TGF- $\beta$ , qui incluent les TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3 sont régulièrement utilisés pour la formation du cartilage articulaire.

Au sein de la superfamille des TGF, les BMP-2 et BMP-7 ont souvent été utilisées en thérapie génique du cartilage (105, 393). Des CSM du périoste transfectées par la BMP-7, placées dans de l'acide poly glycolique et transplantées dans des défauts chondraux ont permis de former plus de cartilage hyalin que les cellules non transfectées (172).

L'IGF-1, de par sa capacité à induire la synthèse de protéoglycane et de collagène, représente un gène d'intérêt pour la thérapie génique du cartilage articulaire. Les premiers résultats *in vitro* ont permis aux cellules transfectées (chondrocytes de chevaux, CSM et synoviocytes) de maintenir un niveau thérapeutique d'IGF-1 en culture monocouche (367). Cependant, les études *in vivo* montrent des résultats différents en fonction du vecteur utilisé, non viral ou adénoviral (429). La transfection d'IGF-1 dans des chondrocytes articulaires de lapin, montre un maintien de la morphologie des chondrocytes *in vitro* et la formation au bout de 8 semaines *in vivo*, d'un cartilage de type hyalin (289).

Des CSM surexprimant Shh ont amélioré la réparation cartilagineuse de défauts ostéochondraux par comparaison à la réparation obtenue avec la BMP-2. De plus, le tissu réparé présente une bonne intégration avec le tissu environnant (172).

D'autres agents anaboliques prometteurs comme les protéines Sox-9, Sox-5 et Sox-6, le FGF-3 et les molécules de signalisations SMADs sont des cibles potentielles pour la thérapie génique. De nombreuses pistes sont actuellement en cours de développement. Cependant, l'utilisation de la thérapie génique pour forcer l'expression de certains facteurs de croissance nécessitera de mieux connaître et contrôler l'activité de ces facteurs de croissance.

### III.

## L'HPMC-SI : UNE MATRICE EXTRACELLULAIRE ARTIFICIELLE POUR LA CULTURE TRIDIMENSIONNELLE DE CHONDROCYTES

#### Article 3

##### **A new-self-setting hydrogel as an extracellular matrix for tissue engineering**

P. Weiss, C. **Vinatier**, J. Guicheux, G. Grimandi, G. Daculsi..

Key engineering materials (2004), 254-256:1107-1110

#### Article 4

##### **A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three dimensional culture of chondrocytes**

C. **Vinatier**, D. Magne, P. Weiss, C. Trojani, N. Rochet, G. F. Carle, C. Vignes-Colombeix, C. Chadjichristos, P. Galera, G. Daculsi, J. Guicheux .

Biomaterials 2005, 26(33):6643-6651.

#### Brevet (Annexe)

##### **Use of a hydrogel for the culture of chondrocytes.**

C. **Vinatier**, J. Guicheux, G. Grimandi, G. Daculsi, P. Weiss.

WO2005/044326, 19 Mai 2005, INSERM

## 1 PROBLEMATIQUE

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif composé d'un seul type cellulaire, le chondrocyte, enchâssé dans une abondante matrice. Le cartilage articulaire n'est pas vascularisé, et les cellules qui le composent sont peu prolifératives. Ces deux caractéristiques limitent ses capacités de réparation spontanée. Les lésions cartilagineuses articulaires sont par conséquent irréversibles et peuvent dégénérer vers des lésions de type arthrosique (56). Dans ce contexte, la thérapie cellulaire appliquée au cartilage articulaire est considérée comme un outil potentiel pour la réparation des lésions cartilagineuses.

Au siècle dernier, une méthode de transplantation de chondrocytes autologues (ACI) a été développée pour traiter les lésions traumatiques du cartilage articulaire (53). Cette technique, pionnière, est limitée par l'amplification des chondrocytes en culture monocouche et par l'utilisation d'un lambeau périoste pour maintenir les cellules sur le siège de la lésion. En effet, le processus de dédifférenciation des chondrocytes lors de leur amplification en culture monocouche est bien décrit (55). Ce processus se traduit par une modification morphologique des chondrocytes, qui prennent une allure fibroblastique (163). Ce processus s'accompagne d'un changement dans la nature des protéines exprimées passant de l'expression des collagènes de type II, IX, XI et de l'agrécan à l'expression des collagènes de type I, III et V normalement exprimés par les fibroblastes (435). Cette perte du phénotype chondrocytaire peut être évitée en cultivant les chondrocytes au sein de matrices tridimensionnelles. Plusieurs matrices naturelles (acide hyaluronique (396), alginate (43), collagène (72)) et synthétiques (acide poly lactique (341, 523), acide poly glycolique (250)) ont été évaluées. Cependant, plusieurs de ces polymères induisent des réponses immunitaires, en partie à cause de leurs produits de dégradation (217).

Le substitut osseux injectable (IBS2) développé au laboratoire, est constitué d'une association de phosphates de calcium avec un polymère auto réticulant (490). Ce polymère est une hydroxypropyl méthylcellulose silanisée (HPMC-Si), qui présente l'avantage d'être un liquide visqueux, capable, par addition d'un tampon spécifique, d'auto réticulation, c'est-à-dire d'établir des liaisons covalentes entre les différentes chaînes macromoléculaires (45, 46). Dans ce contexte, notre objectif fut d'utiliser ce polymère injectable, capable de réticuler *in situ*, comme matrice pour la culture tridimensionnelle des chondrocytes.

Préalablement aux tests *in vitro* et *in vivo*, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux propriétés physico-chimiques de ce polymère. Parmi ses propriétés physico-chimiques, ses

propriétés rhéologiques ont principalement attiré notre attention, car elles conditionnent de façon importante l'utilisation potentielle de cet hydrogel en ingénierie tissulaire. La caractérisation des structures en réseau des liquides visqueux ou hydrogels peut être réalisée de façon quantitative par des mesures rhéologiques oscillatoires, où la contrainte et les fréquences appliquées sont définies. Cette technique permet de déterminer les propriétés de viscosité et d'élasticité séparément. Le but de cette étude rhéologique (article 3) a donc été de mesurer les propriétés visco-élastiques de l'hydrogel HPMC-Si par la détermination de son point de gel (transition entre un état de liquide et solide) en fonction du temps. La mesure de ces propriétés rhéologiques nous a ensuite permis de déterminer les paramètres les influençant. Ces données permettront de définir et d'adapter les propriétés visco-élastiques du polymère d'HPMC-Si pour sa future application à l'ingénierie tissulaire du cartilage.

Les caractéristiques de l'hydrogel, mesurées lors de l'étude précédente, nous ont suggéré qu'il pourrait être utilisé comme matrice pour l'ingénierie tissulaire. Dans une seconde étude (article 4) nous avons donc vérifié si cet hydrogel pouvait être appliqué à l'ingénierie tissulaire spécifique du cartilage. Notre objectif fut donc de vérifier la biocompatibilité de notre hydrogel d'HPMC-Si vis-à-vis de chondrocytes d'origines différentes (chondrocytes articulaires de lapins et lignée de chondrocytes humains) et de déterminer la capacité de cet hydrogel à maintenir le phénotype des chondrocytes en culture tridimensionnelle.

L'objectif de ces deux études était donc de déterminer si l'hydrogel d'HPMC-Si possédait les propriétés physiques et biologiques nécessaires à son utilisation comme matrice extracellulaire artificielle pour la culture tridimensionnelle de chondrocytes dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage.

**2 UN HYDROGEL AUTO-RETICULANT COMME MATRICE EXTRACELLULAIRE SYNTHETIQUE POUR L'INGENIERIE TISSULAIRE. ARTICLE 3**

**Résumé**

Un hydrogel auto réticulant à base d'hydroxypropyl méthylcellulose silanisée (HPMC-Si) a été développé récemment au laboratoire. L'utilisation des hydrogels comme biomatériaux ou matrice tridimensionnelle pour l'ingénierie tissulaire nous a conduit à déterminer les propriétés visco-élastiques et le point de transition entre le liquide visqueux et le réseau de polymère réticulé de l'hydrogel. Ces caractéristiques peuvent être mesurées par une étude rhéologique en mode oscillatoire. Cette étude montre que certains paramètres comme le pH, le taux de gonflement et la quantité de silane greffé peuvent être contrôlés et ajustés. Cet hydrogel peut donc être modifié pour apporter un environnement tridimensionnel adapté aux fonctions cellulaires, et pourrait être utilisé comme matrice pour l'ingénierie tissulaire ou comme biomatériau injectable pour la réparation osseuse.

## **Article 3**

### **A new-self-setting hydrogel as an extracellular matrix for tissue engineering**

P. Weiss, C. Vinatier, J. Guicheux, G. Grimandi, G. Daculsi.

Key engineering materials (2004), 254-256:1107-1110

## A Self Setting Hydrogel as an Extracellular Synthetic Matrix for Tissue Engineering

P. Weiss, C. Vinatier, J. Guicheux, G. Grimandi, G. Daculsi

EMI 99-03, 1 Place A. Ricordeau, BP 84215, 44042 Nantes Cedex 1, France.  
pweiss@sante.univ-nantes.fr

**Keywords** : biomaterial, hydrogel, rheology, polymer network, tissue engineering.

**Abstract.** The use of hydrogel for biomaterials or as 3D synthetic matrix for tissue engineering lead to determine the viscoelastic properties of the hydrogels and the moment when the viscous liquid is transformed in a reticulated polymer network. This can be performed by oscillatory rheological study. We developed a new self-reticulating polymer wich is siled hydroxyl propylmethylcellulose (Si-HPMC). This study shows that the parameters (pH, swelling, amount of silane grafting) can be controlled and adjusted using oscillatory rheological measurements. The polymer network can be adapted to provide the best environment for specific cell functions and use it as a scaffold for tissue engineering and as injectable biomaterial for bone repair.

### Introduction

The "injectable ceramic suspension" IBS (Injectable Bone Substitute) [1, 2] developed in our laboratory is a composite of calcium phosphate granules with a polymer carrier. The polymeric phase consists of an aqueous solution of hemi-synthetic cellulose derivatives, while the calcium phosphate granules consist of biphasic calcium phosphate (BCP), which is a mixture of hydroxyapatite and  $\beta$  tricalcium phosphate. This IBS product is now ready for industrial development (MBCP Gel™, Biomatlante, Vigneux de Bretagne, France) and human applications. Human pilot clinical trials are now in progress in orthopedics and odontology for bone defect filling in non-loading conditions and bone filling of dental extraction sites.

The current IBS product is a non hardening material limiting its application to well defined cavity to prevent the diffusion of the IBS over the surgical site. To improve the properties of IBS and expand its applications, we developed a new injectable bone substitute, IBS2 [3-6], based on a self-reticulating polymer. This new polymer opens new prospectives in the field of osteoarticular engineering or others. Indeed, it seems commonly accepted today, that polymeric hydrogels are potential scaffolds for three-dimensional culture of cells and/or to make composite formulations for biomaterials. This polymer is siled hydroxyl propylmethylcellulose (Si-HPMC) with an organo-silane. After synthesis the silanised polymer is insoluble in water. The dissolution occurs in a sodium hydroxide solution with a pH of 13. The principle guiding the choice of this polymer for this first study, is its absorbent and viscous liquid character even in the presence of BCP granules and before its injection. In the surgical site, in contact with the biological liquids plugs, and/or with the addition of a specific buffer, a chemical reaction without additive and any system of catalysis allows bridging, by self-setting, between the various macromolecular chains involved (Figure 1). The starting reaction is related to pH modification. This process is pH-dependent, leads to the formation of a more or less dense gel, according to the conditions of polymer synthesis.

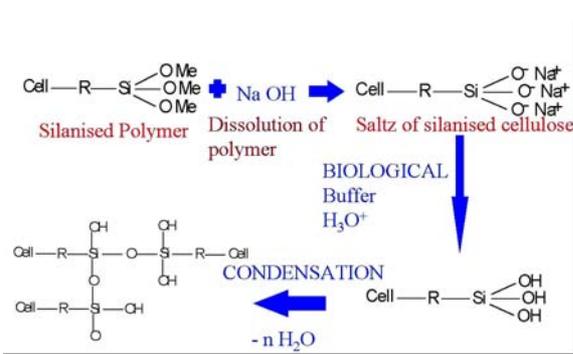


Fig. 1: Representation of dissolution and reticulation process of the self-setting polymer in water.

The synthesis of silanized cellulosic ethers was carried out while grafting in heterogeneous medium of the organosilanes on the polymeric chain of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). In basic medium (fig1), the grafted silanes are ionized and the chains are disjoined,

then when the pH decreases the number of protons increases and R-Si-O becomes R-Si-OH very reactive. Covalent bridges with hydroxyls of the cycles of cellulose ethers or the substituents will be created thus forming a three-dimensional network (Figure 2).

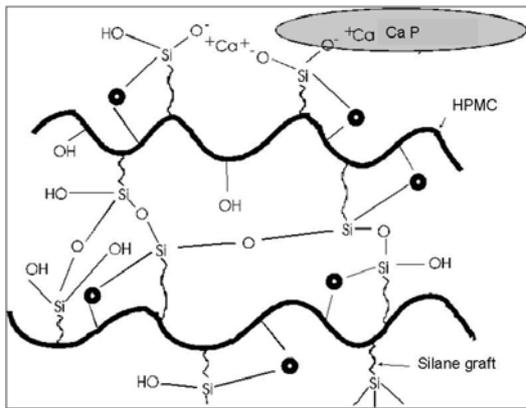


Fig. 2 : Network diagram of the silanized polymer in water with inter-macromolecular and intra-molecular (o) links.

To characterize the network structures, rheological measurements offer a quantitative characterization of the viscoelastic properties of a substance under defined conditions, using the three different types of rheological stresses, i.e. shear flow, elongational flow and oscillatory measurements [8, 9]. The method of choice for characterizing cross-linked

structures is dynamic measurements. Here the substance is subjected to a sine oscillation with a defined deformation  $\gamma$  or stress  $\tau$ , and frequency  $\omega$ . If the substance shows a viscoelastic behavior, a phase shift  $\delta$  occurs. If this deformation is sufficiently small, a non-destructive characterization of the substance is possible. By determining the storage and the loss modulus ( $G'$ ,  $G''$ ) from the oscillatory measurements, the viscous and the elastic properties can be determined separately, and network parameters can be calculated.

Using the phase shift  $\delta$  and the ratio of the maximum shear stress  $\tau_0$  to the maximum amplitude of deformation  $\gamma_0$ , one can calculate a complex oscillatory modulus  $G^*$ :

$$G^* = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot e^{i\delta} = G' + i \cdot G''$$

The stored elastic deformation energy is expressed by the real component (storage modulus  $G'$ ) and the viscous dissipated energy is expressed by the imaginary component (loss modulus  $G''$ ). The quotient of the loss modulus  $G''$  and the storage modulus  $G'$  gives the proportion of the dissipated energy to the stored energy. It is called the loss factor  $\tan\delta$ .

The aim of this study was to analyse the viscoelastic properties of this hydrogel by dynamic measurements and to determine the moment when the viscous liquid becomes a solid hydrogel and the parameters that change these properties.

### Materials and methods

The silated HPMC (si-HPMC) produced was dissolved in NaOH solution at pH equal to 12.8 and with a concentration of 3% (w/w).

The pH of the viscous polymer solution was decreased to around 12.4 before steam sterilization.

HEPES buffer solution, in variable concentrations, was mixed with the polymer solution to obtain a final pH ranging from 7 to 10 and a final polymer concentration between 1 to 2.5%.

Dynamic rheological measurements were then made on a Haake Rheometer (Rheostress 300) using a conical geometry with a diameter of 60 mm and a cone angle of  $1^\circ$ . We used multiwaves procedure with 3 frequencies, 1Hz, 3.2Hz et 10Hz and the imposed stress was 1Pa. The temperature was controlled by an external thermal bath and maintained at  $37^\circ$ . The experiment time was 14 days. To prevent evaporation, oil of paraffin fluid was floated over the exposed sample. The paraffin fluid and sample were immiscible, and there was no anticipated effect on the sample chemistry; no changes in rheological behavior were observed as a result of this treatment.

Oscillation tests measuring parameters  $G'$  and  $G''$  were performed to study the self setting process, gel point and network parameters.

## Results

The gel point (Arrow 1, Figure 3) and the maximum value of conservative modulus  $G'$  (Arrow 2, Figure 3) in dynamic rheological measurements show, for this Si-HPMC behaviour, that the viscous liquid becomes a solid hydrogel after 33 minutes and the reticulation was finished after 244 hours with a maximum  $G'$  storage modulus at 310 Pa.

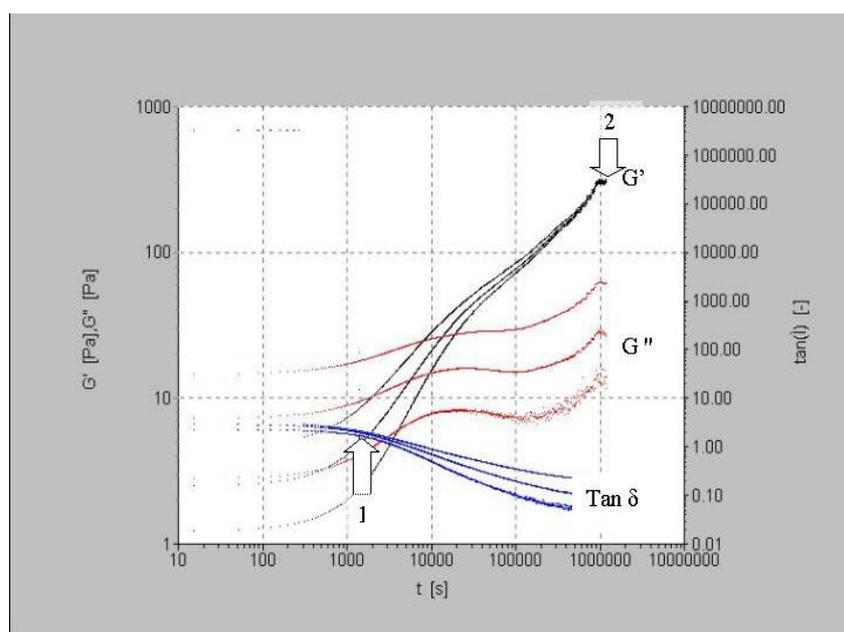


Fig. 3 : Si-HPMC rheometric diagram of E4M (Colorcon-Kent-England) silanized with 14,24 % of 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) graft (0.78 % of Silicium / Dry polymer). Polymer was in 3% NaOH water solution (w/w). HEPES buffer solution volume added was equal of polymer solution volume (1.5 % of dry polymer in the final solution). The pH of this mixture was 7.4

The results also demonstrated that pH catalyses the polycondensation reaction, confirming results reported by Bourges et al. [6] using another method. If pH is near 12, the gel point is about 5 minutes and if pH is near 7, the gel point is about 60 minutes.

The maximum value of conservative modulus  $G'$  (arrow 2, Figure 3) is linked with the degree of swelling (concentration of dry polymer in the final solution) and/or the quantity of silanol grafted on the polymer. This value is directly linked to the network and the cross-link density.

## Discussion

This preliminary oscillatory rheological study confirms that this silanised hydrophilic polymer allows hardening and becomes an hydrogel in up to 60 minutes with a total reaction times of more than 10 days. This polymer provides a network between the macromolecular

polysaccharides when pH solution decreases without any adjuvant or catalytic agent. In alkaline medium, the silane functions are ionized and chains are disconnected causing the pH to decrease. As the number of protons increases  $R-Si-O^- Na^+$  becomes  $R-Si-OH$ , which is very reactive. Polycondensation occurs and covalent bridges will be created thus forming a three-dimensional network. The parameters (pH, swelling, amount of silane grafting) can be controlled and adjusted using oscillatory rheological measurements. Those properties allow the formation of efficient scaffold for tissue engineering. The polymer network can be adapted to provide the best environment for specific cell functions. For example, osteosarcomas (SAOS2 cell line) grow like a nodule in the hydrogel (figure 4) whereas osteoblasts (PAL+ cells, results not shown) from total rat bone marrow grow only on the surface of BCP granules (figure 5). Other preliminary studies with bone cells show the biocompatibility of this hydrogel and the different behavior of the different cell lines used.



Fig. 4: SaoS2 cells after 24 days of Culture in hydrogel and BCP granules.

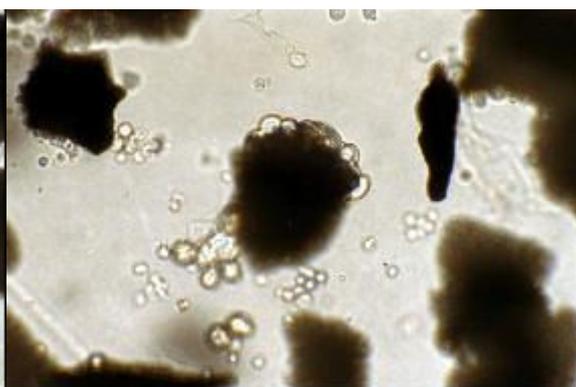


Fig. 5: Marrow cells after 14 days of culture

### Conclusion

These results highlight the potential of this hydrogel as a scaffold for tissue engineering and as injectable biomaterials for bone repair.

### Acknowledgments

This work was supported by ACI "Technologies pour la Sante 2001-2004" and CPER "Biomatériaux" 2000-2004, Pays de Loire.

Acknowledgments for Dr R.Z. LeGeros for her help and critical reading of this paper, Pr M. Basle and Pr D. Chappard from LHEA Laboratoire Histologie-Embryologie, Faculty of Medicine, 49045 ANGERS cedex, France, for the preliminary bone cell culture studies, and Pr J. -F. Tassin from UMR CNRS 6120 – Le Mans, France for his help in rheological measurements.

### References

- [1] O. Gauthier, I Khairoun, J Bosco, L Obadia, X Bourges, C Rau, D Magne, JM Bouler, E Aguado, G Daculsi, P Weiss J Biomed Mater Res 66A (2003), 47.
- [2] P Weiss, L Obadia, D Magne, X Bourges, C Rau, T Weitkamp, I Khairoun, JM Bouler, D Chappard, O Gauthier, G Daculsi, Biomaterials. (*In press*).
- [3] M. Lapkowski, P Weiss, G Daculsi, A Dupraz, CNRS Patent. WO 97/05911, (1995).
- [4] X Bourges, P Weiss, A Coudreuse, G Daculsi, G Legeay Biopolymers 63 (2002), 232.
- [5] R Turczyn, P Weiss, M Lapkowski, G Daculsi J Biomater Sci Polym Ed 11(2000), 217.
- [6] X Bourges, P Weiss, G Daculsi, G Legeay. Adv Colloid Interface 99(2002), 215.
- [7] Sau, T. Majewicz, ACS Symp Ser 476, (1992), 265.
- [8] D. S. Jones: Inter. J. Pharma. 179 (1999), 167.
- [9] K. S. Anseth, C. N. Bowman and L. Brannon-Peppas: Biomaterials 17 (1996), 1649.

**3 UN HYDROGEL D'HYDROXYPROPYL METHYLCELLULOSE SILANISEE POUR LA CULTURE TRIDIMENSIONNELLE DE CHONDROCYTES. ARTICLE 4**

**Résumé :**

Le cartilage articulaire possède des capacités de réparation intrinsèques limitées. Afin de stimuler la réparation du cartilage, l'amplification et le transfert de chondrocytes autologues par des biomatériaux ont été proposés. Nous avons développé un hydrogel auto réticulant composé de chaînes d'hydroxypropyl méthylcellulose greffées par des groupements silanols (HPMC-Si). L'objectif de ce travail est d'évaluer d'une part la cytocompatibilité de cet hydrogel et d'autre part sa capacité à maintenir le phénotype spécifique des chondrocytes. Des chondrocytes primaires isolés de cartilage articulaire de lapin et deux lignées de chondrocytes humains (SW1353 et C28/I2) ont été cultivés dans l'hydrogel. Un test de viabilité à base de sels de méthyle tétrazolium (MTS) ainsi que le dénombrement des cellules indiquent que l'hydrogel de HPMC-Si n'affecte ni la viabilité ni la prolifération cellulaire. L'observation des chondrocytes articulaires de lapin et des cellules de la lignée C28/I2 doublement marqués par du cell tracker green et de l'éthidium homodimère-1 montre que les chondrocytes prolifèrent dans l'hydrogel d'HPMC-Si. L'analyse phénotypique par RT-PCR et la coloration au bleu Alcian indiquent que les chondrocytes cultivés en trois dimensions dans l'hydrogel HPMC-Si expriment les transcrits codants pour le collagène de type II et l'agrécane et produisent des glycosaminoglycanes sulfatés. Ces résultats montrent que l'hydrogel HPMC-Si permet la croissance de chondrocytes différenciés. Cet hydrogel d'HPMC-Si apparaît donc comme un support potentiel pour la culture tridimensionnelle et le transfert de chondrocytes dans l'ingénierie tissulaire du cartilage.

## **Article 4**

### **A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three dimensional culture of chondrocytes**

C. Vinatier, D. Magne, P. Weiss, C. Trojani, N. Rochet, G. F. Carle, C. Vignes-Colombeix, C. Chadjichristos, P. Galera, G. Daculsi, J. Guicheux.

Biomaterials 2005, 26(33):6643-51.

## A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes

C. Vinatier<sup>a</sup>, D. Magne<sup>a</sup>, P. Weiss<sup>a</sup>, C. Trojani<sup>b</sup>, N. Rochet<sup>b</sup>, G.F. Carle<sup>b</sup>,  
C. Vignes-Colombeix<sup>c</sup>, C. Chadjichristos<sup>d</sup>, P. Galera<sup>d</sup>, G. Daculsi<sup>a</sup>, J. Guicheux<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>INSERM EM 9903, Research Center on Materials with Biological Interest, School of Dental Surgery, University of Nantes,  
1-Place Alexis Ricordeau 44042, Nantes Cedex 1, France

<sup>b</sup>FRE 2720 CNRS/UNSA IFR50, School of Medicine, Nice, France

<sup>c</sup>IFR26, School of Medicine, Nantes, France

<sup>d</sup>Laboratory of Connective Tissue Biochemistry, School of Medicine, Caen, France

Received 14 February 2005; accepted 15 April 2005

Available online 9 June 2005

### Abstract

Articular cartilage has limited intrinsic repair capacity. In order to promote cartilage repair, the amplification and transfer of autologous chondrocytes using three-dimensional scaffolds have been proposed. We have developed an injectable and self-setting hydrogel consisting of hydroxypropyl methylcellulose grafted with silanol groups (Si-HPMC). The aim of the present work is to assess both the *in vitro* cytocompatibility of this hydrogel and its ability to maintain a chondrocyte-specific phenotype. Primary chondrocytes isolated from rabbit articular cartilage (RAC) and two human chondrocytic cell lines (SW1353 and C28/I2) were cultured into the hydrogel. Methyl tetrazolium salt (MTS) assay and cell counting indicated that Si-HPMC hydrogel did not affect respectively chondrocyte viability and proliferation. Fluorescent microscopic observations of RAC and C28/I2 chondrocytes double-labeled with cell tracker green and ethidium homodimer-1 revealed that chondrocytes proliferated within Si-HPMC. Phenotypic analysis (RT-PCR and Alcian blue staining) indicates that chondrocytes, when three-dimensionally cultured within Si-HPMC, expressed transcripts encoding type II collagen and aggrecan and produced sulfated glycosaminoglycans. These results show that Si-HPMC allows the growth of differentiated chondrocytes. Si-HPMC therefore appears as a potential scaffold for three-dimensional amplification and transfer of chondrocytes in cartilage tissue engineering.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Articular cartilage; Hydrogel; Chondrocytes; Tissue engineering; Biocompatibility

### 1. Introduction

Articular cartilage is a connective tissue composed of a unique cell type, the chondrocyte, embedded within a dense extracellular matrix [1]. This matrix consists of tissue-specific macromolecules including type II, IX and XI collagens and the large aggregating proteoglycan namely aggrecan [2,3]. The collagen architecture contributes to the tensile strength and stiffness of cartilage

[4] while proteoglycans provide resistance to compression. Articular chondrocytes play a major role in maintaining the integrity of the cartilage through the control of anabolic and catabolic activities. Cartilage tissue exhibits very poor capacity for self-repair, therefore cartilage injuries are maintained for years and may eventually lead to degenerative arthropathies [5]. In this context, cell-based therapy is considered as a potential tool for the development of tissue engineering applied to cartilage repair.

Along the past 10 year, several bioengineering strategies have been reported. Brittberg et al. [6] have proposed a pioneering method based on the

\*Corresponding author. Tel.: +33 (0) 2 40 41 29 19;  
fax: +33 (0) 2 40 08 37 12.

E-mail address: [jerome.guicheux@nantes.inserm.fr](mailto:jerome.guicheux@nantes.inserm.fr) (J. Guicheux).

transplantation of autologous chondrocytes for the surgical treatment of full-thickness cartilage defects. This method, however, presents some limitations mainly related to the monolayer culture conditions of chondrocytes, and to the need of a periosteal flap to retain transplanted cells in the defect. Indeed, it is today clearly acknowledged that chondrocytes in two-dimensional culture undergo a gradual dedifferentiation [7], characterized by a change in their spherical shape into a fibroblastic appearance [8] and a switch of the expression of cartilage-specific collagens namely type II, IX and XI and of aggrecan towards collagen type I, III and V that are normally expressed by fibroblasts [9]. This loss of a cartilage-specific phenotype can be prevented by culturing chondrocytes at high density or in a three-dimensional matrix. Many different types of matrices have, therefore, been evaluated including natural polymers such as hyaluronic acid [10–12], alginate [13–15], collagen [16,17], fibrin glue [18] and chitosan. However some of these matrices elicit giant cell reaction and inflammatory responses [19]. So they have not been applied in human articular cartilage repair. Alternatively, in an attempt to limit the use of products from biological origin, synthetic matrices were developed including polyglycolic acid, polylactic acid polyvinyl alcohol and polyhydroxy-ethyl-methacrylate [20]. Most of these polymers are however known to induce immune and/or inflammatory responses likely related to the release of polymer degradation products [19].

In the light of the above-mentioned data, we aimed at developing a polymer that can be injected along with cells and then cross-linked *in situ* to form a three-dimensional matrix for chondrocyte survival, proliferation and activity. In this attempt, we have recently synthesized a self-setting hydrogel consisting of a silylated hydroxypropyl methylcellulose (Si-HPMC) [21,22].

The aim of the present work is to assess the cytocompatibility of this hydrogel with respect to various chondrocyte models (human cell lines and rabbit primary cells) and its ability to maintain a chondrocyte-like phenotype.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) E4M<sup>®</sup> was purchased from Colorcon-Dow chemical (Bougival, France). 3-glycidoxypolytrimethoxysilane (GPTMS) was obtained from Acros (Geel, Belgium). Cell culture plasticwares were purchased from Corning (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Hyaluronidase, actinomycin-D, trypsin/EDTA, type II collagenase (290 units/mg), HEPES, and isopropanol were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, USA). Hank's

Balanced sodium salt (HBSS), DMEM (4.5 g/l glucose), Ham's F-12, penicillin/streptomycin, L-glutamine, Trizol<sup>®</sup>, DNase I and Taq DNA Polymerase were obtained from Invitrogen corporation (Paisley, UK). Cell titer 96<sup>®</sup> Aqueous Non Radioactive Cell proliferation assay (Methyl tetrazolium salt (MTS)), Avian Myeloblastosis Virus-Reverse Transcriptase (AMV-RT), random hexamer and recombinant ribonuclease inhibitor were provided by Promega corporation (Madison, WI, USA). Fetal calf serum (FCS) was from Dominique Dutscher (Brumath, France). Cell tracker green (CTG) and ethidium homodimer-1 (EthD-1) were obtained from Molecular probes (Leiden, The Netherlands). All other chemicals were from standard laboratory suppliers and were of the highest purity available.

### 2.2. Synthesis of Si-HPMC hydrogel

As previously described [22], the synthesis of Si-HPMC was performed by grafting 14.24% of 3-GPTMS on E4M<sup>®</sup> in heterogeneous medium. Si-HPMC powder (3% w/v) was solubilized in 0.2 M NaOH under constant stirring for 48 h. The solution was then sterilized by steam (121 °C, 30 min). To allow the formation of a reticulated hydrogel, the solution was finally mixed with 0.5 volume of a 0.26 M HEPES buffer and 10% (v/v) of culture medium (DMEM or DMEM/Ham's F-12, supplemented with 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine). Dynamic rheological measurements were performed on a Haake Rheometer (Rheostress 300) using a conical-cylindrical geometry with a diameter of 60 mm and a cone angle of 1°. We used a multiwave procedure with 3 frequencies, 1, 3.2 and 10 Hz, and the imposed stress was 1 Pa. Temperature was controlled by an external thermal bath maintained at 37 °C. The experiment time was 14 days. Oscillation tests measuring storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) were performed to study the self-setting process, gel point and network parameters.

### 2.3. Cell culture

#### 2.3.1. Isolation of rabbit articular chondrocytes

Five weeks old New Zealand white rabbits were killed after general anesthesia, and the shoulders, knee and femoral heads were dissected out under sterile condition [23]. The articular cartilage was removed, cut into small slices and digested at 37 °C with 0.05% hyaluronidase in HBSS for 10 min, then with 0.2% trypsin for 15 min and with 0.2% type II collagenase for 30 min. Finally slices were digested overnight at 37 °C in 0.03% collagenase in DMEM. The suspended rabbit articular chondrocytes (RAC) were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine. The cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and the culture medium was changed every 2–3 days.

#### 2.3.2. Human chondrocytic cells lines

The SW1353 [24] and C28/I2 [25] cell lines were cultured in DMEM/Ham's F-12 medium supplemented with 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Culture medium was changed every 2–3 days.

#### 2.4. Cellular viability and proliferation study in two-dimensional culture

Cellular viability was measured using an MTS assay as previously described [26,27]. Briefly, cells (SW1353, C28/I2 and RAC) were allowed to attach in 24-well plates at a final density of 20,000 cells/well. After 24 h, culture medium was removed and 500  $\mu$ l of Si-HPMC were added in each well. Samples were incubated at 37 °C for 4 h before adding 1 ml of culture medium. As a control, cells were also cultured in the absence of Si-HPMC (plastic) or in the presence of actinomycin-D (5  $\mu$ g/ml), an inhibitor of RNA polymerase [28] which was used as a potent inducer of cell death. After 1, 2 and 3 days, hydrogel and culture media were removed and MTS solution was added in each well for 1–3 h according to the manufacturer's instructions. Finally, colorimetric measurement of formazan dye was performed on a spectrophotometer with an optical density reading at 490 nm. Results were expressed as relative MTS activity as compared to control condition (cells cultured in the absence of Si-HPMC).

Cell proliferation was evaluated by Trypan blue exclusion dye experiments in conditions as described above. After each indicated time, hydrogel and culture medium were removed and the cells were detached by adding trypsin/EDTA for 2 min. The suspended cells were transferred into fresh culture medium and counted with Trypan blue staining that colors dead cells in blue. Results were expressed as the total number of cells per well.

#### 2.5. Cellular viability in three-dimensional culture

One hundred microliters of culture medium containing  $9 \times 10^6$  cells were gently mixed with 9 ml of Si-HPMC prepared as described previously. 500  $\mu$ l of cells/Si-HPMC mixture were seeded in 24-well plates and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After a 4 h incubation, 1 ml of culture medium was added in each well and plates were incubated for the indicated times with medium changes every 2–3 days. As mentioned above, actinomycin-D treatment (5  $\mu$ g/ml, 72 h) was used as an internal control of cell death. Cellular viability in three-dimensional culture was visualized by using CTG and EthD-1 dual staining as previously reported in detail [27]. Briefly, hydrogels containing chondrocytes were treated with 5  $\mu$ M CTG for 30 min at 37 °C, then for 30 min in medium containing FCS and finally for 30 min in 1  $\mu$ M EthD-1 at

room temperature. The imaging of C28/I2 cells was performed by using a confocal laser-scanning microscope (Leica TCS SP1, Wetzlar, Germany) equipped with an argon/krypton laser. The data were collected with a simultaneous dual-channel detector and visualized with 24-bit imaging system including Leica TCS NT software. The imaging of RAC was performed by using an optical microscope equipped with fluorescent light. The fluorescence of CTG incorporated into living RAC was detected through using isothiocyanate (FITC) fluorescent set:  $\lambda_{ex}$  = 488 nm;  $\lambda_{em}$  collected = 490–560 nm. The red EthD-1 emission, characteristic of dead cells, was viewed using the TRITC  $\lambda_{ex}$  = 568 nm;  $\lambda_{em}$  collected = 580–620 nm.

#### 2.6. RT-PCR analysis

RT-PCR analysis of transcripts was conducted on freshly isolated RAC and on RAC cultured for three weeks either in two dimensions (2D) in the absence of Si-HPMC or in three dimensions (3D) in Si-HPMC. Total RNA was extracted by using Trizol<sup>®</sup> reagent according to the manufacturer's instruction. Briefly, lysis of the cells in Trizol<sup>®</sup> was followed by centrifugation at 10,000 g, 4 °C for 15 min in the presence of chloroform. The upper aqueous phase was collected and the RNA was precipitated by addition of isopropanol and centrifugation at 12,000 g, 4 °C for 5 min. Total RNA was then washed with 1 ml of cold 75% ethanol, dried, reconstituted with sterile water, and quantified by spectrometry.

After DNase I digestion, 2  $\mu$ g of RNA samples were reverse transcribed through using AMV-RT and random hexamers in a total volume of 30  $\mu$ l. One microliter of cDNA was amplified in a total volume of 50  $\mu$ l PCR reaction containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1  $\mu$ M of the respective primers (see Table 1), 200  $\mu$ M dNTP and 2.5 units of Taq DNA Polymerase. The magnesium chloride concentration was 1.5 mM. The absence of DNA contamination in RNA preparation was tested by including RNA samples that had not been reverse transcribed. Amplifications were carried out in an Eppendorf master cycler under the following conditions: denaturation for 3 min at 94 °C followed by cycles of 20 s denaturation at 94 °C, 20 s annealing at the primer specific temperature and 15 s elongation at 72 °C. PCR products were electrophoresed on 2% agarose gels and visualized by U.V. transilluminator. All PCR results show amplification products obtained in the linear range of PCR amplification.

Table 1  
Sequences of primer pairs, annealing temperatures, size of PCR products, and cycle numbers used for RT-PCR analysis

Gene	Primer sequences	Annealing temperature	Product length	Cycle number
$\beta$ -actin	Forward 5'-TCTCCATGTCGTCCTCCAGTTG-3' Reverse 5'-AGTCTTCCCCTCCATCGTTG-3'	60 °C	164 pb	30
COL2A1	Forward 5'-GGCAATAGCAGGTTACAGTACA-3' Reverse 5'-GAGGCGTGAGGTCTTCTGTGA-3'	60 °C	108 pb	35
Aggrecan	Forward 5'-CCCTGGCAATGATGGCACTGTTTC-3' Reverse 5'-TGGCAATGATGGCACTGTTTC-3'	60 °C	117 pb	35
COL1A1	Forward 5'-GATGCGTTCCAGTTCGAGTA-3' Reverse 5'-GGTCTCCGGTGGTCTTGTGA-3'	55 °C	312 pb	35

## 2.7. Glycosaminoglycan production

The production of Glycosaminoglycans (GAG) was investigated on RAC cultured for 3 weeks either in 3D into Si-HPMC or in 2D in the absence of Si-HPMC. GAG production was assessed colorimetrically by an Alcian blue staining. Briefly, samples were washed with PBS and fixed 5 min in methanol at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Samples were then stained at room temperature with 0.1% Alcian blue solution in 0.1 M HCl. After overnight incubation, cells were rinsed with distilled water. MC3T3-E1, a non-transformed mouse osteoblastic cell line [29] was cultured in 3D into Si-HPMC for 3 weeks, and used as a negative control for the production of GAG.

## 2.8. Statistical analysis

Each experiment was repeated at least twice with similar results. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations. Comparative studies of means were performed by using one-way ANOVA followed by post-hoc test (Fisher's projected least significant difference) with a statistical significance at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Synthesis of Si-HPMC hydrogel

The final product (Si-HPMC) consists of a reticulated hydrogel with a pH value of 7.4. Dynamic rheological measurement was performed as previously described [30] to investigate the self-setting process of Si-HPMC. An oscillation test allowed us to determine the storage modulus ( $G'$ ), which characterized the hard component, and the loss modulus ( $G''$ ), which characterized the liquid component. The increased value of  $G'$  (Fig. 1) indicated that the viscous liquid became a solid hydrogel after 30 min (Arrow, Fig. 1) and the self-setting process finished after 12 days with a maximum  $G'$  at 190 Pa.

### 3.2. Viability and proliferation of chondrocytes after two-dimensional culture in the presence of Si-HPMC hydrogel

To examine the viability of chondrocytes cultured in 2D in the presence of Si-HPMC hydrogel, we carried out measurements of MTS activity after 24, 48 and 72 h in culture. Fig. 2 shows that Si-HPMC did not affect MTS activity of SW1353 chondrocytes (Fig. 2A), C28/I2 chondrocytes (Fig. 2B) and RAC (Fig. 2C). MTS activity was not significantly different when these three types of chondrocytes were cultured in 2D in the presence or the absence of Si-HPMC. When chondrocytes were treated with actinomycin-D, MTS activity was significantly reduced by nearly 70% ( $P < 0.001$ ) as early as 24 h of treatment (Fig. 2A–C).

The effect of Si-HPMC hydrogel on cellular proliferation was assessed by scoring the cells after trypan

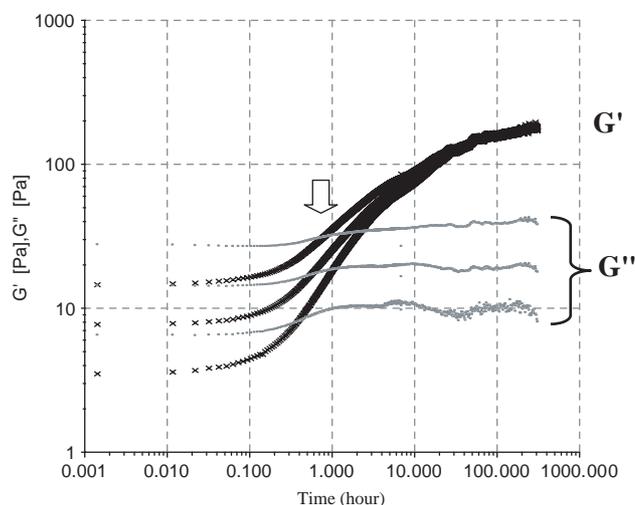


Fig. 1. Dynamic rheometric diagram (log/log) of Si-HPMC. After synthesis of Si-HPMC hydrogel, multiwave procedure under controlled stress was performed for 14 days as described in Section 2. The storage modulus ( $G'$ ) and the loss modulus ( $G''$ ) are reported. For each frequency, the cross line of  $G'$  and  $G''$  corresponds to the gel point (Arrow).

blue staining. Fig. 3 shows that Si-HPMC did not reduce proliferation of SW1353 chondrocytes (Fig. 3A), C28/I2 chondrocytes (Fig. 3B) and RAC (Fig. 3C). The total number of chondrocytes cultured with Si-HPMC showed no significant difference when compared to their respective control. Treatment with actinomycin-D induced a significant decrease in the total number of cells.

Considered together, these results indicate that Si-HPMC had no adverse effects on chondrocyte viability and proliferation.

### 3.3. Viability of chondrocytes after three-dimensional culture in Si-HPMC

The viability of C28/I2 and RAC in three-dimensional culture in Si-HPMC was, respectively, visualized by confocal microscopy (Fig. 4A) and conventional fluorescent microscopy (Fig. 4B). Cells were stained with CTG and EthD-1, which, respectively, label living cells in green and dead cells in red. Chondrocyte viability was visualized through the intense green fluorescence observed as a consequence of incorporation of the CTG fluorescent probe into the cell cytoplasm. As shown in Fig. 4A, C28/I2 chondrocytes were viable during the whole culture period, from day 1 to day 3, and formed nodular structures which seemed to increase with time. The absence of red fluorescence indicated the absence of cell death in three-dimensional culture. When C28/I2 chondrocytes were treated with actinomycin-D, they exhibited a marked red fluorescence indicating that actinomycin-D had promoted cell death.

As shown in Fig. 4B, RAC cultured into Si-HPMC displayed a green fluorescence during the whole culture

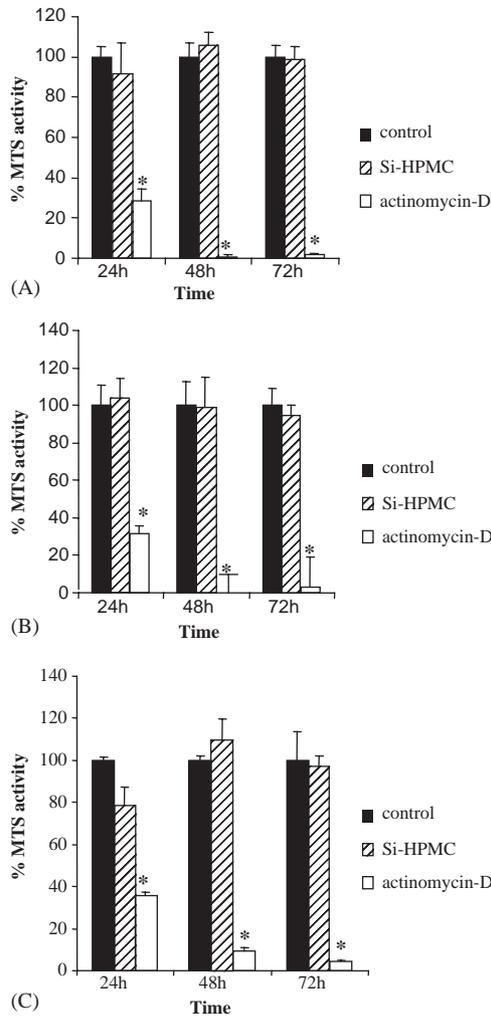


Fig. 2. Cellular viability. Cells were cultured in 2D with or without Si-HPMC (control) or in the presence of actinomycin-D (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) during the indicated times. Viability was assessed by MTS activity as indicated in Section 2. (A) SW1353, (B) C28/I2, (C) Rabbit articular chondrocytes. Results are expressed as relative MTS activity compared with the respective control.  $*P < 0.001$  as compared to control conditions.

period. As previously observed for C28/I2 cells, we failed to detect a red fluorescence even after a long-term culture. These results indicate that C28/I2 chondrocytes and RAC retained their viability and developed in nodular structures when three dimensionally cultured in Si-HPMC hydrogel.

#### 3.4. Phenotype of chondrocytes after three-dimensional culture in Si-HPMC

The ability of Si-HPMC to maintain a chondrocytic phenotype was investigated by RT-PCR (Fig. 5). RAC cultured in 2D expressed low level of type II collagen transcripts compared to freshly isolated RAC. Contrarily to freshly isolated RAC, which expressed

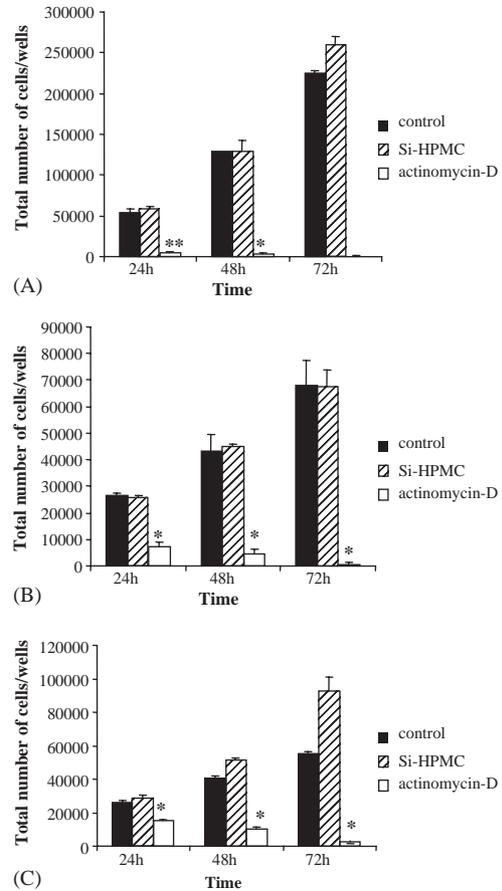


Fig. 3. Cellular proliferation. Cells were cultured in 2D with or without Si-HPMC (control) or in the presence of actinomycin-D (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) during the indicated times. Cells were manually scored after Trypan blue staining. (A) SW1353, (B) C28/I2, (C) Rabbit articular chondrocytes. Results are expressed as the total number of cells per well.  $*P < 0.001$  compared with the respective control.

aggrecan, RAC cultured in 2D failed to express aggrecan. Besides, RAC cultured in 2D expressed high level of type I collagen transcripts, suggesting a loss of chondrocyte phenotype. In contrast to RAC cultured in 2D, RAC after three-dimensional culture into Si-HPMC showed an increased level of type II collagen and aggrecan transcripts as compared to freshly isolated RAC. Three-dimensional culture of RAC was also shown to induce a marked down-regulation of type I collagen expression as compared to two-dimensional culture. These results suggest that Si-HPMC enabled the maintenance of a chondrocyte-like phenotype in RAC.

#### 3.5. GAG production by chondrocytes cultured in 3D

To determine the effect of three-dimensional culture of RAC on sulfated glycosaminoglycans (GAG) production, we performed an Alcian blue staining of RAC after 3 weeks of culture either in 2D in the absence of

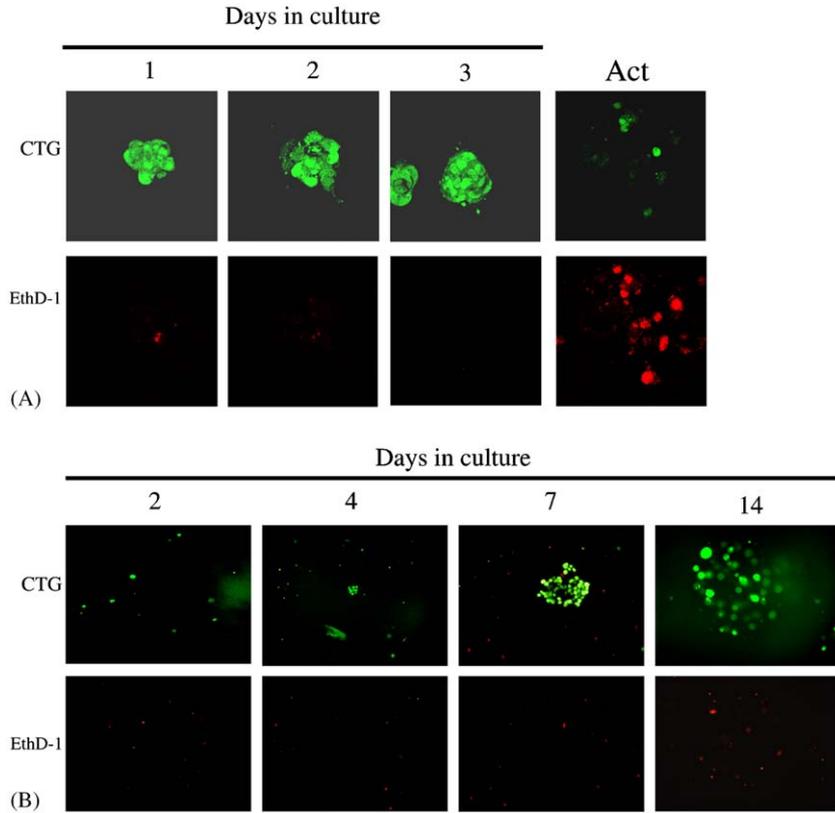


Fig. 4. Visualization of three-dimensional cellular viability. Cells were cultured in 3D during the indicated times into Si-HPMC prior to staining with CTG and EthD-1. (A) C28/I2 viability was visualized by confocal microscopy as indicated in Section 2. Actinomycin-D (ACT) was used as a positive control of cell death. Original magnification  $\times 400$ . (B) long term RAC viability was visualized by conventional fluorescent microscopy. Original magnification  $\times 200$ .

Si-HPMC or in 3D into Si-HPMC (Fig. 6). RAC cultured in 2D showed a light blue staining whereas RAC cultured in 3D were strongly positive. MC3T3-E1 osteoblasts, used as a negative control for GAG production failed to produce an Alcian blue positive extracellular matrix. These results suggest an abundant accumulation of GAG in the extracellular matrix surrounding the RAC cultured in 3D into Si-HPMC.

**4. Discussion**

Cell-based strategies for cartilage tissue engineering are currently considered one of the most promising approach to restore physiological hyaline-like joint surface. Since it is well known that chondrocytes undergo a process of phenotypic dedifferentiation when expanded in two-dimensional culture [7,31,32], such cell-based approaches are focused on the use of natural or synthetic three-dimensional scaffolds. In an attempt to propose a three-dimensional scaffold to support regeneration of functional cartilage [33], we have recently developed a self-setting hydrogel [30]. In the present study, we demonstrate for the first time that a silanized-cellulose-based hydrogel could be a convenient three-

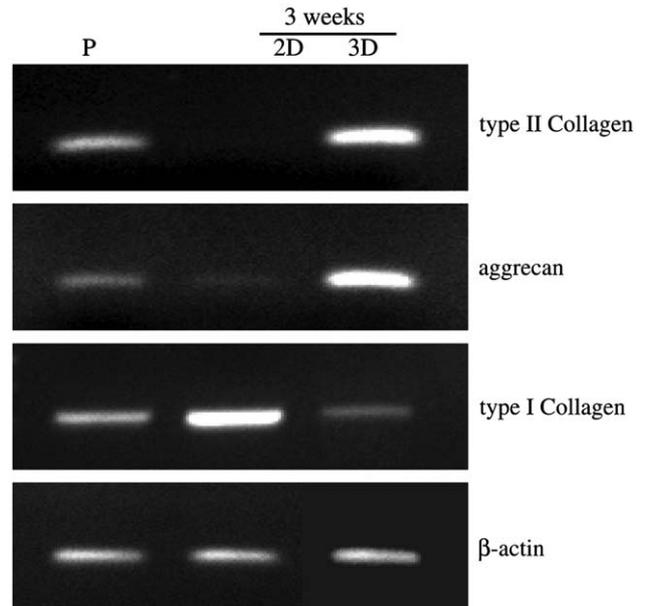


Fig. 5. RT-PCR analysis of mRNA expression. Total RNA was purified from freshly isolated RAC (P), from RAC cultured in 2D for 3 weeks, and from RAC cultured in 3D for 3 weeks. RT-PCR analysis for type II and I collagen transcripts, as well as aggrecan and  $\beta$ -actin were performed using primers and conditions detailed in Section 2. Representative agarose gels are shown.

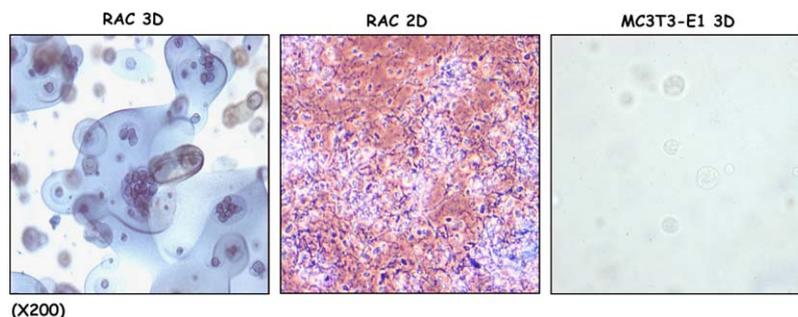


Fig. 6. GAG production. RAC were cultured for 3 weeks either in 3D into Si-HPMC or in 2D in the absence of Si-HPMC. MC3T3-E1 were cultured for 3 weeks in 3D into Si-HPMC and used as a negative internal control. Alcian blue staining was performed as detailed in Section 2. Samples were observed with a light microscope. Original magnification  $\times 200$ .

dimensional network able to support the development of differentiated chondrocytes.

For clinical application of engineered tissues, the delivery of cells by noninvasive surgery should be achieved by an injectable scaffold [33]. In addition, the desired cell-based construct has to be retained at the repair site after being injected. In the light of these requirements, we focused our effort on the development of a hydrophilic polymer able to exhibit self-reticulation properties. We aimed at improving the mechanical properties of HPMC by selective grafting of Silanol groups [22]. The determination of the rheological properties of Si-HPMC clearly indicates that it is initially a viscous liquid, in which cells may be easily mixed and injected at the repair site. Subsequently, this viscous liquid undergoes a process of reticulation that triggers the formation of a solid hydrogel [30].

Since the density of hydrogel networks has been reported to influence induction or maintenance of the chondrocyte phenotype [1], this parameter deserves major consideration. We could propose various self-setting hydrogels with cross-linking properties adapted to clinical applications by controlling the amount of grafted Silanol.

In the field of tissue engineering, one of the first steps in the development of a novel scaffold is the evaluation of its cytotoxicity. In this work, we were first interested in examining the *in vitro* cytotoxicity of Si-HPMC. According to standards (ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity) we focused on a cytotoxicity test by direct contact with chondrocytes cultured in 2D. Among the cellular models mimicking the various stages of chondrocyte growth and differentiation, the cell lines C28/12 [25] and SW1353 [34] are the most widely used since they are human cell lines that express a typical chondrogenic phenotype. C28/12 and SW1353 are however transformed cell lines that may exhibit low sensitivity to cytotoxic signals. Therefore, we aimed at confirming the cytocompatibility of Si-HPMC by using nontrans-

formed primary cells derived from rabbit articular cartilage. In the present work, whatever the cell lines, Si-HPMC failed to affect significantly chondrocyte viability and proliferation as brought out by estimation of the mitochondrial dehydrogenase activity (MTS assay) and by cell counting, respectively.

After demonstrating that Si-HPMC failed to affect chondrocytes by direct contact, we questioned whether three-dimensional cultures into Si-HPMC allowed chondrocytes to retain their viability and proliferation ability. In this attempt, we used a dual fluorescent staining based on CTG and EthD-1 reagents [27]. Our results not only indicate that chondrocytes retained their viability in three-dimensional culture into Si-HPMC, but also reveal that cells proliferated and aggregated into distinct nodules containing large clusters of spherical cells. Added together, our results clearly indicate that Si-HPMC neither altered chondrocyte viability nor proliferation.

A major pitfall in cell-based therapy of cartilage is the dedifferentiation of chondrocytes, which occurs during *in vitro* expansion [8]. It is well known that during monolayer culture, chondrocytes lose their spherical shape and adopt a more fibroblast-like morphology [8]. This process is accompanied on the one hand by a downregulation of type II collagen and aggrecan expression, which are the main markers of chondrocytic phenotype, on the other hand by an up-regulation of type I collagen expression [9]. As a consequence of these data, we aimed at determining whether Si-HPMC hydrogel could maintain a chondrocyte-like phenotype by examining expression of transcripts encoding for collagen (type I and II) and aggrecan. As expected, freshly isolated rabbit articular chondrocytes expressed type II collagen and aggrecan. We have also detected a reliable expression of transcripts coding for type I collagen. This unexpected observation is however consistent with previous studies demonstrating the expression of type I collagen in rabbit [35], chicken, rat, and porcine articular cartilage [36]. According to the

dedifferentiation process of chondrocytes during monolayer expansion [37], type II collagen and aggrecan expression was down-regulated, whereas that of type I collagen was increased. Interestingly, when chondrocytes were cultured in 3D into Si-HPMC hydrogel, expressions of type II collagen and aggrecan were maintained at a level similar to those observed in primary rabbit articular chondrocytes. It seems therefore reasonable to speculate that Si-HPMC is a convenient three-dimensional scaffold for the maintenance of a chondrocyte-like phenotype *in vitro*.

Synthesis of GAG is an important function of chondrocytes and plays significant roles in regulating the chondrocyte phenotype [38]. In the present study, culturing chondrocytes three dimensionally into Si-HPMC leads to a marked production of GAG. These results unequivocally indicate that Si-HPMC hydrogel allows three-dimensional culture of chondrocytes able to synthesize a GAG-containing ECM.

In conclusion, our results demonstrate for the first time that a self-setting and injectable Si-HPMC hydrogel is a convenient scaffold for three-dimensional culture of chondrocytes. This scaffold permits the growth of phenotypically stable chondrocytes, able to synthesize cartilage-like ECM. Whether this hydrogel may be able to support cartilage repair *in vivo* remains to be considered and requires further experiments in adapted animal models.

### Acknowledgements

This study was supported by grants from “Association de Recherche pour la Polyarthrite Rhumatoïde”, “Société Française de Rhumatologie” and INSERM EM 9903. Claire Vinatier received a fellowship from the French Ministry of Research and Technology. Authors also thank Paul Pilet and Gilles Bluteau for helpful suggestions and Janine Guicheux and Pierre Layrolle for critical reading of the manuscript.

### References

- [1] Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol* 2003;22(1): 81–91.
- [2] Holland TA, Mikos AG. Advances in drug delivery for articular cartilage. *J Control Release* 2003;86(1):1–14.
- [3] LeBaron RG, Athanasiou KA. *Ex vivo* synthesis of articular cartilage. *Biomaterials* 2000;21(24):2575–87.
- [4] Buckwalter JA. Articular cartilage. *Instr Course Lect* 1983;32: 349–70.
- [5] Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998;28(4):192–202.
- [6] Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331(14):889–95.
- [7] Brodtkin KR, Garcia AJ, Levenston ME. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials* 2004;25(28):5929–38.
- [8] Glowacki J, Trepman E, Folkman J. Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983; 172(1):93–8.
- [9] Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10(1):62–70.
- [10] Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res* 1999;17(2):205–13.
- [11] Pavesio A, Abatangelo G, Borriore A, Brocchetta D, Hollander AP, Kon E, Torasso F, Zanasi S, Marcacci M. Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft C) in the treatment of knee cartilage defects: preliminary clinical findings. *Novartis Found Symp* 2003;249: 203–17 discussion 229–33, 234–8, 239–41.
- [12] Williams JM, Rayan V, Sumner DR, Thonar EJ. The use of intra-articular Na-hyaluronate as a potential chondroprotective device in experimentally induced acute articular cartilage injury and repair in rabbits. *J Orthop Res* 2003;21(2):305–11.
- [13] Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, van der Veen SW, Hollander AP, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA. Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2002;23(6): 1511–7.
- [14] Bonaventure J, Kadhon N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselín C, Freisinger P. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res* 1994;212(1):97–104.
- [15] Cohen SB, Meirisch CM, Wilson HA, Diduch DR. The use of absorbable co-polymer pads with alginate and cells for articular cartilage repair in rabbits. *Biomaterials* 2003;24(15):2653–60.
- [16] Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 2000;21(5):431–40.
- [17] Chaipinyo K, Oakes BW, van Damme MP. Effects of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis of low-density, primary bovine chondrocytes cultured in collagen I gels. *J Orthop Res* 2002;20(5):1070–8.
- [18] Passaretti D, Silverman RP, Huang W, Kirchhoff CH, Ashiku S, Randolph MA, Yaremchuk MJ. Cultured chondrocytes produce injectable tissue-engineered cartilage in hydrogel polymer. *Tissue Eng* 2001;7(6):805–15.
- [19] Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10(6):432–63.
- [20] Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg* 1991;88(5):753–9.
- [21] Bourges X, Weiss P, Coudreuse A, Daculsi G, Legeay G. General properties of silated hydroxyethylcellulose for potential biomedical applications. *Biopolymers* 2002;63(4):232–8.
- [22] Bourges X, Weiss P, Daculsi G, Legeay G. Synthesis and general properties of silated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci* 2002;99(3):215–28.
- [23] Ghayor C, Herrouin JF, Chadjichristos C, Ala-Kokko L, Takigawa M, Pujol JP, Galera P. Regulation of human COL2A1 gene expression in chondrocytes. Identification of C-Krox-responsive elements and modulation by phenotype alteration. *J Biol Chem* 2000;275(35):27421–38.
- [24] Mengshol JA, Vincenti MP, Brinckerhoff CE. IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways. *Nucleic Acids Res* 2001;29(21): 4361–72.

- [25] Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, Arbisser JL, Apperley JF. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* 1994;94(6):2307–16.
- [26] Relic B, Guicheux J, Mezin F, Lubberts E, Togninalli D, Garcia I, van den Berg WB, Guerne PA. Il-4 and IL-13, but not IL-10, protect human synoviocytes from apoptosis. *J Immunol* 2001;166(4):2775–82.
- [27] Magne D, Bluteau G, Fauchoux C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, Pilet P, Rouillon T, Caverzasio J, Weiss P, Daculsi G, Guicheux J. Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 2003;18(8):1430–42.
- [28] Kimura H, Sugaya K, Cook PR. The transcription cycle of RNA polymerase II in living cells. *J Cell Biol* 2002;159(5):777–82.
- [29] Guicheux J, Lemonnier J, Ghayor C, Suzuki A, Palmer G, Caverzasio J. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res* 2003;18(11):2060–8.
- [30] Weiss P, Vinatier C, Guicheux J, Grimandi G, Daculsi G. A self setting hydrogel as an extracellular synthetic matrix for tissue engineering. *Key Eng Mater* 2004;254–256:1107–10.
- [31] Ronziere MC, Farjanel J, Freyria AM, Hartmann DJ, Herbage D. Analysis of types I, II, III, IX and XI collagens synthesized by fetal bovine chondrocytes in high-density culture. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5(3):205–14.
- [32] Zaucke F, Dinser R, Maurer P, Paulsson M. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. *Biochem J* 2001;358(Pt 1):17–24.
- [33] Sittinger M, Huttmacher DW, Risbud MV. Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Curr Opin Biotechnol* 2004;15(5):411–8.
- [34] Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheumatism* 2000;43(4):801–11.
- [35] Marchuk L, Sciore P, Reno C, Frank CB, Hart DA. Postmortem stability of total RNA isolated from rabbit ligament, tendon and cartilage. *Biochim Biophys Acta* 1998;1379(2):171–7.
- [36] Naumann A, Dennis JE, Awadallah A, Carrino DA, Mansour JM, Kastenbauer E, Caplan AI. Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem* 2002;50(8):1049–58.
- [37] Mandl EW, van der Veen SW, Verhaar JA, van Osch GJ. Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity. *Tissue Eng* 2004;10(1–2):109–18.
- [38] Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79(10):1439–51.

#### 4 DISCUSSION

Les résultats des articles 3 et 4 montrent pour la première fois qu'un hydrogel à base de cellulose silanisée représente une matrice tridimensionnelle apte à supporter le développement en culture tridimensionnelle de chondrocytes différenciés.

L'étude rhéologique réalisée dans l'article 3 nous a confirmé que le polymère silanisé (HPMC-Si) possédait des propriétés d'auto durcissement. Le point de transition entre un liquide visqueux et un hydrogel solide est appelé le point de gel. Notre étude rhéologique réalisée à 37°C nous a permis de caractériser les propriétés rhéologiques d'un hydrogel contenant 1,5 % en masse de polymère sec et présentant un pH de 7,4 après mélange avec un tampon biologique. Dans ces conditions, le point de gel est atteint en 60 minutes et le processus de réticulation s'étend ensuite sur plus de 10 jours. Une des propriétés importantes de cet hydrogel est sa capacité d'auto réticulation en présence de cellules. De plus, son temps de réticulation et sa compatibilité avec les liquides biologiques permettent une manipulation adaptée à l'ingénierie tissulaire. Grâce à ces mesures rhéologiques, nous avons pu vérifier quels étaient les paramètres (pH, % en masse de polymère sec) capables de modifier ces propriétés visco-élastiques et donc d'allonger ou raccourcir le point de gel. La connaissance de ces paramètres permettra de proposer des hydrogels d'HPMC-Si présentant des propriétés visco-élastiques différentes et adaptables en fonction de l'application souhaitée.

Concernant l'utilisation de l'hydrogel d'HPMC-Si en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire, nous avons choisi d'utiliser un hydrogel contenant 2% en masse de polymère sec. L'étude rhéologique réalisée (article 4) dans les mêmes conditions que précédemment (article 3) nous indique que cet hydrogel atteint le point de gel en 30 minutes. Ce temps nécessaire à l'obtention du point de gel, permet aux cellules d'être mélangées avec l'hydrogel.

L'évaluation de la cytotoxicité constitue une des premières étapes de validation des biomatériaux destinés à une application biomédicale. En accord avec les normes ISO 10993-5 (évaluation biologique des dispositifs médicaux partie 5 : test de cytotoxicité *in vitro*), nous avons réalisé un test de cytotoxicité par contact direct entre l'hydrogel et des chondrocytes cultivés en 2 dimensions (2D). Parmi les modèles cellulaires de chondrocytes humains, les plus utilisés sont la lignée C28/I2 (167) et la lignée SW1353 (321). La viabilité et la prolifération des deux lignées chondrocytaires n'ont pas été affectées par la présence de l'hydrogel d'HPMC-Si. Cependant, les C28/I2 et SW1353 sont des lignées cellulaires transformées, ce qui peut diminuer leur sensibilité vis à vis de signaux cytotoxiques. Aussi,

nous avons confirmé la cytocompatibilité de l'hydrogel en utilisant des chondrocytes primaires isolés de cartilage articulaire de lapin. Ces résultats nous ont donc indiqué que l'hydrogel d'HPMC-Si ne présentait pas de cytotoxicité de contact. Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, les cellules ne sont pas simplement en contact avec la matrice, mais associées profondément au travers de cultures tridimensionnelles en suspension. Nous avons ensuite voulu savoir si, utilisé comme matrice tridimensionnelle, l'hydrogel d'HPMC-Si n'était pas cytotoxique. Grâce à un double marquage éthidium homodimer-1 et cell tracker green, nous avons montré que les chondrocytes articulaires de lapin et les chondrocytes de la lignée C28/I2 étaient viables en culture tridimensionnelle. Ces résultats nous ont clairement montré que l'hydrogel d'HPMC-Si n'affectait ni la viabilité ni la prolifération des chondrocytes.

Contrairement à la culture en monocouche qui entraîne la dédifférenciation des chondrocytes (163), la culture en 3D au sein de biomatériaux est connue pour favoriser le maintien du phénotype chondrocytaire (192). Nous avons donc cherché à déterminer l'effet d'une culture 3D dans notre hydrogel sur le phénotype de chondrocytes articulaires de lapins. Nos résultats montrent que les chondrocytes articulaires de lapin ont conservé leur phénotype, mais également leur capacité à synthétiser et produire dans la MEC des glycosaminoglycanes sulfatés. La capacité de l'hydrogel à permettre la synthèse du collagène de type II, traduisant la mise en place d'une matrice extracellulaire cartilagineuse hyaline, devra être déterminée et fera l'objet d'études complémentaires.

En conclusion, nous avons mis au point un hydrogel injectable auto réticulant, dont les propriétés visco-élastiques peuvent être adaptées en fonction des applications thérapeutiques souhaitées. Dans le cadre de son utilisation en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire, nous avons choisi un hydrogel composé à 2% en masse de polymère HPMC-Si. Cet hydrogel présente une réticulation adaptée à une utilisation clinique, puisque son point de gel est atteint en 30 minutes. Enfin cet hydrogel représente une matrice tridimensionnelle pertinente pour la culture de chondrocytes phénotypiquement stables et capables de synthétiser une MEC cartilagineuse. Ces résultats prometteurs nous ont incités à déposer un brevet afin de protéger l'utilisation de l'hydrogel d'HPMC-Si en association avec des cellules autologues pour la thérapie cellulaire du cartilage articulaire (texte complet du brevet en Annexe).

## IV.

# L'HPMC-SILANISÉE : DE L'INGENIERIE TISSULAIRE A LA REPARATION DU CARTILAGE

### Article 5

**Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel**

**C. Vinatier**, D. Magne, P. Weiss, O. Malard, O. Gauthier, A. Moreau, C. Vignes-Colombeix, J. Guicheux.

Journal of Biomedical Materials Research: Part A (2007), 80 (1); 66-74

### Article 6

**Articular cartilage repair using autologous nasal chondrocytes and a cellulose-based hydrogel**

**C. Vinatier** , O. Gauthier, M. Masson, A. Moreau, F. Moreau, B. Fellah, P. Weiss, J. Guicheux.

Biomaterials, soumis.

## 1 PROBLEMATIQUE

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que la dédifférenciation des chondrocytes lors de leur amplification *in vitro*, dans le cadre de la technique ACI pouvait être prévenue par une culture tridimensionnelle au sein d'un hydrogel d'HPMC-Si. Cependant, le prélèvement des chondrocytes en site articulaire représente une autre des limites de la technique ACI. En effet, le prélèvement en site articulaire entraîne une morbidité au niveau du site donneur, et ne permet d'obtenir qu'une faible quantité de chondrocytes. L'utilisation de sources alternatives de chondrocytes autologues représente donc un des challenges actuels en thérapie cellulaire du cartilage. Le prélèvement de cartilage nasal est un geste moins invasif que le prélèvement de cartilage articulaire, ce qui entraîne une réduction de la morbidité associée au prélèvement (234). De plus, les chondrocytes nasaux montrent des capacités de prolifération supérieures à celles des chondrocytes articulaires en culture (234, 476) et sont capables de former un tissu cartilagineux *in vivo* (453). Dans ce contexte, les chondrocytes nasaux peuvent être considérés comme une source potentielle de chondrocytes autologues pour la thérapie cellulaire du cartilage. Parallèlement à la recherche de sources de cellules alternatives aux chondrocytes articulaires, les thérapies cellulaires du cartilage s'orientent vers les techniques de chirurgies mini-invasives. Cette recherche de techniques chirurgicales mini-invasives a permis le développement de nombreuses matrices injectables. Parmi ces matrices, les hydrogels sont une classe de biomatériaux capables de satisfaire aux prérequis de la chirurgie mini-invasive mais également à ceux de la thérapie cellulaire.

Dans les articles précédents, nous avons vu que l'hydrogel d'HPMC-Si était une matrice appropriée pour la culture tridimensionnelle de chondrocytes articulaires. Notre objectif fut donc ensuite de proposer l'association de chondrocytes nasaux autologues et de l'hydrogel d'HPMC-Si comme une technique de thérapie cellulaire pour le traitement des lésions cartilagineuses.

Dans un premier temps, nous nous sommes donc intéressés à la possibilité d'associer l'hydrogel d'HPMC-Si avec des chondrocytes nasaux humains (CNH) (article 5). Pour cela nous avons évalué la cytocompatibilité et la bio fonctionnalité de l'hydrogel vis-à-vis de CNH. Ensuite, nous avons testé la capacité de matrices hybrides associant des chondrocytes nasaux humains et notre hydrogel à former un tissu cartilagineux *in vivo*, en site sous-cutané chez la souris *nude* (article 5).

Dans un second temps, nous nous sommes attachés à démontrer l'intérêt préclinique de notre concept dans un modèle de défauts cartilagineux chez le lapin. Après leur prélèvement, caractérisation et amplification, des chondrocytes nasaux de lapins ont été associés à notre hydrogel et transplantés de façon autologue sur le siège de défauts cartilagineux de taille critique réalisés dans la gouttière inter-condylienne fémorale.

Ces études nous permettront de déterminer si des chondrocytes nasaux autologues et un hydrogel injectable d'HPMC-Si peuvent être proposés comme un nouveau concept d'ingénierie tissulaire visant à traiter des lésions du cartilage articulaire.

2 **FORMATION DE CARTILAGE A L'AIDE D'UN HYDROGEL D'HYDROXYPROPYL METHYLCELLULOSE SILANISEE ET DE CHONDROCYTES NASAUX HUMAINS.**  
**ARTICLE 5**

**Résumé**

Les stratégies d'ingénierie tissulaire, basées sur le développement de matrices tridimensionnelles capables de transférer des cellules chondrogéniques autologues pour la réparation de cartilages lésés, apparaissent prometteuses. L'objectif de cette étude a été de déterminer si un hydrogel d'HPMC-Si pouvait servir de matrice tridimensionnelle à des chondrocytes nasaux pour l'ingénierie du cartilage. Les tests de viabilité, à base de sels de méthyle de tétrazolium (MTS), et de prolifération indiquent que l'hydrogel HPMC-Si permet la prolifération des chondrocytes nasaux humains (CNH). De plus, une coloration par le "cell tracker green" démontre que les CNH prolifèrent en formant des agrégats cellulaires en culture tridimensionnelle dans l'hydrogel. L'analyse de l'expression du collagène II et de l'agrécan par RT-PCR nous a permis d'évaluer le phénotype des CNH. Nos résultats révèlent que la culture tridimensionnelle dans l'hydrogel d'HPMC-Si maintient le phénotype chondrocytaire, mais permet également la récupération du phénotype chondrocytaire. L'aptitude de constructions hybrides, associant l'HPMC-Si aux CNH, à former un tissu cartilagineux *in vivo* a été examinée en site sous-cutané chez la souris *nude*. L'analyse histologique des implants révèle la formation d'un tissu cartilagineux dont la matrice extracellulaire contient des GAG sulfatés et du collagène II.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'association de CNH avec l'hydrogel HPMC-Si est une approche potentielle pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.

## **Article 5**

### **Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel**

C. Vinatier, D. Magne, P. Weiss, O. Malard, O. Gauthier, A. Moreau, C. Vignes-Colombeix, J. Guicheux.

Journal of Biomedical Materials Research: Part A (2007), 80 (1); 66–74

# Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel

C. Vinatier,<sup>1</sup> D. Magne,<sup>1</sup> A. Moreau,<sup>2</sup> O. Gauthier,<sup>1</sup> O. Malard,<sup>1</sup> C. Vignes-Colombeix,<sup>3</sup> G. Daculsi,<sup>1</sup> P. Weiss,<sup>1</sup> J. Guicheux<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U 791, Laboratory of Osteoarticular and Dental Tissue Engineering, LIOAD, University of Nantes, France

<sup>2</sup>Department of Anatomico-Cytopathology, University Hospital, Nantes, France

<sup>3</sup>IFR26, School of Medicine, Nantes, France

Received 29 November 2005; revised 15 February 2006; accepted 5 April 2006

Published online 6 September 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.a.30867

**Abstract:** Tissue engineering strategies, based on developing three-dimensional scaffolds capable of transferring autologous chondrogenic cells, holds promise for the restoration of damaged cartilage. In this study, the authors aimed at determining whether a recently developed silanized hydroxypropyl methylcellulose (Si-HPMC) hydrogel can be a suitable scaffold for human nasal chondrocytes (HNC)-based cartilage engineering. Methyltetrazolium salt assay and cell counting experiments first revealed that Si-HPMC enabled the proliferation of HNC. Cell tracker green staining further demonstrated that HNC were able to form nodular structures in this three-dimensional scaffold. HNC phenotype was then assessed by RT-PCR analysis of type II collagen and aggrecan expression as well as alcian blue staining of extracellular matrix. Our data indi-

cated that Si-HPMC allowed the maintenance and the recovery of a chondrocytic phenotype. The ability of constructs HNC/Si-HPMC to form a cartilaginous tissue *in vivo* was finally investigated after 3 weeks of implantation in subcutaneous pockets of nude mice. Histological examination of the engineered constructs revealed the formation of a cartilage-like tissue with an extracellular matrix containing glycosaminoglycans and type II collagen. The whole of these results demonstrate that Si-HPMC hydrogel associated to HNC is a convenient approach for cartilage tissue engineering. © 2006 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res* 80A: 66–74, 2007

**Key words:** cartilage; hydrogel; chondrocyte; tissue engineering

## INTRODUCTION

Articular cartilage is frequently damaged as a result of trauma and degenerative joint diseases. Incidence of these diseases is moreover rising exponentially with an increasingly aged population.<sup>1</sup> Articular cartilage is composed of few cells, namely, chondrocytes, which synthesize and maintain an abundant extracellular matrix containing proteoglycans, mainly aggrecan, and collagen type II, IX, and XI.<sup>2,3</sup> Adult articular cartilage is an avascular and aneural tissue, both characteristics being responsible for its limited intrinsic repair capacity. Therefore, cartilage injuries are main-

tained for years and may lead to degenerative arthropathie.<sup>4</sup> In this context, repairing lost or injured cartilage represents a clinical and scientific challenge. Various techniques like abrasive chondroplasty, spongyalization, and microfracture are used to stimulate the spontaneous repair based on the capacity of the non-differentiated bone-marrow cells to migrate into the defect and to differentiate locally into cartilage cells. Autologous transplants of periosteum or perichondrium and osteochondral matrix (mosaicplasty) have also been considered. These various approaches have unfortunately proven unsatisfactory (for review see Ref. 5). The field of tissue engineering has offered promising strategies for the replacement of damaged cartilage. In 1994, autologous chondrocyte transplantation has been introduced into clinical use as a novel biological approach.<sup>6</sup> Human articular chondrocytes are harvested from healthy and non-weight-bearing areas of the joint. Chondrocytes are subsequently expanded in monolayer culture to achieve sufficient amounts of cells to fill the defect. In a second operation, chondrocytes are placed in the defect under a periosteal flap.<sup>6</sup> Despite encouraging results (lower pain), this method

Correspondence to: J. Guicheux; e-mail: jerome.guicheux@nantes.inserm.fr

Contract grant sponsor: Association de Recherche pour la Polyarthrite Rhumatoïde

Contract grant sponsor: Société Française de Rhumatologie

Contract grant sponsor: ANR-young researcher

Contract grant sponsor: INSERM; contract grant number: U791

presents some limitations and often leads to the formation of a fibrocartilaginous tissue biochemically and biomechanically inferior to the original hyaline cartilage.<sup>7</sup> The main limit is related to the monolayer culture conditions of chondrocytes, which leads to a gradual dedifferentiation.<sup>8,9</sup> A second limitation is the need of a periosteal flap to retain transplanted cells in the defect, which are not totally impervious. Both limitations could be overcome by using a three-dimensional matrix to culture and maintain chondrocytes in the defect. Many different matrices have therefore been evaluated including natural polymers (hyaluronic acid,<sup>10–12</sup> alginate,<sup>13–15</sup> collagen,<sup>16,17</sup> fibrin glue,<sup>18</sup> and chitosan) and synthetic matrices (polyglycolic acid, polylactic acid, polyvinyl alcohol, and polyhydroxyethyl-methacrylate<sup>19</sup>). Some of these polymers (hyaluronan, alginate, polyglycolic acid, and polylactic acid) have, however, been reported to induce immune or inflammatory response after *in vivo* implantation.<sup>5</sup>

In the light of the above-mentioned data, we have recently developed a self-setting hydrogel consisting of silanized hydroxypropyl methylcellulose (Si-HPMC).<sup>20,21</sup> This Si-HPMC hydrogel has already been demonstrated to be a convenient matrix for the three-dimensional culture of rabbit articular chondrocytes.<sup>22</sup>

In the development of cartilage tissue engineering strategies, implants should include reparative cells able to synthesize hyaline cartilage. Articular chondrocytes from little load bearing regions are commonly used as a chondrocyte source. With respect to the donor site morbidity occurring after harvesting articular cartilage, the use of alternative chondrocyte sources has been also considered. Harvest of nasal cartilage requires less invasive surgery than harvest of articular cartilage and the resulting morbidity is significantly reduced.<sup>23</sup> In addition, several studies have reported higher proliferation and chondrogenic capacity of nasal chondrocytes compared with articular chondrocytes.<sup>23,24</sup> In this context, human nasal cartilage is currently suggested as a potential source of chondrocytes for cartilage engineering.

The aim of the present work was to investigate whether the association of Si-HPMC hydrogel with human nasal chondrocytes (HNC) could be used for engineering cartilage. In this attempt, we first assessed the *in vitro* cytocompatibility and biofunctionality of Si-HPMC hydrogel with respect to HNC. Second, we examined the ability of construct, Si-HPMC hydrogel with HNC, to form a cartilaginous tissue *in vivo* in nude mice.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) E4M<sup>®</sup> was purchased from Colorcon-Dow chemical (Bougival, France).

Glycidoxypropyltrimethoxysilane was obtained from Acros (Geel, Belgium). Cell culture plastic wares were purchased from Corning (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Protease (4.8 units/mg), actinomycin-D, trypsin/EDTA (0.05%/0.53 mM), type IV collagenase (125 units/mg), HEPES, and isopropanol were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis). Hank's Balanced sodium salt (HBSS), DMEM (4.5 g/L glucose), penicillin/streptomycin, L-glutamine, Trizol<sup>®</sup>, Dnase I, and Taq DNA Polymerase were obtained from Invitrogen corporation (Paisley, UK). Cell titer 96<sup>®</sup> AQueous Non Radioactive Cell proliferation assay MTS (methyltetrazolium salt), Avian Myeloblastosis Virus-Reverse Transcriptase, random hexamer, and recombinant ribonuclease inhibitor were provided by Promega corporation (Madison, WI). Fetal calf serum (FCS) was from Dominique Dutscher (Brumath, France). Cell tracker green (CTG) and ethidium homodimer-1 (EthD-1) were obtained from Molecular probes (Leiden, the Netherlands). Antibody against human Ki-67 was from Dako (Glostrup, Denmark). Monoclonal antibody against collagen type II was purchased from Oncogene (San Diego). All other chemicals were from standard laboratory suppliers and were of the highest purity available.

### Preparation of Si-HPMC hydrogel

As previously described,<sup>20</sup> the synthesis of Si-HPMC was performed by grafting 14.24% of 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane on E4M<sup>®</sup> in heterogeneous medium. Si-HPMC powder (3% w/v) was solubilized in 0.2M NaOH under constant stirring for 48 h. The solution was then sterilized by steam (121°C, 30 min). To allow the formation of a reticulated hydrogel, the solution was finally mixed with 0.5 volume of 0.26M HEPES buffer.

### Isolation of HNC

Human nasal septum cartilage was obtained with informed consent from patients undergoing reconstructive septorhinoplasty. The cartilage specimens were washed extensively with HBSS and cut into small slices. Cartilage slices were first digested at 37°C with 0.1% protease in HBSS for 30 min. Slices were then digested with 0.06% type IV collagenase in DMEM supplemented with 10% FCS overnight at 37°C on an orbital shaker. Finally, isolated HNC were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin, and 1% L-glutamine. HNC were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and the culture medium was replaced every 2–3 days. When the cells reached 80% of confluence, they were detached from the culture dish using trypsin/EDTA, counted and plated again at 10,000 cells/cm<sup>2</sup>.

### Cellular viability and proliferation study in two-dimensional culture

Cellular viability was measured using an MTS assay as previously described.<sup>25,26</sup> Briefly, HNC were allowed to attach in 24-well plates at a final density of 1.10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>. After 24 h, culture medium was removed and 500 µL of Si-

HPMC were added in each well. Samples were incubated at 37°C for 4 h before adding 1 mL of culture medium. As a control, HNC were also cultured in the absence of Si-HPMC (plastic) or in the presence of actinomycin-D (5 µg/mL), an inhibitor of RNA polymerase,<sup>27</sup> which was used as a potent inducer of cell death. After 1, 2, and 3 days, hydrogel and culture media were removed and MTS solution was added in each well for 1–3 h according to the manufacturer's instructions. Finally, colorimetric measurement of formazan dye was performed on a spectrophotometer with an optical density reading at 490 nm. Results were expressed as relative MTS activity as compared with control condition (cells cultured in the absence of Si-HPMC).

Cell proliferation was evaluated by Trypan blue exclusion dye experiments in conditions as described above. After each indicated time, hydrogel and culture medium were removed and the cells were detached by adding trypsin/EDTA for 2 min. The suspended cells were transferred into fresh culture medium and counted with Trypan blue staining that colors dead cells in blue. Results were expressed as the total number of cells per well.

### Cellular viability in three-dimensional culture

HNC were gently mixed with Si-HPMC, prepared as described previously, at a density of  $1.10^6$  cells/mL. Cells/Si-HPMC mixture (500 µL) were seeded in 24-well plates and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After 4 h incubation, 1 mL of culture medium was added in each well and plates were incubated for 3 weeks with medium changes every 2–3 days. As mentioned above, actinomycin-D treatment (5 µg/mL) was used as an internal control of cell death. Cellular viability in three-dimensional culture was visualized by using a CTG and ethidium homodimer-1 (EthD-1) dual staining as previously reported in detail.<sup>26</sup> Briefly, hydrogel containing chondrocytes was treated with 5 µM CTG for 30 min at 37°C, then for 30 min in medium containing FCS and finally for 30 min in 1 µM EthD-1 at room temperature. The imaging of HNC was performed by using a confocal laser-scanning microscope (Leica TCS SP1, Wetzlar, Germany) equipped with an argon/krypton laser. HNC were visualized by using a 63/1.4× APO or a 16/0.5× immersion oil objective lens. The data were collected with a simultaneous dual-channel detector and visualized with 24-bit imaging system including Leica TCS NT software. The fluorescence of CTG incorporated into living HNC was detected through using isothiocyanate fluorescent set:  $\lambda_{\text{ex}} = 488$  nm;  $\lambda_{\text{em}}$  collected = 490–560 nm. The red EthD-1 emission, characteristic of dead cells, was viewed using the TRITC:  $\lambda_{\text{ex}} = 568$  nm;  $\lambda_{\text{em}}$  collected = 580–620 nm.

### Glycosaminoglycan production

The production of Glycosaminoglycans (GAG) was visualized in HNC cultured for 3 weeks either in 3D into Si-HPMC or in 2D in the absence of Si-HPMC. GAG production was assessed colorimetrically by an Alcian blue staining. Briefly, samples were washed with PBS and fixed 5 min in methanol at –20°C. Cells were then stained at room temperature with 0.1% Alcian blue solution in 0.1M HCl. After

overnight incubation, cells were rinsed with distilled water. MC3T3-E1, a nontransformed mouse osteoblastic cell line,<sup>28</sup> was cultured in 3D into Si-HPMC for 3 weeks, and used as a negative control for the production of GAG.

### RT-PCR analysis

Total RNA was extracted by using Trizol<sup>®</sup> reagent according to the manufacturer's instruction. Briefly, lysis of the cells in Trizol<sup>®</sup> was followed by centrifugation at 10,000 g, 4°C for 15 min in the presence of chloroform. The upper aqueous phase was collected and the RNA was precipitated by addition of isopropanol and centrifugation at 12,000 g, 4°C for 5 min. Total RNA was then washed with 1 mL of cold 75% ethanol, dried, reconstituted with sterile water, and quantified by spectrometry.

After Dnase I digestion, 2 µg of RNA samples were reverse transcribed through using AMV-RT and random hexamers in a total volume of 30 µL. One microliter of cDNA was amplified in a total volume of 50 µL PCR reaction containing 20 mM Tris–HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1 µM of the respective primers (see Table I), 200 µM dNTP, and 2.5 units of Taq DNA Polymerase. The magnesium chloride concentration was 1.5 mM. The absence of DNA contamination in RNA preparation was tested by including RNA samples that had not been reverse transcribed. Amplifications were carried out in an Eppendorf master cycler under the following conditions: denaturation for 3 min at 94°C followed by cycles of 20s denaturation at 94°C, 20s annealing at the primer specific temperature and 15s elongation at 72°C. All PCR results show amplification products obtained in the linear range of PCR amplification.

### *In vivo* implantation

To investigate whether constructs associating Si-HPMC and HNC enable the formation of a cartilaginous tissue *in vivo*, we performed implantation of constructs (four constructs per condition; two constructs/animal) in subcutaneous pockets of 1-month-old nude mice (swiss nude mice, Charles River, L'Arbresle, France). Three different conditions were tested and six animals were implanted. Firstly, HNC ( $0.5 \times 10^6$ ) were gently mixed with 0.5 mL of Si-HPMC hydrogel and cultured as described above. After a 3-week culture period, the resulting tissue was implanted in nude mice. Second, HNC freshly isolated ( $0.5 \times 10^6$ ) were associated to 0.5 mL of Si-HPMC hydrogel and directly implanted. Third, 0.5 mL of Si-HPMC alone were implanted and used as a negative control. Animal care was provided at the experimental therapeutic unit of the Nantes medical school according to European directives for the conduct of animal experiments. Animals were killed 3 weeks after implantation and the samples were processed histologically as described below.

### Histological and immunohistochemical analyses

Construct samples were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections (5 µm thick) were

**TABLE I**  
Sequences of Primer Pairs, Annealing Temperatures, Size of PCR Products, and Cycle Numbers Used for RT-PCR Analysis

Gene	Primer Sequences	Annealing Temperature	Product Length	Cycle Number
$\beta$ -actin	Forward 5'-TCTCCATGTCGTCCCGAGTTG-3' Reverse 5'-AGTCTTCCCCTCCATCGTTG-3'	60°C	164 pb	30
COL2A1	Forward 5'-GGCAATAGCAGGTTTCACGTACA-3' Reverse 5'-GAGGCGTGAGGTCTTCTGTGA-3'	60°C	108 pb	30
Aggrecan	Forward 5'-CCCTGGCAATGATGGCACTGTTC-3' Reverse 5'-TGGCAATGATGGCACTGTTC-3'	60°C	117 pb	30
COL1A1	Forward 5'-CATGGAACCGTGGTGAAACT-3' Reverse 5'-ACCAGCGATACCAGGCAGAC-3'	60°C	186 pb	30

deparaffinized using toluene, rehydrated through a graded series of ethanol, and rinsed in distilled water. For each sample, three tissue sections were stained with hematoxylin phloxin safran, Alcian Blue and Masson's trichrome. For immunohistochemistry, anti-human Ki67 (1/50) and anti-human type II collagen (1/100) were used. Briefly, 4  $\mu$ m thick paraffin sections were mounted on pretreated slides, deparaffinized, rehydrated, and rinsed in distilled water. Tissue sections were subjected to epitope retrieval in microwave oven using citrate buffer (pH 6.0) for the immunostaining with anti-Ki67 antibody, and pretreated with trypsin at room temperature for the detection of type II collagen. Tissue sections were stained using a three-step visualization system (Dako LSAB). They were rinsed in buffer and then incubated with primary antibody at room temperature for 30 min. This was followed by sequential incubation with biotinylated link antibody for 15 min and streptavidin labeled with peroxidase for 15 min. Immunostaining was visualized using the substrate system provided in the kit (DAB/H2O2 substrate) and tissues were counterstained with hematoxylin for 5 min. Immunopositive cells showed a black nuclear staining with Ki-67 antibody and immunopositive extracellular matrix showed a brown staining with type II Collagen antibody.

### Statistical analysis

Each experiment was repeated at least twice with similar results. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations. Comparative studies of means were performed by using one-way ANOVA followed by post hoc test (Fisher's projected least significant difference) with a statistical significance at  $p < 0.05$ .

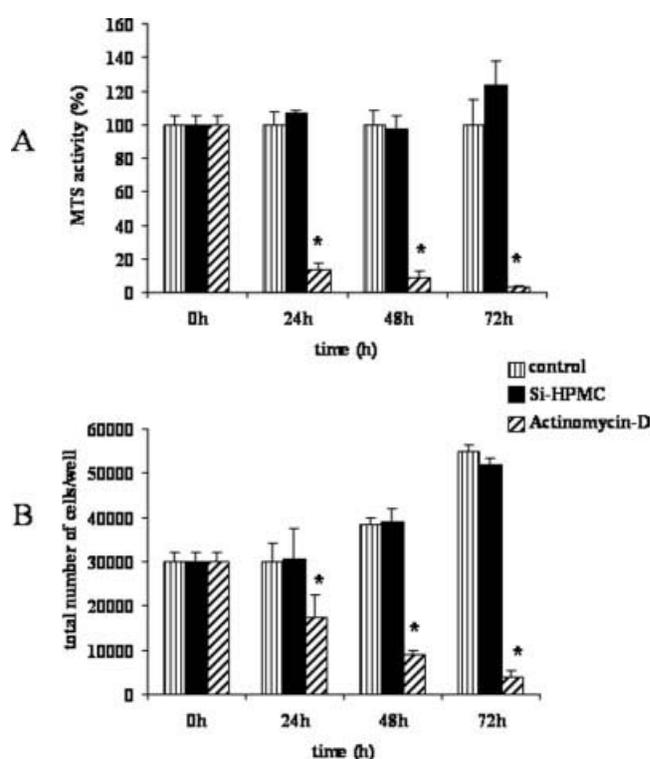
## RESULTS

### Viability and proliferation of HNC in two-dimensional culture

The viability of HNC cultured in contact with Si-HPMC was investigated through a measurement of MTS activity after 24, 48, and 72 h in culture. Figure 1 panel A shows that Si-HPMC did not alter MTS

activity of HNC. MTS activity was not significantly different when HNC were cultured in the presence or the absence of Si-HPMC [Fig. 1(A)]. On the other hand, MTS activity was significantly reduced by nearly 87% ( $p < 0.001$ ) as early as 24 h of treatment with Actinomycin-D [Fig. 1(A)].

To examine the proliferation of HNC cultured in the presence of Si-HPMC hydrogel, we carried out



**Figure 1.** Cellular viability and proliferation. Human nasal chondrocytes were cultured in 2D with or without Si-HPMC (control) or in the presence of actinomycin-D (5  $\mu$ g/mL) during the indicated times. (A) Viability was assessed by MTS activity as indicated in the materials and methods. Results are expressed as relative MTS activity compared with the respective control. \* $p < 0.001$  as compared with control conditions. (B) Proliferation was assessed by scoring the cells after trypan blue staining. Results are expressed as the total number of cells per well. \* $p < 0.001$  compared with the respective control.

cell counting experiments after trypan blue staining. Figure 1 panel B shows that Si-HPMC did not affect the proliferation of HNC. The total number of chondrocytes cultured with Si-HPMC showed no significant difference when compared with their respective control. Treatment with actinomycin-D induced a significant decrease in the total number of cells as early as 24 h of treatment [Fig. 1(B)].

Considered together, these results indicate that Si-HPMC had no adverse effects on HNC viability and proliferation.

### Viability of HNC in three-dimensional culture

The viability of HNC in three-dimensional culture in Si-HPMC was visualized by confocal microscopy (Fig. 2). We performed a dual staining on three-dimensionally cultured HNC with CTG and EthD-1, which respectively label living cells in green and dead cells in red. HNC viability was visualized through the intense green fluorescence observed as a consequence of incorporation of the CTG CMFDA fluorescent probe into the cell cytoplasm. As shown in Figure 2 panel "CTG", HNC were viable after 3 weeks in 3D culture, and have formed nodular structures exhibiting a strong green fluorescence. Whereas actinomycin D treatment induced a marked cell death as evidenced by the intense red fluorescence observed on panel "ACT," the barely detectable fluorescence (Fig. 2 panel "EthD-1") confirms the viability of cell in three-dimensional culture.

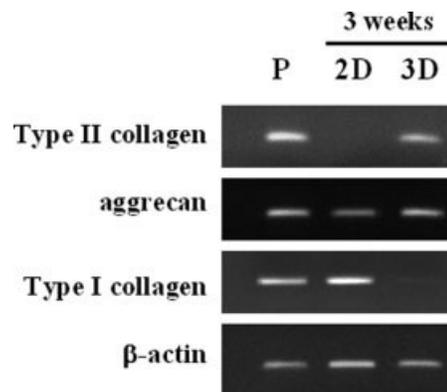
These results indicate that HNC retained their viability and developed in nodular structure when three-dimensionally cultured in Si-HPMC hydrogel.

### Maintenance of chondrocyte phenotype in three-dimensional culture

To investigate the maintenance of a chondrocyte phenotype in three-dimensional culture, HNC were



**Figure 2.** Visualization of three-dimensional cellular viability. HNC were cultured in 3D during 3 weeks into Si-HPMC prior to staining with CTG and EthD-1. Viability was visualized by confocal microscopy as indicated in materials and methods. Actinomycin-D (Act) was used as a positive control of cell death. Original magnification  $\times 400$ . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]



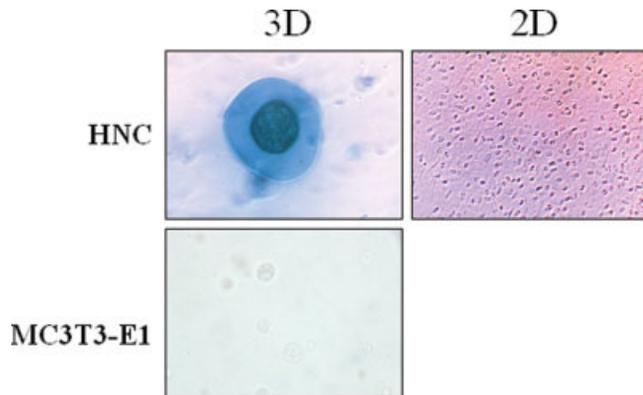
**Figure 3.** RT-PCR analysis of mRNA expression. Total RNA was purified from freshly isolated HNC (P), from HNC cultured in two dimensions (2D) during 3 weeks, and from HNC cultured in three dimensions during 3 weeks (3D). RT-PCR analysis for type II and I collagen transcripts, as well as aggrecan and  $\beta$ -actin, were performed using primers and conditions detailed in experimental procedures. Samples were electrophoresed on 2% agarose gels and visualized by UV transilluminator. Representative agarose gels are shown.

cultured for 3 weeks either in two dimensions (2D) without Si-HPMC or in three dimensions (3D) into Si-HPMC. Expressions of transcripts coding for type I and II collagens and for aggrecan were evaluated by RT-PCR (Fig. 3). Contrarily to freshly isolated HNC (P), which expressed type II collagen, HNC cultured in 2D failed to express type II collagen. HNC cultured in 2D also expressed low level of aggrecan transcripts compared with freshly isolated HNC. In addition, HNC cultured in 2D expressed high level of type I collagen compared with freshly isolated HNC, suggesting a loss of chondrocyte phenotype. In contrast to HNC cultured in 2D, HNC cultured in 3D into Si-HPMC expressed type II collagen transcripts, and exhibited a stimulated aggrecan expression as compared with HNC cultured in 2D. Finally, HNC three-dimensionally cultured did not show type I collagen expression.

These whole results suggest that Si-HPMC enabled the maintenance of a chondrocyte-like phenotype in HNC.

### Glycosaminoglycans production by HNC in three-dimensional culture

To determine the effect of three-dimensional culture of HNC on sulfated GAG production, we performed an Alcian blue staining of HNC after 3 weeks of culture either in 2D in the absence of Si-HPMC or in 3D into Si-HPMC (Fig. 4). HNC cultured in 2D showed no staining for Alcian blue whereas HNC cultured in 3D were strongly positive. MC3T3-E1 cultured in 3D into Si-HPMC, used as a



**Figure 4.** Glycosaminoglycan production. Human nasal chondrocytes (HNC) were cultured for 3 weeks either in three dimensions (3D) into Si-HPMC or in two dimensions (2D) in the absence of Si-HPMC. MC3T3-E1 were cultured for 3 weeks in three dimensions into Si-HPMC and used as a negative internal control. Alcian blue staining was performed as detailed in materials and methods. Samples were observed with a light microscope. Original magnification  $\times 200$ . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

negative control for GAG production, failed to produce an Alcian blue positive extracellular matrix. Hydrogel cultured for 3 weeks in the absence of cells failed to exhibit an Alcian blue staining (data not shown). These results suggest an abundant accumulation of GAG in the extracellular matrix surrounding the HNC cultured in 3D into Si-HPMC.

#### Redifferentiation of HNC in three-dimensional culture

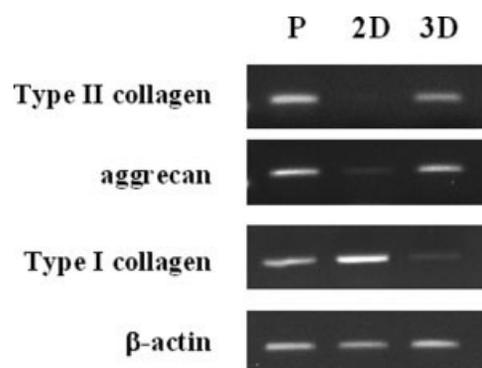
It is well known that dedifferentiated chondrocytes replaced in a three-dimensional environment retrieve a chondrocytic phenotype. This phenomenon has already been described for various matrices.<sup>29–31</sup> Therefore, the ability of Si-HPMC to allow the recovery of a chondrocytic phenotype was investigated by RT-PCR (Fig. 5). For these experiments, freshly isolated HNC were first dedifferentiated by three passages in 2D culture and then replaced in 3D culture into Si-HPMC hydrogel during 3 weeks. The analysis of transcripts were performed on freshly isolated HNC (Fig. 5 column P), on HNC after three passages in two-dimensional culture in the absence of Si-HPMC (Fig. 5 column 2D) and on HNC cultured in 2D during three passages followed by a three-dimensional culture in Si-HPMC (Fig. 5 column 3D). Contrarily to freshly isolated HNC that expressed type II collagen, HNC cultured in 2D for three passages failed to express type II collagen. HNC cultured in 2D also expressed low level of aggrecan transcripts compared with freshly isolated HNC. In addition, HNC cultured in 2D expressed

high level of type I collagen transcripts, suggesting a loss of chondrocyte phenotype in two-dimensional culture. These dedifferentiated chondrocytes recovered the expression of type II collagen and aggrecan after an additional 3 weeks culture in 3D into Si-HPMC. Furthermore, the expression of type I collagen was markedly down regulated after the 3D culture.

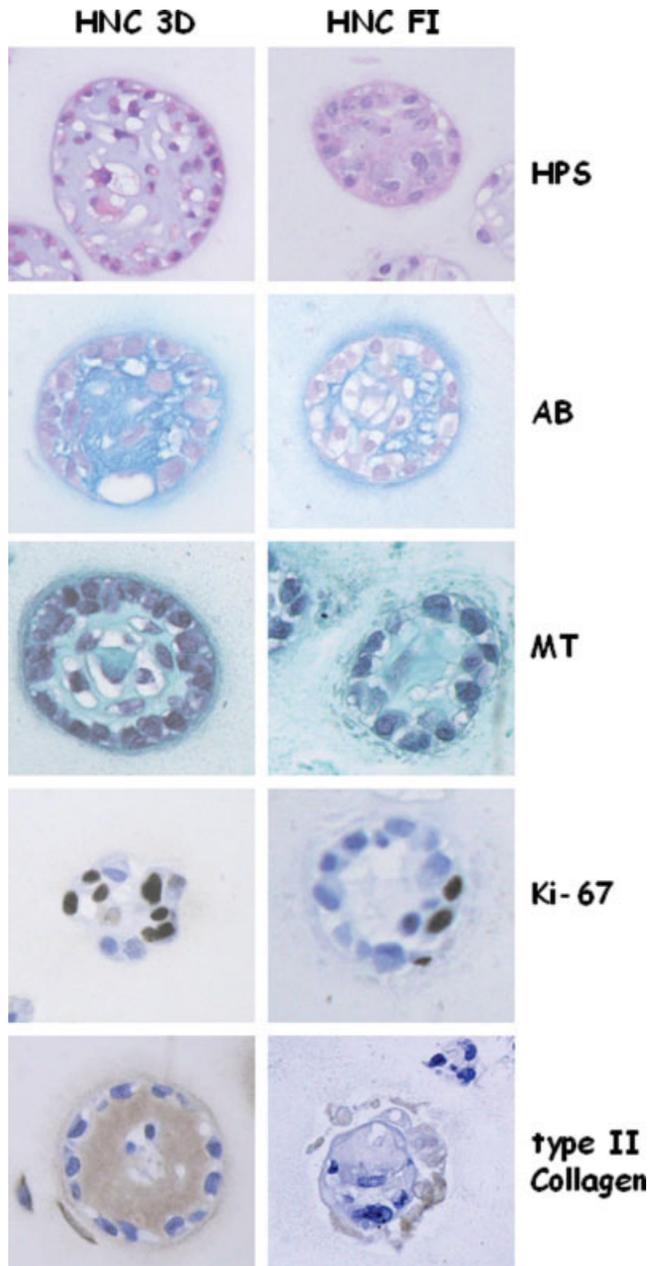
These results suggest that Si-HPMC enables the recovery of a chondrocyte-like phenotype in HNC previously dedifferentiated.

#### *In vivo* tissue formation

To investigate whether Si-HPMC hydrogel makes possible the formation of cartilaginous tissue *in vivo*, we have implanted constructs associating either 3D-cultured HNC (HNC 3D) or freshly isolated HNC (HNC FI) with Si-HPMC in nude mice. After 3 weeks, histological examination showed the formation of chondroid nodules (Fig. 6 panel Hematoxylin Phloxin Safran; HPS) in the two conditions HNC 3D and HNC FI. HPS stains also depicted typical characteristics of mature chondrocytes within lacunae surrounded by a rich basophilic matrix. These nodules were positively stained by Alcian blue (Fig. 6 panel AB) and Masson's trichrome (Fig. 6 panel MT), suggesting the production of an extracellular matrix containing GAG and collagen respectively. Immunohistochemical analysis revealed the presence of chondrocytes positively stained with Ki-67 antibodies (Fig. 6 panel Ki-67), indicating their ability to proliferate. Finally, HNC 3D showed an extracellular



**Figure 5.** RT-PCR analysis of mRNA expression. Total RNA was purified from freshly isolated HNC (P), from HNC cultured in two dimensions (2D), and from HNC cultured in two dimensions for three passages followed by a three-dimensional culture for 3 weeks (3D). RT-PCR analysis for type II and I collagen transcripts, as well as aggrecan and  $\beta$ -actin, were performed using primers and conditions detailed in experimental procedures. Samples were electrophoresed on 2% agarose gels and visualized by UV transilluminator. Representative agarose gels are shown.



**Figure 6.** Histochemical analysis of tissue engineered cartilage. Cartilage was engineered using HNC three-dimensionally cultured during 18 days in Si-HPMC before implantation (HNC 3D) and freshly isolated HNC implanted within Si-HPMC (HNC FI). Sections were stained with haematoxylin phloxin safran (HPS), Alcian blue (AB), and Masson's trichrome (MT). Immunohistochemical detection of Ki67 and type II collagen were also performed. Original magnification  $\times 400$ . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

matrix strongly immunopositive for type II collagen whereas the extracellular matrix of HNC FI exhibited a barely detectable immunopositivity for type II collagen. As a control, Si-HPMC alone showed neither the formation of nodular structure nor the presence of an extracellular matrix (data not shown).

These results indicate that Si-HPMC enables the formation of a cartilaginous tissue *in vivo* with both three-dimensionally cultured and freshly isolated HNC.

## DISCUSSION

Tissue engineering strategies for replacing damaged cartilage are focused on associating chondrocytes and three-dimensional scaffolds. Numerous scaffolds have therefore been developed to repair articular cartilage like natural polymers and synthetic matrices (reviewed in Ref. 5). Owing to their high hydrophilic properties, which are known to promote chondrocyte differentiation,<sup>31,32</sup> hydrogels with cross-linking properties should be convenient injectable scaffolds. For this reason, this study proposes an innovative hybrid construct for engineering cartilage. This construct consists in a combination of HNC and an injectable self-setting hydrogel.<sup>20,21</sup>

The self-setting hydrogel used in this work was an Si-HPMC. In a previous work, we have demonstrated that this hydrogel could be a convenient scaffold for the three-dimensional culture of various chondrocytic cells lines and primary rabbit articular chondrocytes.<sup>22</sup>

Articular cartilage is broadly used as a chondrocyte source for cartilage engineering. Nevertheless, articular cartilage remains hardly accessible and consequently provides only few cells. Since nasal chondrocytes are more easily harvested, they represent a clinically relevant cell source for cartilage engineering.<sup>23</sup> In addition, they were shown to have similar behavior than articular chondrocytes *in vitro*.<sup>24</sup>

To propose the combination of HNC and Si-HPMC hydrogel, we have firstly investigated whether the Si-HPMC hydrogel was not cytotoxic with respect to HNC. According to standards (ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices-Part 5: test for *in vitro* cytotoxicity), we focused on a cytotoxicity test by direct contact with HNC. As we have observed in a previous work using rabbit articular chondrocytes,<sup>22</sup> the Si-HPMC hydrogel is cytocompatible toward HNC as evidenced by the estimation of the mitochondrial dehydrogenase activity (MTS assay) and by cell counting. In addition, the dual fluorescent staining using CTG and EthD-1 reagent<sup>26</sup> revealed that Si-HPMC hydrogel makes possible the three-dimensional culture of HNC. HNC three-dimensionally cultured into Si-HPMC hydrogel retained their viability and have proliferate and aggregated into distinct nodules. Added together, our results indicate that HNC can be associated to Si-HPMC hydrogel without altering their viability and their proliferation.

A limitation of the autologous chondrocytes transplantation technique, developed by Brittberg and collaborators,<sup>6</sup> is the unclear phenotype of *in vitro*

expanded chondrocytes. It is well known that chondrocytes, when two-dimensionally cultured, undergo a progressive dedifferentiation.<sup>9,33,34</sup> Culturing chondrocytes in a three-dimensional scaffold has however been shown to prevent this phenomenon.<sup>35</sup> In the present study and according to the dedifferentiation process of chondrocytes during monolayer expansion, the expression of chondrogenic marker (collagen type II and aggrecan) was down regulated, whereas that of type I collagen was increased. Interestingly, freshly isolated HNC cultured in three-dimensions in our hydrogel maintained the expression of type II collagen and aggrecan and exhibited a decrease in type I collagen expression. These data strongly suggest that three-dimensional culture of HNC into Si-HPMC allows the maintenance of a chondrocyte-like phenotype *in vitro*. These results are further confirmed by the production of GAG by three-dimensionally cultured HNC. The synthesis of GAG is an important function of chondrocytes and plays a significant role in regulating the chondrocytes phenotype.<sup>36</sup> We can therefore assume that Si-HPMC hydrogel enable the three-dimensional culture of phenotypically stable HNC able to further synthesize a GAG-containing extracellular matrix.

The dedifferentiation process of chondrocytes has extensively been reported as a reversible phenomenon. Replacing dedifferentiated chondrocytes in a 3D suitable environment can indeed enable the reexpression of cartilage specific genes<sup>13</sup> as well as the recovery of the chondrocytic spherical morphology observed in anchorage-independent culture.<sup>8</sup> We therefore questioned whether Si-HPMC could not only enable the maintenance of a chondrocytic phenotype but also the recovery of such a phenotype. According to the above-mentioned data, we clearly demonstrated that Si-HPMC allows the recovery of type II collagen and aggrecan expression at the transcript level. These results highlight the potential of Si-HPMC hydrogel to support the recovery of a chondrocytic phenotype *in vitro* and suggest that Si-HPMC hydrogel can be used to transfer monolayer-expanded chondrocytes in future experiments.

As an *in vitro* culture system might not reflect the *in vivo* reality,<sup>37</sup> we further aimed at engineering cartilage *in vivo*. Subcutaneous pocket in nude mice have been demonstrated to create an environment offering a sufficient supply of nutrients for tissue engineering.<sup>38</sup> We therefore carried out implantation of HNC associated with Si-HPMC hydrogel in subcutaneous sites in nude mice. After a 3-week implantation, constructs associating HNC, three-dimensionally cultured or not, with Si-HPMC showed the formation of a cartilaginous tissue. This newly formed tissue exhibits a nodular structure containing an extracellular matrix with sulphated GAG and collagen. Interestingly, implants associating three-dimensionally cultured HNC

and Si-HPMC hydrogel depicted a strongly positive immunostaining for type II collagen, whereas, implants with freshly isolated HNC showed only a barely immunostaining for type II collagen. Since the *in vivo* period was the same for all conditions, the difference in type II collagen expression might be explained by the presence or absence of an *in vitro* culture period. It is therefore reasonable to speculate that HNC three-dimensionally cultured into Si-HPMC for 3 weeks have synthesized an extracellular matrix prior to *in vivo* implantation. These results unequivocally demonstrate that constructs associating HNC with Si-HPMC were able to form a cartilaginous tissue as early as 3 weeks *in vivo*. However, the integrity and stability of the newly formed tissue remains uncertain and needs further long-term *in vivo* experiments to be elucidated.

Kafienah et al.<sup>23</sup> reported that the complex organization of articular cartilage is not an intrinsic property of articular chondrocytes, but is most probably the resultant of tensile and compressive forces acting on this tissue.<sup>39</sup> For this reason, further experiments are needed to investigate whether constructs associating nasal chondrocytes and Si-HPMC hydrogel will be able to form a hyaline-like cartilaginous tissue in articular site.

In conclusion, Si-HPMC hydrogel is biocompatible and biofunctional *in vitro* with respect to HNC. Furthermore, this study clearly demonstrates the potential of hybrid construct associating HNC with Si-HPMC hydrogel for engineering cartilage. Whether this association of nasal chondrocytes with Si-HPMC hydrogel may be able to support cartilage repair in a rabbit model of articular cartilage defect remains to be considered.

The authors thank P. Pilet for fruitful discussion. C.V. received a fellowship from the French Ministry of Research and Technology.

## References

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920–926.
2. Hardingham TE, Fosang AJ, Dudhia J. The structure, function and turnover of aggrecan, the large aggregating proteoglycan from cartilage. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994;32:249–257.
3. Aigner T, Stove J. Collagens—Major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1569–1593.
4. Buckwalter JA. Articular cartilage: Injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998;28:192–202.
5. Hunziker EB. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:432–463.
6. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee

- with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:889–895.
7. Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64:460–466.
  8. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982;30:215–224.
  9. Brodtkin KR, Garcia AJ, Levenston ME. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials* 2004;25:5929–5938.
  10. Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res* 1999;17:205–213.
  11. Williams JM, Rayan V, Sumner DR, Thonar EJ. The use of intra-articular Na-hyaluronate as a potential chondroprotective device in experimentally induced acute articular cartilage injury and repair in rabbits. *J Orthop Res* 2003;21:305–311.
  12. Pavesio A, Abatangelo G, Borriore A, Brocchetta D, Hollander AP, Kon E, Torasso F, Zanasi S, Marcacci M. Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft C) in the treatment of knee cartilage defects: Preliminary clinical findings. *Novartis Found Symp* 2003;249:203–217; discussion 229–233, 234–238, 239–241.
  13. Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger P. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res* 1994;212:97–104.
  14. Cohen SB, Meirisch CM, Wilson HA, Diduch DR. The use of absorbable co-polymer pads with alginate and cells for articular cartilage repair in rabbits. *Biomaterials* 2003;24:2653–2660.
  15. Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, van der Veen SW, Hollander AP, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA. Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2002;23:1511–1517.
  16. Chaipinyo K, Oakes BW, van Damme MP. Effects of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis of low-density, primary bovine chondrocytes cultured in collagen I gels. *J Orthop Res* 2002;20:1070–1078.
  17. Temenoff JS, Mikos AG. Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 2000;21:431–440.
  18. Passaretti D, Silverman RP, Huang W, Kirchhoff CH, Ashiku S, Randolph MA, Yaremchuk MJ. Cultured chondrocytes produce injectable tissue-engineered cartilage in hydrogel polymer. *Tissue Eng* 2001;7:805–815.
  19. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg* 1991;88:753–759.
  20. Bourges X, Weiss P, Daculsi G, Legeay G. Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci* 2002;99:215–228.
  21. Bourges X, Weiss P, Coudreuse A, Daculsi G, Legeay G. General properties of silylated hydroxyethylcellulose for potential biomedical applications. *Biopolymers* 2002;63:232–238.
  22. Vinatier C, Magne D, Weiss P, Trojani C, Rochet N, Carle GF, Vignes-Colombeix C, Chadjichristos C, Galera P, Daculsi G, Guicheux J. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* 2005;26:6643–6651.
  23. Kafienah W, Jakob M, Demartean O, Frazer A, Barker MD, Martin I, Hollander AP. Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: Comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Eng* 2002;8:817–826.
  24. Tay AG, Farhadi J, Suetterlin R, Pierer G, Heberer M, Martin I. Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue Eng* 2004;10:762–770.
  25. Relic B, Guicheux J, Mezin F, Lubberts E, Togninalli D, Garcia I, van den Berg WB, Guerne PA. IL-4 and IL-13, but not IL-10, protect human synoviocytes from apoptosis. *J Immunol* 2001;166:2775–2782.
  26. Magne D, Bluteau G, Fauchoux C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, Pilet P, Rouillon T, Caverzasio J, Weiss P, Daculsi G, Guicheux J. Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: Possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 2003;18:1430–1442.
  27. Kimura H, Sugaya K, Cook PR. The transcription cycle of RNA polymerase II in living cells. *J Cell Biol* 2002;159:777–782.
  28. Guicheux J, Lemonnier J, Ghayor C, Suzuki A, Palmer G, Caverzasio J. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res* 2003;18:2060–2068.
  29. Chen G, Sato T, Ushida T, Hirochika R, Tateishi T. Redifferentiation of dedifferentiated bovine chondrocytes when cultured in vitro in a PLGA-collagen hybrid mesh. *FEBS Lett* 2003;542:95–99.
  30. Grigolo B, Lisignoli G, Piacentini A, Fiorini M, Gobbi P, Mazzotti G, Duca M, Pavesio A, Facchini A. Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAff 11): Molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials* 2002;23:1187–1195.
  31. Miot S, Woodfield T, Daniels AU, Suetterlin R, Peterschmitt I, Heberer M, van Blitterswijk CA, Riesle J, Martin I. Effects of scaffold composition and architecture on human nasal chondrocyte redifferentiation and cartilaginous matrix deposition. *Biomaterials* 2005;26:2479–2489.
  32. Magne D, Vinatier C, Julien M, Weiss P, Guicheux J. Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. *Trends Mol Med* 2005;11:519–526.
  33. Ronziere MC, Farjanel J, Freyria AM, Hartmann DJ, Herbage D. Analysis of types I, II, III, IX and XI collagens synthesized by fetal bovine chondrocytes in high-density culture. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:205–214.
  34. Zaucke F, Dinsler R, Maurer P, Paulsson M. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. *Biochem J* 2001;358:17–24.
  35. Mukaida T, Urabe K, Naruse K, Aikawa J, Katano M, Hyon SH, Itoman M. Influence of three-dimensional culture in a type II collagen sponge on primary cultured and dedifferentiated chondrocytes. *J Orthop Sci* 2005;10:521–528.
  36. Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:1439–1451.
  37. Obradovic B, Martin I, Padera RF, Treppo S, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Integration of engineered cartilage. *J Orthop Res* 2001;19:1089–1097.
  38. van de Breevaart Bravenboer J, In der Maur CD, Bos PK, Feenstra L, Verhaar JA, Weinans H, van Osch GJ. Improved cartilage integration and interfacial strength after enzymatic treatment in a cartilage transplantation model. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R469–R476.
  39. Shieh AC, Athanasiou KA. Principles of cell mechanics for cartilage tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 2003;31:1–11.

**3 REPARATION DU CARTILAGE ARTICULAIRE A L'AIDE DE CHONDROCYTES NASAUX AUTOLOGUES ET D'UN HYDROGEL CELLULOSIQUE .                      ARTICLE 6**

**Résumé :**

Le cartilage articulaire ne possède que de faibles capacités de réparation spontanée. Afin d'améliorer la réparation de ce tissu, le transfert de chondrocytes autologues à l'aide d'une matrice tridimensionnelle semble prometteur. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était d'évaluer l'aptitude de chondrocytes nasaux autologues associés à un hydrogel cellulosique auto réticulant (HPMC-Si) à réparer le cartilage articulaire. L'influence de l'HPMC-Si sur le phénotype de chondrocytes nasaux de lapin a été examinée par une analyse en PCR en temps réel de l'expression des marqueurs chondrocytaires (collagène II et agrécan) et du collagène I. Des chondrocytes nasaux autologues de lapins ont ensuite été amplifiés *in vitro* pendant 4 semaines puis associés à l'hydrogel d'HPMC-Si avant d'être transplantés de façon autologues dans des défauts cartilagineux articulaires. L'analyse phénotypique indique que les chondrocytes nasaux différenciés récupèrent l'expression du collagène de type II et de l'agrécan lors d'une culture en trois dimensions dans l'hydrogel HPMC-Si. L'analyse histologique des chondrocytes nasaux autologues de lapins implantés dans des défauts cartilagineux articulaires montre la formation d'un tissu de réparation présentant une organisation similaire à celle du cartilage articulaire sain. L'immunomarquage positif du collagène II montre, de plus, que le tissu de réparation est un cartilage de type hyalin. Ce travail illustre le potentiel d'une construction hybride associant les chondrocytes nasaux autologues avec l'hydrogel d'HPMC-Si pour l'ingénierie du cartilage. Par ailleurs, l'hydrogel auto réticulant d'HPMC-Si pourrait représenter un outil de choix dans le développement de systèmes injectables pour l'ingénierie tissulaire.

## **Article 6**

### **Articular cartilage repair using autologous nasal chondrocytes and a cellulose-based hydrogel**

C.Vinatier, O. Gauthier, M. Masson, A. Moreau, F. Moreau, B. Fellah, P. weiss, J.  
Guicheux. *Biomaterials*, submitted.

**Articular cartilage repair using a cellulose-based hydrogel and autologous nasal chondrocytes**

**C.Vinatier<sup>1,2</sup>, O. Gauthier<sup>1,2</sup>, M. Masson<sup>1,2</sup>, A. Moreau<sup>4</sup>, F. Moreau<sup>1,2</sup>, B.H. Fellah<sup>1,2</sup>,  
P.Weiss<sup>1,2,3</sup>, J. Guicheux<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *INSERM, U 791, Laboratory for osteo-articular and dental tissue engineering, 1 place Alexis Ricordeau, Nantes, 44042, France*

<sup>2</sup> *Univ Nantes, Faculté de chirurgie dentaire, 1 place Alexis Ricordeau, Nantes, 44042, France*

<sup>3</sup> *CHU Nantes, Service d'Odontologie conservatrice Endodontie, 1 place A. Ricordeau, Nantes, 44042, France*

<sup>4</sup> *Department of anatomo-cytopathology, University Hospital, Nantes, France,*

Running title: Cellulosic hydrogel and nasal chondrocytes for cartilage repair

\*Address for correspondence: Dr Jerome Guicheux, Ph. D.

INSERM U791, Osteoarticular and dental tissue engineering

University of Nantes

1-Place Alexis Ricordeau

44042, Nantes Cedex 1

France

Phone:+33-(0)2-40-41-29-19

Fax: +33-(0)2-40-08-37-12

Email: [jerome.guicheux@nantes.inserm.fr](mailto:jerome.guicheux@nantes.inserm.fr)

## **Introduction:**

Articular cartilage is a highly specialized connective tissue that lines the end of long bones of mammalian synovial joints. This tissue is mainly responsible for the unique biomechanical properties of joints[1]. Articular cartilage consists of only one cell type, the chondrocyte[2], which synthesizes an abundant extracellular matrix (ECM). This matrix is composed of type II, IX and XI collagen[1] and the large aggregating proteoglycan, aggrecan[3]. Since articular cartilage is a non vascularized and aneural tissue, its capacity for spontaneous repair is highly limited and restricted to a certain type of lesion. Indeed, only defects affecting both articular cartilage and the subchondral bone display the formation of repair tissue. This repair tissue, however, consists of a fibrocartilage that fails to restore the mechanical properties of native articular cartilage[4] and degrades in time. Therefore, injuries occurring within the articular surface are irreversible and joint replacement remains the ultimate therapeutic treatment to restore mobility and reduce pain. For this reason, promising strategies are being developed in the field of tissue engineering, to restore damaged articular cartilage. The autologous chondrocyte implantation (ACI) procedure was the first cell-based therapy developed and remains the only one approved by the FDA for clinical use[5]. This technique, which was developed by Brittberg *et al.* in 1994, consists in harvesting healthy articular chondrocytes from a non weight-bearing site. These chondrocytes are then expanded *in vitro* and ultimately injected into the defect under a periosteal flap. This technique has led to encouraging results but also remains disappointing, particularly because the recovery of articular chondrocytes leads to damage at the donor collection site[6]. In addition, chondrocytes lose expression of the main chondrocytic markers in culture, and this process of dedifferentiation leads to the formation of a fibrocartilage biomechanically inferior to the original hyaline cartilage[7]. Another limitation is related to the use of a periosteal flap to retain transplanted cells within the defects, which is not totally impervious and sometimes lead to hypertrophy[8] or uncontrolled calcification[6]. In the light of the above-mentioned data, tissue engineering

strategies aim at improving the ACI technique by associating autologous chondrogenic cells with various biomaterials able to retain cells within the injured site[9]. Both the cellular and the material component are hence under investigation and have led to the development of two fields of research.

The first field of research is driving towards the development of three-dimensional matrices able, on the one hand to maintain the transplanted cell in the defect and, on the other hand, to support the growth of phenotypically stable chondrocytes. In this approach, various matrices have been evaluated (for review see[6]) including protein-based or natural polymers such as fibrin[10] and collagen[11]; carbohydrate-based polymers like hyaluronan[12], agarose, alginate[13], polylactic and polyglycolic acid[14]. However, among the various matrices evaluated, some of them (hyaluronan, alginate, polyglycolic and polylactic acid) have been reported to induce inflammatory responses and foreign body giant cell reaction after *in vivo* implantation[6]. In addition, these days medicine is striving towards less invasive procedures and this has led to the development of injectable cartilage engineering devices for minimally invasive procedures. Hydrogels are a class of materials that satisfy the requirements for a successful injectable procedure[15]. In this context, we have recently patented and described the synthesis of a self-setting hydrogel consisting of silanized hydroxypropyl methylcellulose (Si-HPMC)[16]. We have demonstrated that this Si-HPMC hydrogel was a convenient matrix for the three-dimensional culture of rabbit articular chondrocytes[17].

The second field of research concerns the selection of adequate autologous chondrogenic cells. Articular chondrocytes isolated from a low load-bearing site have been classically considered the cells of choice for the cellular therapy of articular cartilage[9]. However, with regards to the donor site, given the morbidity that occurs following the recovery of articular cartilage, the use of alternative sources of chondrocytes has been contemplated. Among these alternative sources, chondrocytes derived from nasal septum cartilage have been recently considered[18]. Indeed, recovery of nasal cartilage is a less invasive surgery than recovery of

articular cartilage, and the resulting morbidity is hence notably reduced[18]. Moreover, previous studies have demonstrated that nasal chondrocytes are able to give rise to cartilage and that nasal chondrocytes exhibit greater chondrogenic potential than articular chondrocytes[19]. In addition, our previous work has clearly indicated that human nasal chondrocytes associated with a Si-HPMC hydrogel were able to form a cartilaginous tissue in subcutaneous pockets in nude mice[20]. To further decipher whether Si-HPMC hydrogel containing autologous nasal chondrocytes could be used in articular cartilage tissue engineering, our objective, in the present study, was to investigate the potential of this hybrid construct for the repair of articular cartilage defects. We firstly characterized the phenotype of chondrocytes freshly isolated from the nasal septa of adult rabbits, as well as after monolayer and 3D culture within the Si-HPMC hydrogel. Thereafter, we set out to determine whether autologous rabbit nasal chondrocytes (RNC) associated with Si-HPMC were able to give rise to repair tissue in an articular cartilage defect.

## **Materials and methods**

### **Materials:**

Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) E4M<sup>®</sup> was purchased from Colorcon-Dow chemical (Bougival, France). Glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) was obtained from Acros (Geel, Belgium). Cell culture plasticwares were purchased from Corning BV (Schipol-Rijk, The Netherlands). Hyaluronidase (750-1500 units/mg), trypsin (12100 units/mg), type II collagenase (452 units/mg), trypsin/EDTA (0.05%/0.53mM), HEPES, and isopropanol were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, USA). Hank's Balanced sodium salt (HBSS), DMEM (4.5 g/l glucose), penicillin/streptomycin, L-glutamine, Trizol<sup>®</sup> and Dnase I were obtained from Invitrogen Corporation (Paisley, UK). Avian Myeloblastosis Virus-Reverse Transcriptase, random hexamers and recombinant ribonuclease inhibitor were provided by Promega Corporation (Madison, WI, USA). Brilliant<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix was

obtained from Stratagene (La Jolla, USA). PCR primers were synthesized by MWG Biotech (Ebersberg, Germany). Fetal calf serum (FCS) was from Dominique Dutscher (Brumath, France). Monoclonal antibody against type II collagen was purchased from Oncogene Research Products (San Diego, USA). Imalgène 1000<sup>®</sup> was provided by Merial (Lyon, France). Rompun<sup>®</sup> was from Bayer Pharma (Puteaux, France). Safil déc.3<sup>®</sup> was purchased from B. Braun Laboratory (Boulogne Billancourt, France). Dolethal<sup>®</sup> was obtained from Vetoquinol Laboratory (Lure, France). All other chemicals were from standard laboratory suppliers and were of the highest purity available.

#### Preparation of Si-HPMC hydrogel:

The synthesis of Si-HPMC was performed by grafting 14.24% of 3-GPTMS on E4M<sup>®</sup> in heterogeneous medium, as previously described[16, 21]. Si-HPMC powder (3% w/v) was solubilized in 0.2 M NaOH under constant stirring for 48h. The solution was then sterilized by steam (121°C, 30 min). To allow the formation of a reticulated hydrogel, the solution was finally mixed with 0.5 volume of 0.26 M HEPES buffer.

#### Animals and surgical procedures

All animal handling and surgical procedures were conducted according to European Community guidelines for the care and use of laboratory animals (DE 86/609/CEE) and approved by the local Veterinary School ethical committee. Experiments were performed according to Good Laboratory Practices (GLP) at the Experimental Therapeutics Unit of the University of Nantes.

#### Isolation of rabbit nasal chondrocytes:

Rabbit nasal chondrocytes (RNC) were isolated from the nasal cartilage of adult female New Zealand White rabbits (3 to 3.5 kg). Briefly, general anesthesia was induced by intramuscular injection of an association of ketamine (Imalgène 1000<sup>®</sup>) and xylazine (Rompun<sup>®</sup>) and maintained with the same association delivered intravenously through a catheter into the auricular marginal vein. Analgesia was provided through subcutaneous injection of morphine

chlorhydrate (2 mg/kg). A median cutaneous incision was performed according to the nasal bone junction (*sutura internasalis*). The skin was retracted and the two nasal bones were symmetrically elevated via a horizontal osteotomy progressing mesio-distally according to the suture between the incisive bones and the nasal ones (*sutura naso-incisiva*). The subsequent bone flap was manually elevated, reversed caudally and gently fractured with only periosteal remaining attachments at the junction with the frontal bone (*sutura nasofrontalis*). This exposed the nasal turbinates and the median nasal septum (*concha nasalis dorsalis*). The nasal mucosa was gently elevated from both sides of the nasal septum that was then harvested after a ventral incision with a n°11 knife blade, extended distally until the junction with the frontal bone. The nasal bone flap was put back in place under digital pressure and sutured bilaterally with the cartilage part of the nostrils with two single interrupted sutures (Safil déc.3<sup>®</sup>). Cutaneous sutures were performed routinely with absorbable sutures.

The nasal septum was cut into small slices and digested at 37°C with 0.05% hyaluronidase in HBSS for 10 minutes, then with 0.2% trypsin for 15 minutes and with 0.2% type II collagenase for 30 minutes. Finally, slices were digested overnight at 37 °C in 0.03% collagenase in DMEM. The suspended rabbit nasal chondrocytes (RNC) were either frozen for subsequent RNA extraction and RT-PCR analysis or plated at a density of  $1.10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in a 25cm<sup>2</sup> culture flask and cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine (culture medium). The cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and the culture medium was changed every 2-3 days.

#### Dedifferentiation of RNC in monolayer culture:

Freshly isolated RNC were allowed to adhere in 25cm<sup>2</sup> culture flasks at a final density of  $1.10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. This primary culture (P0) was grown until 80% confluent and then detached from the culture flask using trypsin/EDTA. Harvested RNC were washed, resuspended in

culture medium, counted and re-seeded at  $1.10^4$  cells/cm<sup>2</sup> (P1). Cultured RNC were passaged up to three times (P1, P2 and P3). RNC from each passage were frozen for subsequent quantitative RT-PCR analysis.

#### Three-dimensional culture of dedifferentiated RNC in Si-HPMC hydrogel:

Third-passage RNC (P3) at 80% confluence were detached from the culture flask with trypsin/EDTA. Harvested RNC were washed and gently mixed with Si-HPMC hydrogel, prepared as described previously, at a density of  $1.10^6$  cells/ml. The cell/Si-HPMC mixtures (2 ml) were seeded in 6-well plates and incubated at 37°C and 5%CO<sub>2</sub>. After a 2h incubation, culture medium was added as previously described[20] and cells were three-dimensionally cultured for 3 weeks. The culture medium was changed every 2-3 days. After 3 weeks RNC were frozen for subsequent quantitative RT-PCR analysis.

#### Synthesis of sulfated GAG in three-dimensional culture:

RNC (P3) were gently mixed with Si-HPMC, prepared as described previously, at a density of  $1.10^6$  cells/ml. 1 ml aliquots of the cell/Si-HPMC mixture were seeded in 24-well plates and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After a 2h incubation, 1.5 ml of culture medium was added to each well and the plates were incubated for 3 weeks with medium changes every 2-3 days.

After the indicated time, the production of sulfated Glycosaminoglycans (GAG) was assessed colorimetrically by Alcian blue staining. Briefly, samples were washed with PBS and fixed for 5 minutes in methanol at -20°C. Cells were then stained at room temperature with 0.1% Alcian blue solution in 0.1 M HCl. After overnight incubation, cells were rinsed with distilled water. MC3T3-E1, a non-transformed mouse osteoblastic cell line[22] was cultured in 3D in Si-HPMC for three weeks, and used as a negative control for the production of sulfated GAG.

#### Reverse Transcription and real-time polymerase chain reaction:

For real time PCR analysis, total RNA was extracted using Trizol<sup>®</sup> reagent according to the manufacturer's instructions. Briefly, lysis of the cells in Trizol<sup>®</sup> was followed by centrifugation at 10,000 g, 4°C for 15 minutes in the presence of chloroform. The upper aqueous phase was collected and the RNA was precipitated by addition of isopropanol and centrifugation at 12,000 g, 4°C for 5 minutes. Total RNA was then washed with 1 ml of cold 75% ethanol, dried, reconstituted with sterile water, and quantified by spectrometry.

After Dnase I digestion, 1 µg of RNA samples was reverse transcribed using AMV-RT and random hexamers in a total volume of 30 µl. Complementary DNA (cDNA) was amplified in a total volume of 25µl PCR reaction containing 12.5 µl of Brilliant<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (1X) and 30nM of SYBR green reference dye. The sequence and concentration of each primer set used are given in table 1. Real-time polymerase chain reaction was carried out in an MX3000P<sup>®</sup> real-time PCR system (Stratagene) under the following conditions: denaturation for 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 30s at 95°C, 1min at 60°C and 30s at 72°C. The efficiency and specificity of each primer set was confirmed with standard curves of Cycle threshold (Ct) values versus serial dilution of total RNA and melting profile evaluation. Cycle thresholds were normalized to  $\beta$ -actin to control for cDNA quantification differences. Results are reported as fold change in gene expression relative to control conditions

#### Transplantation of autologous rabbit nasal chondrocytes into articular cartilage defects:

Six female New Zealand White Rabbits were used. The nasal septa were harvested and nasal chondrocytes were isolated as described above. Isolated RNC were expanded in monolayer culture for 4 weeks and passaged once before use. These expanded RNC were mixed with Si-HPMC as described above at a density of  $2.5 \cdot 10^6$  cells/ml. Si-HPMC containing RNC was transplanted into osteochondral articular defects of the knee of the same animals. General anesthesia and analgesia were conducted as previously described. Lateral arthrotomy of the knee joint was performed and the patella was luxated medially. Two cylindrical

osteocondral defects 3 mm in diameter and 3 mm in depth were drilled with a dental bur and under sterile saline irrigation in the middle of the femoral trochlea, the first one on the upper part of the trochlear groove, the other in the lower part just proximal to the caudal cruciate ligament insertion. The Si-HPMC/RNC mixture (n=6) at  $2.5 \cdot 10^6$  cells/ml was then carefully injected into the osteochondral defects through a 21-gauge needle. As a control, osteochondral defects were left empty (n=6) or filled with Si-HPMC hydrogel alone (n=6). The patella luxation was reduced and the articular and cutaneous tissues were then closed in different layers with single interrupted absorbable sutures (Safil déc.3<sup>®</sup>). All femoral implantations were performed bilaterally.

No prophylactic antibacterial or anti-inflammatory treatments were administrated after surgery. After 6 weeks of implantation, the animals were anesthetised and sacrificed by intracardiac overdose of sodium pentobarbital (Dolethal<sup>®</sup>) under general anesthesia. The distal femoral ends were immediately dissected from the animals and fixed in formaldehyde solution for histological analysis.

Construct samples were soaked for 5 days in methyl methacrylate and embedded in Glycol methyl methacrylate (PMMA) resin. Thin sections (7  $\mu$ m thick) were then prepared using a hard tissue microtome. The thin sections were stained with Movat's pentachrome. Cartilage was stained in red-pink, calcified cartilage in green, bone in yellow-green and osteoid in red. Specific histological staining (Masson's trichrome, Alcian blue) as well as immunohistological staining for type II collagen were also performed. Construct samples were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections (4  $\mu$ m thick) were deparaffinized using toluene, rehydrated through a graded series of ethanol, and rinsed in distilled water. For each sample, three tissue sections were stained with haematoxylin/phloxin/saffran, Alcian Blue and Masson's trichrome. For immunohistochemistry, an anti-rabbit type II collagen (1/100) was used. Briefly, 4  $\mu$ m thick paraffin sections were mounted on pre-treated slides, deparaffinized, rehydrated, and rinsed

in distilled water. Tissue sections were subjected to epitope retrieval in a microwave oven using citrate buffer (pH 6.0) and pre-treated with trypsin at room temperature (for the detection of collagen II). Tissue sections were stained using a three-step visualization system (Dako LSAB). They were then rinsed in buffer and incubated with primary antibody at room temperature for 30 min. This was followed by sequential incubation with biotinylated link antibody for 15 min. and streptavidin labeled with peroxidase for 15 min. Immunostaining was visualized using the substrate system provided in the kit (DAB/H2O2 substrate) and tissues were counterstained with haematoxylin for 5 min. Negative controls were performed by substituting the primary antibody with PBS. Immunopositive cells showed brown cytoplasmic staining with Collagen II antibody. Samples were then visualized using a light microscope (Zeiss, Axioplan 2, Germany).

#### Statistical analysis:

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations. Comparative studies of means were performed by using one-way ANOVA followed by a post hoc test (Fisher's projected least significant difference) with statistical significance at  $p < 0.05$ .

#### Results:

##### Dedifferentiation of rabbit nasal chondrocytes in 2D culture

It is well known that articular chondrocytes undergo a progressive dedifferentiation in two-dimensional culture [7, 23, 24]. We therefore sought to evaluate whether this phenomenon also happens with rabbit nasal chondrocytes. For this purpose, RNC were cultured in monolayer for 3 passages. Expression of transcripts coding for type I and II collagen as well as aggrecan were evaluated by real-time PCR (figure 1). When RNC were passaged once (figure 1, A, RNC P1) or twice (figure 1, A, RNC P2), a 2.5- and 25-fold decrease in type II collagen expression was observed as compared to freshly isolated RNC (figure 1, A, RNC P0). Aggrecan expression exhibited a 5-fold decrease after three passages (figure 1, B, RNC

P3). On the contrary, the expression of type I collagen transcripts was dramatically increased about 20 fold after 3 passages in monolayer culture (figure 1, C, RNC P3).

#### Redifferentiation of rabbit nasal chondrocytes in 3D culture

It is also known that dedifferentiated articular chondrocytes can redifferentiate when put back into in a three dimensional environment. In this context, we questioned whether dedifferentiated RNC could be redifferentiated by a three-dimensional culture within the Si-HPMC hydrogel. To address this issue, RNC were dedifferentiated by three passages in monolayer as described above and then cultured either in 3D culture within Si-HPMC hydrogel or in two-dimensions for 3 weeks. Real-time PCR analysis revealed that after three weeks, RNC cultured in three-dimensions within Si-HPMC exhibited an 8-fold higher expression of type II collagen and a 2.5-fold higher expression of aggrecan (figure 2, A and B, RNC 3D HPMC) than two dimensionally cultured chondrocytes. Interestingly, the expression of type I collagen after 3 weeks in three dimensional culture within Si-HPMC was approximately 2.5-fold inferior to that measured in two-dimensionally cultured RNC (figure 2, C).

#### Synthesis of sulfated Glycosaminoglycans in 3D culture within Si-HPMC hydrogel:

In order to investigate the ability of rabbit nasal chondrocytes to synthesize sulfated GAG in Si-HPMC hydrogel, we performed an Alcian blue staining of RNC after three weeks of 3D culture within Si-HPMC hydrogel (figure 3). RNC cultured three-weeks within Si-HPMC exhibit a positive Alcian blue staining (figure 3, A). On the contrary, MC3T3-E1 cells cultured in Si-HPMC hydrogel and used as a negative control of sulfated GAG production were negative for Alcian blue (figure 3, B). These results show an accumulation of sulfated GAG in the extracellular matrix surrounding RNC nodules formed in 3D culture within Si-HPMC hydrogel.

#### Repair of articular cartilage defects by Si-HPMC containing autologous RNC:

We next asked ourselves whether these hybrid constructs were able to repair articular cartilage defects. To address this issue, osteochondral defects were created within the articular surface and thereafter filled with an association of Si-HPMC and autologous RNC. Recovery of the articular cavity 6 weeks post-implantation revealed no signs of inflammation regardless of the condition under study. Macroscopically, we observed that all the defects were filled with tissue showing different characteristics (figure 4, A). The control defects (empty defects) were filled with a repair tissue appearing slightly thicker than adjacent cartilage, as indicated by the redness of the defect (figure 4, A, Control). This repair tissue nevertheless exhibited good integration to the host cartilage, as indicated by the absence of a visible margin line. Histological examination by Movat's pentachrome staining revealed the presence of blood vessels in the center of the defect. Furthermore, the repair tissue near the edge of the defect had a poor extracellular matrix, as indicated by the weak staining as compared to adjacent cartilage (figure 4, B, Control). Defects treated with Si-HPMC hydrogel alone became filled with a vascularized tissue (figure 4, A, Si-HPMC). The presence of blood vessels was clearly visible from the center of the defect to the periphery. Furthermore, the border of the defect remained visible after 6 weeks, suggesting poor integration with the adjacent cartilage (figure 4, A, Si-HPMC). The presence of blood vessels was confirmed by histological examination exhibiting a tissue containing numerous blood vessels (figure 4, B, Si-HPMC). Furthermore, Movat's pentachrome staining also revealed the poverty of the extracellular matrix composing the repair tissue as compared to the adjacent cartilage. Defects treated with the hybrid construct Si-HPMC/RNC were totally filled with a bright, white, opaque tissue (figure 4, A, Si-HPMC/RNC). Histologically, the repair tissue exhibit a well-defined structural organization (figure 4, B, Si-HPMC/RNC), appearing quite similar to that observed in native articular cartilage.

To further characterize the repair tissue formed with the hybrid construct, we performed additional histological and immunohistological staining. The femoral condyle containing the

defects filled with Si-HPMC/RNC were embedded in paraffin and stained with hematoxylin/phloxin/saffran (HPS), Alcian blue and Masson's trichrome as well as immunostained for type II collagen (figure 5). HPS staining of the defect treated with Si-HPMC/RNC showed a cartilage-like organization (figure 5, A, RT). Moreover, the staining intensity appeared similar between the profound zone of the newly formed repair tissue and the adjacent healthy cartilage (figure 5, A). Alcian blue staining of the defect treated with Si-HPMC was strongly positive in the deeper layer, fairly positive in the mid layer and barely positive in the superficial layer (figure 5, B). On the contrary, the newly formed tissue filling the defect exhibited an homogenously positive Masson's trichrome staining (figure 5, C). Finally, this repair tissue was also positive for type II collagen immunostaining (figure 5, D RT). Interestingly, we noted that both the deep and the mid layer of the newly formed tissue were strongly positive, as was the surrounding healthy cartilage (HC). The superficial layer was also positively immunostained for type II collagen but to a lesser extent than adjacent healthy cartilage.

These results suggest that Si-HPMC containing autologous nasal chondrocytes is able to fill an articular cartilage defect leading to the formation of a structurally organized hyaline-like repair tissue.

### **Discussion:**

The field of tissue engineering is driving towards the development of strategies to restore damaged cartilage. Indeed, due to the absence of vascularization, articular cartilage exhibits a very weak capacity for spontaneous repair and in some case never heals. Different strategies have therefore been developed in an attempt to repair cartilage, such as the autologous chondrocyte implantation (ACI) technique. ACI was the first general tissue engineering treatment developed and has become the dominant clinical cell-based therapy for cartilage repair over the past decade. This method has achieved encouraging results (lower pain) but

remains limited by the dedifferentiation process of chondrocytes during the *in vitro* phase[24, 25] and by an outflow of the transplanted cells through the suture of the periosteal flaps during the *in vivo* period[26]. To overcome these limits, much attention has been paid to the development of three-dimensional matrices for the transfer and maintenance of cells in the recipient site[15, 27]. In addition, the rise in minimally invasive surgery has oriented researchers towards the development of injectable tissue engineering systems[9]. In this context, hydrogels, which are highly hydrated cross-linked polymers, represent suitable candidates for a successful injectable tissue engineering device. Therefore, we have developed a self-setting hydrogel named Si-HPMC[28]. This Si-HPMC hydrogel is a convenient scaffold for the three-dimensional culture of chondrocytes[17].

An additional restriction of the ACI technique is related to the source of chondrocytes. Indeed, recovery of articular cartilage induces morbidity at the donor site. As a consequence, alternative sources of autologous chondrocytes, such as nasal septum-derived chondrocytes, have been considered[18, 29]. In a previous study, we demonstrated that human nasal chondrocytes associated with Si-HPMC hydrogel and injected subcutaneously in nude mice were able to form a cartilaginous tissue[20]. These previous encouraging results obtained with the association of nasal chondrocytes and Si-HPMC hydrogel have logically led us to test this hybrid construct for the repair of damaged articular cartilage.

The aim of the present work was hence to test the ability of a hybrid construct associating Si-HPMC hydrogel with autologous nasal chondrocytes for the treatment of articular cartilage defects. Various models of osteochondral defects have been described in the literature in rabbits[30, 31], horses[32], goats[33] and cattle[34]. However, the rabbit model remains the most widely used[35]. In contrast to the use of autologous rabbit articular chondrocytes, which have been well described for the treatment of rabbit osteochondral defects[36, 37], the use of autologous rabbit nasal chondrocytes remains poorly documented. Therefore, we first sought to characterize the phenotype of rabbit nasal chondrocytes. Our data indicate that

freshly isolated rabbit nasal chondrocytes express the two main chondrocytic markers, type II collagen and aggrecan, as previously described for articular chondrocytes[38]. One characteristic of articular chondrocytes is the dedifferentiation process that occurs during their monolayer *in vitro* expansion. This dedifferentiation process is characterized morphologically by a loss of the spherical shape typical of chondrocytes and the adoption of a fibroblast-like appearance[39]. These morphological changes are accompanied by a switch in the expression of cartilage-specific collagens, namely type II, IX and XI, and of aggrecan towards collagen type I, III and V that are normally expressed by fibroblasts[7]. As expected, freshly isolated rabbit nasal chondrocytes expressed type II collagen and aggrecan but also type I collagen. This expression of type I collagen in rabbit nasal chondrocytes is consistent with a preceding study showing a positive immunostaining for type I collagen in human[18, 40], rabbit[41] and bovine nasal cartilage[29]. In agreement with the dedifferentiation process of chondrocytes, during two-dimensional culture[42], type II collagen and aggrecan expression were down regulated, whereas that of type I collagen was increased. The dedifferentiation of chondrocytes has, however, been described to be a reversible phenomenon. Indeed, when replaced in a three dimensional environment, dedifferentiated chondrocytes are able to recover the expression of cartilage-specific genes[23, 38, 43]. As previously described with human nasal chondrocytes[20], the three-dimensional culture of dedifferentiated rabbit nasal chondrocytes within Si-HPMC hydrogel enabled the recovery of type II collagen and aggrecan expression at the transcript level. These results emphasize that Si-HPMC hydrogel not only allows the maintenance but also the recovery of a chondrocytic phenotype *in vitro*. Therefore, these data suggest that Si-HPMC hydrogel could be used to transfer monolayer-expanded rabbit nasal chondrocytes *in vivo* for cartilage tissue engineering.

Finally, in order to decipher whether hybrid constructs associating Si-HPMC hydrogel with rabbit nasal autologous chondrocytes could be an appropriate device for articular cartilage

repair, rabbit articular cartilage defects were created and treated with this hybrid construct. The control defects that were left empty exhibited the formation of fibrocartilaginous repair tissue. This self-repair process begins with the formation of a blood clot. This blood clot is invaded, a few days later, by mesenchymal stem cells from bone marrow, which in turn produce the repair tissue[44]. This repair tissue has already been characterized as a fibrous cartilage exhibiting inferior mechanical properties to healthy cartilage[45]. Interestingly, constructs associating autologous nasal chondrocytes with Si-HPMC hydrogel led to the formation of a hyaline-like repair tissue exhibiting the production of GAG and type II collagen. Furthermore, this repair tissue displayed a specific tissular organization resembling that of native articular cartilage. This tissue organization is surprising given that nasal septum and articular cartilage, which have both been described as a hyaline cartilage[46], exhibit different histological organization. This divergence in structural organization between nasal and articular cartilage may be related to the different embryonic origin of these two tissues. Articular chondrocytes are derived from the mesoderm whereas nasal chondrocytes are derived from the neural crest of the neural ectoderm[2, 47]. It has also been suggested that the tissue remodeling occurring under physiological conditions may be responsible for the tissue organization[18]. The specific organization of the repair tissue formed with autologous nasal chondrocytes within Si-HPMC hydrogel in a low-loading articular site tends to confirm this hypothesis. However, it is also well established that mechanical forces play a role in the structural organization of the articular cartilage. On the one hand, compressive forces could act positively by enhancing extracellular matrix deposition and consequently increasing mechanical properties[48]. On the other hand, mechanical stress could act negatively by degrading the repair tissue formed in a weight-bearing site[49]. Whether Si-HPMC hydrogel containing autologous nasal chondrocytes may repair articular cartilage defects in a weight-bearing site through the production of a biologically and biomechanically stable hyaline-like tissue remains, however, to be determined. Since the degradability of our Si-HPMC hydrogel

could also influence the long-term stability of the hyaline-like repair tissue, the investigation of the degradation properties of Si-HPMC now deserves major considerations.

In conclusion, in this study, the transplantation of Si-HPMC hydrogel containing autologous nasal chondrocytes led to the successful repair of an articular cartilage defect in rabbits. These results therefore highlight the potential of associating nasal chondrocytes with the Si-HPMC injectable hydrogel for the treatment of articular cartilage defects. However, the long-term stability of the repair tissue formed needs to be further studied. With the objective of minimally-invasive surgery, transplanting Si-HPMC hydrogel containing autologous cells in an articular cartilage defect through percutaneous injection could pave the way for new therapeutic strategies for the treatment of cartilage defects.

#### **Acknowledgements:**

This study was supported by grants from the "Association de Recherche pour la Polyarthrite Rhumatoïde", the "Société Française de Rhumatologie", "ANR young researchers" and the INSERM U791. This study was also supported by the "Réseau national des technologies pour la santé". C. Vinatier received a fellowship from the French Ministry of Research and Technology. The authors also gratefully acknowledge G. Daculsi and the assistance of P. Pilet and S. Breton.

#### **References:**

- [1]. Aigner T, Stove J. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55(12):1569-93.
- [2]. Archer CW, Francis-West P. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(4):401-4.
- [3]. Hardingham TE, Fosang AJ, Dudhia J. The structure, function and turnover of aggrecan, the large aggregating proteoglycan from cartilage. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994;32(4):249-57.
- [4]. Vangsness CT, Jr., Kurzweil PR, Lieberman JR. Restoring articular cartilage in the knee. *Am J Orthop* 2004;33(2 Suppl):29-34.

- [5].Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331(14):889-95.
- [6].Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10(6):432-63.
- [7].Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, et al. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10(1):62-70.
- [8].Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* 2000(374):212-34.
- [9].Elisseeff J. Injectable cartilage tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4(12):1849-59.
- [10].Passaretti D, Silverman RP, Huang W, Kirchhoff CH, Ashiku S, Randolph MA, et al. Cultured chondrocytes produce injectable tissue-engineered cartilage in hydrogel polymer. *Tissue Eng* 2001;7(6):805-15.
- [11].Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Spector M. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *J Orthop Res* 2003;21(2):272-81.
- [12].Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D, Delcogliano A, Ghinelli D, Gobbi A, et al. Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res* 2005(435):96-105.
- [13].Dausse Y, Grossin L, Miralles G, Pelletier S, Mainard D, Hubert P, et al. Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11(1):16-28.
- [14].Wang X, Grogan SP, Rieser F, Winkelmann V, Maquet V, Berge ML, et al. Tissue engineering of biphasic cartilage constructs using various biodegradable scaffolds: an in vitro study. *Biomaterials* 2004;25(17):3681-8.
- [15].Nesic D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58(2):300-22.
- [16].Bourges X, Weiss P, Daculsi G, Legeay G. Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci* 2002;99(3):215-28.
- [17].Vinatier C, Magne D, Weiss P, Trojani C, Rochet N, Carle GF, et al. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* 2005;26(33):6643-51.
- [18].Kafienah W, Jakob M, Demarteau O, Frazer A, Barker MD, Martin I, et al. Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Eng* 2002;8(5):817-26.
- [19].Tay AG, Farhadi J, Suetterlin R, Pierer G, Heberer M, Martin I. Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue Eng* 2004;10(5-6):762-70.
- [20].Vinatier C, Magne D, Moreau A, Gauthier O, Malard O, Vignes-Colombeix C, et al. Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *J Biomed Mater Res A* 2007;80(1):66-74.
- [21].Bourges X, Weiss P, Coudreuse A, Daculsi G, Legeay G. General properties of silylated hydroxyethylcellulose for potential biomedical applications. *Biopolymers* 2002;63(4):232-8.
- [22].Guicheux J, Lemonnier J, Ghayor C, Suzuki A, Palmer G, Caverzasio J. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res* 2003;18(11):2060-8.

- [23].Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982;30(1):215-24.
- [24].Brodtkin KR, Garcia AJ, Levenston ME. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials* 2004;25(28):5929-38.
- [25].Zaucke F, Dinser R, Maurer P, Paulsson M. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. *Biochem J* 2001;358(Pt 1):17-24.
- [26].Marlovits S, Zeller P, Singer P, Resinger C, Vecsei V. Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur J Radiol* 2006;57(1):24-31.
- [27].Vacanti JP, Langer R, Upton J, Marler JJ. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;33(1-2):165-182.
- [28].Weiss P, Vinatier C, Guicheux J, Grimandi G, Daculsi G. A self setting hydrogel as an extracellular synthetic matrix for tissue engineering. *Key Engineering Material* 2004;254-256:1107-1110.
- [29].Isogai N, Kusuvara H, Ikada Y, Ohtani H, Jacquet R, Hillyer J, et al. Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng* 2006;12(4):691-703.
- [30].Kang SW, Yoon JR, Lee JS, Kim HJ, Lim HW, Lim HC, et al. The use of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as injectable cell carriers for cartilage regeneration in rabbit knees. *J Biomater Sci Polym Ed* 2006;17(8):925-39.
- [31].Holland TA, Bodde EW, Cuijpers VM, Baggett LS, Tabata Y, Mikos AG, et al. Degradable hydrogel scaffolds for in vivo delivery of single and dual growth factors in cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage* 2006.
- [32].Nixon AJ, Fortier LA, Williams J, Mohammed H. Enhanced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor-I-laden fibrin composites. *J Orthop Res* 1999;17(4):475-87.
- [33].Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin J, Boehnlein E, Pastor G, Blancuzzi V, et al. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials* 2002;23(1):109-19.
- [34].Janssen LM, In der Maur CD, Bos PK, Hardillo JA, van Osch GJ. Short-duration enzymatic treatment promotes integration of a cartilage graft in a defect. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006;115(6):461-8.
- [35].Reinholz GG, Lu L, Saris DB, Yaszemski MJ, O'Driscoll SW. Animal models for cartilage reconstruction. *Biomaterials* 2004;25(9):1511-21.
- [36].Masuoka K, Asazuma T, Ishihara M, Sato M, Hattori H, Ishihara M, et al. Tissue engineering of articular cartilage using an allograft of cultured chondrocytes in a membrane-sealed atelocollagen honeycomb-shaped scaffold (ACHMS scaffold). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;75(1):177-84.
- [37].Kose GT, Korkusuz F, Ozkul A, Soysal Y, Ozdemir T, Yildiz C, et al. Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials* 2005;26(25):5187-97.
- [38].Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, et al. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res* 1994;212(1):97-104.
- [39].Glowacki J, Trepman E, Folkman J. Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983;172(1):93-8.
- [40].Naumann A, Dennis JE, Aigner J, Coticchia J, Arnold J, Berghaus A, et al. Tissue engineering of autologous cartilage grafts in three-dimensional in vitro macroaggregate culture system. *Tissue Eng* 2004;10(11-12):1695-706.
- [41].Naumann A, Dennis JE, Awadallah A, Carrino DA, Mansour JM, Kastenbauer E, et al. Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem* 2002;50(8):1049-58.

- [42].Mandl EW, van der Veen SW, Verhaar JA, van Osch GJ. Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity. *Tissue Eng* 2004;10(1-2):109-18.
- [43].Chen G, Sato T, Ushida T, Hirochika R, Tateishi T. Redifferentiation of dedifferentiated bovine chondrocytes when cultured in vitro in a PLGA-collagen hybrid mesh. *FEBS Lett* 2003;542(1-3):95-9.
- [44].Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75(4):532-53.
- [45].Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 1980;62(1):79-89.
- [46].Bouchet BY, Colon M, Polotsky A, Shikani AH, Hungerford DS, Frondoza CG. Beta-1 integrin expression by human nasal chondrocytes in microcarrier spinner culture. *J Biomed Mater Res* 2000;52(4):716-24.
- [47].Shum L, Nuckolls G. The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. *Arthritis Res* 2002;4(2):94-106.
- [48].Waldman SD, Spiteri CG, Grynblas MD, Pilliar RM, Kandel RA. Long-term intermittent compressive stimulation improves the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng* 2004;10(9-10):1323-31.
- [49].Shao XX, Hutmacher DW, Ho ST, Goh JC, Lee EH. Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials* 2006;27(7):1071-80.

Gene	accession number	sequences	concentration	Base pairs
<b>beta-actin</b>	AF404278	Fwd 5'-CCCATCTACGAGGGCTACGC-3'	300 nM	152 bp
		Rev 5'-TCCTTGATGTCCCGCACGATC-3'	900 nM	
<b>Aggreca n</b>	L38480	Fwd 5'-TTCCCTGGCGTGAGAACCTAC-3'	600 nM	77 bp
		Rev 5'-CCTCCATCTCCTCTGCGAAGC-3'	900 nM	
<b>COL1A1</b>	D49399	Fwd 5'-AGCCCAGCATTGCCCAGAAG-3'	300 nM	79 bp
		Rev 5'-GCTCTCGCCGAACCACACG-3'	100 nM	
<b>COL2A1</b>	D83228	Fwd 5'-CACGCTCAAGTCCCTCAACAAC-3'	600 nM	131 bp
		Rev 5'-CTATCCAGTAGTCACCGCTCTTCC-3'	900 nM	

**Table 1:** Sequences of primer pairs and concentrations used for real-time quantitative PCR analysis.

### **Figure captions :**

**Figure 1:** Effect of monolayer culture on rabbit nasal chondrocyte phenotype. Freshly isolated chondrocytes were cultured in monolayer (P0) and passaged three times (P1, P2 and P3). Total RNA was purified from each passaged RNC as described in the *Materials and Methods*. Real time PCR analysis for type II collagen (A), aggrecan (B) and type I collagen (C) was performed as described in the *Materials and Methods*. Results are reported as fold change in gene expression relative to the control condition (RNC P0). Data are representative of experiments with similar results. \*, P<0.05 compared with RNC P0.

**Figure 2:** Effect of three-dimensional culture on the phenotype of rabbit nasal chondrocytes. RNC P3 were cultured either in monolayer (RNC P4 2D) or in three-dimensions within Si-HPMC (RNC 3D HPMC) for three weeks. Total RNA was purified from RNC as described in the *Materials and Methods*. Real time PCR analysis for type II collagen (A), aggrecan (B) and type I collagen (C) was performed as described in the *Materials and Methods*. Results are reported as fold change in gene expression relative to the control condition (RNC P4 2D). Data are representative of experiments with similar results. \*, P<0.05 compared with RNC P4 2D.

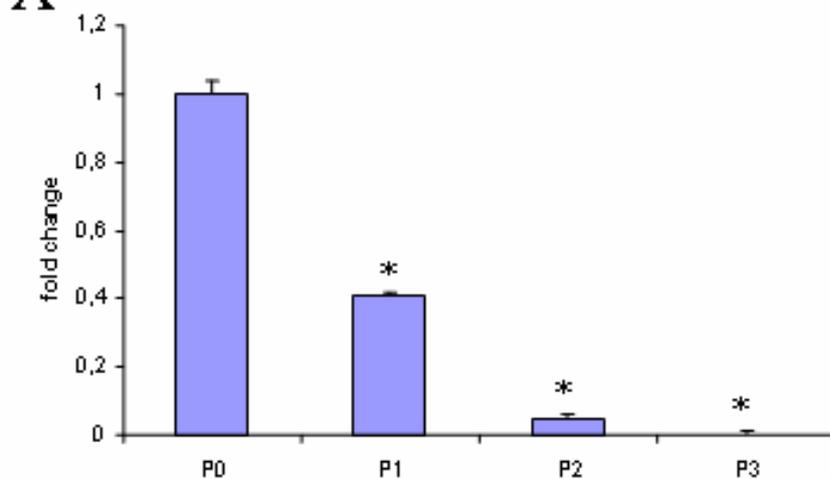
**Figure 3:** Glycosaminoglycans production. Rabbit nasal chondrocytes (RNC) were cultured in 3D within Si-HPMC for 3 weeks (A). MC3T3-E1 were cultured for 3 weeks in 3D within Si-HPMC and used as a negative internal control (B). Alcian blue staining was performed as detailed in the *Materials and Methods*. Samples were observed with a light microscope. Bar: 100  $\mu$ m.

**Figure 4:** Macroscopic and histological appearance of defects 6 weeks after implantation. Si-HPMC alone (Si-HPMC) or with RNC (Si-HPMC/ RNC) injected in an articular cartilage defect and analysed 6 weeks later. Defects left empty served as a control (CTRL). A) Macroscopic appearance of joint surface 6 weeks after implantation. Bar: 3mm. B) Macroscopic appearance of joint surface 6 weeks after implantation at higher magnification.

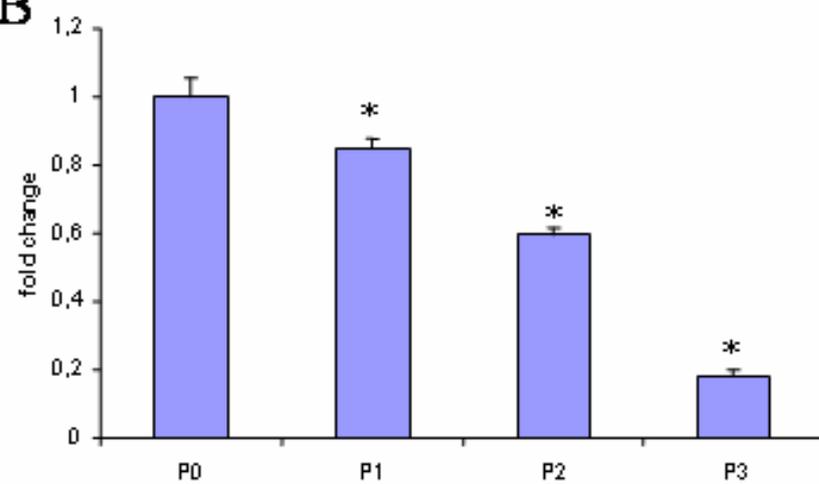
Bar: 1mm. C) Histological appearance of articular cartilage defects 6 weeks after implantation. Sections were stained with Movat's pentachrome. Bar: 200  $\mu$ m.

Figure 5: Histological and immunohistological analysis of articular cartilage defects after 6 weeks in vivo. Representative sections of defects filled with Si-HPMC containing autologous RNC were stained with hematoxylin/phloxin/safran (A), Alcian blue (B), Masson's trichrome (C) and immunostained for type II collagen (D). **HC**: Healthy cartilage. **RC**: Repaired cartilage. Bar: 200 $\mu$ m.

Figure 1 **A**



**B**



**C**

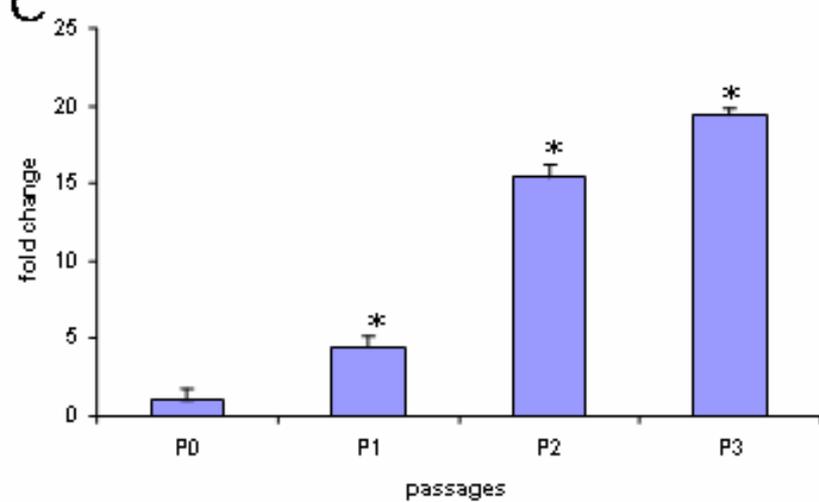


Figure 2

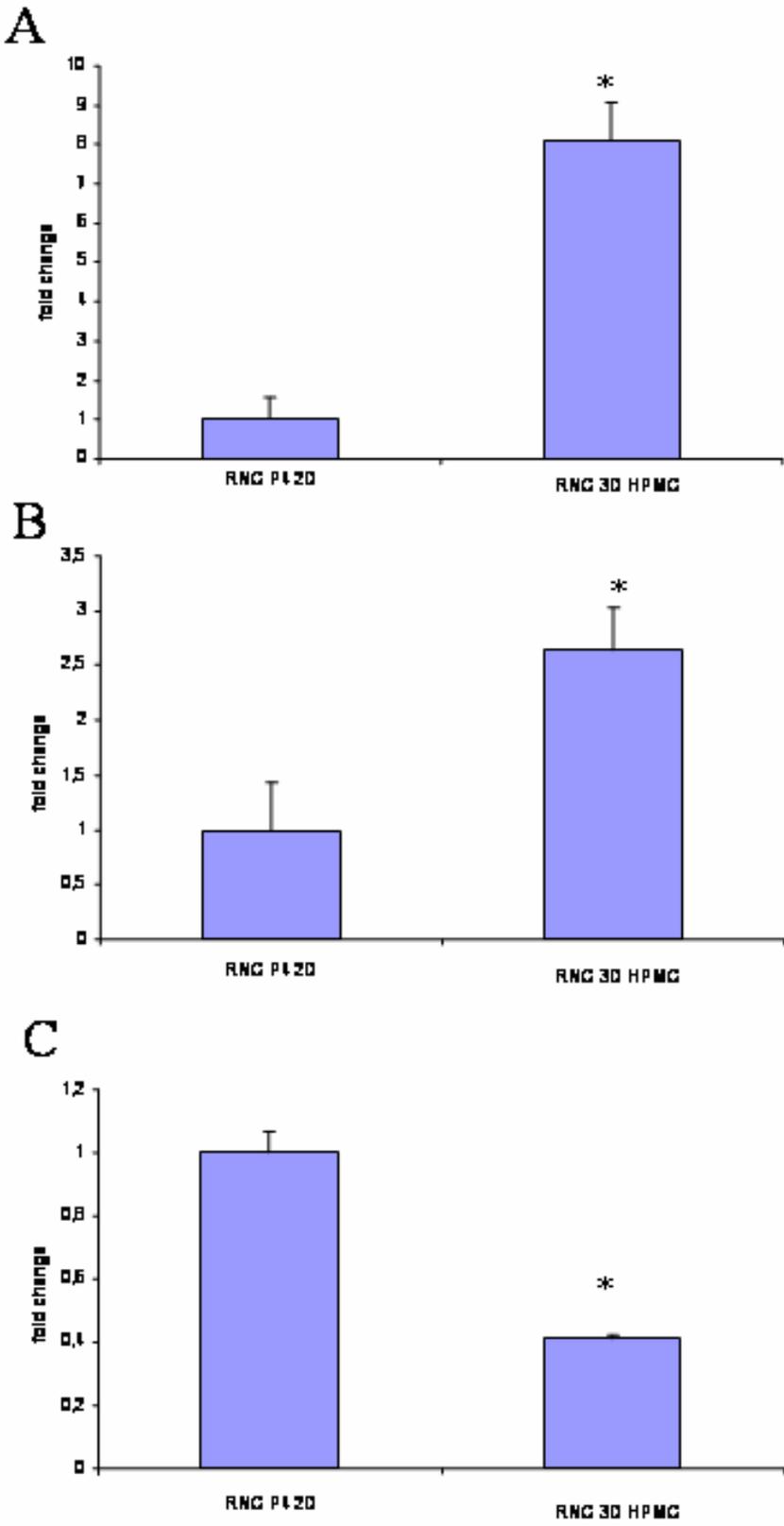


Figure 3

RNC



MC3T3-E1



Figure 4

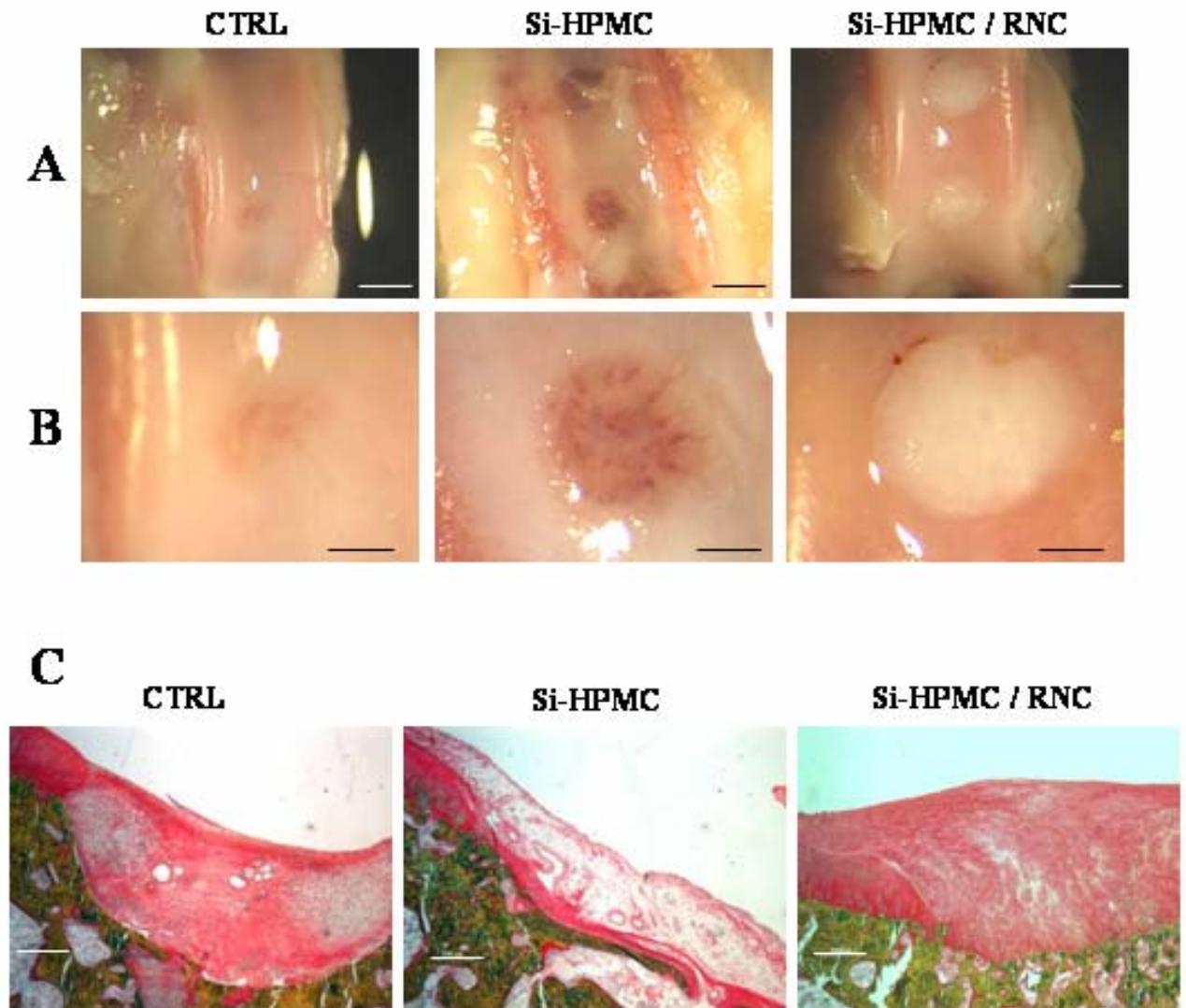
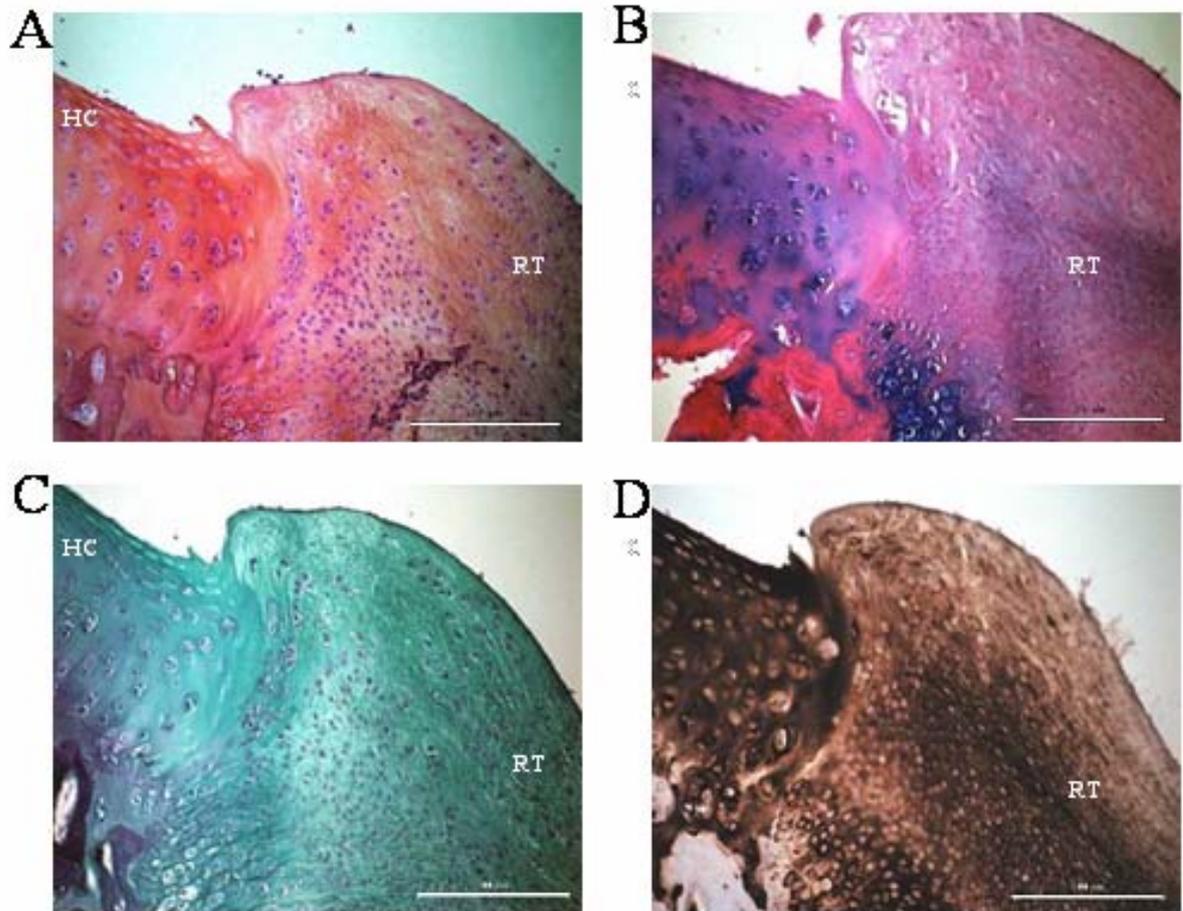


Figure 5



#### 4 DISCUSSION

Les stratégies d'ingénierie tissulaire développées pour remplacer le cartilage endommagé sont focalisées sur l'association de chondrocytes avec des matrices tridimensionnelles. Parmi celles-ci, les biomatériaux injectables permettraient, outre la réparation du tissu endommagé, le développement de techniques chirurgicales mini-invasives. Grâce à leur propriétés hydrophiles, connues pour améliorer la différenciation chondrocytaire (337), les hydrogels présentant des propriétés d'auto réticulation apparaissent comme des biomatériaux pertinents pour répondre au challenge de la thérapie cellulaire du cartilage par chirurgie mini-invasive.

Comme nous l'avons déjà observé pour les chondrocytes articulaires de lapins (article 4), l'hydrogel d'HPMC-Si est cytocompatible à l'égard de chondrocytes nasaux humains (CNH) en culture monocouche mais également en culture tridimensionnelle (article 5). Nos résultats nous indiquent en effet que les CNH peuvent être associés à l'hydrogel d'HPMC-Si sans altération de leur viabilité et de leur capacité de prolifération. De plus notre analyse phénotypique montre que la culture tridimensionnelle dans l'hydrogel d'HPMC-Si permet le maintien du phénotype des CNH et le maintien de leur capacité de synthèse de glycosaminoglycanes (GAG) sulfatés. Parallèlement nous avons également montré que des CNH préalablement dédifférenciés par une culture en monocouche, récupéraient leur phénotype chondrocytaire après une culture tridimensionnelle dans l'hydrogel. Ces résultats nous indiquent que l'HPMC-Si peut être utilisé comme matrice pour la culture tridimensionnelle des CNH mais pourrait aussi être utilisé pour transférer des chondrocytes amplifiés en monocouche. Cependant, les systèmes de culture *in vitro* ne reflètent que partiellement la formation de tissu observée *in vivo*. Nous avons donc testé la capacité de l'hydrogel d'HPMC-Si associé aux CNH à former un tissu cartilagineux *in vivo* chez la souris *nude*. Des constructions hybrides associant soit des CNH fraîchement isolés soit des CNH cultivés en trois dimensions (3D) ont été injectés en sous-cutané chez la souris *nude*. Après 3 semaines, les implants récupérés montrent la formation de nodules cartilagineux contenant des GAG sulfatés et du collagène, quelles que soient les conditions. Cependant, alors que les chondrocytes cultivés en trois dimensions avant implantation forment un tissu présentant un immunomarquage positif pour le collagène de type II, le tissu formé par les chondrocytes fraîchement isolés n'est que très faiblement positif pour le collagène de type II. Ceci laisse supposer que les CNH cultivés en trois dimensions pendant trois semaines *in vitro* ont synthétisé une matrice extracellulaire avant leur implantation. Le tissu néoformé par ces

chondrocytes cultivés en 3D serait donc plus mature que celui obtenu avec les CNH fraîchement isolés.

Cependant il faut noter que ce tissu néoformé en sous-cutané ne semble pas présenter d'organisation particulière. L'organisation complexe retrouvée dans le cartilage articulaire est certainement la résultante des forces de compression et de tension s'appliquant sur ce tissu (234). Pour cette raison, il apparaît nécessaire de tester ces constructions hybrides en site articulaire. Parmi les différents modèles animaux sur lesquels des défauts ostéocondraux ont été créés (le cheval (368), la chèvre (410) et le lapin) ce dernier reste le modèle le plus couramment utilisé (203, 237, 415). Cependant, contrairement aux chondrocytes articulaires de lapins qui sont bien décrits dans le traitement de défauts ostéocondraux (253, 311), les chondrocytes nasaux de lapins ont été beaucoup moins décrits. Il nous est donc apparu intéressant de réaliser une caractérisation comparative de ces cellules *in vitro* en culture 2D et 3D. Nos résultats (article 6) nous montre que les chondrocytes nasaux de lapins expriment, comme les chondrocytes articulaires, les principaux marqueurs du phénotype chondrocytaire, le collagène de type II et l'agrécan (43). Ces chondrocytes nasaux de lapins subissent également le processus de dédifférenciation en culture monocouche. Ils perdent l'expression des marqueurs chondrocytaires (collagène de type II et agrécane) et acquièrent une morphologie fibroblastique (163), qui s'accompagne d'une augmentation de l'expression du collagène de type I (435). De façon similaire à ce qui est observé pour les chondrocytes nasaux humains (article 5), la culture en trois dimensions dans l'hydrogel des chondrocytes nasaux de lapins dédifférenciés permet la récupération de l'expression des marqueurs chondrocytaires, associée à une diminution de l'expression du collagène de type I. Ceci suggère que l'hydrogel d'HPMC-Si peut être utilisé pour transférer *in vivo* des chondrocytes nasaux de lapins préalablement amplifiés en culture monocouche.

Ainsi des chondrocytes nasaux autologues ont été associés à l'hydrogel d'HPMC-Si et implantés dans des défauts cartilagineux articulaires créés dans la fosse inter-condylienne chez le lapin. La caractérisation histologique des défauts non traités par l'association HPMC-Si/chondrocytes nasaux de lapin réalisée après 6 semaines, montre la formation d'un tissu fibrocartilagineux, présentant une déplétion de la surface articulaire dans la zone réparée, caractéristique du processus de réparation spontanée, (230). En revanche, le tissu de réparation formé suite à l'implantation des chondrocytes nasaux autologues par notre hydrogel est de type hyalin (GAG sulfatés et collagène de type II). Afin de mieux définir le tissu de réparation obtenu grâce à notre concept, nous souhaitons utiliser, au travers d'une

collaboration avec le laboratoire Inserm U 484 (Dr E. Miot-Noirault), une technique de scintigraphie au technicium 99 couplé à un ammonium quaternaire. De par l'affinité spécifique de l'ammonium quaternaire pour les protéoglycanes du cartilage, cette technique permettra, en fonction de la fixation du traceur, de déterminer la teneur en protéoglycanes dans le tissu néoformé. La comparaison de cette teneur entre le tissu de réparation et le tissu sain permettra de conclure quant à la nature hyaline intègre du tissu néoformé.

Le tissu de réparation néoformé, après l'implantation de notre construction hybride, présente, de plus, une organisation tissulaire comparable à celle du cartilage articulaire sain. Cette similitude dans l'organisation des tissus peut être surprenante si on considère que le cartilage nasal, bien que de type hyalin comme le cartilage articulaire, est un tissu qui ne présente pas cette organisation spécifique *in situ*. Ceci tend à confirmer l'hypothèse que l'organisation tissulaire complexe du cartilage articulaire est la conséquence du remodelage tissulaire intervenant sous l'action des forces de compression et de tension s'appliquant sur le cartilage articulaire(234). Ces forces de compression et de tension peuvent, par ailleurs, avoir des effets contraires sur le tissu néoformé, soit positifs en améliorant ses propriétés mécaniques et sa synthèse matricielle (508), soit négatifs en favorisant sa dégradation (442). Le site d'implantation choisi pour cette étude (article 6), la fosse inter-condylienne, est une zone faiblement portante de l'articulation. Par conséquent, la capacité de notre construction hybride à réparer un défaut cartilagineux devra être testée dans une zone portante de l'articulation. La stabilité du tissu de réparation obtenu grâce à notre construction hybride devra donc être vérifiée après des durées d'implantations plus longues. Par ailleurs, la dégradabilité des biomatériaux est connue pour influencer la stabilité à long terme des tissus de réparation. Des études devront être réalisées afin de caractériser, si ils existent, les processus de dégradation de notre hydrogel. Cette étude (article 6) nous indique que des constructions hybrides associant des chondrocytes nasaux autologues avec l'hydrogel d'HPMC-Si sont capables de réparer des défauts cartilagineux articulaires chez le lapin. Dans l'optique du développement de techniques chirurgicales mini-invasives, la transplantation de cellules autologues contenues dans l'hydrogel par simple injection transcutanée à l'aide de l'HPMC-Si pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies pour le traitement des défauts cartilagineux.

## V.

# VOIES DE RECHERCHES ALTERNATIVES EN INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE ARTICULAIRE

### Article 7

#### **Nasal chondrocytes and Fibrin sealant for cartilage tissue engineering**

**C.Vinatier** , O. Gauthier, M. Masson, O. Malard, A. Moreau, B. Fellah, M. Bilban, R. Spaethe, G. Daculsi, J. Guicheux. Biomaterial, soumis.

### Article 8

#### **Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage.**

D. Magne, **C. Vinatier**, M. Julien, P. Weiss, J. Guicheux.  
Trends in molecular medicine (2005), (11):519-526.

## **1 PROBLEMATIQUE**

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'ingénierie tissulaire cherche à réparer les lésions cartilagineuses articulaires en développant des constructions hybrides associant des cellules chondrogéniques avec des matrices tridimensionnelles. Ainsi, deux champs d'investigation principaux ont été développés, l'un orienté vers le développement de matrices tridimensionnelles, et l'autre vers la recherche et la sélection de sources de cellules chondrogéniques autologues.

Dans les articles 5 et 6, nous avons proposé d'associer les chondrocytes nasaux à notre hydrogel d'HPMC-Si pour le traitement des lésions cartilagineuses articulaires. Nous avons de plus montré que cette construction hybride était capable de former un tissu cartilagineux en site sous-cutané et de réparer des défauts cartilagineux en site articulaire.

Dans l'objectif de développer de nouvelles matrices 3D, nous avons cherché à savoir si les chondrocytes nasaux associés à une matrice tridimensionnelle à base de fibrine étaient capables de former un tissu cartilagineux en site sous-cutané et en site articulaire. Dans cet optique et toujours dans l'objectif de promouvoir les techniques chirurgicales mini-invasives, nous avons choisi d'associer les chondrocytes nasaux avec la colle de fibrine. La colle de fibrine commerciale (Tissucol<sup>®</sup>, Baxter Bioscience Biosurgery, Vienne, Autriche) est déjà utilisée cliniquement pour la réparation de fractures ostéochondrales (390), de nerfs et de tendon (449). De plus elle a déjà été utilisée dans des études précliniques comme support de chondrocytes (224, 494). Enfin, la forme injectable de la colle de fibrine permet d'envisager l'implantation par voie transcutanée d'une suspension de colle de fibrine contenant des cellules et ensuite la rétention de ces cellules au sein d'une matrice solide (207). Ainsi, le premier objectif de l'article 7 a été d'évaluer le potentiel de constructions hybrides, associant des chondrocytes nasaux à la colle de fibrine, dans la formation de cartilage en site sous-cutané. Le second objectif de cet article fut de déterminer le potentiel clinique de ces constructions hybrides en site articulaire.

Le deuxième champ d'investigation de l'ingénierie tissulaire concerne la recherche et la sélection de sources alternatives de cellules chondrogéniques autologues. Des cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont été découvertes dans de nombreux tissus adultes et pourraient représenter une source alternative de cellules. Mais cette hypothèse reste encore très éloignée d'une potentielle application clinique satisfaisante. L'étude attentive des avancées récentes dans le domaine de la chondrogenèse et du comportement des CSM pourrait nous aider à

mieux définir le potentiel clinique de ces cellules pour la thérapie cellulaire du cartilage. Dans ce contexte, nous avons contribué à la rédaction d'un article de revue visant à établir l'état de l'art sur les CSM et l'ingénierie du cartilage. L'objectif de cette revue est donc, à l'aide des données concernant les cartilages et leurs dégradations pathologiques et celles concernant la différenciation des chondrocytes, de discuter de la place des CSM dans le traitement des pathologies cartilagineuses.

2 CHONDROCYTES NASAUX ET COLLE DE FIBRINE APPLIQUES A L'INGENIERIE  
TISSULAIRE DU CARTILAGE. ARTICLE 7.

**Résumé :**

L'association de matrices biodégradables et de chondrocytes autologues permet l'obtention de constructions hybrides pertinentes pour le traitement des lésions cartilagineuses articulaires. Dans ce contexte, notre objectif était d'étudier l'utilisation potentielle de chondrocytes nasaux autologues associés à la colle de fibrine pour le traitement de défauts cartilagineux articulaires. Le phénotype des chondrocytes nasaux humains et de lapins a été caractérisé par RT-PCR. La capacité de constructions hybrides, associant des chondrocytes nasaux à la colle de fibrine, à former du cartilage *in vivo* a été étudiée, premièrement en site sous-cutané chez la souris *nude*, et deuxièmement au sein de défauts cartilagineux articulaires chez le lapin. Nos résultats indiquent que les chondrocytes nasaux humains expriment le collagène II et l'agrécan, les deux marqueurs majeurs du phénotype chondrocytaire. De plus, ces chondrocytes associés à la colle de fibrine et injectés en sous-cutané chez la souris *nude* sont capables de former un tissu cartilagineux. Nos résultats indiquent que les chondrocytes nasaux de lapins expriment, eux aussi, le collagène II et l'agrécan et maintiennent leur phénotype en culture tridimensionnelle dans la colle de fibrine. De plus, l'utilisation de chondrocytes nasaux autologues associés à la colle de fibrine pour traiter des défauts cartilagineux articulaires chez le lapin a conduit à la formation d'un tissu de réparation de nature hyaline. L'utilisation de la colle de fibrine contenant des chondrocytes nasaux autologues apparaît donc comme une approche potentielle pour la thérapie cellulaire du cartilage articulaire.

## **Article 7**

### **Nasal chondrocytes and Fibrin sealant for cartilage tissue engineering**

C.Vinatier , O. Gauthier, M. Masson, O. Malard, A. Moreau, B. Fellah, M. Bilban, R. Spaethe, G.

Daculsi, J. Guicheux.

Biomaterial, submitted.

Editorial Manager(tm) for Biomaterials  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Nasal chondrocytes and Fibrin Sealant for cartilage tissue engineering

Article Type: FLA Original Research

Section/Category: Biomaterials & Tissue Engineering

Keywords: Fibrin sealant; nasal chondrocytes; Tissue engineering; articular cartilage

Corresponding Author: Miss Claire Vinatier, PhD student

Corresponding Author's Institution: INSERM, U 791, Laboratory for osteo-articular and dental tissue engineering

First Author: Claire Vinatier, PhD student

Order of Authors: Claire Vinatier, PhD student; Olivier Gauthier; Martial Masson; Olivier Malard; Anne Moreau; Borhan H Fellah; Melita Bilban; Reiner Spaethe; Guy Daculsi; Jérôme Guicheux

Manuscript Region of Origin:

Abstract: Hybrid constructs associating a biodegradable matrix and autologous chondrocytes hold promise for the treatment of articular cartilage defects. In this context, our objective was to investigate the potential use of nasal chondrocytes associated with a fibrin sealant for the treatment of articular cartilage defects. The phenotype of primary nasal chondrocytes (NC) from human (HNC) and rabbit (RNC) origin were characterized by RT-PCR. The ability of constructs associating fibrin sealant and NC to form a cartilaginous tissue in vivo was investigated, firstly in a subcutaneous site in nude mice and secondly in an articular cartilage defect in rabbit. HNC express type II collagen and aggrecan, the two major hallmarks of a chondrocytic phenotype. Furthermore, when injected subcutaneously into nude mice within a fibrin sealant, these chondrocytes were able to form a cartilaginous tissue. Our data indicate that RNC also express type II collagen and aggrecan and maintained their phenotype in three-dimensional culture within a fibrin sealant. Moreover, treatment of rabbit articular cartilage defects with autologous RNC embedded in a fibrin sealant

led to the formation of a hyalin-like repair tissue. The use of fibrin sealant containing hybrid autologous NC therefore appears as a promising approach for cell-based therapy of articular cartilage.

Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire  
LIOAD, INSERM U 791 (Dr Pierre WEISS)  
Université de Nantes

From:

**Claire Vinatier, PhD student**  
Inserm U791,  
Faculté de Chirurgie Dentaire,  
1, place A. Ricordeau,  
44042 Nantes Cedex 1, France.  
Phone : 0033-2-40-41-29-16

To:

**Professor David Williams**  
Editor-in-Chief  
Biomaterials

Dear Sir,

Please find enclosed a manuscript entitled "**Nasal chondrocytes and fibrin sealant for cartilage tissue engineering**" for submitting to biomaterial.

The authors certify that this research is original, not submitted for publication elsewhere, free of conflict of interest and conducted by the highest principles of human subject and animal welfare.

Yours sincerely,

C. Vinatier

## Nasal chondrocytes and Fibrin Sealant for cartilage tissue engineering

C. Vinatier<sup>1</sup>, O. Gauthier<sup>1</sup>, M. Masson<sup>1</sup>, O. Malard<sup>1</sup>, A. Moreau<sup>2</sup>, B.H. Fellah<sup>1</sup>, M. Bilban<sup>3</sup>, R. Spaethe<sup>3</sup>, G. Daculsi<sup>1</sup>, J. Guicheux<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM, U 791, Laboratory for osteo-articular and dental tissue engineering, 1 place Alexis Ricordeau, Nantes, 44042, France

<sup>2</sup> Department of anatomo-cytopathology, University Hospital, Nantes, France,

<sup>3</sup> Baxter Biosciences Biosurgery, Vienna, Austria

Running title: Nasal chondrocytes for cartilage repair

\*Address for correspondence: Dr Jerome Guicheux, PhD.

INSERM U791, laboratory of Osteoarticular and dental tissue engineering

University of Nantes

1-Place Alexis Ricordeau

44042, Nantes Cedex 1

France

Phone:+33-(0)2-40-41-29-19

Fax: +33-(0)2-40-08-37-12

Email : [jerome.guicheux@nantes.inserm.fr](mailto:jerome.guicheux@nantes.inserm.fr)

**Abstract:**

Hybrid constructs associating a biodegradable matrix and autologous chondrocytes hold promise for the treatment of articular cartilage defects. In this context, our objective was to investigate the potential use of nasal chondrocytes associated with a fibrin sealant for the treatment of articular cartilage defects. The phenotype of primary nasal chondrocytes (NC) from human (HNC) and rabbit (RNC) origin were characterized by RT-PCR. The ability of constructs associating fibrin sealant and NC to form a cartilaginous tissue in vivo was investigated, firstly in a subcutaneous site in nude mice and secondly in an articular cartilage defect in rabbit. HNC express type II collagen and aggrecan, the two major hallmarks of a chondrocytic phenotype. Furthermore, when injected subcutaneously into nude mice within a fibrin sealant, these chondrocytes were able to form a cartilaginous tissue. Our data indicate that RNC also express type II collagen and aggrecan and maintained their phenotype in three-dimensional culture within a fibrin sealant. Moreover, treatment of rabbit articular cartilage defects with autologous RNC embedded in a fibrin sealant led to the formation of a hyalin-like repair tissue. The use of fibrin sealant containing hybrid autologous NC therefore appears as a promising approach for cell-based therapy of articular cartilage.

**Keywords:** Fibrin sealant; nasal chondrocytes; Tissue engineering; articular cartilage.

## **Introduction:**

The spontaneous healing of damaged articular cartilage is limited due to the avascular nature of this tissue as well as its relatively low cell density. This poor capacity for self-repair strongly depends on the depth of the articular lesion. On the one hand, partial thickness defects, which only affect the superficial cartilage layer, do not heal spontaneously. On the other hand, full-thickness defects, which also affect the subchondral bone, exhibit a repair process that leads to the formation of fibrocartilage. However, this fibrocartilage does not display the mechanical properties of native articular cartilage [1] and degrades rapidly following injury. Finally, joint replacement remains the only therapeutic treatment to recover mobility and relieve chronic pain for many patients. In this context, the field of tissue-engineering has offered promising strategies for the replacement of damaged cartilage. The autologous chondrocyte implantation (ACI) approach, introduced by Brittberg et al. in 1994, has become the dominant clinical cell-based therapy for the repair of cartilage lesions over the past decade [2]. In this technique, human articular chondrocytes are harvested from healthy and non-weight-bearing areas of the joint and chondrocytes are subsequently expanded in monolayer culture in order to achieve sufficient amounts of cells to fill the defect. Expanded chondrocytes are then injected into the defect under a periosteal flap in a second surgery [2]. ACI has achieved good results [3] but still remains unsatisfactory [4], mainly because the harvesting of articular chondrocytes results in damage to the donor site. Furthermore, chondrocytes lose the expression of cartilage-specific proteins during monolayer culture [5, 6], resulting in the formation of fibrocartilage that does not exhibit properties of the original articular cartilage [7]. In addition, cases of hypertrophy [8] and uncontrolled calcification have been reported with the use of a periosteal flap [4, 9]. Another concern related to the ACI technique is the risk of chondrocyte leakage from the recipient site [10]. Researchers in the

field of tissue-engineering are therefore trying to improve the technique by combining the autologous chondrogenic cells with a three-dimensional matrix able to maintain cells in the defect. Two fields of investigation are hence under development: the search for and selection of adequate autologous cells, and the development of a three-dimensional matrix.

Chondrocytes, which are commonly isolated from low load-bearing areas of articular cartilage, have been considered the cell of choice for cell-based therapy for cartilage repair. However, donor site morbidity resulting from harvesting articular cartilage has encouraged investigation into the possibility of using nasal septum cartilage as an alternative chondrocyte source. Previous studies have already demonstrated that nasal chondrocytes are able to give rise to cartilage [11]. Furthermore, an increased cartilage formation has been reported with the use of nasal chondrocytes, in comparison to that of articular chondrocytes [12].

The second field of research concerns the development of scaffolds, which allow the fixation of the cells into the cartilage defect without cell loss into the microenvironment. These three-dimensional matrices must also be able to allow for the growth of phenotypically stable chondrocytes [13, 14]. However, among the various synthetic and organic matrices that have been evaluated (for review see [4]) some of them, namely hyaluronan, alginate, polyglycolic acid and polylactic acid, have been reported to induce inflammatory responses and major cell reactions to foreign bodies after in vivo implantation. Commercial fibrin sealants, produced by polymerizing fibrinogen with thrombin, have been widely used clinically to repair osteochondral fractures [15], nerves, and tendons [16]. Fibrin glue has also been used in preclinical studies as a delivery carrier for articular chondrocyte transplantation [17, 18]. The injectable form of fibrin sealant allows for the percutaneous injection of cell-fibrin sealant suspensions and subsequently for the retention of cells within a solid matrix [19].

Following on from the above data relating to nasal chondrocytes and fibrin sealant, the aim of the present study was to develop a hybrid construct made of fibrin sealant and nasal

chondrocytes for articular cartilage tissue engineering. We first set out to determine whether nasal chondrocytes associated with fibrin sealant are able to form cartilaginous tissue in subcutaneous pockets in nude mice. We then investigated the potential use of this hybrid construct for the repair of damaged articular cartilage.

## **Materials and methods**

### **Materials:**

Baxter Bioscience Biosurgery (Vienna, Austria) generously supplied fibrin sealant (Tissucol®). Cell culture plasticware was purchased from Corning BV (Schipol-Rijk, The Netherlands). Protease (4.8 units/mg), hyaluronidase (750-1500 units/mg), trypsin (12100 units/mg), type II collagenase (452 units/mg), trypsin/EDTA (0.05%/0.53mM), type IV collagenase (125 units/mg), HEPES, and isopropanol were all purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, USA). Hank's Balanced sodium salt (HBSS), DMEM (4.5 g/l glucose), penicillin/streptomycin, L-glutamine, Trizol<sup>®</sup>, DNase I and Taq DNA Polymerase were obtained from Invitrogen Corporation (Paisley, UK). Avian Myeloblastosis Virus-Reverse Transcriptase, random hexamers and recombinant ribonuclease inhibitor were provided by Promega Corporation (Madison, WI, USA). Fetal calf serum (FCS) was from Dominique Dutscher (Brumath, France). Monoclonal antibody against collagen type II was purchased from Oncogene Research Products (San Diego, USA). Imalgène 1000<sup>®</sup> was provided by Merial (Lyon, France). Rompun<sup>®</sup> was from Bayer Pharma (Puteaux, France). Safil déc.3<sup>®</sup> was purchased from B. Braun Laboratory (Boulogne Billancourt, France). Dolethal<sup>®</sup> was obtained from Vetoquinol Laboratory (Lure, France). All other chemicals were from standard laboratory suppliers and were of the highest purity available.

### **Animals and surgical procedures**

All animal handling and surgical procedures were conducted according to European Community guidelines for the care and use of laboratory animals (DE 86/609/CEE) and approved by the local Veterinary School ethical committee. The experiments were performed

according to Good Laboratory Practices (GLP) at the Experimental Therapeutic Unit of the University of Nantes.

Isolation and characterization of human nasal chondrocytes (HNC):

Human nasal septum cartilage samples were obtained with informed consent from patients undergoing reconstructive rhinoplasty (University hospital of Nantes, Department of Head and Neck surgery). As previously described [20], the cartilage specimens were washed extensively with HBSS and cut into small slices. Cartilage slices were first digested at 37°C with 0.1% protease in HBSS for 30 minutes. Slices were then digested with 0.06% type IV collagenase in DMEM supplemented with 10% FCS overnight at 37°C on an orbital shaker. Finally, isolated HNC were either frozen for subsequent RNA isolation and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) analysis or used for implantation in subcutaneous pockets in nude mice.

For RT-PCR analysis, total RNA was extracted using Trizol<sup>®</sup> reagent according to the manufacturer's instruction. Briefly, lysis of the cells in Trizol<sup>®</sup> was followed by centrifugation at 10,000 g, 4°C for 15 minutes in the presence of chloroform. The upper aqueous phase was collected and the RNA was precipitated by addition of isopropanol and centrifugation at 12,000 g, 4°C for 5 minutes. Total RNA was then washed with 1 ml of cold 75% ethanol, dried, reconstituted with sterile water, and quantified by spectrometry.

After Dnase I digestion, 2 µg of each RNA sample were reverse transcribed using AMV-RT and random hexamers in a total volume of 30 µl. One microliter of cDNA was amplified in a total volume of 50 µl PCR reaction containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1 µM of the respective primers (see table 1), 200 µM dNTP and 2.5 units of Taq DNA Polymerase. The magnesium chloride concentration was 1.5 mM. The absence of DNA contamination in RNA preparations was tested by including RNA samples that had not been reverse

transcribed. Amplifications were carried out in an Eppendorf master cycler under the following conditions: denaturation for 3 minutes at 94°C followed by cycles of 20s denaturation at 94 °C, 20s annealing at the primer specific temperature (see table 1) and 15s elongation at 72 °C. Actin, a housekeeping gene, was used as an internal control. All results show products obtained in the linear range of amplification. For this purpose, each cycle number was determined by serial PCR reactions with decreasing cycle numbers so as to obtain a faint reproducible signal.

Implantation of human nasal chondrocytes associated with fibrin sealant in subcutaneous pockets in nude mice:

Five hundred thousand freshly isolated HNC were mixed with 250 µl of a fibrinogen/fibronectin solution. This fibrinogen/fibronectin/HNC solution was then mixed with an equal volume of thrombin solution using the joining piece of the Duploject<sup>®</sup> Kit for application of Fibrin Sealant (Baxter Bioscience Biosurgery). 500 µl of HNC/fibrin sealant mixture (n = 4) or 500µl of Fibrin sealant<sup>®</sup> (n = 4) were injected subcutaneously in 1 month-old nude mice. Animals were killed 3 weeks after implantation and implants were harvested and processed for histological analysis.

Construct samples were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections (5 µm thick) were deparaffinized using toluene, rehydrated through a graded series of ethanol, and rinsed in distilled water. For each sample, three tissue sections were stained with haematoxylin phloxin safran, Alcian Blue and Masson's trichrome as previously described [21]. For immunohistochemistry, antibody directed against human type II collagen (1/100) was used. Briefly, 4 µm-thick paraffin sections were mounted on pre-treated slides, deparaffinized, rehydrated, and rinsed in distilled water. Tissue sections were subjected to epitope retrieval in a microwave oven using citrate buffer (pH 6.0) and pre-treated with

trypsin at room temperature. Tissue sections were stained using a three-step visualization system (Dako LSAB). They were rinsed in buffer and then incubated with primary antibody at room temperature for 30 min. This was followed by sequential incubation with a biotinylated antibody for 15 min and streptavidin peroxidase for 15 min. Immunostaining was visualized using the substrate system provided in the kit (DAB/H2O2 substrate) and tissues were counterstained with haematoxylin for 5 min. Negative controls were performed by substituting the primary antibody with PBS. Immunopositive areas were stained brown. Samples were then visualized using a light microscope (Zeiss, Axioplan 2, Oberkochen, Germany).

#### Isolation and characterization of rabbit nasal chondrocytes:

Autologous rabbit chondrocytes were isolated from the nasal cartilage of adult female New Zealand White rabbits (weighing 3 to 3.5 kg). Briefly, general anesthesia was induced by intramuscular injection of an association of ketamine (Imalgène 1000<sup>®</sup>) and xylazine (Rompun<sup>®</sup>) and maintained with the same association delivered intravenously through a catheter into the auricular marginal vein. Analgesia was provided through subcutaneous injection of morphine chlorhydrate (2 mg/kg). A median cutaneous incision was performed according to the nasal bone junction (*sutura internasalis*). The skin was retracted and the two nasal bones were symmetrically elevated via a horizontal osteotomy progressing mesio-distally according to the suture between the incisive bones and the nasal bones (*sutura nasoincisiva*). The subsequent bone flap was manually elevated, reversed caudally and gently fractured with only periosteal attachments remaining at the junction with the frontal bone (*sutura nasofrontalis*). This exposed the nasal turbinates and the median nasal septum (*concha nasalis dorsalis*). The nasal mucosa was gently elevated from both sides of the nasal septum, which was then harvested after a ventral incision with a n°11 knife blade, and

extended distally up to the junction with the frontal bone. The nasal bone flap was put back in place under digital pressure and sutured bilaterally with the cartilage part of the nares with two single interrupted sutures (Safil déc.3<sup>®</sup>). Cutaneous sutures were performed routinely with absorbable sutures.

The nasal septum was cut into small slices and digested at 37°C with 0.05% hyaluronidase in HBSS for 10 minutes, then with 0.2% trypsin for 15 minutes and with 0.2% type II collagenase for 30 minutes. Finally, slices were digested overnight at 37 °C in 0.03% collagenase in DMEM. The suspended rabbit nasal chondrocytes (RNC) were either frozen for subsequent RNA extraction and RT-PCR analysis or plated at a density of  $1.10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in a 25-cm<sup>2</sup> culture flask and cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine (culture medium). The cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and the culture medium was changed every 2-3 days.

In order to investigate the maintenance of rabbit nasal chondrocyte phenotype in fibrin sealant, RNC were cultured either as a monolayer, as described above, or in three dimensions in fibrin sealant for three weeks. Briefly, RNC were mixed with fibrin sealant at a final density of  $1.10^6$  cells /ml and 2 ml of this solution was placed in each well of a 6-well plate. The plate was then incubated 20 min at 37 °C to allow for the fibrin sealant polymerization process before adding 2 ml of culture medium. RT-PCR analysis of transcripts was conducted, as previously described, on freshly isolated RNC, on RNC cultured as a monolayer (2D) in the absence of fibrin sealant for three weeks, and on RNC cultured in three-dimensions (3D) in fibrin sealant for three weeks. PCR primer sequences are provided in Table 1.

Transplantation of autologous rabbit nasal chondrocytes into articular cartilage defects:

The nasal septa of 3 adult female New Zealand White rabbits were harvested and nasal chondrocytes were isolated as described above. Isolated RNC were expanded in monolayer culture for 4 weeks and passaged once before use. The expanded RNC were mixed with fibrin sealant as described above at a density of  $2.5 \cdot 10^6$  cells/ml. Fibrin sealant containing RNC was then transplanted into articular cartilage defects of the knee of the same animals. General anesthesia and analgesia were conducted as previously described.

Bilateral arthrotomy of the knee joint was performed and the patella was luxated medially. Two cylindrical osteochondral defects of 3 mm in diameter and 3 mm deep were drilled with a dental bur and under sterile saline irrigation in the middle of the femoral trochlea, the first one on the upper part of the trochlear groove, the other in the lower part just proximally to the caudal cruciate ligament insertion. Fibrin sealant containing autologous RNC was then carefully injected into the osteochondral defects (n = 6) through a 21-gauge needle. As a control, the same number of osteochondral defects were left empty. The patella luxation was reduced and the articular and cutaneous tissues were then closed in different layers with single interrupted absorbable sutures (Safil déc.3®). All femoral implantations were performed bilaterally.

No prophylactic antibacterial or anti-inflammatory medication was administered after surgery. Six weeks after implantation, the animals were anesthetised and sacrificed by an intracardiac overdose of sodium pentobarbital (Dolethal®) after general anesthesia. The distal femoral ends were immediately dissected from the animals and fixed in formaldehyde solution. They were then decalcified in 10% nitric acid for 24h and processed in paraffin for histological analysis as described above.

## **Results:**

### Characterization of human nasal chondrocytes

Prior to using human nasal chondrocytes for in vivo transplantation in nude mice, we first sought to confirm whether HNC isolated from nasal septa by enzymatic digestion expressed the two major chondrocytic markers, namely type II collagen and aggrecan. RT-PCR analysis (figure 1) indicates that freshly isolated HNC expressed type II collagen and aggrecan, therefore suggesting that our isolation protocol allows for the recovery of cells expressing the main chondrocytic markers.

### Cartilage formation by fibrin sealant containing HNC in a subcutaneous site

To investigate the ability of fibrin sealant containing HNC to form cartilaginous tissue in vivo, we implanted HNC together with fibrin sealant in subcutaneous pockets in nude mice. The histological analysis of implants after 3 weeks revealed the formation of a compact tissue containing numerous cells (figure 2, A). This tissue was stained by Alcian blue (figure 2, B) and Masson's trichrome (figure 2, C), indicating the presence of sulfated Glycosaminoglycans (GAG) and collagen, respectively. Figure 2 also shows the presence of chondrocytic cells typically embedded in lacunae. Immunohistochemical analysis revealed a positive staining for type II collagen in the central zone of the implant (figure 2, D). No staining for type II collagen was detected on the negative control (data not shown). These results indicate that HNC associated with fibrin sealant are able to form a cartilage-like tissue in vivo.

### Characterization of rabbit nasal chondrocytes

Thereafter, we sought to evaluate whether nasal chondrocytes within fibrin sealant were able to repair an articular cartilage defect. We first analyzed by RT-PCR whether freshly isolated

rabbit nasal chondrocytes expressed transcripts encoding type II collagen and aggrecan. Our data show that freshly isolated RNC expressed type II collagen and aggrecan (figure 3, A). Secondly, the ability of Fibrin sealant to maintain the chondrocytic phenotype was investigated. Freshly isolated rabbit nasal chondrocytes were cultured either as a monolayer or in three dimensions in a fibrin sealant for 3 weeks. Expression of transcripts encoding type II collagen and aggrecan was investigated using semi-quantitative RT-PCR. Our results show that freshly isolated chondrocytes seeded in two dimensions expressed low levels of type II collagen and aggrecan. As compared to two-dimensionally cultured chondrocytes, three-dimensionally cultured chondrocytes showed an increased level of type II collagen and aggrecan transcripts (figure 3, B). These results suggest that fibrin sealant enabled the maintenance of a chondrocyte-like phenotype in RNC.

#### Repair of articular cartilage defects by fibrin sealant containing autologous RNC

We next evaluated the ability of autologous rabbit nasal chondrocytes to repair articular cartilage defects. For this purpose, defects were created in the articular surface and autologous rabbit nasal chondrocytes were implanted within fibrin sealant (n=6). Six weeks after implantation, the articular cavity was harvested and no signs of inflammation were detected. The cartilage around the defects showed the typical white-to-pale red color of healthy cartilage. Macroscopic inspection revealed filling of all the defects with tissue exhibiting various features (figure 4). The control defects (empty defects) appeared to be filled by a slightly thicker tissue as compared to the surrounding healthy cartilage. This repair tissue, however, showed good integration to the host cartilage, as seen by the absence of a visible boundary line (figure 4 lower panel). The repair tissue filling the defects treated by fibrin sealant containing autologous nasal chondrocytes appeared white, bright and opaque. This white repair tissue totally filled the defect.

In order to characterize the repair tissue formed after 6 weeks *in vivo*, we performed specific histological staining of the femoral condyles with hematoxylin/phloxin/safran, Alcian blue and Masson's trichrome as well as immunohistological staining for type II collagen.

Hematoxylin/Phloxin/Safran (HPS) staining of the untreated defect (CTRL, figure 5 A), showed the formation of repair tissue (NT, figure 5 A), which partially filled the defect. The histological organization of this newly-formed tissue appeared quite different from that of the healthy articular cartilage (HC, figure 5 A). This repair tissue was not stained by Alcian blue or Masson's trichrome. Moreover, immunohistological staining for type II collagen was also negative (NT, figure 5 D). On the contrary, adjacent articular cartilage was positively immunostained for type II collagen (HC, figure 5 D).

Defects treated with fibrin sealant containing autologous nasal chondrocytes (FS+RNC, figure 5) exhibited the presence of a thick repair tissue. HPS staining revealed that this repair tissue (NT, figure 5 E) was composed of cells embedded within an abundant extracellular matrix. These cells displayed a morphology quite comparable to that of articular chondrocytes (figure 5, E). This repair tissue was positively stained by Alcian blue and Masson's trichrome (NT, figure 5 F and G), indicating the presence of sulfated GAG and collagen, respectively. A positive immunostaining for type II collagen was also observed (figure 5 H). No staining for type II collagen was detected in the negative control (data not shown). These results strongly suggest that the repair tissue formed by fibrin sealant containing autologous nasal chondrocytes is a cartilage-like tissue.

## **Discussion:**

The lack of regenerative ability of cartilage has led researchers to develop surgical strategies to restore damaged cartilage. Despite many advances in cartilage tissue engineering, like autologous chondrocyte implantation (ACI) [2], the healing of injured cartilage remains a clinical problem. The ACI technique is restricted because articular chondrocytes dedifferentiate *in vitro* during their expansion in monolayer culture [22, 23]. ACI is also limited by an outflow of the transplanted cells through the suture of the periosteal flap [24]. To overcome both of these limitations, much attention has been paid to the development of three-dimensional matrices for the expansion, transfer and maintenance of cells at the recipient site for the treatment of articular cartilage defects [25, 26]. Among the various matrices developed for cartilage tissue engineering (for review see [4]), those that allow for a percutaneous injection of cells into the cartilage defect are considered the most valuable candidates [27]. In this context, it seems reasonable to speculate that an injectable fibrin sealant obtained by mixing fibrinogen with thrombin may be a potential matrix [28]. The biocompatibility and biodegradability of fibrin sealant have been well demonstrated [29] and its degradation products are physiological [4]. Furthermore, injection of a suspension of articular chondrocytes within a fibrin sealant into articular cartilage defects has been shown to improve healing as compared to untreated defects [30].

Nevertheless, like the ACI technique, harvesting of articular chondrocytes induces donor site morbidity and provides only low cell numbers. The further development of cartilage cell-based therapy therefore relies on the identification of alternative sources of chondrocytes. Among the available sources of hyaline cartilage, nasal septum has been contemplated as an alternative to articular cartilage [12, 31]. Nasal chondrocytes are able to give rise to cartilaginous tissue *in vitro* [32] and *in vivo* [12]. Following on from the above-mentioned

data, the aim of the present study was to examine whether a hybrid construct associating an injectable matrix such as fibrin sealant and nasal chondrocytes could be of relevance for cartilage tissue engineering.

We first set out to characterize the phenotype of cells isolated from human nasal septum. Since we found that cells freshly isolated from human nasal septum express type II collagen and aggrecan, the two main chondrocytic markers [33, 34], one can assume that these cells display a chondrocyte-like phenotype. To confirm that these cells exhibited a chondrogenic potential and could give rise to cartilage, we then tested the ability of constructs associating human nasal chondrocytes and fibrin sealant to form a cartilaginous tissue *in vivo*. The *in vivo* chondrogenic potential of tissue-engineered constructs is usually tested using heterotopic animal models [35-37]. We therefore embarked on *in vivo* implantation of our constructs in the model of subcutaneous pockets in nude mice, which have been demonstrated to offer a suitable environment for tissue engineering [38]. The formation of a tissue with a dense extracellular matrix containing sulfated GAG and type II collagen strongly suggests that our constructs were able to form a cartilage-like tissue in this heterotopic animal model. This successful production of a cartilaginous tissue also indicates that fibrin sealant supplies the cells with a microenvironment that supports the synthesis of extracellular matrix [39]. A large body of evidence, however, indicates that hypotheses drawn from results obtained in nude mice may be difficult to confirm in physiopathological implantation assays. Therefore, to further decipher whether our hybrid constructs were of relevance for cartilage repair, we sought to determine their ability to repair an articular cartilage defect. Among the various animal models (rabbit [40, 41], bovine [42], goat [43] and horse [44]) of osteochondral defects, the rabbit is one of the most widely used [45]. However, whereas the treatment of rabbit osteochondral defects has been extensively described with autologous articular chondrocytes [46, 47], the use of rabbit nasal chondrocytes (RNC) remains poorly

documented. In this context, we first aimed at demonstrating that RNC could be mixed with fibrin sealant without a loss of their differentiated phenotype. Interestingly, and as previously reported for other three-dimensional matrices, such as cellulose derivative [21], gelatin [48] and collagen [49], a three-dimensional culture of RNC within fibrin sealant was shown to maintain the expression of type II collagen and to a lesser extent that of aggrecan. These data further confirm that fibrin sealant provides the cells with a three dimensional environment suitable for the expression of a stable chondrocytic phenotype.

To ultimately assess whether fibrin sealant containing autologous nasal chondrocytes could be an appropriate device for articular cartilage repair, rabbit articular cartilage defects were treated with our hybrid construct. Defects left empty, which served as controls, showed a repair process leading to the formation of a fibrocartilaginous tissue. The spontaneous repair of articular cartilage begins with the formation of a blood clot. A few days after, mesenchymal stem cells from bone marrow penetrate the clot and produce a repair tissue [50]. This repair tissue has been reported to be a fibrous cartilage [51] with poor mechanical properties as compared to native articular cartilage. This spontaneous repair is not surprising with respect to our animal model [52] and the osteochondral defect created (3 mm in diameter) [50]. Of interest, fibrin sealant containing autologous nasal chondrocytes successfully filled the articular cartilage defect and led to the formation of a hyaline-like repair tissue. The long-term stability of this tissue remains, however, to be further studied, since apparently well-repaired tissue may degenerate prematurely [50]. This is due in large part to the degradation of fibrin sealant resulting, in some cases, in the replacement of the initial repair tissue by a fibrous tissue [17] that tends to degenerate with time. Mechanical forces are also known to influence the stability of the repair tissue formed, either positively, by enhancing cartilage mechanical properties [53-55], or negatively, by degrading the repair tissue formed in a weight-bearing site [56]. Finally, whilst the nasal septum and articular

surfaces are both described as hyaline cartilage [49], they exhibit a quite different histological organization [57]. This discrepancy in tissue organization is thought to be the consequence of tissue remodeling occurring under physiological conditions *in vivo* [12]. This difference in structural organization may also be related to the various embryonic origins of articular cartilage and nasal chondrocytes. Nasal chondrocytes indeed derive from the neural crest [58] whereas articular chondrocytes derive from the mesoderm [59]. In light of all the above-mentioned data, it remains to be determined whether hybrid constructs associating nasal chondrocytes and fibrin sealant may repair articular defects in a weight-bearing site through the formation of a biologically and biomechanically stable hyaline-like tissue.

In conclusion, our study demonstrates that human nasal chondrocytes are able to support cartilage tissue formation in subcutaneous sites. In addition, autologous nasal chondrocytes associated with fibrin sealant allow the formation of a hyaline-like repair tissue in an osteochondral defect model. This study therefore suggests that autologous nasal chondrocytes are a potentially relevant cell source for articular cartilage repair and highlights the potential of fibrin sealant for tissue engineering and cell-based therapy of articular cartilage.

#### **Acknowledgement:**

This study was supported by grants from Baxter Biosciences Biosurgery, "Association de Recherche pour la Polyarthrite Rhumatoïde", "Société Française de Rhumatologie", "ANR "SCARTIFOLD" -young researcher" and INSERM U791. C. Vinatier received a fellowship from the French Ministry of Research and Technology. The authors also gratefully acknowledge the assistance of F. Moreau, P. Weiss and S. Breton.

## **Figures Legends:**

**Figure 1:** Phenotypic characterization of freshly isolated human nasal chondrocytes (HNC). Total RNA was purified from freshly isolated HNC. RT-PCR analysis for type II collagen transcripts, as well as aggrecan and  $\beta$ -actin, was performed using the primers and conditions detailed in the Materials and Methods. Samples were electrophoresed on 2% agarose gels and visualized by U.V. A representative agarose gel is shown.

**Figure 2:** Histological and immunohistological analysis of subcutaneous implants. HNC associated with a fibrin sealant were implanted subcutaneously in nude mice and analyzed 3 weeks later. Histological sections were stained with Hematoxylin Phloxin Safran (A), Alcian blue (B), Masson's Trichrome (C) and immunostained for type II collagen (D). Bar: 200 $\mu$ m.

**Figure 3:** Phenotypic characterization of rabbit nasal chondrocytes (RNC). Total RNA was purified from freshly isolated RNC (A), from RNC cultured in two dimensions for 3 weeks (B, 2D) and from RNC cultured in Fibrin sealant for 3 weeks (B, 3D). RT-PCR analysis for type II collagen, aggrecan and  $\beta$ -actin was performed using the primers and conditions detailed in the Materials and Methods. Samples were electrophoresed on 2% agarose gels and visualized by U.V. Representative agarose gels are shown.

**Figure 4:** Macroscopic appearance of joint surface 6 weeks after implantation (upper panel). RNC associated with a fibrin sealant were injected into an articular cartilage defect and analyzed 6 weeks later. Representative photographs at higher magnification of the defect left empty (CTRL) and filled with fibrin sealant containing RNC (FS+RNC) are shown (lower panel). Bar: 3mm.

**Figure 5:** Histological and immunohistological analysis of articular cartilage defects after 6 weeks *in vivo*. Representative sections of defects left empty (CTRL, A, B, C, D) and filled with a fibrin sealant containing autologous RNC (FS+RNC, E, F, G, H)) were stained with hematoxylin/phloxin/safran (A, E), Alcian blue (B, F) and Masson's Trichrome (C, G). Sections were also immunostained for type II collagen (D, H). **HC**: healthy cartilage. **NT**: newly-formed tissue. Bar: 200 $\mu$ m.

**References:**

- [1]. Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1998 Oct;28(4):192-202.
- [2]. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994 Oct 6;331(14):889-95.
- [3]. Lindahl A, Brittberg M, Peterson L. Cartilage repair with chondrocytes: clinical and cellular aspects. *Novartis Found Symp.* 2003;249:175-86; discussion 86-9, 234-8, 9-41.
- [4]. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002 Jun;10(6):432-63.
- [5]. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, et al. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002 Jan;10(1):62-70.
- [6]. Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res.* 2005 Mar;23(2):425-32.
- [7]. Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am.* 1982 Mar;64(3):460-6.
- [8]. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop.* 2000 May(374):212-34.
- [9]. Brittberg M. Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop.* 1999 Oct(367 Suppl):S147-55.
- [10]. Kuriwaka M, Ochi M, Uchio Y, Maniwa S, Adachi N, Mori R, et al. Optimum combination of monolayer and three-dimensional cultures for cartilage-like tissue engineering. *Tissue Eng.* 2003 Feb;9(1):41-9.
- [11]. Sitterling M, Bujia J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR. Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials.* 1996 Feb;17(3):237-42.
- [12]. Kafienah W, Jakob M, Demarteau O, Frazer A, Barker MD, Martin I, et al. Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Eng.* 2002 Oct;8(5):817-26.
- [13]. Grandolfo M, D'Andrea P, Paoletti S, Martina M, Silvestrini G, Bonucci E, et al. Culture and differentiation of chondrocytes entrapped in alginate gels. *Calcif Tissue Int.* 1993 Jan;52(1):42-8.
- [14]. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, et al. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg Br.* 1989 Jan;71(1):74-80.
- [15]. Paletta GA, Arnoczky SP, Warren RF. The repair of osteochondral defects using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs. *Am J Sports Med.* 1992 Nov-Dec;20(6):725-31.
- [16]. Silver FH, Wang MC, Pins GD. Preparation and use of fibrin glue in surgery. *Biomaterials.* 1995 Aug;16(12):891-903.
- [17]. van Susante JL, Buma P, Schuman L, Homminga GN, van den Berg WB, Veth RP. Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. *Biomaterials.* 1999 Jul;20(13):1167-75.

- [18]. Itay S, Abramovici A, Nevo Z. Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. *Clin Orthop*. 1987 Jul(220):284-303.
- [19]. Homminga GN, Buma P, Koot HW, van der Kraan PM, van den Berg WB. Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro. *Acta Orthop Scand*. 1993 Aug;64(4):441-5.
- [20]. Guicheux J, Palmer G, Relic B, Mezin F, Caverzasio J, Apostolides P, et al. Primary human articular chondrocytes, dedifferentiated chondrocytes, and synoviocytes exhibit differential responsiveness to interleukin-4: correlation with the expression pattern of the common receptor gamma chain. *J Cell Physiol*. 2002 Jul;192(1):93-101.
- [21]. Vinatier C, Magne D, Moreau A, Gauthier O, Malard O, Vignes-Colombeix C, et al. Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Jan;80(1):66-74.
- [22]. Brodtkin KR, Garcia AJ, Levenston ME. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials*. 2004 Dec;25(28):5929-38.
- [23]. Zaucke F, Dinser R, Maurer P, Paulsson M. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. *Biochem J*. 2001 Aug 15;358(Pt 1):17-24.
- [24]. Marlovits S, Zeller P, Singer P, Resinger C, Vecsei V. Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur J Radiol*. 2006 Jan;57(1):24-31.
- [25]. Vacanti JP, Langer R, Upton J, Marler JJ. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998 Aug 3;33(1-2):165-82.
- [26]. Nestic D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006 May 20;58(2):300-22.
- [27]. Elisseeff J. Injectable cartilage tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*. 2004 Dec;4(12):1849-59.
- [28]. Silverman RP, Passaretti D, Huang W, Randolph MA, Yaremchuk MJ. Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin glue polymer. *Plast Reconstr Surg*. 1999 Jun;103(7):1809-18.
- [29]. Sims CD, Butler PE, Cao YL, Casanova R, Randolph MA, Black A, et al. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast Reconstr Surg*. 1998 May;101(6):1580-5.
- [30]. Hendrickson DA, Nixon AJ, Grande DA, Todhunter RJ, Minor RM, Erb H, et al. Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J Orthop Res*. 1994 Jul;12(4):485-97.
- [31]. Isogai N, Kusuvara H, Ikada Y, Ohtani H, Jacquet R, Hillyer J, et al. Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng*. 2006 Apr;12(4):691-703.
- [32]. Tay AG, Farhadi J, Suetterlin R, Pierer G, Heberer M, Martin I. Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue Eng*. 2004 May-Jun;10(5-6):762-70.
- [33]. Kuettner KE. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem*. 1992 Jun;25(3):155-63.
- [34]. Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, et al. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res*. 1994 May;212(1):97-104.
- [35]. Madry H, Padera R, Seidel J, Langer R, Freed LE, Trippel SB, et al. Gene transfer of a human insulin-like growth factor I cDNA enhances tissue engineering of cartilage. *Hum Gene Ther*. 2002 Sep 1;13(13):1621-30.

- [36]. Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Schloo BL, Vacanti JP, Vacanti CA. De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs. *Plast Reconstr Surg.* 1996 Jan;97(1):168-78; discussion 79-80.
- [37]. Lipman JM, McDevitt CA, Sokoloff L. Xenografts of articular chondrocytes in the nude mouse. *Calcif Tissue Int.* 1983 Sep;35(6):767-72.
- [38]. van de Breevaart Bravenboer J, In der Maur CD, Bos PK, Feenstra L, Verhaar JA, Weinans H, et al. Improved cartilage integration and interfacial strength after enzymatic treatment in a cartilage transplantation model. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(5):R469-76.
- [39]. Haisch A, Klaring S, Groger A, Gebert C, Sittinger M. A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2002 Jul;259(6):316-21.
- [40]. Kang SW, Yoon JR, Lee JS, Kim HJ, Lim HW, Lim HC, et al. The use of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as injectable cell carriers for cartilage regeneration in rabbit knees. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2006;17(8):925-39.
- [41]. Holland TA, Bodde EW, Cuijpers VM, Baggett LS, Tabata Y, Mikos AG, et al. Degradable hydrogel scaffolds for in vivo delivery of single and dual growth factors in cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006 Sep 8.
- [42]. Janssen LM, In der Maur CD, Bos PK, Hardillo JA, van Osch GJ. Short-duration enzymatic treatment promotes integration of a cartilage graft in a defect. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2006 Jun;115(6):461-8.
- [43]. Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin J, Boehnlein E, Pastor G, Blancuzzi V, et al. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials.* 2002 Jan;23(1):109-19.
- [44]. Nixon AJ, Fortier LA, Williams J, Mohammed H. Enhanced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor-I-laden fibrin composites. *J Orthop Res.* 1999 Jul;17(4):475-87.
- [45]. Reinholz GG, Lu L, Saris DB, Yaszemski MJ, O'Driscoll SW. Animal models for cartilage reconstruction. *Biomaterials.* 2004 Apr;25(9):1511-21.
- [46]. Masuoka K, Asazuma T, Ishihara M, Sato M, Hattori H, Ishihara M, et al. Tissue engineering of articular cartilage using an allograft of cultured chondrocytes in a membrane-sealed atelocollagen honeycomb-shaped scaffold (ACHMS scaffold). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005 Oct;75(1):177-84.
- [47]. Kose GT, Korkusuz F, Ozkul A, Soysal Y, Ozdemir T, Yildiz C, et al. Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials.* 2005 Sep;26(25):5187-97.
- [48]. Malda J, Kreijveld E, Temenoff JS, van Blitterswijk CA, Riesle J. Expansion of human nasal chondrocytes on macroporous microcarriers enhances redifferentiation. *Biomaterials.* 2003 Dec;24(28):5153-61.
- [49]. Bouchet BY, Colon M, Polotsky A, Shikani AH, Hungerford DS, Frondoza CG. Beta-1 integrin expression by human nasal chondrocytes in microcarrier spinner culture. *J Biomed Mater Res.* 2000 Dec 15;52(4):716-24.
- [50]. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1993 Apr;75(4):532-53.
- [51]. Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am.* 1980 Jan;62(1):79-89.

- [52]. Kawamura S, Wakitani S, Kimura T, Maeda A, Caplan AI, Shino K, et al. Articular cartilage repair. Rabbit experiments with a collagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it. *Acta Orthop Scand*. 1998 Feb;69(1):56-62.
- [53]. Browne JE, Anderson AF, Arciero R, Mandelbaum B, Moseley JB, Jr., Micheli LJ, et al. Clinical outcome of autologous chondrocyte implantation at 5 years in US subjects. *Clin Orthop Relat Res*. 2005 Jul(436):237-45.
- [54]. Waldman SD, Spiteri CG, Grynblas MD, Pilliar RM, Kandel RA. Long-term intermittent compressive stimulation improves the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng*. 2004 Sep-Oct;10(9-10):1323-31.
- [55]. Mauck RL, Soltz MA, Wang CC, Wong DD, Chao PH, Valhmu WB, et al. Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J Biomech Eng*. 2000 Jun;122(3):252-60.
- [56]. Shao XX, Hutmacher DW, Ho ST, Goh JC, Lee EH. Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(7):1071-80.
- [57]. Naumann A, Dennis JE, Awadallah A, Carrino DA, Mansour JM, Kastenbauer E, et al. Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem*. 2002 Aug;50(8):1049-58.
- [58]. Chai Y, Maxson RE, Jr. Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn*. 2006 Sep;235(9):2353-75.
- [59]. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*. 2002 Apr;2(4):389-406.

**Table 1**

<b>Gene</b>	<b>Primer sequences</b>	<b>Annealing temperature</b>	<b>Product length</b>	<b>Cycle number</b>
<b>β-actin</b> <b>(human, rabbit)</b>	Forward 5'-TCTCCATGTCGTCCCAGTTG-3' Reverse 5'-AGTCTTCCCCTCCATCGTTG-3'	60°C	164 bp	30
<b>COL2A1</b> <b>(human, rabbit)</b>	Forward 5'-GGCAATAGCAGGTTACGTACA-3' Reverse 5'-GAGGCGTGAGGTCTTCTGTGA-3'	60°C	108 bp	35
<b>Aggrecan</b> <b>(human, rabbit)</b>	Forward 5'-CCCTGGCAATGATGGCACTGTTC-3' Reverse 5'-TGGCAATGATGGCACTGTTC-3'	60°C	117 bp	35

**Table1:** Sequences of primer pairs, annealing temperatures, size of PCR products, and cycle numbers used for RT-PCR analysis.

# Figure 1

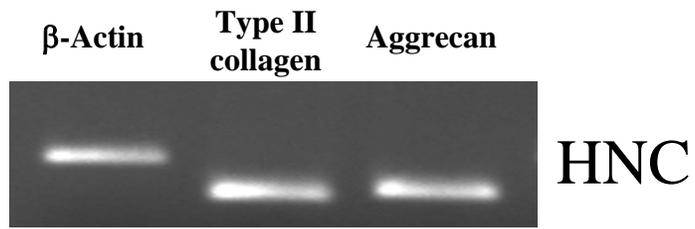
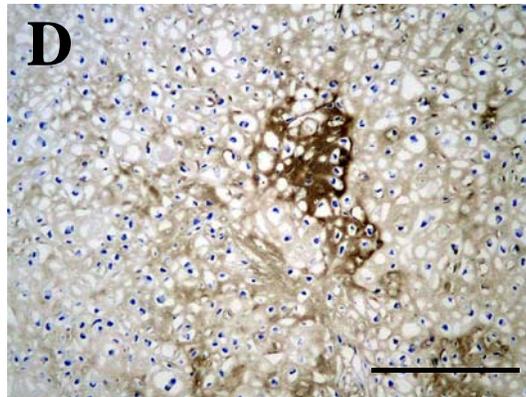
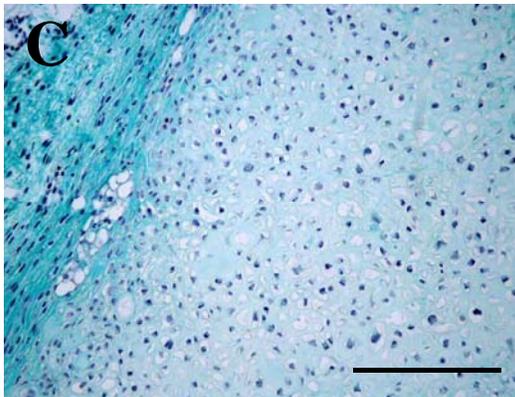
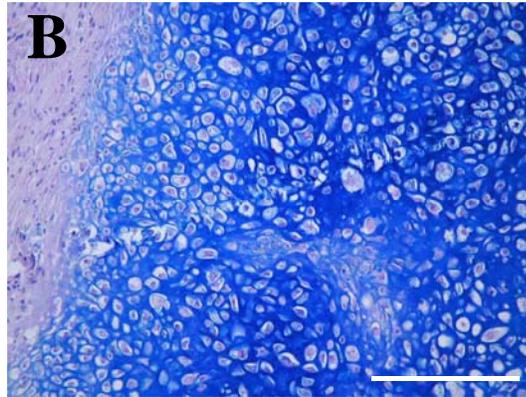
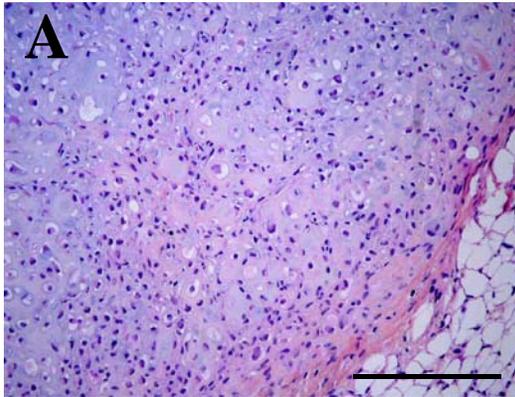


Figure 2



# Figure 3

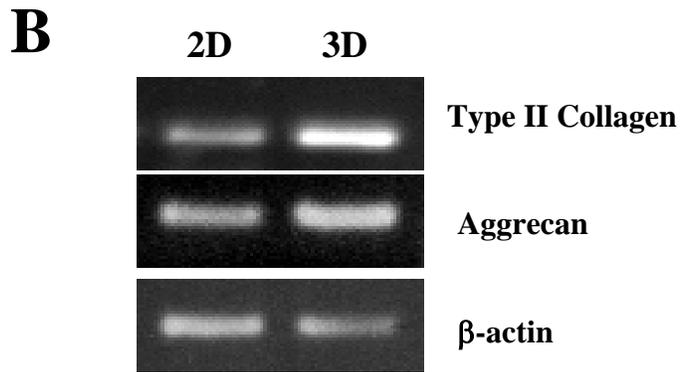
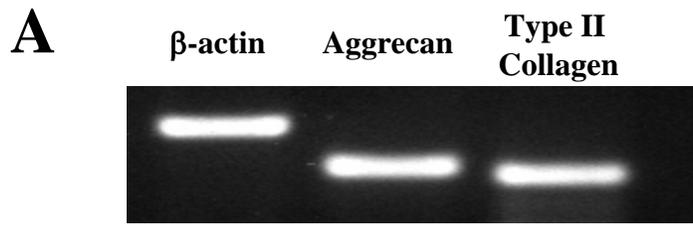


Figure 4

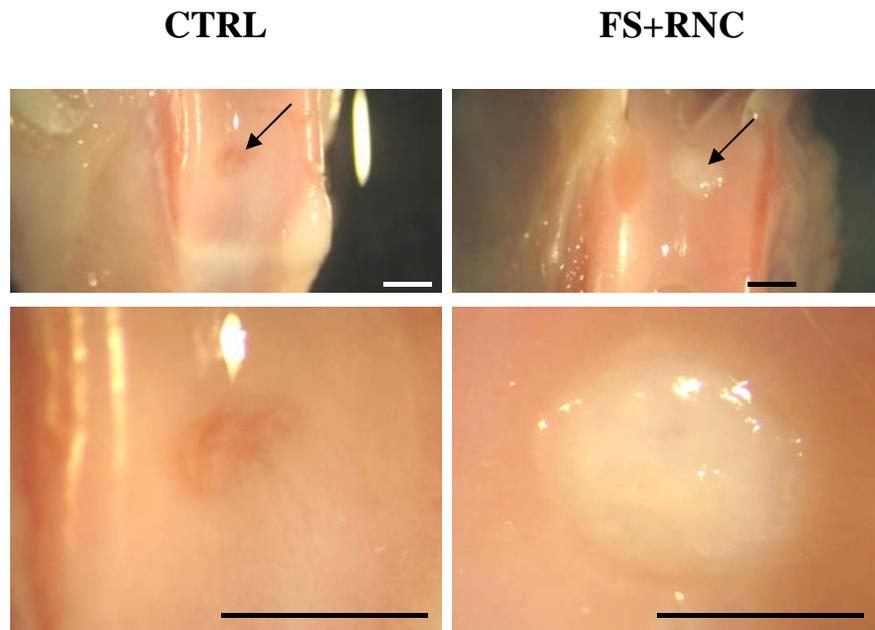
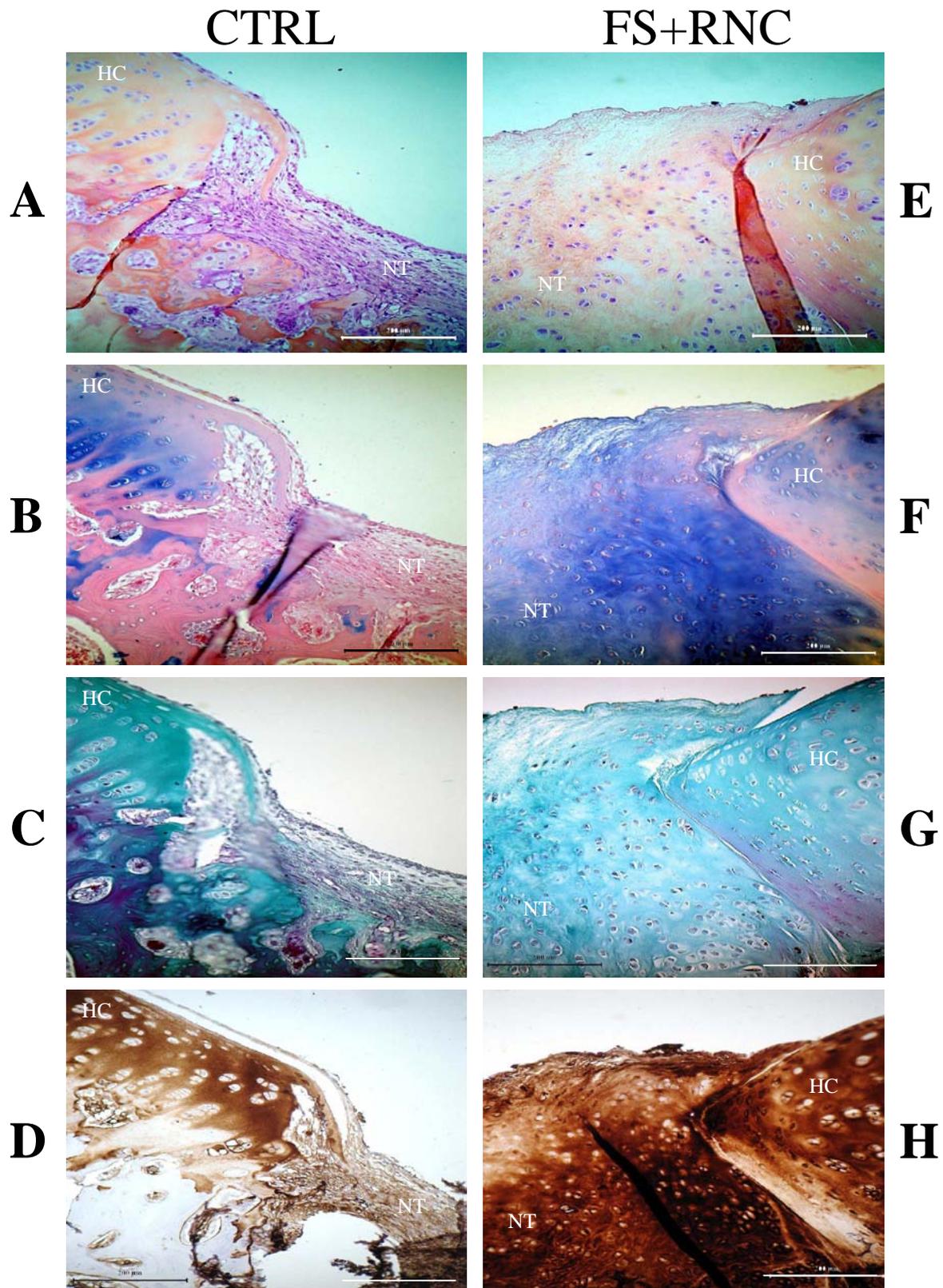


Figure 5



## AUTHOR DECLARATION TEMPLATE

We the undersigned declare that this manuscript is original, has not been published before and is not currently being considered for publication elsewhere.

We would like to draw the attention of the Editor to the following publications of one or more of us that refer to aspects of the manuscript presently being submitted. Where relevant copies of such publications are attached. [CAN BE DELETED IF NOT RELEVANT]

We wish to draw the attention of the Editor to the following facts which may be considered as potential conflicts of interest and to significant financial contributions to this work. [OR]

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us.

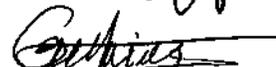
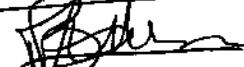
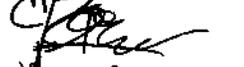
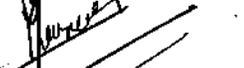
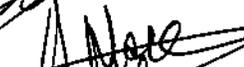
We confirm that we have given due consideration to the protection of intellectual property associated with this work and that there are no impediments to publication, including the timing of publication, with respect to intellectual property. In so doing we confirm that we have followed the regulations of our institutions concerning intellectual property.

We further confirm that any aspect of the work covered in this manuscript that has involved either experimental animals or human patients has been conducted with the ethical approval of all relevant bodies and that such approvals are acknowledged within the manuscript. [CAN BE DELETED IF NOT RELEVANT]

We understand that the Corresponding Author is the sole contact for the Editorial process (including Editorial Manager and direct communications with the office). He/she is responsible for communicating with the other authors about progress, submissions of revisions and final approval of proofs. We confirm that we have provided a current, correct email address which is accessible by the Corresponding Author and which has been configured to accept email from [biomaterials@online.be](mailto:biomaterials@online.be).

Signed by all authors as follows:

[LIST AUTHORS AND DATED SIGNATURES ALONGSIDE]

VINATIER Claire	29/03/07	
Gauthier Olivier	29/03/07	
Guichev Jerome	29/03/07	
DACULSI Guy	29/03/07	
Brillouin Felicia	29/03/07	
Fellah Boudiane	29/03/07	
Person partial.	29/03/07	
SPAETHE Reimer	29/03/07	
NOREAU Anne	29/03/07	
Maland Olivier	29/03/07	

**3 CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES POUR LA THERAPIE RECONSTRUCTRICE DU  
CARTILAGE ARTICLE 8**

**Résumé :**

Les pathologies affectant le cartilage touchent une part importante de la population et sont une des causes majeures d'invalidité chez l'adulte. Les approches thérapeutiques développées pour réparer le cartilage étaient initialement focalisées sur l'implantation de chondrocytes autologues, mais cette technique n'est pas satisfaisante en raison de la quantité limitée de chondrocytes obtenus lors du prélèvement. La découverte de cellules souches mésenchymateuses (CSM), dans certains tissus adultes, capables de se différencier en chondrocytes a renforcé la possibilité d'utiliser des CSM pour réparer le cartilage. Les données importantes publiées récemment concernant les facteurs contrôlant l'engagement vers la voie chondrocytaire des CSM, doivent être minutieusement analysées, afin de progresser dans cette approche thérapeutique. L'application potentielle de thérapies à base de CSM apporte un nouvel espoir dans le développement de traitements innovants pour la réparation du cartilage.

## **Article 8**

### **Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage.**

D. Magne, C. Vinatier, M. Julien, P. Weiss, J. Guicheux.

Trends in molecular medicine (2005), (11):519-526.

# Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage

David Magne<sup>1,2</sup>, Claire Vinatier<sup>1</sup>, Marion Julien<sup>1</sup>, Pierre Weiss<sup>1</sup> and Jérôme Guicheux<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM EM 99-03, 1 place A. Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Recherche sur les Biomatériaux et les Biotechnologies, Boulogne-sur-Mer, France

**Disorders affecting cartilage touch almost the whole population and are one of the leading causes of invalidity in adults. To repair cartilage, therapeutic approaches initially focused on the implantation of autologous chondrocytes, but this technique proved unsatisfactory because of the limited number of chondrocytes obtained at harvest. The discovery that several adult human tissues contain mesenchymal stem cells (MSCs) capable of differentiating into chondrocytes raised the possibility of injecting MSCs to repair cartilages. The important data published recently on the factors controlling chondrocyte commitment must be thoroughly considered to make further progress towards this therapeutic approach. The potential application of MSC therapy provides new hope for the development of innovative treatments for the repair of cartilage disorders.**

## We are all affected by cartilage disorders

Cartilages are poorly vascularized tissues with a very weak capacity for self-repair. After trauma and in diseases that result in cartilage degradation, cartilages will therefore never heal. Together with cardiovascular diseases, disorders affecting cartilages are the main cause of decreased quality of life and invalidity in adults. Osteoarthritis (OA), for instance, affects most people over the age of 65. OA is a consequence of mechanical and biological events that destabilize articular cartilage homeostasis. The disease process leads to joint pain, tenderness, limitation of movement, occasional effusion and variable degrees of inflammation. Numerous surgical approaches have been developed to repair articular cartilage: abrasive chondroplasty, micro-fracture, spongylation, autologous transplants of periosteum or perichondrium and osteochondral matrix (mosaicplasty). These approaches have unfortunately proven unsatisfactory (reviewed in [1]). More than ten years ago, Brittberg *et al.* [2] proposed a treatment based on the transplantation of autologous chondrocytes extracted from a low-weight-bearing region of the body and expanded *in vitro*. This approach was the first general tissue engineering treatment to be approved for cartilage repair, under the trademark Carticel®, marketed in the US by Genzyme Biosurgery, with similar products in Europe marketed by

Codon and others (reviewed in [3]). This method led to encouraging results but also remains unsatisfactory, particularly because articular chondrocytes are not easily extractable and because in culture chondrocytes lose expression of cartilage-specific proteins, resulting in the formation of a fibrocartilage lacking the biological and mechanical properties of the normal tissue.

Back pain also affects a large number of people; the point prevalence rates in several studies ranged from 12% to 35%, with around 10% of sufferers becoming chronically disabled (reviewed in [4]). Back pain is strongly associated with degeneration of the intervertebral disc (IVD), the composition of which, as discussed below, is quite similar to that of articular cartilage. The main role of IVDs is to provide biomechanical properties, but alterations in these properties are thought to be the leading cause of degeneration and, subsequently, of back pain [5]. Current treatments are conservative and palliative, and are aimed at returning patients to work (reviewed in [4]). Disc-degeneration-related pain is also treated surgically either by discectomy or by immobilization of the affected vertebrae. Although surgical procedures produce good short-term clinical results in terms of pain relief, they alter the biomechanics of the spine, leading to further degeneration of the surrounding tissue and discs at adjacent levels.

Incidence of these diseases is rising exponentially with current demographic changes and an increasingly aged population. Young people are also affected by cartilage disorders. The first unequivocal findings of degeneration in the lumbar discs can be seen in the 11 to 16 year age group and ~20% of people in their teens have discs with mild signs of degeneration (reviewed in [4]). In addition, young subjects frequently present with cartilage focal lesions as a result of trauma, often from sporting activities, and in some instances, this articular surface damage leads to progressive joint degeneration. These dramatic data have played a role in the launch of the Bone and Joint Decade by the headquarters of the World Health Organization in Geneva in January 2000 ('Joint diseases, back complaints, osteoporosis and limb trauma resulting from accidents have an enormous impact on individuals and societies, and on healthcare services and economies [...] We must act now.' <http://www.boneandjointdecade.org/>).

Since the discovery that mesenchymal stem cells (MSCs) can be easily recovered from a wide variety of

Corresponding author: Guicheux, J. (jerome.guicheux@nantes.inserm.fr).

Available online 5 October 2005

adult human tissues, and have the capacity to differentiate toward chondrocytes, much effort has been focused on engineering cartilage with MSCs, but it is still a long way from satisfactory clinical application. If thoroughly considered, the crucial recent advances in the field of chondrogenesis and MSC behavior will help us overcome the difficulties. In this review, we will first briefly explain what cartilages are, how they form and how they are degraded. Then we will consider the recent developments in research into chondrocyte differentiation, and finally try to discuss on the possible application of these developments to MSC therapy of cartilage disorders.

### **Cartilages: formation, function, and disorders**

Hyaline cartilages are avascular tissues that, at different locations in the body (for example, the growth plate of long bones, nasal septum and joints), serve distinct functions. Although IVD is not traditionally considered to be hyaline cartilage, its composition is closer to that of articular cartilage than to any other tissue, and thus may be considered as a cartilage. With the exception of the growth plate, cartilages are persistent tissues whose formation and maintenance are under the control of a single cell type: the chondrocyte. Studies of chondrogenesis and chondrocyte maturation have almost exclusively been based on chondrocytes from the growth plate, the formation of which occurs in the context of endochondral ossification. By contrast, the differentiation of articular chondrocytes and IVD cells remains obscure. Chondrocyte differentiation will therefore first be considered in detail in the context of the growth plate.

#### *Growth plate cartilage*

Bone formation occurs through two distinct developmental processes: endochondral and intramembranous ossification. Endochondral ossification occurs in the long bones of the limbs, basal part of the skull, vertebrae, ribs and medial part of the clavicles, whereas intramembranous ossification takes place in several craniofacial bones and the lateral part of clavicles. In both processes, mesenchymal cells are recruited into condensations before differentiation. During endochondral ossification, they form a cartilaginous template, the growth plate, prefiguring the future bone. During intramembranous ossification, they directly commit to osteoblasts, and bone formation does not require a cartilaginous mold. During endochondral ossification, cells located in the centre of condensations differentiate into chondrocytes, expressing early markers such as collagen types II, IX and XI, and the proteoglycan aggrecan, whereas cells located in condensations surrounding the cartilage element differentiate into osteoblasts (reviewed in [6]). Chondrocytes then further differentiate to become postmitotic, pre-hypertrophic chondrocytes, and then hypertrophic chondrocytes, which express type X collagen instead of type II. Hypertrophic chondrocytes calcify their surrounding extracellular matrix (ECM) and eventually die through apoptosis. Vascular invasion of calcified cartilage then brings osteoclasts, which degrade the matrix, and

osteoblasts, which form bone at the expense of growth plate cartilage (Figure 1).

#### *Articular cartilage*

In addition to their role in controlling long bone formation, chondrocytes are also responsible for the formation and maintenance of articular cartilage, which makes smooth, frictionless movement possible while also dissipating stresses in the joints and acting as a load-bearing surface (Figure 2a). Much less is known about the formation of articular cartilage than is known about growth plate cartilage. Most of the joints form through segmentation of a pre-existing cartilage rod. This process begins at the site of a future articulation with the appearance of regions of high cell density, called interzones, in which the cells lose the expression of chondrocyte-specific markers such as type II collagen (reviewed in [6]). Later in development, the interzone cells differentiate and form three layers. The central layer of the interzone, the central intermediate lamina, has a lower cell density, and cells in this region will eventually die through apoptosis, thereby creating the joint cavity. Cells on either side of the central intermediate lamina will differentiate into articular chondrocytes, separated by the joint cavity. Adult articular cartilage can also be subdivided into three layers (Figure 2b). The surface zone is characterized by flattened, discoid cells that mainly secrete proteoglycans. The mid zone comprises rounded cells arranged in columns, secreting collagen type II and aggrecan. The deeper zone is calcified and contains type X collagen [7]. The chondrocytes in articular cartilage are responsible for the maintenance of the balance between secretion and degradation of the ECM.

#### *Intervertebral discs*

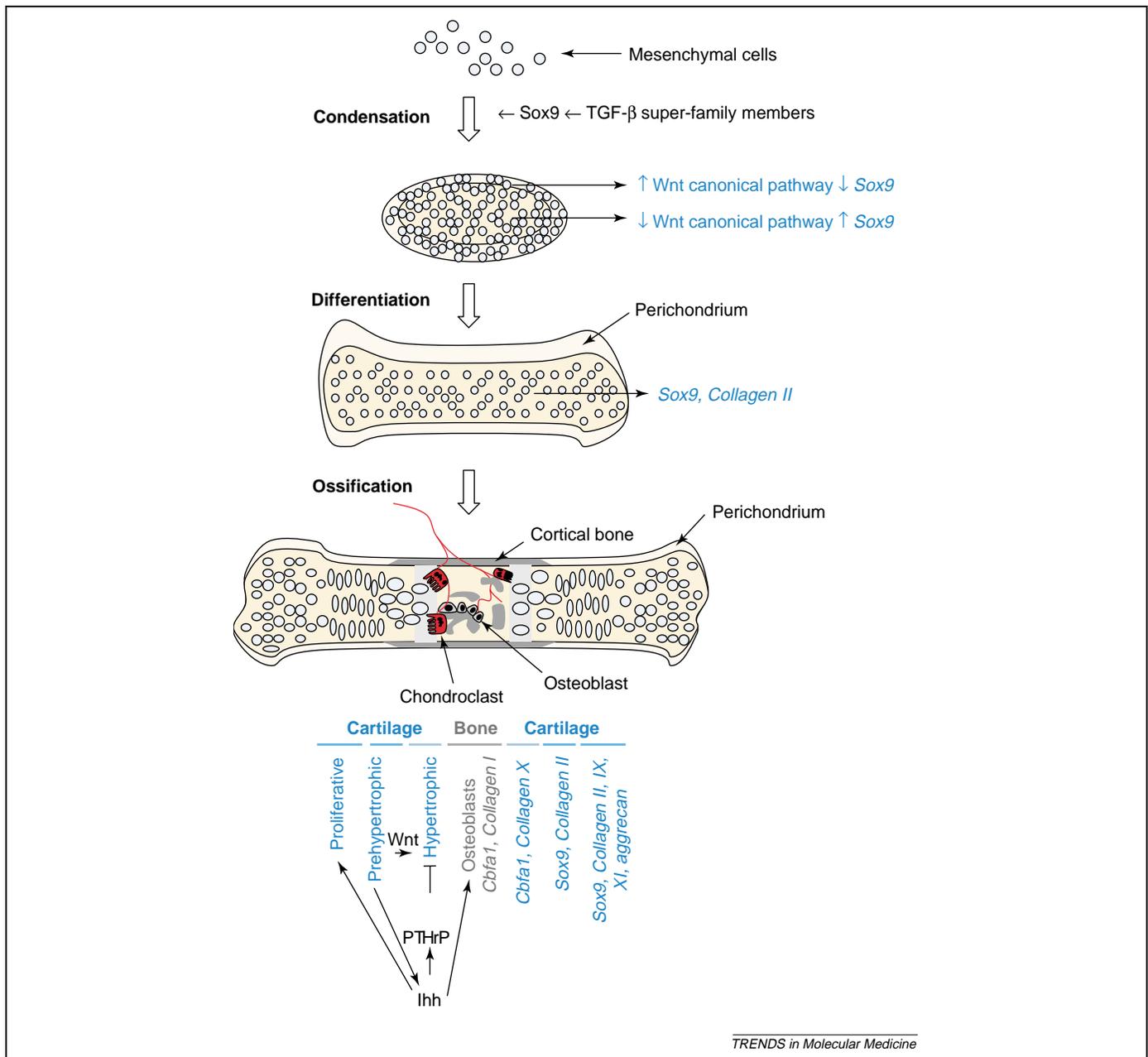
IVDs lie between the vertebral bodies linking them together, and are the main joints of the spinal column. IVDs are composite structures with a peripheral annulus fibrosus (AF) surrounding a central nucleus pulposus (NP), and a cartilage end-plate interspersed between the disc and the vertebral bodies (Figure 2c). NP composition is very close to that of articular cartilage, being largely composed of water, type II collagen and aggrecan, although NP might have a higher proteoglycan content [8,9].

### **What we know about chondrocyte differentiation**

In the present review, chondrocyte differentiation is schematically divided into three steps. These three stages are cell condensations, which are necessary for both pre-chondrogenic and pre-osteogenic commitment; chondrocyte differentiation; and finally chondrocyte hypertrophic maturation.

#### *Cell condensations*

Members of the transforming growth factor (TGF)- $\beta$  superfamily, TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 and - $\beta$ 3, and bone morphogenetic protein (BMP)-2, -4, -6, and -7 are considered to be the main inducers of endochondral ossification [6,10]. For instance, *in vivo* injection of TGF- $\beta$ 1 or TGF- $\beta$ 2 in the subperiosteal region of rat femurs induces endochondral

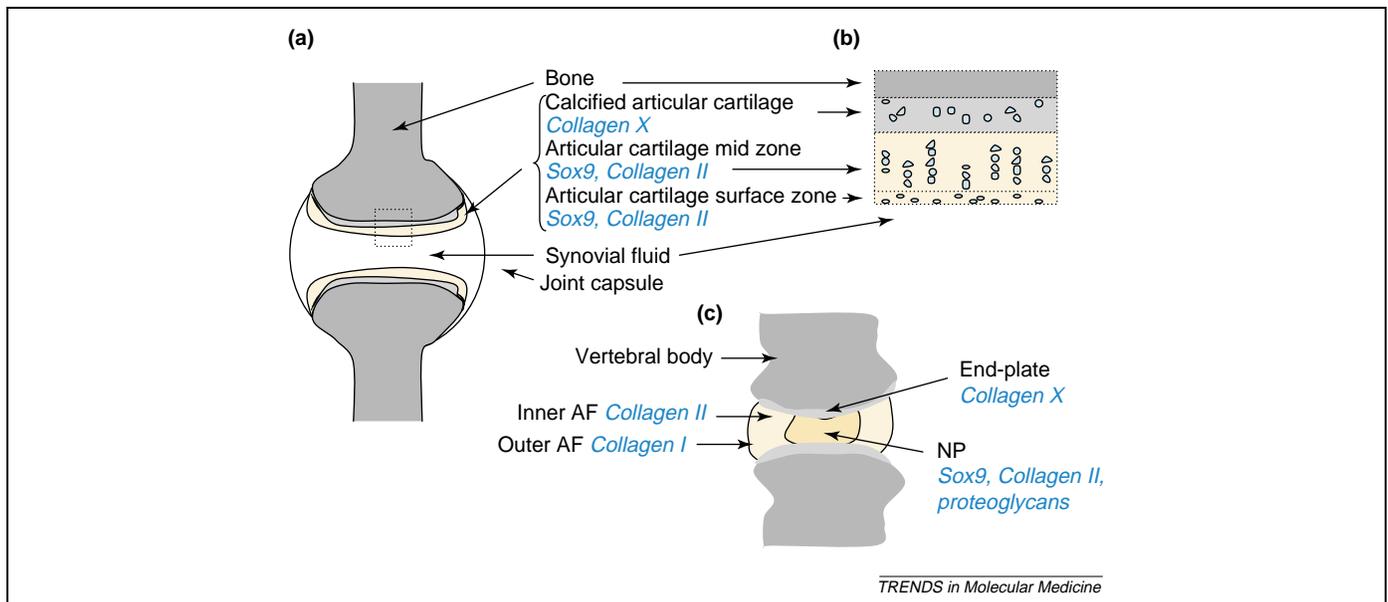


**Figure 1.** A schematic representation of a longitudinal section of a long bone during endochondral ossification. On receiving signals elicited by factors such as members of the TGF- $\beta$  superfamily, mesenchymal cells are recruited into condensations. In the core of the condensations, strong Sox9 activation and low Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promote overt chondrocyte differentiation, whereas cells at the periphery form the perichondrium. Later in development, growth plate chondrocytes become flattened and organized into columns in which they proliferate, expressing markers such as collagen type II. The hypertrophic maturation of chondrocytes is above all under the control of the Ihh/PTHrP loop: Ihh expressed in pre-hypertrophic cells induces expression of PTHrP in cells located in the perichondrium. PTHrP in turn inhibits hypertrophic differentiation. Ihh might also positively regulate osteoblast differentiation. On the contrary, members of the Wnt family such as Wnt4 trigger hypertrophic differentiation, characterized by type X collagen expression. Hypertrophic chondrocytes eventually mineralize their ECM and die through apoptosis. Vasculization of the growth plate allows chondroclasts to degrade the cartilage, while osteoblasts derived from mesenchymal cells secrete and mineralize the bony matrix.

ossification [11]. Local expression of TGF- $\beta$ 1 in rat aorta also induces a cartilaginous metaplasia that is reversible when the treatment with TGF- $\beta$ 1 is stopped [12]. TGF- $\beta$  may promote cell condensation by inducing expression of the chondrocyte transcription factor Sox9 [13], although the precise mechanisms involved remain unclear. TGF- $\beta$  might also stimulate Sox9 transcriptional activity, through smad3 activation [13]. Inactivation of Sox9 in limb buds before chondrogenic mesenchymal condensation results in the complete absence of condensation, and the subsequent cartilage and bone formation [14].

Sox9 inactivation after the establishment of mesenchymal condensations does not, however, prevent osteoblast differentiation, indicating that Sox9 is required to establish osteochondro-progenitor cells that produce both chondrocytes and osteoblasts.

Spatial regulation of chondrogenesis and osteoblastogenesis might be under the control of the canonical Wnt signaling pathway [15,16]. Wnts activate the canonical pathway by binding to the Frizzled family of receptors and the LRP5/6 family of co-receptors. This binding stabilizes  $\beta$ -catenin, which then translocates into the nucleus where



**Figure 2.** A schematic representation of longitudinal sections of (a,b) articular cartilage and (c) an intervertebral disc. (a) Articular cartilage lies between the synovial fluid and the subchondral bone. (b) It is composed of three zones: the surface zone composed of flat cells, the central zone of round cells organized into columns, and a narrow, calcified deep zone. The surface and central zones are essentially composed of collagen type II and proteoglycans, whereas the deep zone contains collagen type X. (c) Nucleus pulposus (NP) in the intervertebral disc displays a similar composition and structure, being largely composed of collagen type II and proteoglycans, and also being separated from the vertebral bony body by a zone of calcified cartilage, the end-plate. AF, annulus fibrosus.

it interacts with members of the T-cell-factor (TCF)/lymphoid-enhancer factor (LEF) HMG-box family to activate target genes. Genetic inactivation of  $\beta$ -catenin causes ectopic formation of chondrocytes at the expense of osteoblast differentiation during both endochondral and intramembranous ossification, whereas ectopic canonical Wnt signaling leads to enhanced ossification and suppression of chondrocyte formation [15]. It is likely that the inhibitory effect of  $\beta$ -catenin on chondrogenesis is due to transcriptional down-regulation of Sox9 [16]. The spatial and temporal chondrocyte differentiation in cell condensations may be controlled by the preferential expression of *Wnt5a*, *Wnt11* and *Wnt14* at the periphery of the newly formed cartilage in the limb [17], and by expression of Wnt antagonists such as *Sfrp-3* into prechondrogenic mesenchymal condensations (reviewed in [18]). In prechondrogenic condensations, in the presence of low  $\beta$ -catenin protein levels, Sox9 might cause  $\beta$ -catenin degradation [19], thereby further favoring chondrocyte differentiation. The mutual inhibition between Sox9 expression and the canonical Wnt signaling indicates that chondrocyte differentiation is controlled by a positive feedback loop in which initial inhibition of the canonical Wnt signaling leads to Sox9 expression, which further inhibits Wnt signaling and osteoblast differentiation to promote full differentiation of chondrocytes [15].

The canonical Wnt signaling pathway is also likely to be crucial in the chondrogenesis taking place in joints. The  $\beta$ -catenin-mediated Wnt pathway might be necessary and sufficient for inducing synovial joint formation [17,20]. Activation of the canonical Wnt pathway may lead to loss of chondrocyte markers through decreased Sox9 expression [17,20]. Simultaneously, maintenance of the differentiated state in articular chondrocytes may be due to expression of *Sfrp-2* and *Sfrp-3* [17,21].

#### Overt chondrocyte differentiation

In addition to its role in cell condensations, Sox9 positively regulates expression of collagen types II, IX, XI and aggrecan (reviewed in [22]). Sox9 transcriptional activity is positively modulated by factors such as CREB-binding protein (CBP/p300) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) [13,23], which might represent a spatial and temporal control of Sox9 activity. Sox5 and Sox6 are also expressed early during chondrocyte differentiation, but probably downstream of Sox-9 in the differentiation pathway [14]. Sox5- and Sox6-deficient mice still form cartilage, even though they express reduced levels of collagen type II, IX and XI, and aggrecan [24]. Unlike Sox9, Sox5 and Sox6 do not have transactivation domains and the molecular mechanisms whereby these two factors affect chondrocyte differentiation have not yet been elucidated. Differentiated chondrocytes in the growth plate and joints become located in a hypoxic environment, which induces activation of hypoxia inducible factor (HIF)-1. HIF-1 makes chondrocyte survival possible in hypoxic conditions [25] and may be required to maintain expression of chondrocyte markers such as type II collagen [26].

#### Hypertrophic chondrocyte differentiation

In the growth plate, and probably also in articular cartilage [7] and the IVD end-plate [27], chondrocytes undergo hypertrophic differentiation, characterized by expression of collagen type X. Hypertrophic conversion has almost exclusively been studied in the context of the growth plate. Although Sox9 appears important in the first steps of chondrocyte differentiation, the transcription factor Cbfa1 is involved in the control of hypertrophy. Cbfa1 expression increases with maturation of chondrocytes and type X collagen expression is disturbed in Cbfa1-deficient mice [28]. The Wnt canonical pathway might also

be involved in hypertrophic differentiation. When over-expressed in the chick, Wnt4, which is normally expressed in cells flanking the peri-articular region, accelerates the progression of proliferating to hypertrophic chondrocytes [18,29]. The distribution of  $\beta$ -catenin, changing from largely cytoplasmic in proliferating and pre-hypertrophic chondrocytes, to nuclear in hypertrophic cells, also suggests that the canonical Wnt pathway is involved in terminal differentiation [21]. Hypertrophic conversion is also largely controlled by a signaling loop involving Indian hedgehog (Ihh) and parathyroid hormone-related protein (PTHrP; Figure 1). In addition to its role in stimulating osteoblast differentiation [30,31], Ihh secreted by the pre-hypertrophic chondrocytes signals to its receptor Patched in cells of the surrounding perichondrium [32]. This results in expression of PTHrP, which inhibits hypertrophic differentiation of pre-hypertrophic cells.

#### *Role of chondrocytes in cartilage homeostasis*

In persistent cartilages, chondrocytes are responsible for the maintenance of the balance between secretion and degradation of the ECM. In the course of degenerative diseases such as OA, the equilibrium between secretion and degradation is altered in favor of the latter, because of mechanical and inflammatory factors. After traumas, chondral defects do not heal and are often subject to inflammation. During OA, chondrocyte behavior is often heterogeneous, although it is commonly observed that cells lose expression of ECM proteins while increasing that of proteases (reviewed in [33]). In late stages of OA, inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 $\beta$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  may cause loss of chondrocyte markers by decreasing Sox9 levels [34], increasing expression of Wnt, and stabilizing  $\beta$ -catenin [35,36]. In addition, one of the consistent features of joints affected by OA is the development of intra-articular osteochondral tissues, named osteophytes [33], in which mesenchymal cells from periosteum or synovial tissue differentiate towards hypertrophic, type X collagen-expressing cells [37]. The changes associated with IVD degeneration appear very similar, with the loss of Sox9, collagen type II, and aggrecan, and an increase in collagen type X expression [27,38,39].

#### **Applying our basic knowledge to cartilage engineering** *Mesenchymal stem cells for engineering cartilage*

The use of autologous chondrocytes for tissue engineering raises several major issues such as morbidity at the donor site, low cell number upon harvest, and loss of chondrocyte markers in culture. MSCs have therefore been considered to be a promising alternative. Initially discovered in the bone marrow, MSCs are stromal cells that support hematopoiesis, and have the ability to give rise to many lineages such as myoblasts, hepatocytes, adipocytes, osteoblasts and chondrocytes [40]. However, not all stromal cells from bone marrow are multipotent. Although most surface markers have been found inadequate as a means to identify stem cells because the putative markers may also be found on non-stem cells, or a particular marker may only be expressed on a stem cell at a certain stage or under certain conditions [41], MSCs are believed

to be uniformly positive for markers such as CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, and negative for markers of the hematopoietic lineage, including CD14, CD4, and CD45. For a long time, bone marrow was considered the main reservoir of MSCs. Typically the MSCs recovered from a 2-ml bone marrow aspirate can be expanded 500-fold over a period of about three weeks resulting in a theoretical yield of 12.5 to 37.5 billion cells [42]. The cells generally retain their pluripotency for at least a further 6–10 passages [42]. Because the recovery of MSCs from bone marrow is also a source of pain, morbidity and is not very high yielding, many researchers have investigated other sources. MSCs were subsequently isolated in several locations such as adipose tissue [43], cryo-preserved umbilical cord blood [44], human exfoliated deciduous teeth [45], skin [46] and even peripheral blood [47]. Interestingly, several recent studies have provided some evidence that during culture chondrocytes revert to a primitive phenotype similar to that of MSCs, and can be also induced to re-differentiate into multiple lineages [48–50].

When transplanted into non-immunocompromised animals, human MSCs undergo site-specific differentiation into multiple lineages and persist in the long term [51]. The persistence of MSCs and maintenance of their pluripotency in a xenogenic environment may be due to their lack of an HLA type II receptor and the secretion of cytokines. Nevertheless, there remain major obstacles in the path towards the clinical use of MSCs. For example, the addition of fetal calf serum (FCS) in the culture media poses the risk of the transmission of viruses or prions and a reaction to bovine proteins. It has been determined that 7–30 mg of FCS proteins are associated with a standard preparation of 100 million MSCs, a dosage that will probably be needed for clinical therapies [42]. In the first clinical trials using MSCs in the treatment of osteogenesis imperfecta, an immune response caused by anti-FCS antibodies was observed in one patient, even though clinical results were promising in other patients [52]. One of the biggest challenges facing the advancement of MSC therapy is therefore the development of FCS-free alternatives. Autologous serum and artificial serum substitutes have already proved promising in allowing proliferation while maintaining pluripotency [53,54].

Although implantation of unmodified MSCs has been reported to repair cartilage defects in rabbits [55], the implantation of uncommitted cells often leads to fibrocartilage formation, indicating that the *in vivo* environment is not sufficient to promote chondrogenesis. Before envisioning the *ex vivo* use of growth factors or genetic manipulations, we must, however, carefully consider that the chondrogenic potential of MSCs is dependent on the plating density and period of expansion [56], and is favored by hypoxia [57] and hydrostatic pressure [58].

The chondrocyte differentiation of MSCs is typically achieved in the presence of TGF- $\beta$  [6,10,59], whereas the IVD cell differentiation of MSCs may be favored by TGF- $\beta$ 3, ascorbate and dexamethasone [8]. However, although TGF- $\beta$  inhibits chondrocyte terminal differentiation [60], TGF- $\beta$ -containing media have been associated with type X collagen expression in MSCs [8,43,56]. It must therefore

be carefully checked that reimplantation in persistent cartilages of MSC treated with TGF- $\beta$  will not lead to uncontrolled chondrocyte hypertrophy. For instance, repair of cartilage in rats by implantation of mesenchymal cells overexpressing BMP-2 led to osteophyte formation [61]. Osteophyte formation might be prevented by forced overexpression of Sox9, which promotes cell condensation and early differentiation, but blocks hypertrophy (reviewed in [2]). Unfortunately, Sox9 overexpression failed to induce chondrogenesis in MSCs [13], probably because additional signals are necessary for Sox9 activity [62]. The *ets* transcription factor ERG, which is expressed during development in a pattern similar to that of Sox9, has been reported to prevent chondrocyte hypertrophic maturation [63]. The precise role of ERG in chondrocyte differentiation remains obscure, however. The canonical Wnt signaling could also be manipulated to modulate chondrogenesis by altering  $\beta$ -catenin levels [15]. Levels of  $\beta$ -catenin would have to be kept low to promote initial chondrocyte differentiation and inhibit hypertrophic differentiation. Accordingly, mouse embryonic mesenchymal progenitor cells in which  $\beta$ -catenin was inactivated differentiate toward chondrocytes in osteogenic conditions [15]. In this context, the recent conflicting report that activation of the nuclear effector of the Wnt canonical pathway, LEF-1, promotes chondrogenic differentiation of the mesenchymal C3H10T1/2 cells [64], appears surprising and will need to be confirmed with a more relevant cell model.

#### Scaffolds for cartilage engineering

Two approaches can be considered in cartilage tissue engineering: implanting either cartilage that is immature (without a dense cartilage ECM), or mature (with an ECM). In case of immature engineered cartilage, a combination of cells and a scaffold will form the new tissue *in vivo*; in case of mature engineered cartilage, the tissue is formed *in vitro* before implantation. Although mature cartilage has greater mechanical properties, implantation of immature cartilage has several significant advantages (reviewed in [3]). Firstly, immature engineered cartilage can be injected, allowing minimally invasive procedures that will reduce morbidity. Secondly, immature cartilage will integrate better with the surrounding host cartilage by taking the form of a defect that has an irregular size and shape. Thirdly, injectable scaffolds that will reticulate and adhere *in situ* will prevent the use of periosteal flaps, which are commonly used to maintain cells in the defect, but are difficult to suture to the surrounding healthy cartilage, and often result in leaks (reviewed in [65]). Finally, given that the water content of cartilage is high and that chondrocyte differentiation increases with scaffold hydrophilicity [66], the use of hydrogels would be advantageous. Hydrogels are cross-linked polymeric systems capable of absorbing large volumes of aqueous solutions. Besides their hydrogel composition, which can be highly variable, important parameters that need to be thoroughly considered are their resorbability and their architectural properties. Indeed, any biomaterial, either synthetic or from a foreign origin, must ideally be eliminated once the material has

permitted the formation of a functional tissue. The three-dimensional parameters of hydrogels need to be precisely controlled to optimize their bioactivity. The network density of hydrogels can be modulated by altering cross-linking density, which in effect, changes the volume of water that is absorbed in the hydrogel and the mechanical properties (reviewed in [3]). Hydrogel reticulation can be triggered by temperature changes (glycol polymer Pluronic<sup>®</sup>, collagen, ECM extract from a mouse sarcoma Matrigel<sup>™</sup>, and fibrin glue; reviewed in [3]), addition of a polymerizing agent (alginate) [67], change in pH (cellulose) [68] or exposure to light [69].

To date, numerous hydrogels have been synthesized and tested both *in vitro* and in small animal models of articular cartilage defects (reviewed in [3,70]). Although encouraging results have been obtained in some studies [55,71], much work still needs to be accomplished to optimize the biological and, above all, mechanical properties of the newly formed articular cartilage tissue. In addition, clinical application will depend on the successful application of these hybrid materials and technologies to large animal models that are more relevant to humans.

In contrast to articular cartilage repair, the tissue engineering approaches to repairing the IVD are only just starting to emerge. A recent study has nevertheless demonstrated the feasibility of using MSCs embedded in Atelocollagen to restore altered disc tissue in a rabbit model [72]. There is still a lack of relevant animal models for IVD degeneration, however. Several models of induced or spontaneous degeneration have been described but they fall short on many criteria (for a review see [73]). An acceptable model therefore has to be developed to facilitate understanding of how stem cell therapy can be used to correct or ameliorate disc disease.

#### Concluding remarks

MSCs, which are easily available in several adult tissues and are able to undergo chondrogenic commitment, are of great interest in articular cartilage engineering. Several recent studies on chondrocyte commitment have provided us with new possibilities to optimize MSC-induced chondrogenesis. In particular, the stimulation of chondrogenesis by manipulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway provides a great challenge. Concerning intervertebral disc regeneration, much work remains to be accomplished to characterize precisely the phenotype of the NP cells and decipher whether MSCs can satisfactorily rebuild a degenerated NP. Finally, hybrid materials combining MSCs with injectable scaffolds will have to be tested in relevant animal models of articular cartilage defects and IVD degeneration. The successful application of this approach in humans requires answers to these questions (Box 1). The number of people

#### Box 1. Outstanding questions

- Can we manipulate the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway to favor chondrocyte commitment of MSCs?
- Can we achieve efficient chondrogenesis in FCS-free culture media?
- What is the exact phenotype of the nucleus pulposus cells?
- Is it possible to build a nucleus pulposus using MSCs?

experiencing invalidity as a consequence of cartilage disorders is increasing exponentially, so effective therapeutic strategies must be developed now.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from 'Association de Recherche pour la Polyarthrite Rhumatoïde', 'Société Française de Rhumatologie' and INSERM EM 9903. David Magne received a fellowship from 'Région des Pays de la Loire', Claire Vinatier received a fellowship from the French Ministry of Research and Technology and Marion Julien received a fellowship from INSERM and 'Région des pays de la Loire'.

### References

- Hunziker, E.B. (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 432–463
- Brittberg, M. *et al.* (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 331, 889–895
- Elisseeff, J. (2004) Injectable cartilage tissue engineering. *Expert Opin. Biol. Ther.* 4, 1849–1859
- Urban, J.P. and Roberts, S. (2003) Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res. Ther.* 5, 120–130
- Salminen, J.J. *et al.* (1999) Recurrent low back pain and early disc degeneration in the young. *Spine* 24, 1316–1321
- Karsenty, G. and Wagner, E.F. (2002) Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell* 2, 389–406
- Eyre, D.R. (1991) The collagens of articular cartilage. *Semin. Arthritis Rheum.* 21(3, Suppl 2), 2–11
- Steck, E. *et al.* (2005) Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 23, 403–411
- Mwale, F. *et al.* (2004) Distinction between the extracellular matrix of the nucleus pulposus and hyaline cartilage: a requisite for tissue engineering of intervertebral disc. *Eur. Cell. Mater.* 8, 58–63
- Capdevila, J. and Izpisua Belmonte, J.C. (2001) Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 87–132
- Joyce, M.E. *et al.* (1990) Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J. Cell Biol.* 110, 2195–2207
- Schulick, A.H. *et al.* (1998) Overexpression of transforming growth factor beta1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6983–6988
- Furumatsu, T. *et al.* (2005) Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *J. Biol. Chem.* 280, 8343–8350
- Akiyama, H. *et al.* (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* 16, 2813–2828
- Day, T.F. *et al.* (2005) Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev. Cell* 8, 739–750
- Hill, T.P. *et al.* (2005) Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev. Cell* 8, 727–738
- Guo, X. *et al.* (2004) Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev.* 18, 2404–2417
- Church, V. *et al.* (2002) Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J. Cell Sci.* 115, 4809–4818
- Akiyama, H. *et al.* (2004) Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.* 18, 1072–1087
- Hartmann, C. and Tabin, C.J. (2001) Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell* 104, 341–351
- Enomoto-Iwamoto, M. *et al.* (2002) The Wnt antagonist Frzb-1 regulates chondrocyte maturation and long bone development during limb skeletogenesis. *Dev. Biol.* 251, 142–156
- Magne, D. *et al.* (2005) Cartilage formation in growth plate and arteries: from physiology to pathology. *Bioessays* 27, 708–716
- Kawakami, Y. *et al.* (2005) Transcriptional coactivator PGC-1alpha regulates chondrogenesis via association with Sox9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2414–2419
- Smits, P. *et al.* (2001) The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev. Cell* 1, 277–290
- Schipani, E. *et al.* (2001) Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.* 15, 2865–2876
- Pfander, D. *et al.* (2003) HIF-1alpha controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes. *J. Cell Sci.* 116, 1819–1826
- Roberts, S. *et al.* (1998) Type X collagen in the human intervertebral disc: an indication of repair or remodelling? *Histochem. J.* 30, 89–95
- Inada, M. *et al.* (1999) Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev. Dyn.* 214, 279–290
- Hartmann, C. and Tabin, C.J. (2000) Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development* 127, 3141–3159
- St-Jacques, B. *et al.* (1999) Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 13, 2072–2086
- Long, F. *et al.* (2004) Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development* 131, 1309–1318
- Vortkamp, A. *et al.* (1996) Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273, 613–622
- Sandell, L.J. and Aigner, T. (2001) Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res.* 3, 107–113
- Murakami, S. *et al.* (2000) Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* 275, 3687–3692
- Ryu, J.H. *et al.* (2002) Regulation of the chondrocyte phenotype by beta-catenin. *Development* 129, 5541–5550
- Hwang, S.G. *et al.* (2004) Wnt-7a causes loss of differentiated phenotype and inhibits apoptosis of articular chondrocytes via different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 279, 26597–26604
- Eerola, I. *et al.* (1998) Type X collagen, a natural component of mouse articular cartilage: association with growth, aging, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 41, 1287–1295
- Gruber, H.E. *et al.* (2005) The SOX9 transcription factor in the human disc: decreased immunolocalization with age and disc degeneration. *Spine* 30, 625–630
- Antoniou, J. *et al.* (1996) The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J. Clin. Invest.* 98, 996–1003
- Pittenger, M.F. *et al.* (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147
- Pittenger, M.F. and Martin, B.J. (2004) Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.* 95, 9–20
- Spees, J.L. *et al.* (2004) Internalized antigens must be removed to prepare hypoinflammatory mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol. Ther.* 9, 747–756
- Zuk, P.A. *et al.* (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295
- Lee, M.W. *et al.* (2004) Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 273–278
- Miura, M. *et al.* (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5807–5812
- Toma, J.G. *et al.* (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.* 3, 778–784
- Kuznetsov, S.A. *et al.* (2001) Circulating skeletal stem cells. *J. Cell Biol.* 153, 1133–1140
- Dell'Accio, F. *et al.* (2003) Microenvironment and phenotypic stability specify tissue formation by human articular cartilage-derived cells *in vivo*. *Exp. Cell Res.* 287, 16–27
- Barbero, A. *et al.* (2003) Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 48, 1315–1325
- de la Fuente, R. *et al.* (2004) Dedifferentiated adult articular chondrocytes: a population of human multipotent primitive cells. *Exp. Cell Res.* 297, 313–328

- 51 Liechty, K.W. *et al.* (2000) Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat. Med.* 6, 1282–1286
- 52 Horwitz, E.M. *et al.* (2002) Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8932–8937
- 53 Anselme, K. *et al.* (2002) *In vitro* control of human bone marrow stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng.* 8, 941–953
- 54 Stute, N. *et al.* (2004) Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp. Hematol.* 32, 1212–1225
- 55 Wakitani, S. *et al.* (1994) Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* 76, 579–592
- 56 Sekiya, I. *et al.* (2002) Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 20, 530–541
- 57 Wang, D.W. *et al.* (2005) Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *J. Cell. Physiol.* 204, 184–191
- 58 Angele, P. *et al.* (2003) Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated *in vitro*. *J. Orthop. Res.* 21, 451–457
- 59 Mackay, A.M. *et al.* (1998) Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 4, 415–428
- 60 Yang, X. *et al.* (2001) TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J. Cell Biol.* 153, 35–46
- 61 Gelse, K. *et al.* (2003) Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum.* 48, 430–441
- 62 Kypriotou, M. *et al.* (2003) SOX9 exerts a bifunctional effect on type II collagen gene (COL2A1) expression in chondrocytes depending on the differentiation state. *DNA Cell Biol.* 22, 119–129
- 63 Iwamoto, M. *et al.* (2005) The balancing act of transcription factors C-1-1 and Runx2 in articular cartilage development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 777–782
- 64 Yano, F. *et al.* (2005) The canonical Wnt signaling pathway promotes chondrocyte differentiation in a Sox9-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 1300–1308
- 65 Lynn, A.K. *et al.* (2004) Repair of defects in articular joints. Prospects for material-based solutions in tissue engineering. *J. Bone Joint Surg. Br.* 86, 1093–1099
- 66 Miot, S. *et al.* (2005) Effects of scaffold composition and architecture on human nasal chondrocyte redifferentiation and cartilaginous matrix deposition. *Biomaterials* 26, 2479–2489
- 67 Alsberg, E. *et al.* (2002) Engineering growing tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12025–12030
- 68 Vinatier, C. *et al.* (2005) A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* 26, 6643–6651
- 69 Elisseeff, J. *et al.* (1999) Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3104–3107
- 70 Drury, J.L. and Mooney, D.J. (2003) Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24, 4337–4351
- 71 Grande, D.A. *et al.* (2003) Stem cells as platforms for delivery of genes to enhance cartilage repair. *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A(Suppl 2), 111–116
- 72 Sakai, D. *et al.* (2003) Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials* 24, 3531–3541
- 73 Risbud, M.V. *et al.* (2004) Stem cell regeneration of the nucleus pulposus. *Spine J.* 4(6 Suppl), 348S–353S

### ScienceDirect collection reaches six million full-text articles

Elsevier recently announced that six million articles are now available on its premier electronic platform, ScienceDirect. This milestone in electronic scientific, technical and medical publishing means that researchers around the globe will be able to access an unsurpassed volume of information from the convenience of their desktop.

ScienceDirect's extensive and unique full-text collection covers over 1900 journals, including titles such as *The Lancet*, *Cell*, *Tetrahedron* and the full suite of *Trends* and *Current Opinion* journals. With ScienceDirect, the research process is enhanced with unsurpassed searching and linking functionality, all on a single, intuitive interface.

The rapid growth of the ScienceDirect collection is due to the integration of several prestigious publications as well as ongoing addition to the Backfiles – heritage collections in a number of disciplines. The latest step in this ambitious project to digitize all of Elsevier's journals back to volume one, issue one, is the addition of the highly cited *Cell Press* journal collection on ScienceDirect. Also available online for the first time are six *Cell* titles' long-awaited Backfiles, containing more than 12,000 articles highlighting important historic developments in the field of life sciences.

The six-millionth article loaded onto ScienceDirect entitled "Gene Switching and the Stability of Odorant Receptor Gene Choice" was authored by Benjamin M. Shykind and colleagues from the Dept. of Biochemistry and Molecular Biophysics and Howard Hughes Medical Institute, College of Physicians and Surgeons at Columbia University. The article appears in the 11 June issue of Elsevier's leading journal *Cell*, Volume 117, Issue 6, pages 801–815.

[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

#### 4 DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux voies de recherche alternatives de l'ingénierie tissulaire du cartilage. Dans ce but, nous avons recherché la capacité de chondrocytes nasaux autologues associés à une matrice tridimensionnelle alternative, la colle de fibrine, à former un tissu cartilagineux en site sous-cutané et en site articulaire. Dans un deuxième temps, les données de la littérature concernant l'éventuelle utilisation des cellules souches mésenchymateuses adultes pour l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire font l'objet d'un article de revue.

L'article 7 confirme que les chondrocytes nasaux humains possèdent des capacités chondrogéniques. En effet, les chondrocytes nasaux fraîchement isolés et injectés en sous-cutané chez la souris *nude* ont permis la formation d'un tissu cartilagineux présentant une matrice extracellulaire dense contenant des GAG sulfatés et du collagène de type II. Ces résultats indiquent que la colle de fibrine offre un microenvironnement favorable à la synthèse d'une matrice extracellulaire (183). Cependant, de nombreuses hypothèses fondées sur des études réalisées chez la souris *nude* se sont révélées difficiles à confirmer dans des essais d'implantation en conditions physiopathologiques. Nous avons donc cherché à déterminer si une construction hybride associant les chondrocytes nasaux et la colle de fibrine était capable de réparer des défauts cartilagineux réalisés dans la fosse inter-condylienne de lapins. Nous avons observé que les chondrocytes nasaux de lapins pouvaient être associés avec la colle de fibrine sans modifications de leur phénotype. En effet, comme observé avec de nombreuses autres matrices tridimensionnelles, telle que la gélatine (291), le collagène (44) ou l'alginate (42), la culture tridimensionnelle de chondrocytes dans la colle de fibrine permet le maintien de leur phénotype chondrocytaire. Ces données renforcent l'hypothèse que la colle de fibrine offre un environnement tridimensionnel favorable aux chondrocytes. Finalement, cette étude (article 7) indique que les chondrocytes nasaux autologues peuvent être associés à la colle de fibrine et former une construction hybride capable de réparer des défauts cartilagineux. En effet, les chondrocytes nasaux et la colle de fibrine ont permis la formation d'un tissu de réparation semblant être de type hyalin contenant des GAG et du collagène de type II. Cependant, la haute dégradabilité de la colle de fibrine peut entraîner le remplacement du tissu de réparation initial par un tissu fibreux (494) qui tend à dégénérer avec le temps. Par conséquent, des implantations à plus long terme devront être réalisées pour vérifier la stabilité à long terme du tissu néoformé.

Le processus de réparation spontanée, observé lorsque les lésions cartilagineuses atteignent l'os sous-chondral, passe par la formation d'un caillot sanguin contenant de la fibrine (443). Or, ce processus aboutit à la formation d'un tissu de réparation fibrocartilagineux présentant des propriétés mécaniques plus faible que le cartilage articulaire sain (148). L'utilisation de la fibrine comme support des cellules chondrogéniques pourrait simplement mimer ce processus de réparation spontanée et ainsi aboutir à la formation d'un fibrocartilage. La visualisation du contenu en collagène de type I du tissu de réparation obtenu, par la construction colle de fibrine-chondrocytes nasaux, devra être réalisée afin de conclure précisément quant à la nature hyaline ou fibro-hyaline du tissu.

Les contraintes mécaniques sont connues pour influencer l'organisation tissulaire et les propriétés mécaniques du cartilage (313, 506-508). La capacité de la colle de fibrine associée aux chondrocytes nasaux autologues devra donc également être évaluée au sein de défauts créés en zone portante de l'articulation. Ces données suggèrent que la colle de fibrine est une matrice injectable potentielle pour le traitement des lésions cartilagineuses.

Les nombreuses limites associées à l'utilisation de chondrocytes articulaires autologues comme la morbidité du site donneur, le faible nombre de chondrocytes obtenus et leur dédifférenciation en culture, ont motivé la recherche de sources alternatives de cellules autologues. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules stromales capables de se différencier en myocytes, hépatocytes, adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes (403). La revue des données de la littérature, concernant l'utilisation des CSM en ingénierie tissulaire du cartilage (article 8), indique que des CSM peuvent être isolées à partir de nombreux tissus adultes comme la moelle osseuse (403), le tissu adipeux (534), la peau (484) et le sang de cordon ombilical (267). Ces CSM humaines semblent ne pas posséder de molécules HLA de classe II. Elles sont ainsi tolérées et persistent longtemps après leur implantation dans des animaux non immunodéficients (277). Par ailleurs l'implantation de CSM non modifiées a permis la réparation de défauts cartilagineux articulaires chez le lapin (504). Cependant, les essais de différenciation des CSM vers un phénotype chondrocytaire à l'aide de facteurs de croissance (TGF- $\beta$ , BMP-2) conduisent souvent à une hypertrophie et dans certains cas à la minéralisation de la MEC(156, 398). L'ensemble de ces données bibliographiques démontre le grand intérêt des CSM adultes dans l'ingénierie tissulaire du cartilage. Cependant de nombreux progrès restent à faire pour promouvoir la différenciation de ces cellules vers un phénotype proche de celui des chondrocytes articulaires.

## VI.

### CONCLUSIONS GENERALES-PERSPECTIVES

Le cartilage articulaire, de par la complexité de sa structure et sa composition, est un tissu dont les capacités de réparations spontanées sont très limitées. Les lésions cartilagineuses, traumatiques ou dégénératives, sont par conséquent irréversibles. Les répercussions de plus en plus importantes sur les coûts de santé, et l'invalidité associée à ces pathologies ont contribué au développement de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des lésions du cartilage articulaire, au premier rang desquelles se situe l'ingénierie tissulaire. L'ingénierie tissulaire a pour objectif de réparer les lésions du cartilage articulaire à l'aide de cellules chondrogéniques autologues transplantées et maintenues sur le site lésionnel via une matrice tridimensionnelle.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail a été de développer un nouveau concept d'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire par l'association d'un hydrogel injectable auto-réticulant (HPMC-Si) avec des chondrocytes autologues.

Dans une première partie, nous avons montré par la caractérisation des propriétés visco-élastiques de l'hydrogel et des paramètres influençant ces propriétés que cet hydrogel était injectable sous sa forme visqueuse et pouvait ensuite durcir *in situ*. Nous avons également démontré que cet hydrogel représentait une matrice biocompatible de choix pour la culture tridimensionnelle de chondrocytes phénotypiquement stable.

Dans une deuxième partie, nous avons montré que l'association de notre hydrogel d'HPMC-Si avec des chondrocytes isolés de cartilage hyalin nasal aboutissait à la formation d'un tissu cartilagineux et à la réparation de lésions cartilagineuses articulaires. La plupart des études précliniques concernant la réparation du cartilage articulaire sont réalisées au sein de défauts créés dans la fosse inter-condylienne. Cette zone, dite non portante, est soumise à des contraintes mécaniques réduites. Cependant, les lésions du cartilage articulaire se forment généralement sur les condyles fémoraux, qui sont les zones où les contraintes mécaniques sont les plus fortes. De plus, la géométrie de cette zone, à l'inverse de la fosse inter-condylienne qui forme une surface concave, présente une forme convexe moins adaptée à la mise en place de matrices tridimensionnelles injectables. Nos prochains tests précliniques de réparation de défauts cartilagineux articulaires devront donc être réalisés sur des zones portantes comme les condyles fémoraux. Ceci nous permettra d'évaluer, sous contraintes mécaniques, la capacité d'adhésion de notre hydrogel au tissu environnant la lésion. Par ailleurs, afin d'achever notre preuve de concept, nous devons maintenant choisir un modèle animal plus proche de l'homme en terme d'épaisseur de cartilage et de capacité de réparation spontanée. Parmi les différents modèles animaux, le cheval a l'avantage de présenter une

épaisseur de cartilage (1,5 à 2 mm) proche de celle observée chez l'homme (2,2 à 2,5 mm). Les chevaux sont, par ailleurs, sujets aux lésions cartilagineuses, ce qui confère à notre concept un intérêt en médecine vétérinaire. La technique de mosaïcplastie est déjà appliquée chez le cheval et pourra nous permettre de réaliser des études comparatives de notre concept avec une méthode de référence. Une collaboration avec le service de chirurgie équine de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (Dr O. Geffroy) a été mise en place en ce sens.

Dans la troisième partie, nous nous sommes intéressés à une matrice tridimensionnelle alternative : la colle de fibrine. Cette matrice d'origine biologique présente des propriétés d'adhésion tissulaire qui pourrait être pertinente pour la thérapie cellulaire du cartilage. Nos données ont confirmé cette hypothèse, puisque la colle de fibrine s'est révélée être une matrice d'intérêt pour la culture et le transfert de chondrocytes sur le siège de lésions cartilagineuses. Parallèlement au développement de nouvelles matrices et pour pallier les inconvénients liés à l'utilisation de chondrocytes, les recherches s'orientent vers la découverte de sources alternatives de cellules chondrogéniques. Parmi ces sources alternatives de cellules réparatrices, les cellules souches mésenchymateuses sont probablement celles qui ont connu l'essor le plus important ces dix dernières années. La moelle osseuse représentait la source majeure de cellules souches adultes. Mais récemment, de nombreuses autres sources de cellules souches adultes ont été mises en évidence. Parmi celles-ci, les cellules souches dérivées du tissu adipeux représentent une source réellement prometteuse de cellules réparatrices pour le cartilage. Cependant, le défi que représente l'utilisation des CSM pour l'ingénierie tissulaire du cartilage reste entier. Il sera nécessaire en effet de pouvoir contrôler de manière précise la différenciation des CSM vers un phénotype chondrocytaire stable mais surtout adapté aux contraintes de la réparation du cartilage articulaire. Dans ce but, il apparaît nécessaire de pouvoir orienter les CSM vers la lignée chondrogénique tout en prévenant leur différenciation terminale hypertrophique conduisant à la minéralisation de la matrice. Il a récemment été suggéré qu'un environnement tridimensionnel associé à des conditions de culture particulières (hypoxie, contraintes mécaniques, facteurs de croissance) pourraient permettre d'orienter les CSM vers un phénotype chondrocytaire tout en les maintenant dans un état de différenciation phénotypique adapté à leur utilisation en thérapie du cartilage articulaire. Afin d'étayer cette hypothèse, nous mènerons des études transcriptomiques et protéomiques qui permettront de déterminer le rôle et le potentiel de ces facteurs environnementaux en ingénierie du cartilage.

Parallèlement, les progrès récents en chimie des polymères et les avancées dans le développement de nouveaux systèmes à libération contrôlée de principes actifs permettent d'envisager l'utilisation, en ingénierie tissulaire, de matrices fonctionnalisées pouvant intégrer dans leurs structures des principes actifs (anti-inflammatoires, facteurs de croissance, antimitotique, ADN). Cette nouvelle classe de matrices "intelligentes" pourrait contribuer, dans un avenir proche, à l'ouverture de nouvelles applications cliniques pour l'ingénierie tissulaire squelettique. Parmi les tissus squelettiques cibles de l'ingénierie tissulaire, le disque intervertébral (DIV) revêt un intérêt particulier. En effet, la dégénérescence du disque intervertébral (DDI) représente vraisemblablement la première cause de douleur chronique du dos, qui touche un jour ou l'autre 80% de la population. Afin de pallier la DDI, l'injection de protéines recombinantes et la thérapie génique ont été envisagées. Cependant, la courte durée de vie des protéines *in vivo* et la faible accessibilité des cellules du nucleus pulposus rendent ces approches peu adaptées au traitement de la DDI. Des approches utilisant des matrices fonctionnalisées et cellularisées (cellules souches autologues) pourraient être une alternative intéressante aux traitements actuels de la DDI. Dans ce contexte, notre concept basé sur l'association de CSM issues du tissu adipeux à une matrice fonctionnalisée injectable et auto-réticulante pourrait s'avérer pertinent pour le remplacement du nucleus pulposus et la prévention de la dégénérescence du DIV.

Notre travail s'est intégré dans un programme de recherche pluridisciplinaire large, qui vise à proposer une nouvelle approche thérapeutique des atteintes cartilagineuses par thérapie cellulaire à l'aide de cellules autologues et de biomatériaux injectables. Nous espérons que nos études permettront la réalisation d'essais cliniques chez l'homme. Nos résultats pourraient donc ouvrir de nouvelles fenêtres thérapeutiques en médecine régénérative et particulièrement dans le traitement des atteintes ostéoarticulaires traumatiques ou liées à l'âge. La poursuite de notre travail pourrait également fournir d'importantes données sur les mécanismes moléculaires fondamentaux qui régissent la différenciation chondrogénique des cellules souches. Ces données pourraient être utiles à la thérapie cellulaire du cartilage mais aussi à la compréhension des maladies cartilagineuses dégénératives.

Les pathologies ostéoarticulaires ont été reconnues comme cause décennale par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui a déclaré les années 2000-2010 comme la "Bone and joint decade" (<http://www.boneandjointdecade.org/>). Il s'agit d'un programme de sensibilisation et d'incitation à la recherche dans un domaine que l'OMS soutient. La décennie de

l'os et des articulations entend s'attaquer aux grandes pathologies de l'appareil locomoteur comme l'ostéoporose, l'arthrose, l'arthrite, le mal de dos, les atteintes rachidiennes, les traumatismes des membres, et les malformations squelettiques infantiles. Dans ce contexte, notre travail apparaît en parfaite adéquation avec les préoccupations de l'OMS ce qui nous encourage à poursuivre nos démarches vers le développement de l'ingénierie tissulaire appliquée à la réparation des tissus squelettiques.

VII.  
BIBLIOGRAPHIE

1. Abu-Hijleh, G., Reid, O., and Scothorne, R.J. 1997. Cell death in the developing chick knee joint: I. Spatial and temporal patterns. *Clin Anat* 10:183-200.
2. Aigner, T., Bertling, W., Stoss, H., Weseloh, G., and von der Mark, K. 1993. Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 91:829-837.
3. Aigner, T., Dietz, U., Stoss, H., and von der Mark, K. 1995. Differential expression of collagen types I, II, III, and X in human osteophytes. *Lab Invest* 73:236-243.
4. Aigner, T., and Dudhia, J. 1997. Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis. *Ann Rheum Dis* 56:287-291.
5. Aigner, T., Kim, H.A., and Roach, H.I. 2004. Apoptosis in osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 30:639-653, xi.
6. Aigner, T., Rose, J., Martin, J., and Buckwalter, J. 2004. Aging theories of primary osteoarthritis: from epidemiology to molecular biology. *Rejuvenation Res* 7:134-145.
7. Aigner, T., Sachse, A., Gebhard, P.M., and Roach, H.I. 2006. Osteoarthritis: pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev* 58:128-149.
8. Aigner, T., and Stove, J. 2003. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* 55:1569-1593.
9. Akiyama, H., Chaboissier, M.C., Martin, J.F., Schedl, A., and de Crombrughe, B. 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16:2813-2828.
10. Akiyama, H., Lyons, J.P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J.M., Taketo, M.M., Nakamura, T., Behringer, R.R., et al. 2004. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* 18:1072-1087.
11. Akizuki, S., Yasukawa, Y., and Takizawa, T. 1997. Does arthroscopic abrasion arthroplasty promote cartilage regeneration in osteoarthritic knees with eburnation? A prospective study of high tibial osteotomy with abrasion arthroplasty versus high tibial osteotomy alone. *Arthroscopy* 13:9-17.
12. Ala-Kokko, L., Baldwin, C.T., Moskowitz, R.W., and Prockop, D.J. 1990. Single base mutation in the type II procollagen gene (COL2A1) as a cause of primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6565-6568.
13. Albrecht, D.R., Underhill, G.H., Wassermann, T.B., Sah, R.L., and Bhatia, S.N. 2006. Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments. *Nat Methods* 3:369-375.
14. Almqvist, K.F., Wang, L., Wang, J., Baeten, D., Cornelissen, M., Verdonk, R., Veys, E.M., and Verbruggen, G. 2001. Culture of chondrocytes in alginate surrounded by fibrin gel: characteristics of the cells over a period of eight weeks. *Ann Rheum Dis* 60:781-790.
15. Alsberg, E., Anderson, K.W., Albeiruti, A., Rowley, J.A., and Mooney, D.J. 2002. Engineering growing tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12025-12030.
16. Amir, G., Pirie, C.J., Rashad, S., and Revell, P.A. 1992. Remodelling of subchondral bone in osteoarthritis: a histomorphometric study. *J Clin Pathol* 45:990-992.
17. Andrews, G.P., Gorman, S.P., and Jones, D.S. 2005. Rheological characterisation of primary and binary interactive bioadhesive gels composed of cellulose derivatives designed as ophthalmic viscosurgical devices. *Biomaterials* 26:571-580.

18. Angermann, P., Riegels-Nielsen, P., and Pedersen, H. 1998. osteochondritis dissecans of the femoral condyle treated with periosteal transplantation-poor outcome in 14 patients followed for 6-9 years. *acta Orthop Scand* 69:595-597.
19. Archer, C.W., Dowthwaite, G.P., and Francis-West, P. 2003. Development of synovial joints. *Birth Defects Res Part C Embryo Today* 69:144-155.
20. Archer, C.W., and Francis-West, P. 2003. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 35:401-404.
21. Arokoski, J.P., Jurvelin, J.S., Vaatainen, U., and Helminen, H.J. 2000. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand J Med Sci Sports* 10:186-198.
22. Atala, A., Cima, L.G., Kim, W., Paige, K.T., Vacanti, J.P., Retik, A.B., and Vacanti, C.A. 1993. Injectable alginate seeded with chondrocytes as a potential treatment for vesicoureteral reflux. *J Urol* 150:745-747.
23. Ateshian, G.A. 2007. Artificial cartilage: weaving in three dimensions. *Nat Mater* 6:89-90.
24. Atik, O.S., Uslu, M.M., and Eksioğlu, F. 2005. Osteochondral multiple autograft transfer (OMAT) for the treatment of cartilage defects in the knee joint. *Bull Hosp Jt Dis* 63:37-40.
25. Awad, H.A., Wickham, M.Q., Leddy, H.A., Gimble, J.M., and Guilak, F. 2004. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 25:3211-3222.
26. Ayral, X. 2001. Injections in the treatment of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15:609-626.
27. Bachmann, G., Basad, E., Lommel, D., and Steinmeyer, J. 2004. [MRI in the follow-up of matrix-supported autologous chondrocyte transplantation (MACI) and microfracture]. *Radiologe* 44:773-782.
28. Bai, X., Xiao, Z., Pan, Y., Hu, J., Pohl, J., Wen, J., and Li, L. 2004. Cartilage-derived morphogenetic protein-1 promotes the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 325:453-460.
29. Bakay, A., Csonge, L., Papp, G., and Fekete, L. 1998. Osteochondral resurfacing of the knee joint with allograft. Clinical analysis of 33 cases. *Int Orthop* 22:277-281.
30. Barbucci, R., Lamponi, S., Borzacchiello, A., Ambrosio, L., Fini, M., Torricelli, P., and Giardino, R. 2002. Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials* 23:4503-4513.
31. Bassett, L.W., Grover, J.S., and Seeger, L.L. 1990. Magnetic resonance imaging of knee trauma. *Skeletal Radiol* 19:401-405.
32. Bates, G.P., Schor, S.L., and Grant, M.E. 1987. A comparison of the effects of different substrata on chondrocyte morphology and the synthesis of collagen types IX and X. *In Vitro Cell Dev Biol* 23:374-380.
33. Bell, D.M., Leung, K.K., Wheatley, S.C., Ng, L.J., Zhou, S., Ling, K.W., Sham, M.H., Koopman, P., Tam, P.P., and Cheah, K.S. 1997. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* 16:174-178.
34. Benito, M.J., veale, D.J., and fitzGerald, O. 2005. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Disease* 64:1263-1267.
35. Bentley, G., Biant, L.C., Carrington, R.W., Akmal, M., Goldberg, A., Williams, A.M., Skinner, J.A., and Pringle, J. 2003. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br* 85:223-230.
36. Benya, P.D., and Shaffer, J.D. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30:215-224.

37. Betre, H., Ong, S.R., Guilak, F., Chilkoti, A., Fermor, B., and Setton, L.A. 2006. Chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells in elastin-like polypeptide. *Biomaterials* 27:91-99.
38. Bland, Y.S., and Ashhurst, D.E. 2001. The hip joint: the fibrillar collagens associated with development and ageing in the rabbit. *J Anat* 198:17-27.
39. Blaney Davidson, E.N., Vitters, E.L., van der Kraan, P.M., and van den Berg, W.B. 2006. Expression of transforming growth factor-beta (TGFbeta) and the TGFbeta signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation. *Ann Rheum Dis* 65:1414-1421.
40. Blaschke, U.K., Eikenberry, E.F., Hulmes, D.J., Galla, H.J., and Bruckner, P. 2000. Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *J Biol Chem* 275:10370-10378.
41. Bluteau, G., Julien, M., Magne, D., Mallein-Gerin, F., Weiss, P., Daculsi, G., and Guicheux, J. 2007. VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes. *Bone* 40:568-576.
42. Bonamo, J.J., and Saperstein, A.L. 1994. Contemporary magnetic resonance imaging of the knee. The orthopedic surgeon's perspective. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 2:481-495.
43. Bonaventure, J., Kadhon, N., Cohen-Solal, L., Ng, K.H., Bourguignon, J., Lasselin, C., and Freisinger, P. 1994. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res* 212:97-104.
44. Bouchet, B.Y., Colon, M., Polotsky, A., Shikani, A.H., Hungerford, D.S., and Frondoza, C.G. 2000. Beta-1 integrin expression by human nasal chondrocytes in microcarrier spinner culture. *J Biomed Mater Res* 52:716-724.
45. Bourges, X., Weiss, P., Coudreuse, A., Daculsi, G., and Legeay, G. 2002. General properties of silylated hydroxyethylcellulose for potential biomedical applications. *Biopolymers* 63:232-238.
46. Bourges, X., Weiss, P., Daculsi, G., and Legeay, G. 2002. Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci* 99:215-228.
47. Braddock, M., and Quinn, A. 2004. targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. *Nature Reviews . Drug Discovery* 3:330-339.
48. Bradham, D.M., Passaniti, A., and Horton, W.E., Jr. 1995. Mesenchymal cell chondrogenesis is stimulated by basement membrane matrix and inhibited by age-associated factors. *Matrix Biol* 14:561-571.
49. Brandt, K.D., Mazzuca, S.A., Katz, B.P., Lane, K.A., Buckwalter, K.A., Yocum, D.E., Wolfe, F., Schnitzer, T.J., Moreland, L.W., Manzi, S., et al. 2005. Effects of doxycycline on progression of osteoarthritis: results of a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Arthritis Rheum* 52:2015-2025.
50. Brandt, K.D., Smith, G.N., and Myers, S.L. 2004. Hyaluronan injection affects neither osteoarthritis progression nor loading of the OA knee in dogs. *Biorheology* 41:493-502.
51. Brewton, R.G., Wright, D.W., and Mayne, R. 1991. Structural and functional comparison of type IX collagen-proteoglycan from chicken cartilage and vitreous humor. *J Biol Chem* 266:4752-4757.

52. Briggs, T.W., Mahroof, S., David, L.A., Flannelly, J., Pringle, J., and Bayliss, M. 2003. Histological evaluation of chondral defects after autologous chondrocyte implantation of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 85:1077-1083.
53. Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L. 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331:889-895.
54. Brittberg, M., Peterson, L., Sjogren-Jansson, E., Tallheden, T., and Lindahl, A. 2003. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3:109-115.
55. Brodtkin, K.R., Garcia, A.J., and Levenston, M.E. 2004. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials* 25:5929-5938.
56. Buckwalter, J.A. 1998. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther* 28:192-202.
57. Buckwalter, J.A. 2002. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop*:21-37.
58. Buckwalter, J.A., and Brown, T.D. 2004. Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*:7-16.
59. Buckwalter, J.A., and Mankin, H.J. 1998. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 47:487-504.
60. Buckwalter, J.A., and Mankin, H.J. 1998. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 47:477-486.
61. Buckwalter, J.A., and Martin, J. 1995. Degenerative joint disease. *Clin Symp* 47:1-32.
62. Buckwalter, J.A., and Martin, J.A. 2006. Osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev* 58:150-167.
63. Buckwalter, J.A., Martin, J.A., Olmstead, M., Athanasiou, K.A., Rosenwasser, M.P., and Mow, V.C. 2003. Osteochondral repair of primate knee femoral and patellar articular surfaces: implications for preventing post-traumatic osteoarthritis. *Iowa Orthop J* 23:66-74.
64. Bueno, E.M., Bilgen, B., and Barabino, G.A. 2005. Wavy-walled bioreactor supports increased cell proliferation and matrix deposition in engineered cartilage constructs. *Tissue Eng* 11:1699-1709.
65. Bulic, K. 1996. Articular chondrocytes interact with basement membrane Matrigel through laminin active binding sites. *Acta Med Croatica* 50:69-74.
66. Burdick, J.A., and Anseth, K.S. 2002. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials* 23:4315-4323.
67. Burjanadze, T.V. 1979. Hydroxyproline content and location in relation to collagen thermal stability. *Biopolymers* 18:931-938.
68. Canty, E.G., and Kadler, K.E. 2005. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 118:1341-1353.
69. Caplan, A.I., and Bruder, S.P. 2001. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 7:259-264.
70. Carossino, A.M., Recenti, R., Carossino, R., Piscitelli, E., Gozzini, A., Martinetti, V., Mavilia, C., Franchi, A., Danielli, D., Aglietti, P., et al. 2007. Methodological models for in vitro amplification and maintenance of human articular chondrocytes from elderly patients. *Biogerontology*.
71. Carranza-Bencano, A., Armas-Padron, J.R., Gili-Miner, M., and Lozano, M.A. 2000. Carbon fiber implants in osteochondral defects of the rabbit patella. *Biomaterials* 21:2171-2176.

72. Chaipinyo, K., Oakes, B.W., and van Damme, M.P. 2002. Effects of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis of low-density, primary bovine chondrocytes cultured in collagen I gels. *J Orthop Res* 20:1070-1078.
73. Chang, C.H., Lin, F.H., Lin, C.C., Chou, C.H., and Liu, H.C. 2004. Cartilage tissue engineering on the surface of a novel gelatin-calcium-phosphate biphasic scaffold in a double-chamber bioreactor. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 71:313-321.
74. Chang, C.H., Liu, H.C., Lin, C.C., Chou, C.H., and Lin, F.H. 2003. Gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 24:4853-4858.
75. Chang, J., and Poole, C.A. 1996. Sequestration of type VI collagen in the pericellular microenvironment of adult chondrocytes cultured in agarose. *Osteoarthritis Cartilage* 4:275-285.
76. Cheah, K.S., Lau, E.T., Au, P.K., and Tam, P.P. 1991. Expression of the mouse alpha 1(II) collagen gene is not restricted to cartilage during development. *Development* 111:945-953.
77. Chen, F.H., Rousche, K.T., and Tuan, R.S. 2006. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2:373-382.
78. Chen, H.C., Lee, H.P., Sung, M.L., Liao, C.J., and Hu, Y.C. 2004. A novel rotating-shaft bioreactor for two-phase cultivation of tissue-engineered cartilage. *Biotechnol Prog* 20:1802-1809.
79. Chen, L., Fink, T., Ebbesen, P., and Zachar, V. 2006. Hypoxic treatment inhibits insulin-induced chondrogenesis of ATDC5 cells despite upregulation of DEC1. *Connect Tissue Res* 47:119-123.
80. Chen, L., Fink, T., Ebbesen, P., and Zachar, V. 2006. Optimized chondrogenesis of ATDC5 cells through sequential regulation of oxygen conditions. *Tissue Eng* 12:559-567.
81. Cherubino, P., Grassi, F.A., Bulgheroni, P., and Ronga, M. 2003. Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 11:10-15.
82. Chevalier, X., Giraudeau, B., Conrozier, T., Marliere, J., Kiefer, P., and Goupille, P. 2005. Safety study of intra articular injection of interleukin 1 receptor antagonist in patients with painful knee osteoarthritis: a multicenter study. *J Rheumatol* 32:1317-1323.
83. Chimal-Monroy, J., Rodriguez-Leon, J., Montero, J.A., Ganan, Y., Macias, D., Merino, R., and Hurle, J.M. 2003. Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol* 257:292-301.
84. Chu, C.R., Convery, F.R., Akeson, W.H., Meyers, M., and Amiel, D. 1999. articular cartilage transplantation-clinical results in the knee. *Clin Orthop Relat Res* 00:159-168.
85. Chubinskaya, S., Hakimiyan, A., Pacione, C., Yanke, A., Rappoport, L., Aigner, T., Rueger, D.C., and Loeser, R.F. 2007. Synergistic effect of IGF-1 and OP-1 on matrix formation by normal and OA chondrocytes cultured in alginate beads. *Osteoarthritis Cartilage* 15:421-430.
86. Chubinskaya, S., and Kuettner, K.E. 2003. Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1323-1340.
87. Cimmino, M.A., and Parodi, M. 2005. Risk factors for osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 34:29-34.
88. Clegg, D.O., Reda, D., Harris, C.L., Klein, M.A., O'Dell, J.R., Hooper, M.M., Bradley, J.D., Bingham, C.O., 3rd, Weisman, M.H., Jackson, C.G., et al. 2006.

- Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med* 354:795-808.
89. Clément-Bouheddi, C. 2005. Contribution à l'étude du traitement de lésions du cartilage fémoral par greffe de chondrocytes dans une colle de fibrine. *Thèse de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Université Claude Bernard*.
  90. Coggon, D., Reading, I., Croft, P., McLaren, M., Barrett, D., and Cooper, C. 2001. Knee osteoarthritis and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:622-627.
  91. Cohen, N.P., Foster, R.J., and Mow, V.C. 1998. Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state. *J Orthop Sports Phys Ther* 28:203-215.
  92. Colnot, C. 2005. Cellular and molecular interactions regulating skeletogenesis. *J Cell Biochem* 95:688-697.
  93. Coventry, M.B. 1984. Upper tibial osteotomy. *Clin Orthop Relat Res*:46-52.
  94. Curl, W.W., Krome, J., Gordon, E.S., Rushing, J., Smith, B.P., and Poehling, G.G. 1997. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 13:456-460.
  95. Darling, E.M., and Athanasiou, K.A. 2005. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res* 23:425-432.
  96. Davies, G.B., Oxford, J.T., Hausafus, L.C., Smoody, B.F., and Morris, N.P. 1998. Temporal and spatial expression of alternative splice-forms of the alpha1(XI) collagen gene in fetal rat cartilage. *Dev Dyn* 213:12-26.
  97. De Bari, C., Dell'Accio, F., and Luyten, F.P. 2001. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum* 44:85-95.
  98. De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., and Luyten, F.P. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44:1928-1942.
  99. de Crombrughe, B., Lefebvre, V., and Nakashima, K. 2001. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol* 13:721-727.
  100. Defrere, J., and Franckart, A. 1992. Teflon/polyurethane arthroplasty of the knee: the first 2 years preliminary clinical experience in a new concept of artificial resurfacing of full thickness cartilage lesions of the knee. *Acta Chir Belg* 92:217-227.
  101. DeLise, A.M., Fischer, L., and Tuan, R.S. 2000. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 8:309-334.
  102. Denker, A.E., Nicoll, S.B., and Tuan, R.S. 1995. Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1. *Differentiation* 59:25-34.
  103. Derfoul, A., Miyoshi, A.D., Freeman, D.E., and Tuan, R.S. 2007. Glucosamine promotes chondrogenic phenotype in both chondrocytes and mesenchymal stem cells and inhibits MMP-13 expression and matrix degradation. *Osteoarthritis Cartilage*.
  104. Devine, S.M., Peter, S., Martin, B.J., Barry, F., and McIntosh, K.R. 2001. Mesenchymal stem cells: stealth and suppression. *Cancer J* 7:S76-82.
  105. Di Cesare, P.E., S, R.F., Carlson, C.S., Fang, C., and Liu, C. 2006. Regional gene therapy for full-thickness articular cartilage lesions using naked DNA with a collagen matrix. *J Orthop Res* 24:1118-1127.
  106. Di Martino, A., Sittinger, M., and Risbud, M.V. 2005. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 26:5983-5990.
  107. Diab, M., Wu, J.J., and Eyre, D.R. 1996. Collagen type IX from human cartilage: a structural profile of intermolecular cross-linking sites. *Biochem J* 314 ( Pt 1):327-332.

108. Diduch, D.R., Jordan, L.C., Mierisch, C.M., and Balian, G. 2000. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy* 16:571-577.
109. Domm, C., Schunke, M., Christesen, K., and Kurz, B. 2002. Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage* 10:13-22.
110. Douchis, J.S., Coutts, R.D., and Amiel, D. 2000. Cartilage repair with autogenic perichondrium cell/poly(lactic acid) grafts: a two-year study in rabbits. *J Orthop Res* 18:512-515.
111. Drury, J.L., and Mooney, D.J. 2003. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24:4337-4351.
112. Dudhia, J. 2005. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell Mol Life Sci* 62:2241-2256.
113. Dudhia, J., Davidson, C.M., Wells, T.M., Hardingham, T.E., and Bayliss, M.T. 1996. Studies on the G3 domain of aggrecan from human cartilage. *Ann N Y Acad Sci* 785:245-247.
114. Elders, M.J. 2000. The increasing impact of arthritis on public health. *J Rheumatol* suppl 60:6-8.
115. Elisseeff, J. 2004. Injectable cartilage tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* 4:1849-1859.
116. Elisseeff, J., Anseth, K., Sims, D., McIntosh, W., Randolph, M., Yaremchuk, M., and Langer, R. 1999. Transdermal photopolymerization of poly(ethylene oxide)-based injectable hydrogels for tissue-engineered cartilage. *Plast Reconstr Surg* 104:1014-1022.
117. Elisseeff, J., McIntosh, W., Anseth, K., Riley, S., Ragan, P., and Langer, R. 2000. Photoencapsulation of chondrocytes in poly(ethylene oxide)-based semi-interpenetrating networks. *J Biomed Mater Res* 51:164-171.
118. Elisseeff, J.H., Lee, A., Kleinman, H.K., and Yamada, Y. 2002. Biological response of chondrocytes to hydrogels. *Ann NY Acad Sci* 961:118-122.
119. Ellsworth, J.L., Berry, J., Bukowski, T., Claus, J., Feldhaus, A., Holderman, S., Holdren, M.S., Lum, K.D., Moore, E.E., Raymond, F., et al. 2002. Fibroblast growth factor-18 is a trophic factor for mature chondrocytes and their progenitors. *Osteoarthritis Cartilage* 10:308-320.
120. Elsaid, K.A., Jay, G.D., and Chichester, C.O. 2007. Reduced expression and proteolytic susceptibility of lubricin/superficial zone protein may explain early elevation in the coefficient of friction in the joints of rats with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 56:108-116.
121. Elsaid, K.A., Jay, G.D., Warman, M.L., Rhee, D.K., and Chichester, C.O. 2005. Association of articular cartilage degradation and loss of boundary-lubricating ability of synovial fluid following injury and inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 52:1746-1755.
122. Enomoto, H., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Nomura, S., Himeno, M., Kitamura, Y., Kishimoto, T., and Komori, T. 2000. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem* 275:8695-8702.
123. Erickson, G.R., Gimble, J.M., Franklin, D.M., Rice, H.E., Awad, H., and Guilak, F. 2002. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 290:763-769.
124. Estrada, L.E., Dodge, G.R., Richardson, D.W., Farole, A., and Jimenez, S.A. 2001. Characterization of a biomaterial with cartilage-like properties expressing type X

- collagen generated in vitro using neonatal porcine articular and growth plate chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 9:169-177.
125. Eyre, D. 2002. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 4:30-35.
126. Eyre, D.R., Weis, M.A., and Wu, J.J. 2006. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur Cell Mater* 12:57-63.
127. Eyre, D.R., Wu, J.J., Fernandes, R.J., Pietka, T.A., and Weis, M.A. 2002. Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network. *Biochem Soc Trans* 30:893-899.
128. Facchini, A., Lisignoli, G., Cristino, S., Roseti, L., De Franceschi, L., Marconi, E., and Grigolo, B. 2006. Human chondrocytes and mesenchymal stem cells grown onto engineered scaffold. *Biorheology* 43:471-480.
129. Fan, H., Hu, Y., Qin, L., Li, X., Wu, H., and Lv, R. 2006. Porous gelatin-chondroitin-hyaluronate tri-copolymer scaffold containing microspheres loaded with TGF-beta1 induces differentiation of mesenchymal stem cells in vivo for enhancing cartilage repair. *J Biomed Mater Res A* 77:785-794.
130. Fan, Z., Bau, B., Yang, H., and Aigner, T. 2004. IL-1beta induction of IL-6 and LIF in normal articular human chondrocytes involves the ERK, p38 and NFkappaB signaling pathways. *Cytokine* 28:17-24.
131. Fan, Z., Bau, B., Yang, H., Soeder, S., and Aigner, T. 2005. Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* 52:136-143.
132. Fan, Z., Chubinskaya, S., Rueger, D.C., Bau, B., Haag, J., and Aigner, T. 2004. Regulation of anabolic and catabolic gene expression in normal and osteoarthritic adult human articular chondrocytes by osteogenic protein-1. *Clin Exp Rheumatol* 22:103-106.
133. Felson, D.T. 1992. Obesity and osteoarthritis of the knee. *Bull Rheum Dis* 41:6-7.
134. Felson, D.T. 2004. An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis. *Radiol Clin North Am* 42:1-9, v.
135. Felson, D.T., Goggins, J., Niu, J., Zhang, Y., and Hunter, D.J. 2004. The effect of body weight on progression of knee osteoarthritis is dependent on alignment. *Arthritis Rheum* 50:3904-3909.
136. Felson, D.T., and Neogi, T. 2004. Osteoarthritis: is it a disease of cartilage or of bone? *Arthritis Rheum* 50:341-344.
137. Felson, D.T., Zhang, Y., Hannan, M.T., Naimark, A., Weissman, B.N., Aliabadi, P., and Levy, D. 1995. The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 38:1500-1505.
138. Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J., and Pelletier, J.P. 2002. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39:237-246.
139. Ferretti, M., Srinivasan, A., Deschner, J., Gassner, R., Baliko, F., Piesco, N., Salter, R., and Agarwal, S. 2005. Anti-inflammatory effects of continuous passive motion on meniscal fibrocartilage. *J Orthop Res* 23:1165-1171.
140. Flannery, C.R., Little, C.B., Hughes, C.E., and Caterson, B. 1998. Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases. *Biochem Biophys Res Commun* 251:824-829.
141. Font, B., Eichenberger, D., Goldschmidt, D., Boutillon, M.M., and Hulmes, D.J. 1998. Structural requirements for fibromodulin binding to collagen and the control of type I collagen fibrillogenesis--critical roles for disulphide bonding and the C-terminal region. *Eur J Biochem* 254:580-587.

142. Fragonas, E., Valente, M., Pozzi-Mucelli, M., Toffanin, R., Rizzo, R., Silvestri, F., and Vittur, F. 2000. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials* 21:795-801.
143. Franchimont, P., Bassleer, C., and Henrotin, Y. 1989. Effects of hormones and drugs on cartilage repair. *J Rheumatol Suppl* 18:5-9.
144. Freed, L.E., Grande, D.A., Lingbin, Z., Emmanuel, J., Marquis, J.C., and Langer, R. 1994. Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 28:891-899.
145. Freed, L.E., Guilak, F., Guo, X.E., Gray, M.L., Tranquillo, R., Holmes, J.W., Radisic, M., Sefton, M.V., Kaplan, D., and Vunjak-Novakovic, G. 2006. Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling. *Tissue Eng* 12:3285-3305.
146. Fricain, J.C., Granja, P.L., Barbosa, M.A., de Jeso, B., Barthe, N., and Baquey, C. 2002. Cellulose phosphates as biomaterials. In vivo biocompatibility studies. *Biomaterials* 23:971-980.
147. Fukui, N., Purple, C.R., and Sandell, L.J. 2001. Cell biology of osteoarthritis: the chondrocyte's response to injury. *Curr Rheumatol Rep* 3:496-505.
148. Furukawa, T., Eyre, D.R., Koide, S., and Glimcher, M.J. 1980. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 62:79-89.
149. Fussenegger, M., Meinhart, J., Hobling, W., Kullich, W., Funk, S., and Bernatzky, G. 2003. Stabilized autologous fibrin-chondrocyte constructs for cartilage repair in vivo. *Ann Plast Surg* 51:493-498.
150. Gabay, C. 2002. Cytokine inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther* 2:135-149.
151. Galois, L., Freyria, A.M., Herbage, D., and Mainard, D. 2005. [Cartilage tissue engineering: state-of-the-art and future approaches]. *Pathol Biol (Paris)* 53:590-598.
152. Garcadiago-Cazares, D., Rosales, C., Katoh, M., and Chimal-Monroy, J. 2004. Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by alpha5beta1 integrin in the developing appendicular skeleton. *Development* 131:4735-4742.
153. Gardner, D.L. 1994. Problems and paradigms in joint pathology. *J Anat* 184:465-476.
154. Garrett, J.C. 1998. oqtéochondral allografts for reconstruction of articular defects of the knee. *Instr Course Lect* 47:517-522.
155. Ge, Z., Hu, Y., Heng, B.C., Yang, Z., Ouyang, H., Lee, E.H., and Cao, T. 2006. Osteoarthritis and therapy. *Arthritis Rheum* 55:493-500.
156. Gelse, K., and Schneider, H. 2006. Ex vivo gene therapy approaches to cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* 58:259-284.
157. Gerwin, N., Hops, C., and Lucke, A. 2006. Intraarticular drug delivery in osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev* 58:226-242.
158. Giannoudis, P.V., Tzioupis, C.C., and Tsiridis, E. 2006. Gene therapy in orthopaedics. *Injury* 37 Suppl 1:S30-40.
159. Gibson, J., White, M., Chapman, V., and Strachan, R. 1992. Arthroscopic lavage and debridement for osteoarthritis of the knee. *J Bone Joint Surg* 74B:534-537.
160. Gimble, J., and Guilak, F. 2003. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 5:362-369.
161. Girkontaite, I., Frischholz, S., Lammi, P., Wagner, K., Swoboda, B., Aigner, T., and Von der Mark, K. 1996. Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies. *Matrix Biol* 15:231-238.
162. Glass, G.G. 2006. Osteoarthritis. *Dis Mon* 52:343-362.
163. Glowacki, J., Trepman, E., and Folkman, J. 1983. Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 172:93-98.

164. Gold, G.E., Bergman, A.G., Pauly, J.M., Lang, P., Butts, R.K., Beaulieu, C.F., Hargreaves, B., Frank, L., Boutin, R.D., Macovski, A., et al. 1998. Magnetic resonance imaging of knee cartilage repair. *Top Magn Reson Imaging* 9:377-392.
165. Goldring, M.B. 2000. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep* 2:459-465.
166. Goldring, M.B. 2006. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20:1003-1025.
167. Goldring, M.B., Birkhead, J.R., Suen, L.F., Yamin, R., Mizuno, S., Glowacki, J., Arbisser, J.L., and Apperley, J.F. 1994. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* 94:2307-2316.
168. Goldring, M.B., Tsuchimochi, K., and Ijiri, K. 2006. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97:33-44.
169. Goldring, S.R., and Goldring, M.B. 2004. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*:S27-36.
170. Gomez-Barrena, E., Lindroos, L., Ceponis, A., Lopez-Franco, M., Sanchez-Pernaute, O., Monkkonen, J., Salo, J., Herrero-Beaumont, G., and Konttinen, Y. 2006. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is modified by intra-articular liposomal clodronate in an experimental model of arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 24:622-628.
171. Grad, S., Kupcsik, L., Gorna, K., Gogolewski, S., and Alini, M. 2003. The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. *Biomaterials* 24:5163-5171.
172. Grande, D.A., Mason, J., Light, E., and Dines, D. 2003. Stem cells as platforms for delivery of genes to enhance cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am* 85-A:111-116.
173. Grande, D.A., Pitman, M.I., Peterson, L., Menche, D., and Klein, M. 1989. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 7:208-218.
174. Gress, C.J., and Jacenko, O. 2000. Growth plate compressions and altered hematopoiesis in collagen X null mice. *J Cell Biol* 149:983-993.
175. Gruber, R., Mayer, C., Bobacz, K., Krauth, M.T., Graninger, W., Luyten, F.P., and Erlacher, L. 2001. Effects of cartilage-derived morphogenetic proteins and osteogenic protein-1 on osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells. *Endocrinology* 142:2087-2094.
176. Grunder, T., Gaissmaier, C., Fritz, J., Stoop, R., Hortschansky, P., Mollenhauer, J., and Aicher, W.K. 2004. Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis Cartilage* 12:559-567.
177. Guideline., A.C.o.R.S.o.O. 2000. Recommendation for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. *Arthritis Rheum* 43:1905-1915.
178. Guilak, F., Alexopoulos, L.G., Upton, M.L., Youn, I., Choi, J.B., Cao, L., Setton, L.A., and Haider, M.A. 2006. The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Ann NY Acad Sci* 1068:498-512.
179. Guilak, F., Fermor, B., Keefe, F.J., Kraus, V.B., Olson, S.A., Pisetsky, D.S., Setton, L.A., and Weinberg, J.B. 2004. The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clin Orthop Relat Res*:17-26.
180. Guilak, F., Jones, W.R., Ting-Beall, H.P., and Lee, G.M. 1999. The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 7:59-70.
181. Guilak, F., Ratcliffe, A., Lane, N., Rosenwasser, M.P., and Mow, V.C. 1994. Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J Orthop Res* 12:474-484.

182. Guo, X., Day, T.F., Jiang, X., Garrett-Beal, L., Topol, L., and Yang, Y. 2004. Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev* 18:2404-2417.
183. Haisch, A., Klaring, S., Groger, A., Gebert, C., and Sittinger, M. 2002. A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 259:316-321.
184. Hall, A.C., Horwitz, E.R., and Wilkins, R.J. 1996. The cellular physiology of articular cartilage. *Exp Physiol* 81:535-545.
185. Hall, B.K., and Miyake, T. 2000. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* 22:138-147.
186. Han, F., Adams, C.S., Tao, Z., Williams, C.J., Zaka, R., Tuan, R.S., Norton, P.A., and Hickok, N.J. 2005. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) regulates ATDC5 chondrogenic differentiation and fibronectin isoform expression. *J Cell Biochem* 95:750-762.
187. Hanada, K., Solchaga, L.A., Caplan, A.I., Hering, T.M., Goldberg, V.M., Yoo, J.U., and Johnstone, B. 2001. BMP-2 induction and TGF-beta 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. *J Cell Biochem* 81:284-294.
188. Hangody, L., and Fules, P. 2003. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 2:25-32.
189. Hangody, L., Kish, G., Karpati, Z., Szerb, I., and Udvarhelyi, I. 1997. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 5:262-267.
190. HAS. 2005. evaluation de la greffe chondrocytaire autologue du genou-rapport d'étape.pp54.
191. Hatakeyama, Y., Nguyen, J., Wang, X., Nuckolls, G.H., and Shum, L. 2003. Smad signaling in mesenchymal and chondroprogenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3:13-18.
192. Hauselmann, H.J., Fernandes, R.J., Mok, S.S., Schmid, T.M., Block, J.A., Aydelotte, M.B., Kuettner, K.E., and Thonar, E.J. 1994. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 107 ( Pt 1):17-27.
193. Hecht, J., Seitz, V., Urban, M., Wagner, F., Robinson, P.N., Stiege, A., Dieterich, C., Kornak, U., Wilkening, U., Brieske, N., et al. 2007. Detection of novel skeletogenesis target genes by comprehensive analysis of a Runx2(-/-) mouse model. *Gene Expr Patterns* 7:102-112.
194. Hedlund, H., Hedbom, E., Heinegard, D., Mengarelli-Widholm, S., Reinholt, F.P., and Svensson, O. 1999. Association of the aggrecan keratan sulfate-rich region with collagen in bovine articular cartilage. *J Biol Chem* 274:5777-5781.
195. Henderson, I.J., Tuy, B., Connell, D., Oakes, B., and Hettwer, W.H. 2003. Prospective clinical study of autologous chondrocyte implantation and correlation with MRI at three and 12 months. *J Bone Joint Surg Br* 85:1060-1066.
196. Hendrickson, D.A., Nixon, A.J., Grande, D.A., Todhunter, R.J., Minor, R.M., Erb, H., and Lust, G. 1994. Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J Orthop Res* 12:485-497.
197. Hermansson, M., Sawaji, Y., Bolton, M., Alexander, S., Wallace, A., Begum, S., Wait, R., and Saklatvala, J. 2004. Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J Biol Chem* 279:43514-43521.

198. Hickey, M., Ohta, I., Shigetomi, M., Hurley, J., Kuwata, N., and O'Brien, B. 1994. vascularized heterotopic osteochondral allografts in a rat model following long-term immunosuppression. *J Reconstr Microsurg* 10:255-260.
199. Hirao, M., Tamai, N., Tsumaki, N., Yoshikawa, H., and Myoui, A. 2006. Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J Biol Chem* 281:31079-31092.
200. Hoemann, C.D., Hurtig, M., Rossomacha, E., Sun, J., Chevrier, A., Shive, M.S., and Buschmann, M.D. 2005. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am* 87:2671-2686.
201. Holden, P., Canty, E.G., Mortier, G.R., Zabel, B., Spranger, J., Carr, A., Grant, M.E., Loughlin, J.A., and Briggs, M.D. 1999. Identification of novel pro-alpha2(I) collagen gene mutations in two families with distinctive oligo-epiphyseal forms of multiple epiphyseal dysplasia. *Am J Hum Genet* 65:31-38.
202. Holder, N. 1977. An experimental investigation into the early development of the chick elbow joint. *J Embryol Exp Morphol* 39:115-127.
203. Holland, T.A., Bodde, E.W., Cuijpers, V.M., Baggett, L.S., Tabata, Y., Mikos, A.G., and Jansen, J.A. 2006. Degradable hydrogel scaffolds for in vivo delivery of single and dual growth factors in cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage*.
204. Holmgren, S.K., Taylor, K.M., Bretscher, L.E., and Raines, R.T. 1998. Code for collagen's stability deciphered. *Nature* 392:666-667.
205. Homminga, G.N., Bulstra, S.K., Bouwmeester, P.S., and van der Linden, A.J. 1990. Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 72:1003-1007.
206. Homminga, G.N., Bulstra, S.K., Kuijer, R., and van der Linden, A.J. 1991. Repair of sheep articular cartilage defects with a rabbit costal perichondrial graft. *Acta Orthop Scand* 62:415-418.
207. Homminga, G.N., Buma, P., Koot, H.W., van der Kraan, P.M., and van den Berg, W.B. 1993. Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro. *Acta Orthop Scand* 64:441-445.
208. Horas, U., Pelinkovic, D., Herr, G., Aigner, T., and Schnettler, R. 2003. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am* 85-A:185-192.
209. Horner, A., Kemp, P., Summers, C., Bord, S., Bishop, N.J., Kelsall, A.W., Coleman, N., and Compston, J.E. 1998. Expression and distribution of transforming growth factor-beta isoforms and their signaling receptors in growing human bone. *Bone* 23:95-102.
210. Hotten, G.C., Matsumoto, T., Kimura, M., Bechtold, R.F., Kron, R., Ohara, T., Tanaka, H., Satoh, Y., Okazaki, M., Shirai, T., et al. 1996. Recombinant human growth/differentiation factor 5 stimulates mesenchyme aggregation and chondrogenesis responsible for the skeletal development of limbs. *Growth Factors* 13:65-74.
211. Hoyland, J.A., Thomas, J.T., Donn, R., Marriott, A., Ayad, S., Boot-Handford, R.P., Grant, M.E., and Freemont, A.J. 1991. Distribution of type X collagen mRNA in normal and osteoarthritic human cartilage. *Bone Miner* 15:151-163.
212. Huang, X., Yang, D., Yan, W., Shi, Z., Feng, J., Gao, Y., Weng, W., and Yan, S. 2007. Osteochondral repair using the combination of fibroblast growth factor and amorphous calcium phosphate/poly(l-lactic acid) hybrid materials. *Biomaterials*.
213. Huard, J., Cao, B., and Qu-Petersen, Z. 2003. Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69:230-237.

214. Huber, M., Trattng, S., and Lintner, F. 2000. Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol* 35:573-580.
215. Humphries, J.D., Byron, A., and Humphries, M.J. 2006. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 119:3901-3903.
216. Hung, C.T., LeRoux, M.A., Palmer, G.D., Chao, P.H., Lo, S., and Valhmu, W.B. 2003. Disparate aggrecan gene expression in chondrocytes subjected to hypotonic and hypertonic loading in 2D and 3D culture. *Biorheology* 40:61-72.
217. Hunziker, E.B. 2002. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10:432-463.
218. Hunziker, E.B., and Kapfinger, E. 1998. Removal of proteoglycans from the surface of defects in articular cartilage transiently enhances coverage by repair cells. *J Bone Joint Surg Br* 80:144-150.
219. Ichimura, S., Wu, J.J., and Eyre, D.R. 2000. Two-dimensional peptide mapping of cross-linked type IX collagen in human cartilage. *Arch Biochem Biophys* 378:33-39.
220. Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A., Kou, I., Seki, S., Takato, T., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Ikegawa, S., and Chung, U.I. 2004. The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum* 50:3561-3573.
221. Inada, M., Yasui, T., Nomura, S., Miyake, S., Deguchi, K., Himeno, M., Sato, M., Yamagiwa, H., Kimura, T., Yasui, N., et al. 1999. Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev Dyn* 214:279-290.
222. Insall, J. 1974. The Pridie debridement operation for osteoarthritis of the knee. *Clin Orthop Relat Res*:61-67.
223. Isogai, N., Kusuhara, H., Ikada, Y., Ohtani, H., Jacquet, R., Hillyer, J., Lowder, E., and Landis, W.J. 2006. Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng* 12:691-703.
224. Itay, S., Abramovici, A., and Nevo, Z. 1987. Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. *Clin Orthop*:284-303.
225. Ito, M.M., and Kida, M.Y. 2000. Morphological and biochemical re-evaluation of the process of cavitation in the rat knee joint: cellular and cell strata alterations in the interzone. *J Anat* 197 Pt 4:659-679.
226. Iwamoto, M., Higuchi, Y., Enomoto-Iwamoto, M., Kurisu, K., Koyama, E., Yeh, H., Rosenbloom, J., and Pacifici, M. 2001. The role of ERG (ets related gene) in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 9 Suppl A:S41-47.
227. Iwamoto, M., Higuchi, Y., Koyama, E., Enomoto-Iwamoto, M., Kurisu, K., Yeh, H., Abrams, W.R., Rosenbloom, J., and Pacifici, M. 2000. Transcription factor ERG variants and functional diversification of chondrocytes during limb long bone development. *J Cell Biol* 150:27-40.
228. Iwamoto, M., Koyama, E., Enomoto-Iwamoto, M., and Pacifici, M. 2005. The balancing act of transcription factors C-1-1 and Runx2 in articular cartilage development. *Biochem Biophys Res Commun* 328:777-782.
229. Iwanaga, H., Matsumoto, T., Enomoto, H., Okano, K., Hishikawa, Y., Shindo, H., and Koji, T. 2005. Enhanced expression of insulin-like growth factor-binding proteins in human osteoarthritic cartilage detected by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Osteoarthritis Cartilage* 13:439-448.
230. Jackson, D.W., Lator, P.A., Aberman, H.M., and Simon, T.M. 2001. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am* 83-A:53-64.

231. Jakob, R.P., Franz, T., Gautier, E., and Mainil-Varlet, P. 2002. Autologous osteochondral grafting in the knee: indication, results, and reflections. *Clin Orthop Relat Res*:170-184.
232. Jin, C.Z., Park, S.R., Choi, B.H., Lee, K.Y., Kang, C.K., and Min, B.H. 2007. Human Amniotic Membrane as a Delivery Matrix for Articular Cartilage Repair. *Tissue Eng.*
233. Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., and Yoo, J.U. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238:265-272.
234. Kafienah, W., Jakob, M., Demarteau, O., Frazer, A., Barker, M.D., Martin, I., and Hollander, A.P. 2002. Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Eng* 8:817-826.
235. Kaiser, M., Haag, J., Soder, S., Bau, B., and Aigner, T. 2004. Bone morphogenetic protein and transforming growth factor beta inhibitory Smads 6 and 7 are expressed in human adult normal and osteoarthritic cartilage in vivo and are differentially regulated in vitro by interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* 50:3535-3540.
236. Kang, S.W., Jeon, O., and Kim, B.S. 2005. Poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as an injectable scaffold for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng* 11:438-447.
237. Kang, S.W., Yoon, J.R., Lee, J.S., Kim, H.J., Lim, H.W., Lim, H.C., Park, J.H., and Kim, B.S. 2006. The use of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as injectable cell carriers for cartilage regeneration in rabbit knees. *J Biomater Sci Polym Ed* 17:925-939.
238. Kaps, C., Bramlage, C., Smolian, H., Haisch, A., Ungethum, U., Burmester, G.R., Sittinger, M., Gross, G., and Haupl, T. 2002. Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum* 46:149-162.
239. Katayama, R., Wakitani, S., Tsumaki, N., Morita, Y., Matsushita, I., Gejo, R., and Kimura, T. 2004. Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow. *Rheumatology (Oxford)*.
240. Kato, Y., and Iwamoto, M. 1990. Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *J Biol Chem* 265:5903-5909.
241. Kaul, G., Cucchiari, M., Arntzen, D., Zurakowski, D., Menger, M.D., Kohn, D., Trippel, S.B., and Madry, H. 2006. Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J Gene Med* 8:100-111.
242. Khalafi, A., Schmid, T.M., Neu, C., and Reddi, A.H. 2007. Increased accumulation of superficial zone protein (SZP) in articular cartilage in response to bone morphogenetic protein-7 and growth factors. *J Orthop Res* 25:293-303.
243. Kiani, C., Chen, L., Wu, Y.J., Yee, A.J., and Yang, B.B. 2002. Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 12:19-32.
244. Kiani, C., Lee, V., Cao, L., Chen, L., Wu, Y., Zhang, Y., Adams, M.E., and Yang, B.B. 2001. Roles of aggrecan domains in biosynthesis, modification by glycosaminoglycans and product secretion. *Biochem J* 354:199-207.
245. Kim, H.K., Moran, M.E., and Salter, R.B. 1991. The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 73:1301-1315.
246. Kim, T.K., Sharma, B., Williams, C.G., Ruffner, M.A., Malik, A., McFarland, E.G., and Elisseeff, J.H. 2003. Experimental model for cartilage tissue engineering to regenerate the zonal organization of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 11:653-664.

247. Kimura, S., and Shiota, K. 1996. Sequential changes of programmed cell death in developing fetal mouse limbs and its possible roles in limb morphogenesis. *J Morphol* 229:337-346.
248. Kimura, T., Nakata, K., Tsumaki, N., Miyamoto, S., Matsui, Y., Ebara, S., and Ochi, T. 1996. Progressive degeneration of articular cartilage and intervertebral discs. An experimental study in transgenic mice bearing a type IX collagen mutation. *Int Orthop* 20:177-181.
249. Kirsch, T., Nah, H.D., Shapiro, I.M., and Pacifici, M. 1997. Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *J Cell Biol* 137:1149-1160.
250. Knecht, S., Erggelet, C., Endres, M., Sittinger, M., Kaps, C., and Stussi, E. 2007. Mechanical testing of fixation techniques for scaffold-based tissue-engineered grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*.
251. Knudson, W., Casey, B., Nishida, Y., Eger, W., Kuettner, K.E., and Knudson, C.B. 2000. Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis. *Arthritis Rheum* 43:1165-1174.
252. Knutsen, G., Engebretsen, L., Ludvigsen, T.C., Drogset, J.O., Grontvedt, T., Solheim, E., Strand, T., Roberts, S., Isaksen, V., and Johansen, O. 2004. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 86-A:455-464.
253. Kose, G.T., Korkusuz, F., Ozkul, A., Soysal, Y., Ozdemir, T., Yildiz, C., and Hasirci, V. 2005. Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials* 26:5187-5197.
254. Krampera, M., Pasini, A., Pizzolo, G., Cosmi, L., Romagnani, S., and Annunziato, F. 2006. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol* 6:435-441.
255. Kronenberg, H.M. 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423:332-336.
256. Kuhn, K., and Eble, J. 1994. The structural bases of integrin-ligand interactions. *Trends Cell Biol* 4:256-261.
257. Kuroda, R., Ishida, K., Matsumoto, T., Akisue, T., Fujioka, H., Mizuno, K., Ohgushi, H., Wakitani, S., and Kurosaka, M. 2007. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 15:226-231.
258. Kwan, K.M., Pang, M.K., Zhou, S., Cowan, S.K., Kong, R.Y., Pfordte, T., Olsen, B.R., Sillence, D.O., Tam, P.P., and Cheah, K.S. 1997. Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: implications for function. *J Cell Biol* 136:459-471.
259. Labos, M. 2004. Place du traitement non pharmacologique dans la prise en charge de la gonarthrose chez 60 patients. *Université Paris VI-Pierre et Marie Curie-U.F.R de Saint Antoine*.
260. Lajeunesse, D. 2004. The role of bone in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12 Suppl A:S34-38.
261. Lane, J., Brighton, C.T., Ottens, H.R., and Lipton, M. 1977. Joint resurfacing in the rabbit using an autologous osteochondral graft. *J bone Joint Surg* 59:218-222.
262. Lane, N.E., Gore, L.R., Cummings, S.R., Hochberg, M.C., Scott, J.C., Williams, E.N., and Nevitt, M.C. 1999. Serum vitamin D levels and incident changes of radiographic hip osteoarthritis: a longitudinal study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arthritis Rheum* 42:854-860.
263. Langer, R., and Vacanti, J.P. 1993. Tissue engineering. *Science* 260:920-926.

264. Lawrence, R.C., Helmick, C.G., Arnett, F.C., Deyo, R.A., Felson, D.T., Giannini, E.H., Heyse, S.P., Hirsch, R., Hochberg, M.C., Hunder, G.G., et al. 1998. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 41:778-799.
265. Lee, C.H., Singla, A., and Lee, Y. 2001. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 221:1-22.
266. Lee, C.R., Grodzinsky, A.J., Hsu, H.P., and Spector, M. 2003. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *J Orthop Res* 21:272-281.
267. Lee, M.W., Choi, J., Yang, M.S., Moon, Y.J., Park, J.S., Kim, H.C., and Kim, Y.J. 2004. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun* 320:273-278.
268. Lefebvre, V. 2002. Toward understanding the functions of the two highly related Sox5 and Sox6 genes. *J Bone Miner Metab* 20:121-130.
269. Lefebvre, V., Li, P., and de Crombrughe, B. 1998. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *Embo J* 17:5718-5733.
270. Lefebvre, V., and Smits, P. 2005. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75:200-212.
271. Lequesne, M.G., Dang, N., and Lane, N.E. 1997. Sport practice and osteoarthritis of the limbs. *Osteoarthritis and Cartilage* 5:75-86.
272. Li, S.W., Prockop, D.J., Helminen, H., Fassler, R., Lapvetelainen, T., Kiraly, K., Peltari, A., Arokoski, J., Lui, H., Arita, M., et al. 1995. Transgenic mice with targeted inactivation of the Col2 alpha 1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and periosteal bone but no endochondral bone. *Genes Dev* 9:2821-2830.
273. Li, T.F., Dong, Y., Ionescu, A.M., Rosier, R.N., Zuscik, M.J., Schwarz, E.M., O'Keefe, R.J., and Drissi, H. 2004. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) inhibits Runx2 expression through the PKA signaling pathway. *Exp Cell Res* 299:128-136.
274. Li, T.J., Browne, R.M., and Matthews, J.B. 1997. Immunocytochemical expression of parathyroid hormone related protein (PTHrP) in odontogenic jaw cysts. *Br J Oral Maxillofac Surg* 35:275-279.
275. Li, Z., Yao, S., Alini, M., and Grad, S. 2007. Different response of articular chondrocyte subpopulations to surface motion. *Osteoarthritis Cartilage*.
276. Liao, E., Yaszemski, M., Krebsbach, P., and Hollister, S. 2007. Tissue-engineered cartilage constructs using composite hyaluronic acid/collagen I hydrogels and designed poly(propylene fumarate) scaffolds. *Tissue Eng* 13:537-550.
277. Liechty, K.W., MacKenzie, T.C., Shaaban, A.F., Radu, A., Moseley, A.M., Deans, R., Marshak, D.R., and Flake, A.W. 2000. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 6:1282-1286.
278. Lin, Z., Willers, C., Xu, J., and Zheng, M.H. 2006. The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Eng* 12:1971-1984.
279. Lippiello, L., Hall, D., and Mankin, H.J. 1977. Collagen synthesis in normal and osteoarthritic human cartilage. *J Clin Invest* 59:593-600.
280. Liu, Y., Shu, X.Z., and Prestwich, G.D. 2006. Osteochondral Defect Repair with Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in an Injectable, In Situ, Cross-Linked Synthetic Extracellular Matrix. *Tissue Eng*.
281. Livesley, P., doherty, M., Needoff, M., and Moulton, A. 1991. Arthroscopic lavage of osteoarthritic knee. *J Bone Joint Surg Br* 73:922-926.

282. Loeser, R.F. 2002. Integrins and cell signaling in chondrocytes. *Biorheology* 39:119-124.
283. Loeser, R.F., Chubinskaya, S., Pacione, C., and Im, H.J. 2005. Basic fibroblast growth factor inhibits the anabolic activity of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 in adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 52:3910-3917.
284. Loeser, R.F., Jr. 2004. Aging cartilage and osteoarthritis--what's the link? *Sci Aging Knowledge Environ* 2004:pe31.
285. Lorentzon, R., Alfredson, H., and Hildingsson, C. 1998. Treatment of deep cartilage defects of the patella with periosteal transplantation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 6:202-208.
286. Lories, R.J., and Luyten, F.P. 2005. Bone morphogenetic protein signaling in joint homeostasis and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:287-298.
287. Lubiatowski, P., Kruczynski, J., Gradys, A., Trzeciak, T., and Jaroszewski, J. 2006. Articular cartilage repair by means of biodegradable scaffolds. *Transplant Proc* 38:320-322.
288. Lyons, T.J., Stoddart, R.W., McClure, S.F., and McClure, J. 2005. The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint. *J Mol Histol* 36:207-215.
289. Madry, H., Kaul, G., Cucchiaroni, M., Stein, U., Zurakowski, D., Remberger, K., Menger, M.D., Kohn, D., and Trippel, S.B. 2005. Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). *Gene Ther* 12:1171-1179.
290. Magne, D., Bluteau, G., Faucheux, C., Palmer, G., Vignes-Colombeix, C., Pilet, P., Rouillon, T., Caverzasio, J., Weiss, P., Daculsi, G., et al. 2003. Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 18:1430-1442.
291. Malda, J., Kreijveld, E., Temenoff, J.S., van Blitterswijk, C.A., and Riesle, J. 2003. Expansion of human nasal chondrocytes on macroporous microcarriers enhances redifferentiation. *Biomaterials* 24:5153-5161.
292. Malda, J., van Blitterswijk, C.A., Grojec, M., Martens, D.E., Tramper, J., and Riesle, J. 2003. Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances redifferentiation. *Tissue Eng* 9:939-948.
293. Malda, J., van Blitterswijk, C.A., van Geffen, M., Martens, D.E., Tramper, J., and Riesle, J. 2004. Low oxygen tension stimulates the redifferentiation of dedifferentiated adult human nasal chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 12:306-313.
294. Malladi, P., Xu, Y., Chiou, M., Giaccia, A.J., and Longaker, M.T. 2006. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C1139-1146.
295. Mallein-Gerin, F., Ruggiero, F., Quinn, T.M., Bard, F., Grodzinsky, A.J., Olsen, B.R., and van der Rest, M. 1995. Analysis of collagen synthesis and assembly in culture by immortalized mouse chondrocytes in the presence or absence of alpha 1(IX) collagen chains. *Exp Cell Res* 219:257-265.
296. Mandl, E.W., van der Veen, S.W., Verhaar, J.A., and van Osch, G.J. 2004. Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity. *Tissue Eng* 10:109-118.
297. Mankin, H.J. 1982. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 64:460-466.
298. Mankin, H.J., Dorfman, H., Lippiello, L., and Zarins, A. 1971. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II.

- Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 53:523-537.
299. Marcacci, M., Berruto, M., Brocchetta, D., Delcogliano, A., Ghinelli, D., Gobbi, A., Kon, E., Pederzini, L., Rosa, D., Sacchetti, G.L., et al. 2005. Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res*:96-105.
300. Marcelino, J., Carpten, J.D., Suwairi, W.M., Gutierrez, O.M., Schwartz, S., Robbins, C., Sood, R., Makalowska, I., Baxevanis, A., Johnstone, B., et al. 1999. CACP, encoding a secreted proteoglycan, is mutated in camptodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis syndrome. *Nat Genet* 23:319-322.
301. Marco, F., Lopez-Oliva, F., Fernandez, F.-A., de, P.J., Perez, A., and Leon, C. 1993. osteochondral allografts for osteochondritis dissecans and osteonecrosis of the femoral condyles. *Int Orthop* 17:104-108.
302. Marshall, K.W. 1997. The current status of hylan therapy for the treatment of osteoarthritis. *Today's Ther. Trends* 15:99-108.
303. Martel-Pelletier, J., Di Battista, J.A., Lajeunesse, D., and Pelletier, J.P. 1998. IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis. *Inflamm Res* 47:90-100.
304. Martin, I., Obradovic, B., Treppo, S., Grodzinsky, A.J., Langer, R., Freed, L.E., and Vunjak-Novakovic, G. 2000. Modulation of the mechanical properties of tissue engineered cartilage. *Biorheology* 37:141-147.
305. Martin, I., Suetterlin, R., Baschong, W., Heberer, M., Vunjak-Novakovic, G., and Freed, L.E. 2001. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *J Cell Biochem* 83:121-128.
306. Martin, J.A., Brown, T., Heiner, A., and Buckwalter, J.A. 2004. Post-traumatic osteoarthritis: the role of accelerated chondrocyte senescence. *Biorheology* 41:479-491.
307. Martin, J.A., and Buckwalter, J.A. 2002. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biogerontology* 3:257-264.
308. Martin, J.A., and Buckwalter, J.A. 2002. Human chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biorheology* 39:145-152.
309. Martin, J.A., and Buckwalter, J.A. 2003. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am* 85-A:106-110.
310. Martson, M., Viljanto, J., Hurme, T., and Saukko, P. 1998. Biocompatibility of cellulose sponge with bone. *Eur Surg Res* 30:426-432.
311. Masuoka, K., Asazuma, T., Ishihara, M., Sato, M., Hattori, H., Ishihara, M., Yoshihara, Y., Matsui, T., Takase, B., Kikuchi, M., et al. 2005. Tissue engineering of articular cartilage using an allograft of cultured chondrocytes in a membrane-sealed atelocollagen honeycomb-shaped scaffold (ACHMS scaffold). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75:177-184.
312. Matsusue, Y., Yamamuro, T., and Hama, H. 1993. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy* 9:318-321.
313. Mauck, R.L., Soltz, M.A., Wang, C.C., Wong, D.D., Chao, P.H., Vallmu, W.B., Hung, C.T., and Ateshian, G.A. 2000. Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J Biomech Eng* 122:252-260.
314. McAlinden, A., Zhu, Y., and Sandell, L.J. 2002. Expression of type II procollagens during development of the human intervertebral disc. *Biochem Soc Trans* 30:831-838.

315. McAlindon, T.E., Felson, D.T., Zhang, Y., Hannan, M.T., Aliabadi, P., Weissman, B., Rush, D., Wilson, P.W., and Jacques, P. 1996. Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham Study. *Ann Intern Med* 125:353-359.
316. McAlindon, T.E., LaValley, M.P., Gulin, J.P., and Felson, D.T. 2000. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis. *Jama* 283:1469-1475.
317. McCoy, J.P., Jr., Schade, W.J., Siegle, R.J., Waldinger, T.P., Vanderveen, E.E., and Swanson, N.A. 1985. Characterization of the humoral immune response to bovine collagen implants. *Arch Dermatol* 121:990-994.
318. McEwan, P.A., Scott, P.G., Bishop, P.N., and Bella, J. 2006. Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans. *J Struct Biol* 155:294-305.
319. McKinley, T.O., Rudert, M.J., Koos, D.C., Tochigi, Y., Baer, T.E., and Brown, T.D. 2004. Pathomechanic determinants of posttraumatic arthritis. *Clin Orthop Relat Res*:S78-88.
320. Meech, R., Edelman, D.B., Jones, F.S., and Makarenkova, H.P. 2005. The homeobox transcription factor Barx2 regulates chondrogenesis during limb development. *Development* 132:2135-2146.
321. Mengshol, J.A., Vincenti, M.P., Coon, C.I., Barchowsky, A., and Brinckerhoff, C.E. 2000. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* 43:801-811.
322. Mercer, D.K., Nicol, P.F., Kimbembe, C., and Robins, S.P. 2003. Identification, expression, and tissue distribution of the three rat lysyl hydroxylase isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 307:803-809.
323. Mercier, N.R., Costantino, H.R., Tracy, M.A., and Bonassar, L.J. 2004. A novel injectable approach for cartilage formation in vivo using PLG microspheres. *Ann Biomed Eng* 32:418-429.
324. Mercier, N.R., Costantino, H.R., Tracy, M.A., and Bonassar, L.J. 2005. Poly(lactide-co-glycolide) microspheres as a moldable scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 26:1945-1952.
325. Messier, S.P., Gutekunst, D.J., Davis, C., and DeVita, P. 2005. Weight loss reduces knee-joint loads in overweight and obese older adults with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 52:2026-2032.
326. Messier, S.P., Loeser, R.F., Miller, G.D., Morgan, T.M., Rejeski, W.J., Sevick, M.A., Ettinger, W.H., Jr., Pahor, M., and Williamson, J.D. 2004. Exercise and dietary weight loss in overweight and obese older adults with knee osteoarthritis: the Arthritis, Diet, and Activity Promotion Trial. *Arthritis Rheum* 50:1501-1510.
327. Messner, K. 1993. Hydroxylapatite supported Dacron plugs for repair of isolated full-thickness osteochondral defects of the rabbit femoral condyle: mechanical and histological evaluations from 6-48 weeks. *J Biomed Mater Res* 27:1527-1532.
328. Messner, K. 1994. The concept of a permanent synthetic meniscus prosthesis: a critical discussion after 5 years of experimental investigations using Dacron and Teflon implants. *Biomaterials* 15:243-250.
329. Messner, K. 1994. Durability of artificial implants for repair of osteochondral defects of the medial femoral condyle in rabbits. *Biomaterials* 15:657-664.

330. Messner, K., and Gillquist, J. 1993. Synthetic implants for the repair of osteochondral defects of the medial femoral condyle: a biomechanical and histological evaluation in the rabbit knee. *Biomaterials* 14:513-521.
331. Messner, K., Lohmander, L.S., and Gillquist, J. 1993. Neocartilage after artificial cartilage repair in the rabbit: histology and proteoglycan fragments in joint fluid. *J Biomed Mater Res* 27:949-954.
332. Micheli, L.J., Browne, J.E., Erggelet, C., Fu, F., Mandelbaum, B., Moseley, J.B., and Zurakowski, D. 2001. Autologous chondrocyte implantation of the knee: multicenter experience and minimum 3-year follow-up. *Clin J Sport Med* 11:223-228.
333. Mierisch, C.M., Wilson, H.A., Turner, M.A., Milbrandt, T.A., Berthoux, L., Hammarskjold, M.L., Rekosh, D., Balian, G., and Diduch, D.R. 2003. Chondrocyte transplantation into articular cartilage defects with use of calcium alginate: the fate of the cells. *J Bone Joint Surg Am* 85-A:1757-1767.
334. Millward-Sadler, S.J., Wright, M.O., Davies, L.W., Nuki, G., and Salter, D.M. 2000. Mechanotransduction via integrins and interleukin-4 results in altered aggrecan and matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but not osteoarthritic, human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 43:2091-2099.
335. Minas, T. 2001. Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. *Clin Orthop*:S349-361.
336. Minina, E., Kreschel, C., Naski, M.C., Ornitz, D.M., and Vortkamp, A. 2002. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell* 3:439-449.
337. Miot, S., Woodfield, T., Daniels, A.U., Suetterlin, R., Peterschmitt, I., Heberer, M., van Blitterswijk, C.A., Riesle, J., and Martin, I. 2005. Effects of scaffold composition and architecture on human nasal chondrocyte redifferentiation and cartilaginous matrix deposition. *Biomaterials* 26:2479-2489.
338. Mitrovic, D.R. 1977. Development of the metatarsophalangeal joint of the chick embryo: morphological, ultrastructural and histochemical studies. *Am J Anat* 150:333-347.
339. Montembault, A., Tahiri, K., Korwin-Zmijowska, C., Chevalier, X., Corvol, M.T., and Domard, A. 2006. A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering. *Biochimie* 88:551-564.
340. Moore, E.E., Bendele, A.M., Thompson, D.L., Littau, A., Waggle, K.S., Reardon, B., and Ellsworth, J.L. 2005. Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 13:623-631.
341. Moran, J.M., Pazzano, D., and Bonassar, L.J. 2003. Characterization of polylactic acid-polyglycolic acid composites for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng* 9:63-70.
342. Moreland, L.W. 2003. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther* 5:54-67.
343. Morris, N.P., Oxford, J.T., Davies, G.B., Smoody, B.F., and Keene, D.R. 2000. Developmentally regulated alternative splicing of the alpha1(XI) collagen chain: spatial and temporal segregation of isoforms in the cartilage of fetal rat long bones. *J Histochem Cytochem* 48:725-741.
344. Moulharat, N., Lesur, C., Thomas, M., Rolland-Valognes, G., Pastoureau, P., Anract, P., De Ceuninck, F., and Sabatini, M. 2004. Effects of transforming growth factor-beta on aggrecanase production and proteoglycan degradation by human chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 12:296-305.
345. Muir, H. 1970. The intracellular matrix in the environment of connective tissue cells. *Clin Sci* 38:8P.

346. Mukherjee, D., Nissen, S.E., and Topol, E.J. 2001. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *Jama* 286:954-959.
347. Muller, B., and Kohn, D. 1999. [Indication for and performance of articular cartilage drilling using the Pridie method]. *Orthopade* 28:4-10.
348. Muller, F.A., Muller, L., Hofmann, I., Greil, P., Wenzel, M.M., and Staudenmaier, R. 2006. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 27:3955-3963.
349. Muragaki, Y., Mariman, E.C., van Beersum, S.E., Perala, M., van Mourik, J.B., Warman, M.L., Olsen, B.R., and Hamel, B.C. 1996. A mutation in the gene encoding the alpha 2 chain of the fibril-associated collagen IX, COL9A2, causes multiple epiphyseal dysplasia (EDM2). *Nat Genet* 12:103-105.
350. Murphy, G., and Lee, M.H. 2005. What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage? *Ann Rheum Dis* 64 Suppl 4:iv44-47.
351. Mussa, R., Hans, M.G., Enlow, D., and Goldberg, J. 1999. Condylar cartilage response to continuous passive motion in adult guinea pigs: A pilot study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 115:360-367.
352. Mustafa, Z., Chapman, K., Irlen, C., Carr, A.J., Clipsham, K., Chitnavis, J., Sinsheimer, J.S., Bloomfield, V.A., McCartney, M., Cox, O., et al. 2000. Linkage analysis of candidate genes as susceptibility loci for osteoarthritis-suggestive linkage of COL9A1 to female hip osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 39:299-306.
353. Myllyharju, J., and Kivirikko, K.I. 2001. Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med* 33:7-21.
354. Nagarajan, V., Kamitori, S., and Okuyama, K. 1999. Structure analysis of a collagen-model peptide with a (Pro-Hyp-Gly) sequence repeat. *J Biochem (Tokyo)* 125:310-318.
355. Najm, W.I., Reinsch, S., Hoehler, F., and al., e. 2004. S-adenosyl methionine (SAME) versus celecoxib for the treatment of osteoarthritis symptoms: a double-blind cross-over trial. *BMC Musculoskelet Disord* 5:6.
356. Nakahara, H., Dennis, J.E., Bruder, S.P., Haynesworth, S.E., Lennon, D.P., and Caplan, A.I. 1991. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res* 195:492-503.
357. Nalin, A.M., Greenlee, T.K., Jr., and Sandell, L.J. 1995. Collagen gene expression during development of avian synovial joints: transient expression of types II and XI collagen genes in the joint capsule. *Dev Dyn* 203:352-362.
358. Naumann, A., Dennis, J.E., Awadallah, A., Carrino, D.A., Mansour, J.M., Kastenbauer, E., and Caplan, A.I. 2002. Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem* 50:1049-1058.
359. Nelea, V., Luo, L., Demers, C.N., Antoniou, J., Petit, A., Lerouge, S., M, R.W., and Mwale, F. 2005. Selective inhibition of type X collagen expression in human mesenchymal stem cell differentiation on polymer substrates surface-modified by glow discharge plasma. *J Biomed Mater Res A* 75:216-223.
360. Nelson, F., Billingham, R.C., Pidoux, I., Reiner, A., Langworthy, M., McDermott, M., Malogne, T., Sitler, D.F., Kilambi, N.R., Lenczner, E., et al. 2006. Early post-traumatic osteoarthritis-like changes in human articular cartilage following rupture of the anterior cruciate ligament. *Osteoarthritis Cartilage* 14:114-119.
361. Nesic, D., Whiteside, R., Brittberg, M., Wendt, D., Martin, I., and Mainil-Varlet, P. 2006. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 58:300-322.
362. Neyret, P., Donell, S.T., and Dejour, H. 1994. Osteoarthritis of the knee following meniscectomy. *Br J Rheumatol* 33:267-268.

363. Ng, L.J., Tam, P.P., and Cheah, K.S. 1993. Preferential expression of alternatively spliced mRNAs encoding type II procollagen with a cysteine-rich amino-propeptide in differentiating cartilage and nonchondrogenic tissues during early mouse development. *Dev Biol* 159:403-417.
364. Ng, L.J., Wheatley, S., Muscat, G.E., Conway-Campbell, J., Bowles, J., Wright, E., Bell, D.M., Tam, P.P., Cheah, K.S., and Koopman, P. 1997. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* 183:108-121.
365. Ninomiya, Y., Gordon, M., van der Rest, M., Schmid, T., Linsenmayer, T., and Olsen, B.R. 1986. The developmentally regulated type X collagen gene contains a long open reading frame without introns. *J Biol Chem* 261:5041-5050.
366. Nishimura, I., Muragaki, Y., and Olsen, B.R. 1989. Tissue-specific forms of type IX collagen-proteoglycan arise from the use of two widely separated promoters. *J Biol Chem* 264:20033-20041.
367. Nixon, A.J., Brower-Toland, B.D., Bent, S.J., Saxer, R.A., Wilke, M.J., Robbins, P.D., and Evans, C.H. 2000. Insulinlike growth factor-I gene therapy applications for cartilage repair. *Clin Orthop*:S201-213.
368. Nixon, A.J., Fortier, L.A., Williams, J., and Mohammed, H. 1999. Enhanced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor-I-laden fibrin composites. *J Orthop Res* 17:475-487.
369. Notbohm, H., Nokelainen, M., Myllyharju, J., Fietzek, P.P., Muller, P.K., and Kivirikko, K.I. 1999. Recombinant human type II collagens with low and high levels of hydroxylysine and its glycosylated forms show marked differences in fibrillogenesis in vitro. *J Biol Chem* 274:8988-8992.
370. O'Driscoll, S.W., Keeley, F.W., and Salter, R.B. 1986. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am* 68:1017-1035.
371. O'Driscoll, S.W., and Salter, R.B. 1986. The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *Clin Orthop Relat Res*:131-140.
372. Obradovic, B., Martin, I., Padera, R.F., Treppo, S., Freed, L.E., and Vunjak-Novakovic, G. 2001. Integration of engineered cartilage. *J Orthop Res* 19:1089-1097.
373. Ochi, M., Uchio, Y., Kawasaki, K., Wakitani, S., and Iwasa, J. 2002. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 84:571-578.
374. Oehler, S., Neureiter, D., Meyer-Scholten, C., and Aigner, T. 2002. Subtyping of osteoarthritic synoviopathy. *Clin Exp Rheumatol* 20:633-640.
375. Ogilvie-Harris, D.J., and Jackson, R.W. 1984. The arthroscopic treatment of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br* 66:660-665.
376. Oh, C.D., and Chun, J.S. 2003. Signaling mechanisms leading to the regulation of differentiation and apoptosis of articular chondrocytes by insulin-like growth factor-1. *J Biol Chem* 278:36563-36571.
377. Olsen, B.R. 1997. Collagen IX. *Int J Biochem Cell Biol* 29:555-558.
378. Ornitz, D.M. 2005. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:205-213.
379. Ortega, N., Behonick, D.J., Colnot, C., Cooper, D.N., and Werb, Z. 2005. Galectin-3 is a downstream regulator of matrix metalloproteinase-9 function during endochondral bone formation. *Mol Biol Cell* 16:3028-3039.

380. Ossendorf, C., Kaps, C., Kreuz, P.C., Burmester, G.R., Sittinger, M., and Erggelet, C. 2007. Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: Two year clinical results. *Arthritis Res Ther* 9:R41.
381. Otsuka, Y., Mizuta, H., Takagi, K., Iyama, K., Yoshitake, Y., Nishikawa, K., Suzuki, F., and Hiraki, Y. 1997. Requirement of fibroblast growth factor signaling for regeneration of epiphyseal morphology in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Dev Growth Differ* 39:143-156.
382. Outerbridge, H.K., Outerbridge, A.R., Outerbridge, R.E., and Smith, D.E. 1999. The use of lateral patellar autologous grafts for the repair of large osteochondral defects in the knee. *acta orthop bel* 65suppl 1:129-135.
383. Oxford, J.T., Doege, K.J., and Morris, N.P. 1995. Alternative exon splicing within the amino-terminal nontriple-helical domain of the rat pro-alpha 1(XI) collagen chain generates multiple forms of the mRNA transcript which exhibit tissue-dependent variation. *J Biol Chem* 270:9478-9485.
384. Paccola, C.A., Xavier, C.A., and Goncalves, R.P. 1979. Fresh immature articular cartilage allografts. A study on the integration of chondral and osteochondral grafts both in normal and in papain-treated knee joints of rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg* 93:253-259.
385. Pacifici, M., Golden, E.B., Adams, S.L., and Shapiro, I.M. 1991. Cell hypertrophy and type X collagen synthesis in cultured articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 192:266-270.
386. Pacifici, M., Koyama, E., and Iwamoto, M. 2005. Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: recent advances, but many lingering mysteries. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75:237-248.
387. Pacifici, M., Koyama, E., Shibukawa, Y., Wu, C., Tamamura, Y., Enomoto-Iwamoto, M., and Iwamoto, M. 2006. Cellular and molecular mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation. *Ann N Y Acad Sci* 1068:74-86.
388. Paige, K.T., Cima, L.G., Yaremchuk, M.J., Schloo, B.L., Vacanti, J.P., and Vacanti, C.A. 1996. De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs. *Plast Reconstr Surg* 97:168-178; discussion 179-180.
389. Paige, K.T., Cima, L.G., Yaremchuk, M.J., Vacanti, J.P., and Vacanti, C.A. 1995. Injectable cartilage. *Plast Reconstr Surg* 96:1390-1398; discussion 1399-1400.
390. Paletta, G.A., Arnoczky, S.P., and Warren, R.F. 1992. The repair of osteochondral defects using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs. *Am J Sports Med* 20:725-731.
391. Palmoski, M., Perricone, E., and Brandt, K.D. 1979. Development and reversal of a proteoglycan aggregation defect in normal canine knee cartilage after immobilization. *Arthritis Rheum* 22:508-517.
392. Panula, H.E., Helminen, H.J., and Kiviranta, I. 1997. Slowly progressive osteoarthritis after tibial valgus osteotomy in young beagle dogs. *Clin Orthop Relat Res*:192-202.
393. Park, J., Gelse, K., Frank, S., von der Mark, K., Aigner, T., and Schneider, H. 2006. Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat-derived cells. *J Gene Med* 8:112-125.
394. Patwari, P., Cook, M.N., DiMicco, M.A., Blake, S.M., James, I.E., Kumar, S., Cole, A.A., Lark, M.W., and Grodzinsky, A.J. 2003. Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: interaction with exogenous cytokines. *Arthritis Rheum* 48:1292-1301.

395. Pavelka, K., Gatterova, J., Olejarova, M., Machacek, S., Giacobelli, G., and Rovati, L.C. 2002. Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Arch Intern Med* 162:2113-2123.
396. Pavesio, A., Abatangelo, G., Borrione, A., Brocchetta, D., Hollander, A.P., Kon, E., Torasso, F., Zanasi, S., and Marcacci, M. 2003. Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft C) in the treatment of knee cartilage defects: preliminary clinical findings. *Novartis Found Symp* 249:203-217; discussion 229-233, 234-208, 239-241.
397. Pedersen, M.S., Moghaddam, A.Z., Bak, K., and Koch, J.S. 1995. The effect of bone drilling on pain in gonarthrosis. *Int Orthop* 19:12-15.
398. Pelttari, K., Winter, A., Steck, E., Goetzke, K., Hennig, T., Ochs, B.G., Aigner, T., and Richter, W. 2006. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum* 54:3254-3266.
399. Peretti, G.M., Randolph, M.A., Villa, M.T., Buragas, M.S., and Yaremchuk, M.J. 2000. Cell-based tissue-engineered allogeneic implant for cartilage repair. *Tissue Eng* 6:567-576.
400. Peterson, L., Brittberg, M., Kiviranta, I., Akerlund, E.L., and Lindahl, A. 2002. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med* 30:2-12.
401. Peterson, L., Minas, T., Brittberg, M., and Lindahl, A. 2003. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 2:17-24.
402. Pfander, D., Swoboda, B., and Kirsch, T. 2001. Expression of early and late differentiation markers (proliferating cell nuclear antigen, syndecan-3, annexin VI, and alkaline phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes. *Am J Pathol* 159:1777-1783.
403. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
404. Podskubka, A., Povysil, C., Kubes, R., Sprindrich, J., and Sedlacek, R. 2006. [Treatment of deep cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte transplantation on a hyaluronic Acid ester scaffolds (Hyalograft C)]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 73:251-263.
405. Poole, C.A. 1997. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat* 191 ( Pt 1):1-13.
406. Poole, C.A., Flint, M.H., and Beaumont, B.W. 1988. Chondrons extracted from canine tibial cartilage: preliminary report on their isolation and structure. *J Orthop Res* 6:408-419.
407. Praul, C.A., Ford, B.C., and Leach, R.M. 2002. Effect of fibroblast growth factors 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 10 on avian chondrocyte proliferation. *J Cell Biochem* 84:359-366.
408. Provot, S., and Schipani, E. 2005. Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem Biophys Res Commun* 328:658-665.
409. Pulkkinen, H., Tiitu, V., Lammentausta, E., Laasanen, M.S., Hamalainen, E.R., Kiviranta, I., and Lammi, M.J. 2006. Cellulose sponge as a scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomed Mater Eng* 16:S29-35.
410. Quintavalla, J., Uziel-Fusi, S., Yin, J., Boehnlein, E., Pastor, G., Blancuzzi, V., Singh, H.N., Kraus, K.H., O'Byrne, E., and Pellas, T.C. 2002. Fluorescently labeled

- mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials* 23:109-119.
411. Rahfoth, B., Weisser, J., Sternkopf, F., Aigner, T., von der Mark, K., and Brauer, R. 1998. Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 6:50-65.
412. Rangger, C., Klestil, T., Gloetzer, W., Kemmler, G., and Benedetto, K.P. 1995. Osteoarthritis after arthroscopic partial meniscectomy. *Am J Sports Med* 23:240-244.
413. Redini, F. 2001. [Structure and regulation of articular cartilage proteoglycan expression]. *Pathol Biol (Paris)* 49:364-375.
414. Reginato, A.M., Iozzo, R.V., and Jimenez, S.A. 1994. Formation of nodular structures resembling mature articular cartilage in long-term primary cultures of human fetal epiphyseal chondrocytes on a hydrogel substrate. *Arthritis Rheum* 37:1338-1349.
415. Reinholz, G.G., Lu, L., Saris, D.B., Yaszemski, M.J., and O'Driscoll, S.W. 2004. Animal models for cartilage reconstruction. *Biomaterials* 25:1511-1521.
416. Revell, P.A., Mayston, V., Llor, P., and Mapp, P. 1988. The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Ann Rheum Dis* 47:300-307.
417. Rhee, D.K., Marcelino, J., Baker, M., Gong, Y., Smits, P., Lefebvre, V., Jay, G.D., Stewart, M., Wang, H., Warman, M.L., et al. 2005. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest* 115:622-631.
418. Rogers, B.A., Murphy, C.L., Cannon, S.R., and Briggs, T.W. 2006. Topographical variation in glycosaminoglycan content in human articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 88:1670-1674.
419. Ronga, M., Grassi, F.A., and Bulgheroni, P. 2004. Arthroscopic autologous chondrocyte implantation for the treatment of a chondral defect in the tibial plateau of the knee. *Arthroscopy* 20:79-84.
420. Roth, V., and Mow, V.C. 1980. The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. *J Bone Joint Surg Am* 62:1102-1117.
421. Roughley, P.J., Nguyen, Q., and Mort, J.S. 1991. Mechanisms of proteoglycan degradation in human articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* 27:52-54.
422. Rubak, J.M., Poussa, M., and Ritsila, V. 1982. Chondrogenesis in repair of articular cartilage defects by free periosteal grafts in rabbits. *Acta Orthop Scand* 53:181-186.
423. Rudolphi, K., Gerwin, N., Verzijl, N., van der Kraan, P., and van den Berg, W. 2003. Pralnacasan, an inhibitor of interleukin-1beta converting enzyme, reduces joint damage in two murine models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 11:738-746.
424. Ryan, M.C., Sieraski, M., and Sandell, L.J. 1990. The human type II procollagen gene: identification of an additional protein-coding domain and location of potential regulatory sequences in the promoter and first intron. *Genomics* 8:41-48.
425. Saas, J., Haag, J., Rueger, D., Chubinskaya, S., Sohler, F., Zimmer, R., Bartnik, E., and Aigner, T. 2006. IL-1beta, but not BMP-7 leads to a dramatic change in the gene expression pattern of human adult articular chondrocytes--portraying the gene expression pattern in two donors. *Cytokine* 36:90-99.
426. Sahni, M., Ambrosetti, D.C., Mansukhani, A., Gertner, R., Levy, D., and Basilico, C. 1999. FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev* 13:1361-1366.
427. Sandell, L.J., and Aigner, T. 2001. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 3:107-113.

428. Sandell, L.J., Morris, N., Robbins, J.R., and Goldring, M.B. 1991. Alternatively spliced type II procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development: differential expression of the amino-propeptide. *J Cell Biol* 114:1307-1319.
429. Saraf, A., and Mikos, A.G. 2006. Gene delivery strategies for cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 58:592-603.
430. Schipani, E. 2005. Hypoxia and HIF-1 alpha in chondrogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 16:539-546.
431. Schipani, E., Ryan, H.E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., and Johnson, R.S. 2001. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* 15:2865-2876.
432. Schlessinger, J., Lax, I., and Lemmon, M. 1995. Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell* 83:357-360.
433. Schmidt, H., and Hasse, E. 1989. [Arthroscopic surgical treatment of circumscribed cartilage damage with spongiolization or Pridie drilling]. *Beitr Orthop Traumatol* 36:35-37.
434. Schmitz, M., Becker, A., Schmitz, A., Weirich, C., Paulsson, M., Zaucke, F., and Dinser, R. 2006. Disruption of extracellular matrix structure may cause pseudoachondroplasia phenotypes in the absence of impaired cartilage oligomeric matrix protein secretion. *J Biol Chem* 281:32587-32595.
435. Schnabel, M., Marlovits, S., Eckhoff, G., Fichtel, I., Gotzen, L., Vecsei, V., and Schlegel, J. 2002. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 10:62-70.
436. Schneider, U., and Andereya, S. 2003. [First results of a prospective randomized clinical trial on traditional chondrocyte transplantation vs CaReS-Technology]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 141:496-497.
437. Schouten, J.S., de Bie, R.A., and Swaen, G. 2002. An update on the relationship between occupational factors and osteoarthritis of the hip and knee. *Curr Opin Rheumatol*. 14:89-90.
438. Scott, D.L., and Kingsley, G. 2004. Translating research into practice: acetaminophen in osteoarthritis revisited. *J Rheumatol* 31:199-202.
439. Scott, J.E. 1996. Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen. *Biochemistry* 35:8795-8799.
440. Sellers, R.S., Peluso, D., and Morris, E.A. 1997. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 79:1452-1463.
441. Serra, R., Johnson, M., Filvaroff, E.H., LaBorde, J., Sheehan, D.M., Derynck, R., and Moses, H.L. 1997. Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J Cell Biol* 139:541-552.
442. Shao, X.X., Hutmacher, D.W., Ho, S.T., Goh, J.C., and Lee, E.H. 2006. Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials* 27:1071-1080.
443. Shapiro, F., Koide, S., and Glimcher, M.J. 1993. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 75:532-553.

444. Sharma, B., Williams, C.G., Khan, M., Manson, P., and Elisseeff, J.H. 2007. In vivo chondrogenesis of mesenchymal stem cells in a photopolymerized hydrogel. *Plast Reconstr Surg* 119:112-120.
445. Sharma, L., Lou, C., Cahue, S., and Dunlop, D.D. 2000. the mechanism of the effect of obesity in knee osteoarthritis: the mediating role of malalignment. *arthritis Rheum* 43:568-575.
446. Shen, G. 2005. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod Craniofac Res* 8:11-17.
447. Shikhman, A.R., Amiel, D., D'Lima, D., Hwang, S.B., Hu, C., Xu, A., Hashimoto, S., Kobayashi, K., Sasho, T., and Lotz, M.K. 2005. Chondroprotective activity of N-acetylglucosamine in rabbits with experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 64:89-94.
448. Shlopov, B.V., Lie, W.R., Mainardi, C.L., Cole, A.A., Chubinskaya, S., and Hasty, K.A. 1997. Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum* 40:2065-2074.
449. Silver, F.H., Wang, M.C., and Pins, G.D. 1995. Preparation and use of fibrin glue in surgery. *Biomaterials* 16:891-903.
450. Silverman, R.P., Passaretti, D., Huang, W., Randolph, M.A., and Yaremchuk, M.J. 1999. Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin glue polymer. *Plast Reconstr Surg* 103:1809-1818.
451. Simon, T.M., and Jackson, D.W. 2006. Articular cartilage: injury pathways and treatment options. *Sports Med Arthrosc* 14:146-154.
452. Sims, C.D., Butler, P.E., Cao, Y.L., Casanova, R., Randolph, M.A., Black, A., Vacanti, C.A., and Yaremchuk, M.J. 1998. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast Reconstr Surg* 101:1580-1585.
453. Sittering, M., Bujia, J., Rotter, N., Reitzel, D., Minuth, W.W., and Burmester, G.R. 1996. Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials* 17:237-242.
454. Sledge, C. 2005. *Principles of reconstructive surgery for arthritis: the knee*. Philadelphia. 1890-1900 pp.
455. Sledge, S.L. 2001. Microfracture techniques in the treatment of osteochondral injuries. *Clin Sports Med* 20:365-377.
456. Slemenda, C., Heilman, D.K., Brandt, K.D., Katz, B.P., Mazzuca, S.A., Braunstein, E.M., and Byrd, D. 1998. reduced quadriceps strength relative to body weight: a risk factor for knee osteoarthritis in women? *Arthritis Rheum* 41:1951-1959.
457. Smits, P., Dy, P., Mitra, S., and Lefebvre, V. 2004. Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *J Cell Biol* 164:747-758.
458. Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., de Crombrughe, B., and Lefebvre, V. 2001. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell* 1:277-290.
459. Soeken, K.L., Lee, W.L., Bausell, R.B., Agelli, M., and Berman, B.M. 2002. Safety and efficacy of S-adenosylmethionine (SAME) for osteoarthritis. *J Fam Pract* 51:425-430.
460. Soeken, K.L., Lee, W.L., Bausell, R.B., and al., e. 2002. Safety and efficacy of S-adenosylmethionine (SAME) for osteoarthritis *J Fam Pract* 51:425-430.
461. Solomon, S.D., McMurray, J.J., Pfeffer, M.A., Wittes, J., Fowler, R., Finn, P., Anderson, W.F., Zauber, A., Hawk, E., and Bertagnolli, M. 2005. Cardiovascular risk

- associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med* 352:1071-1080.
462. Solursh, M. 1991. Formation of cartilage tissue in vitro. *J Cell Biochem* 45:258-260.
463. Sommarin, Y., Larsson, T., and Heinegard, D. 1989. Chondrocyte-matrix interactions. Attachment to proteins isolated from cartilage. *Exp Cell Res* 184:181-192.
464. Sontjens, S.H., Nettles, D.L., Carnahan, M.A., Setton, L.A., and Grinstaff, M.W. 2006. Biodendrimer-based hydrogel scaffolds for cartilage tissue repair. *Biomacromolecules* 7:310-316.
465. St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., and McMahon, A.P. 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13:2072-2086.
466. Steadman, J.R., Rodkey, W.G., and Briggs, K.K. 2002. Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation, and outcomes. *J Knee Surg* 15:170-176.
467. Steadman, J.R., Rodkey, W.G., Briggs, K.K., and Rodrigo, J.J. 1999. [The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]. *Orthopade* 28:26-32.
468. Stevenson, S. 1987. The immune response to osteochondral allografts in dogs. *J bone Joint Surg* 69A:573-582.
469. Stevenson, S., Li, X.Q., and Martin, B. 1991. The fate of cancellous and cortical bone after transplantation of fresh and frozen tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 73:1143-1156.
470. Storm, E.E., Huynh, T.V., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kingsley, D.M., and Lee, S.J. 1994. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature* 368:639-643.
471. Suh, J.K., and Matthew, H.W. 2000. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 21:2589-2598.
472. Svensson, A., Nicklasson, E., Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D.L., Brittberg, M., and Gatenholm, P. 2005. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials* 26:419-431.
473. Taguchi, T., Xu, L., Kobayashi, H., Taniguchi, A., Kataoka, K., and Tanaka, J. 2005. Encapsulation of chondrocytes in injectable alkali-treated collagen gels prepared using poly(ethylene glycol)-based 4-armed star polymer. *Biomaterials* 26:1247-1252.
474. Takahashi, N., Rieneck, K., and van der Kraan, P.M. 2005. Elucidation of IL-1/TGF-beta interaction in mouse chondrocytes cell line by genome-wide gene expression. *Osteoarthritis and Cartilage* 13:426-438.
475. Tallheden, T., Bengtsson, C., Brantsing, C., Sjogren-Jansson, E., Carlsson, L., Peterson, L., Brittberg, M., and Lindahl, A. 2005. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis Res Ther* 7:R560-568.
476. Tay, A.G., Farhadi, J., Suetterlin, R., Pierer, G., Heberer, M., and Martin, I. 2004. Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue Eng* 10:762-770.
477. Tchetina, E.V., Antoniou, J., Tanzer, M., Zukor, D.J., and Poole, A.R. 2006. Transforming growth factor-beta2 suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic cartilage, reduces expression of genes associated with chondrocyte hypertrophy and degradation, and increases prostaglandin E(2) production. *Am J Pathol* 168:131-140.
478. Temenoff, J.S., Park, H., Jabbari, E., Conway, D.E., Sheffield, T.L., Ambrose, C.G., and Mikos, A.G. 2004. Thermally cross-linked oligo(poly(ethylene glycol) fumarate)

- hydrogels support osteogenic differentiation of encapsulated marrow stromal cells in vitro. *Biomacromolecules* 5:5-10.
479. Tetlow, L.C., Adlam, D.J., and Woolley, D.E. 2001. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 44:585-594.
480. Tew, S.R., Kwan, A.P., Hann, A., Thomson, B.M., and Archer, C.W. 2000. The reactions of articular cartilage to experimental wounding: role of apoptosis. *Arthritis Rheum* 43:215-225.
481. Tickle, C. 2002. Molecular basis of vertebrate limb patterning. *Am J Med Genet* 112:250-255.
482. Tiralocche, G., Girard, C., Chouinard, L., Sampalis, J., Moquin, L., Ionescu, M., Reiner, A., Poole, A.R., and Laverty, S. 2005. Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 52:1118-1128.
483. Tognana, E., Padera, R.F., Chen, F., Vunjak-Novakovic, G., and Freed, L.E. 2005. Development and remodeling of engineered cartilage-explant composites in vitro and in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* 13:896-905.
484. Toma, J.G., Akhavan, M., Fernandes, K.J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3:778-784.
485. Toole, B.P. 2001. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 12:79-87.
486. Toole, B.P. 2004. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 4:528-539.
487. Towheed, T., Shea, B., Wells, G., and Hochberg, M. 2000. Analgesia and non-aspirin, non-steroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis of the hip. *Cochrane Database Syst Rev*:CD000517.
488. Tuan, R.S. 2006. Stemming cartilage degeneration: adult mesenchymal stem cells as a cell source for articular cartilage tissue engineering. *Arthritis Rheum* 54:3075-3078.
489. Tuli, R., Li, W.J., and Tuan, R.S. 2003. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 5:235-238.
490. Turczyn, R., Weiss, P., Lapkowski, M., and Daculsi, G. 2000. In situ self hardening bioactive composite for bone and dental surgery. *J Biomater Sci Polym Ed* 11:217-223.
491. Tyyni, A., and Karlsson, J. 2000. Biological treatment of joint cartilage damage. *Scand J Med Sci Sports* 10:249-265.
492. van der Rest, M., and Garrone, R. 1991. Collagen family of proteins. *Faseb J* 5:2814-2823.
493. van der Rest, M., Mayne, R., Ninomiya, Y., Seidah, N.G., Chretien, M., and Olsen, B.R. 1985. The structure of type IX collagen. *J Biol Chem* 260:220-225.
494. van Susante, J.L., Buma, P., Schuman, L., Homminga, G.N., van den Berg, W.B., and Veth, R.P. 1999. Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. *Biomaterials* 20:1167-1175.
495. van Susante, J.L.C., Pieper, J., Buma, P., van Kuppevelt, T.H., van Beuningen, H., van Der Kraan, P.M., Veerkamp, J.H., van den Berg, W.B., and Veth, R.P.H. 2001. Linkage of chondroitin-sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes in vitro. *Biomaterials* 22:2359-2369.
496. Varghese, S., Theprungsirikul, P., Sahani, S., Hwang, N., Yarema, K.J., and Elisseeff, J.H. 2007. Glucosamine modulates chondrocyte proliferation, matrix synthesis, and gene expression. *Osteoarthritis Cartilage* 15:59-68.

497. Vaughan-Thomas, A., Young, R.D., Phillips, A.C., and Duance, V.C. 2001. Characterization of type XI collagen-glycosaminoglycan interactions. *J Biol Chem* 276:5303-5309.
498. Vaughan, L., Mendler, M., Huber, S., Bruckner, P., Winterhalter, K.H., Irwin, M.I., and Mayne, R. 1988. D-periodic distribution of collagen type IX along cartilage fibrils. *J Cell Biol* 106:991-997.
499. Vilamitjana-Amedee, J., and Harmand, M.F. 1990. Biochemical analysis of normal and osteoarthritic human cartilage. *Clin Physiol Biochem* 8:221-230.
500. Vincent, T., Hermansson, M., Bolton, M., Wait, R., and Saklatvala, J. 2002. Basic FGF mediates an immediate response of articular cartilage to mechanical injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8259-8264.
501. Vu, T.H., Shipley, J.M., Bergers, G., Berger, J.E., Helms, J.A., Hanahan, D., Shapiro, S.D., Senior, R.M., and Werb, Z. 1998. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93:411-422.
502. Vunjak-Novakovic, G. 2003. The fundamentals of tissue engineering: scaffolds and bioreactors. *Novartis Found Symp* 249:34-46; discussion 46-51, 170-174, 239-141.
503. Vunjak-Novakovic, G., Obradovic, B., Martin, I., and Freed, L.E. 2002. Bioreactor studies of native and tissue engineered cartilage. *Biorheology* 39:259-268.
504. Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S.J., Young, R.G., Mansour, J.M., Caplan, A.I., and Goldberg, V.M. 1994. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76:579-592.
505. Wakitani, S., Goto, T., Young, R.G., Mansour, J.M., Goldberg, V.M., and Caplan, A.I. 1998. Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng* 4:429-444.
506. Waldman, S.D., Spiteri, C.G., Grynepas, M.D., Pilliar, R.M., Hong, J., and Kandel, R.A. 2003. Effect of biomechanical conditioning on cartilaginous tissue formation in vitro. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 2:101-105.
507. Waldman, S.D., Spiteri, C.G., Grynepas, M.D., Pilliar, R.M., and Kandel, R.A. 2003. Long-term intermittent shear deformation improves the quality of cartilaginous tissue formed in vitro. *J Orthop Res* 21:590-596.
508. Waldman, S.D., Spiteri, C.G., Grynepas, M.D., Pilliar, R.M., and Kandel, R.A. 2004. Long-term intermittent compressive stimulation improves the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng* 10:1323-1331.
509. Wang, C., Luosujarvi, H., Heikkinen, J., Risteli, M., Uitto, L., and Myllyla, R. 2002. The third activity for lysyl hydroxylase 3: galactosylation of hydroxylysyl residues in collagens in vitro. *Matrix Biol* 21:559-566.
510. Wang, C.T., Lin, J., and Chang, C.J. 2004. Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. A meta-analyse of randomized controlled trials. *J Bone Joint Surg Am* 86:538-544.
511. Wang, X., Grogan, S.P., Rieser, F., Winkelmann, V., Maquet, V., Berge, M.L., and Mainil-Varlet, P. 2004. Tissue engineering of biphasic cartilage constructs using various biodegradable scaffolds: an in vitro study. *Biomaterials* 25:3681-3688.
512. Watson, M.C., Brookes, S.T., Kirwan, J.R., and al., e. 1997. Non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev* 1:CD000142.
513. Wilke, H.J., Heuer, F., Neidlinger-Wilke, C., and Claes, L. 2006. Is a collagen scaffold for a tissue engineered nucleus replacement capable of restoring disc height and stability in an animal model? *Eur Spine J* 15 Suppl 3:S433-438.

514. Wilke, M.M., Nydam, D.V., and Nixon, A.J. 2007. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J Orthop Res*.
515. Wislowska, M., and Jablonska, B. 2005. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rheumatoid arthritis and knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 24:278-284.
516. Wong, M., and Carter, D.R. 2003. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* 33:1-13.
517. Worster, A.A., Nixon, A.J., Brower-Toland, B.D., and Williams, J. 2000. Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 61:1003-1010.
518. Wu, J.J., and Eyre, D.R. 1995. Structural analysis of cross-linking domains in cartilage type XI collagen. Insights on polymeric assembly. *J Biol Chem* 270:18865-18870.
519. Wu, J.J., Eyre, D.R., and Slayter, H.S. 1987. Type VI collagen of the intervertebral disc. Biochemical and electron-microscopic characterization of the native protein. *Biochem J* 248:373-381.
520. Wu, J.J., Woods, P.E., and Eyre, D.R. 1992. Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J Biol Chem* 267:23007-23014.
521. Wu, W., Billingham, R.C., Pidoux, I., Antoniou, J., Zukor, D., Tanzer, M., and Poole, A.R. 2002. Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. *Arthritis Rheum* 46:2087-2094.
522. Yada, T., Arai, M., Suzuki, S., and Kimata, K. 1992. Occurrence of collagen and proteoglycan forms of type IX collagen in chick embryo cartilage. Production and characterization of a collagen form-specific antibody. *J Biol Chem* 267:9391-9397.
523. Yan, H., and Yu, C. 2007. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy* 23:178-187.
524. Yokouchi, Y., Sasaki, H., and Kuroiwa, A. 1991. Homeobox gene expression correlated with the bifurcation process of limb cartilage development. *Nature* 353:443-445.
525. Yoon, B.S., and Lyons, K.M. 2004. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem* 93:93-103.
526. Yoshida, C.A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K., Yamana, K., Zanna, A., Takada, K., Ito, Y., et al. 2004. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* 18:952-963.
527. Youn, I., Choi, J.B., Cao, L., Setton, L.A., and Guilak, F. 2006. Zonal variations in the three-dimensional morphology of the chondron measured in situ using confocal microscopy. *Osteoarthritis Cartilage* 14:889-897.
528. Young, R.D., Lawrence, P.A., Duance, V.C., Aigner, T., and Monaghan, P. 1995. Immunolocalization of type III collagen in human articular cartilage prepared by high-pressure cryofixation, freeze-substitution, and low-temperature embedding. *J Histochem Cytochem* 43:421-427.
529. Young, R.D., Lawrence, P.A., Duance, V.C., Aigner, T., and Monaghan, P. 2000. Immunolocalization of collagen types II and III in single fibrils of human articular cartilage. *J Histochem Cytochem* 48:423-432.
530. Zhang, W., Jones, A., and Doherty, M. 2004. Does paracetamol (acetaminophen) reduce the pain of osteoarthritis? A meta-analysis of randomised controlled trials. *Ann Rheum Dis* 63:901-907.

531. Zheng, Q., Zhou, G., Morello, R., Chen, Y., Garcia-Rojas, X., and Lee, B. 2003. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J Cell Biol* 162:833-842.
532. Zhidkova, N.I., Justice, S.K., and Mayne, R. 1995. Alternative mRNA processing occurs in the variable region of the pro-alpha 1(XI) and pro-alpha 2(XI) collagen chains. *J Biol Chem* 270:9486-9493.
533. Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279-4295.
534. Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211-228.

## VIII. ANNEXE

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
19 mai 2005 (19.05.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2005/044326 A1

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
A61L 27/46, 27/50
- (21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2004/002844
- (22) Date de dépôt international :  
4 novembre 2004 (04.11.2004)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :  
03292759.2 4 novembre 2003 (04.11.2003) EP
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA  
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR] : 101,  
rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). UNIVERSITE DE  
NANTES [FR/FR] ; 1, quai de Tourville, F-44000 Nantes  
(FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : WEISS,  
Pierre [FR/FR] ; 4, impasse du Coteau Bodin, F-44800  
Saint Herblain (FR). GUICHEUX, Jérôme [FR/FR] ;  
21, rue Louis Lumière -, Le Séquoia, F-44000 Nantes  
(FR). DACULSI, Pierre [FR/FR] ; La Favrie du Buron,  
F-44360 Vigneux De Bretagne (FR). GRIMANDI, Gaël  
[FR/FR] ; 26bis, rue de l'Éperonnière, F-44000 Nantes  
(FR). VINATIER, Claire [FR/FR] ; 200, rue de la Re-  
naudière, F-44300 Nantes (FR).
- (74) Mandataires : COLOMBET, Alain etc.; CABINET  
LAVOIX, 2, Place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris  
Cedex 09 (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,  
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,  
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE,  
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :  
— avec rapport de recherche internationale  
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.



WO 2005/044326 A1

(54) Title: USE OF A HYDROGEL FOR THE CULTURE OF CHONDROCYTES

(54) Titre : UTILISATION D'UN HYDROGEL POUR LA CULTURE DE CHONDROCYTES.

(57) Abstract: The invention relates to the use of a silanised hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) or silanised hydroxyethylcellulose (HEC) hydrogel, self-crosslinking as a function of pH, for the three-dimensional *ex vivo* culture of chondrocytes.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation d'un hydrogel d'hydroxyéthylcellulose (HEC) silanisée ou d'hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) silanisé, auto-réticulant en fonction du pH, pour la culture tridimensionnelle *ex vivo* de chondrocytes.

Utilisation d'un hydrogel pour la culture de chondrocytes

L'invention concerne l'utilisation d'un hydrogel cellulosique pour la culture tridimensionnelle de chondrocytes en vue de leur implantation en un site  
5 cartilagineux.

Le cartilage est un tissu conjonctif de soutien spécialisé non vascularisé, non innervé, résistant et élastique. Il est présent au niveau des côtes, du sternum, du nez et des oreilles mais également au niveau des articulations. Le  
10 cartilage contient des cellules spécialisées appelées chondrocytes et une matrice extracellulaire (MEC) composée essentiellement de fibres de collagène et de protéoglycanes.

Le cartilage articulaire peut être le siège de nombreuses altérations d'origine inflammatoire (polyarthrite rhumatoïde, ostéoarthrite), traumatologique  
15 ou liées au vieillissement (arthrose). L'établissement de ces atteintes cartilagineuses conduit, à plus ou moins long terme, à une dégradation de la matrice extracellulaire et une diminution de la cellularité. L'absence de vascularisation et de prolifération des chondrocytes confère à ce tissu de faibles capacités de réparation qui rendent ces processus cataboliques irréversibles. Au  
20 regard du vieillissement de la population, ces pathologies dégénératives concernent aujourd'hui une part importante de la population et représentent donc un enjeu majeur de santé publique. Dans ce contexte, la communauté scientifique s'intéresse depuis de nombreuses années aux moyens de régénérer un tissu cartilagineux fonctionnel.

25 Afin de stimuler les faibles propriétés de réparation spontanée du cartilage, des techniques chirurgicales de chondroplastie abrasive, de micro fracture ou de spongialisation ont été proposées (Hunziker, 2002). Ces techniques, permettant la formation d'un caillot sanguin d'origine sous-chondrale, conduisent à la formation d'un tissu cartilagineux qui demeure fibreux et transitoire (Shapiro et  
30 al., 1993). Parallèlement, des techniques de transplantation de tissu possédant des propriétés chondrogéniques ont également été étudiées. L'utilisation de transplants autologues de périoste ou de périchondre et de tissus ostéochondral (mosaicplastie) a permis la néoformation d'un tissu de type cartilagineux après

implantation (Hunziker, 2002). Les nombreuses limitations de ces techniques (instabilité de la greffe, calcification, faible reproductibilité des résultats cliniques) et la restriction de leur indication à la réparation de lésions focales, ont récemment conduit au développement de nouvelles techniques d'ingénierie  
5 tissulaire appliquées aux atteintes traumatologiques du cartilage.

Brittberg et al. furent les premiers à proposer une méthode de réparation basée sur la transplantation de chondrocytes autologues (Brittberg et al., 1994). Celle-ci se déroule en trois temps, tout d'abord un fragment de cartilage est prélevé dans une zone non portante afin d'isoler des chondrocytes. Ceux-ci sont  
10 alors multipliés *in vitro* en monocouche puis réimplantés sous un lambeau périosté au niveau de la lésion. Les résultats ont montré une réparation du défaut cartilagineux, mais les patients doivent subir deux interventions chirurgicales lourdes. Par ailleurs, le phénotype des cellules après leur amplification en monocouche reste à déterminer.

Plusieurs matrices tridimensionnelles d'origine végétale ou animale ont par ailleurs été développées comme les éponges de collagène, la fibrine, l'acide  
15 hyaluronique ou l'alginate (Cancedda et al., 2003). Le risque de transmission virale associé à l'utilisation de ces matériaux biologiques et les réactions inflammatoires observées lors des expérimentations pré-cliniques, ont dirigé les  
20 recherches actuelles vers le développement de biomatériaux totalement synthétiques (Hunziker, 2002). Des polymères tels que l'acide poly lactique, l'acide poly glycolique, les fibres de carbone, le polyesteruréthane, le Dacron et le Téflon ont été proposés et utilisés *in vitro* pour la culture 3D de chondrocytes ou  
25 de cellules mésenchymateuses. Parmi ces polymères synthétiques, certains ont entraîné des réactions immunitaires ou une inflammation après leur implantation en site cartilagineux (Cancedda et al., 2003).

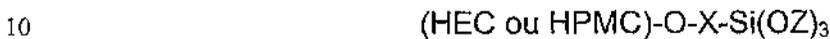
Des compositions d'hydrogel injectables sont décrites notamment dans le brevet US 6,129,761.

30 Les inventeurs ont maintenant mis en évidence l'intérêt de cultiver des chondrocytes en trois dimensions au sein d'un hydrogel auto-réticulant en fonction du pH, en vue d'une implantation dans un site cartilagineux.

L'hydrogel utilisé est un hydrogel auto-réticulant en fonction du pH, qui est constitué d'une solution aqueuse d'hydroxyéthylcellulose (HEC) ou d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) sur laquelle sont greffés des groupements silanes qui permettent la formation de liaisons covalentes entre les chaînes d'HEC ou d'HPMC.

Ce type de matériau polymère est décrit en association avec une charge minérale dans la demande de brevet internationale WO 97/05911.

Ce matériau est constitué de préférence d'un polymère de formule simplifiée :

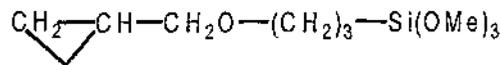


pouvant être obtenu par réaction d'hydroxyéthylcellulose (HEC) ou d'hydroxypropylméthylcellulose avec un composé de formule (1) :

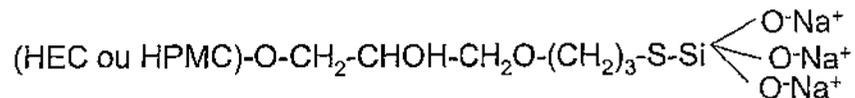


où X représente un atome d'halogène ou un groupe hydrocarboné à fonction époxy, notamment en C<sub>2-20</sub>, et Z est choisi parmi un atome d'hydrogène, un métal alcalin et un groupe alkyle, notamment en C<sub>1-5</sub>.

Le composé de formule (1) peut être par exemple le (3-glycidoxypropyl)triméthoxysilane

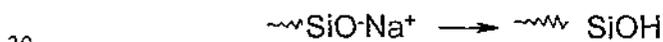


20 En milieu basique, le composé organosilicié se greffe sur l'HEC ou l'HPMC avec ouverture de l'époxyde et les groupes métoxysilane sont hydrolysés pour conduire à un polymère de formule simplifiée :



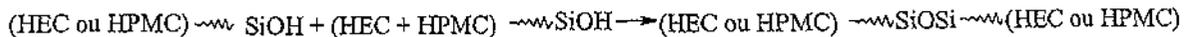
De préférence, le polymère est un polymère d'HPMC silanisée.

25 Ce polymère est stable en solution aqueuse à un pH supérieur ou égal à environ 12,4. Une acidification de la solution provoque une augmentation progressive de la viscosité et la formation d'un hydrogel. Ce phénomène physique correspond à la réticulation du polymère par (i) transformation des groupes silanolates en groupes silanols :



puis, formation d'un réseau tridimensionnel par

(ii) condensation d'un silanol sur un autre silanol



et/ou

5 (iii) condensation d'un silanol sur un groupe hydroxy des cycles des éthers de cellulose ou des substituants



10 Cette réticulation de type covalent provoquée par une baisse du pH de la solution aqueuse du polymère est réversible et l'hydrogel se redissout lorsque l'on augmente le pH du milieu. Ainsi, avant d'être utilisé, le polymère synthétisé peut se présenter sous la forme d'une poudre qui peut être dissoute dans une solution alcaline d'hydroxyde de sodium. Le pH de gélification se situe entre 7 et  
15 12 en fonction de la vitesse de réticulation recherchée.

Le gel obtenu est stérilisable à l'autoclave (par exemple à 121°C pendant 20 minutes).

Le polymère en solution aqueuse basique, avant réticulation, peut également être mélangé à une solution tampon physiologique avant son  
20 utilisation biologique. Le pH du mélange final est ainsi adapté au temps de manipulation recherché avant réticulation de l'ensemble. Ce temps de réticulation est mesurable par rhéométrie oscillatoire et peut varier de 5 minutes à 5 jours en fonction des paramètres de ce mélange, principalement le pH et la température (Bourges et al., 2002a ; Bourges et al., 2002b).

25 Pour fournir un taux de réticulation convenable pour l'application envisagée, il est souhaitable que les groupes latéraux porteurs de silicium, de type silanolate ou précurseur de silanolate de métal alcalin ou d'ammonium, représentent de 0,5 à 5% du poids sec total du polymère.

L'invention a pour objet l'utilisation d'un tel hydrogel d'HEC silanisée ou  
30 d'HPMC silanisée, auto-réticulant en fonction du pH, pour la culture tridimensionnelle *ex vivo* de chondrocytes.

L'hydrogel utilisé présente notamment les avantages suivants :

- il est biocompatible avec des cellules chondrocytaires intégrées en son sein ;
- les chondrocytes sont intégrés de manière intime dans l'hydrogel ;
- les chondrocytes dédifférenciés par amplification en monocouche se redifférencient au sein de l'hydrogel, et maintiennent des caractéristiques de chondrocytes ;
- la réticulation est contrôlable par le pH du tampon biologique ajouté au mélange d'hydrogel et de cellules chondrocytaires.

Les cellules mises en culture dans l'hydrogel sont de préférence des chondrocytes humains ou animaux, de préférence des chondrocytes autologues, de patients présentant une lésion du cartilage. Il peut par exemple s'agir de cellules prélevées au niveau d'un tissu cartilagineux, par exemple à partir d'une partie du cartilage articulaire ou au niveau du cartilage nasal.

Les cellules mises en culture dans l'hydrogel peuvent être également des cellules indifférenciées, capables de différenciation chondrogénique. Sont ainsi comprises les cellules souches mésenchymateuses ou des cellules souches provenant de tissu adipeux. Les premières peuvent être notamment obtenues par prélèvement de moelle osseuse (typiquement par aspiration à l'aide d'une seringue depuis les os trabéculaires tels que os longs, crête iliaque), les secondes par lipo-aspirations (typiquement par aspiration sous vide de masses graisseuses).

Ces cellules indifférenciées sont ensuite cultivées en présence de l'hydrogel dans des conditions permettant l'induction d'un phénotype chondrocytaire. Ces conditions sont de préférence une culture dans des milieux de culture classiques (DMEM ou MEM), additionnés de glutamine et d'antibiotiques si nécessaires, et de sérum animal ou humain, de préférence autologue, ou substituts de sérum, ainsi que d'adjuvants chondrogéniques. On peut citer notamment insuline, transferrine, sodium sélénite, acide ascorbique, TGF-beta, IGF-1, BMP (« bone morphogenetic protein »), dexaméthasone, acide linoléique, BSA (« serum albumine bovine »), ou pyruvate. D'autres adjuvants pourront également être utilisés afin d'induire la différenciation chondrogénique des cellules. La culture est de préférence réalisée dans des conditions humides à 37°C en présence de concentrations en oxygène pouvant varier selon les

besoins. L'hypoxie a en effet été montrée comme un facteur important pour le développement d'un phénotype chondrocytaire.

L'invention a également pour objet un procédé *ex vivo* de préparation d'un  
5 complexe de cellules intégrées dans un hydrogel, complexe destiné à être injecté dans un site cartilagineux, ledit procédé comprenant le mélange *ex vivo* de chondrocytes ou de cellules indifférenciées, capables de différenciation chondrogénique, avec un hydrogel d'HEC ou d'HPMC silanisée, autoréticulant en fonction du pH, dans un tampon biologique au pH approprié pour la réticulation  
10 de l'hydrogel, dans des conditions et une durée appropriées pour l'intégration et la culture tridimensionnelle des chondrocytes, le cas échéant issus de la différenciation desdites cellules indifférenciées, dans l'hydrogel.

Tout tampon biologique peut être utilisé par l'homme du métier. A titre d'exemples, on peut citer le tampon phosphate (PBS, phosphate buffered salt),  
15 tampon HEPES, ou TRIS. Tout milieu biologique connu de l'homme du métier est en outre utilisable, tel que le milieu DMEM ou alpha-MEM (alpha minimum essential medium).

De manière préférée, le procédé comprend les étapes *ex vivo* suivantes :

- l'amplification de chondrocytes en monocouche, sur un support solide, tel  
20 qu'une plaque de culture ;

- la récolte des chondrocytes amplifiés, dédifférenciés de par leur amplification en monocouche ;

- le mélange des chondrocytes amplifiés dédifférenciés avec l'hydrogel dans un tampon biologique au pH approprié pour la réticulation de l'hydrogel, ce  
25 qui conduit à l'intégration des chondrocytes au sein de l'hydrogel et à leur redifférenciation.

Les propriétés rhéologiques de l'hydrogel composé d'HEC ou d'HPMC silanisée permettent son injection sur le lieu d'implantation, favorisant ainsi la vectorisation des chondrocytes par chirurgie peu invasive.

30 L'hydrogel au sein duquel les chondrocytes ont été cultivés peut être implanté dans un site de la lésion, normalement occupé par du cartilage.

Les lésions visées peuvent être des pertes de substances cartilagineuses focales liées à des séquelles traumatologiques ou, plus généralement, toutes les atteintes ou pertes cartilagineuses ostéoarticulaires ou plastiques.

L'invention peut être appliquée à l'ingénierie de l'ensemble des tissus cartilagineux c'est à dire de type :

- hyalin (présent au niveau de la cloison nasale, du larynx, des anneaux trachéaux, articulaires, ou à l'extrémité sternale des côtes) ;
- fibro-cartilage (présent au niveau des disques intervertébraux, certains cartilages articulaires, et la symphyse pubienne) ;
- 10 - élastique (présent au niveau du pavillon de l'oreille, du conduit auditif externe, de l'épiglotte, de la trompe d'eustache, et des cartilages laryngés).

La réparation des disques intervertébraux est particulièrement visée. La cause des lombalgies n'est pas connue, mais pourrait être due au disque intervertébral et à sa détérioration inévitable et relative à l'âge. Le disque intervertébral est une structure fibrocartilagineuse composé de quatre tissus concentriques disposés entre les corps vertébraux adjacents. La couche extérieure est l'anneau fibreux externe, qui est constitué de fibres de collagène fortement orientées. L'anneau fibreux interne est moins dense en collagène, et est moins organisé que l'anneau externe. La zone de transition est une fine zone de tissu fibreux, qui sépare l'anneau intérieur du nucleus pulposus, zone centrale gélatineuse formant un noyau. Les disques intervertébraux sont hypovascularisés et possèdent une innervation limitée. Chez l'adulte, les disques sont nourris par diffusion des nutriments et des métabolites. Les disques contiennent relativement peu de cellules enchassées dans une matrice extracellulaire abondante, constituée principalement d'eau, de protéoglycanes, de collagène, et de protéines non collagéniques. Les cellules du disque synthétisent ces macromolécules et maintiennent et réparent cette matrice extracellulaire. A l'âge adulte, les cellules chondrocytaires sont les seules cellules du noyau. L'anneau fibreux intérieur, la zone de transition, et le plateau cartilagineux des corps vertébraux adjacents contiennent également ces chondrocytes, tandis que l'anneau externe contient une majorité de cellules de type fibroblastique. Un certain degré de dégénérescence du disque se produit chez tous les individus. Une association claire a été montrée entre l'âge et la dégénérescence des

disques. La dégénérescence a été observée dès la seconde décennie de la vie. Les personnes qui présentent des disques symptomatiques subissent une accélération du processus normal de vieillissement, en raison de facteurs acquis mais également génétiques.

5

L'invention a donc également pour objet un procédé du traitement du corps humain ou animal, comprenant l'administration par injection d'hydrogel tel que défini plus haut préalablement colonisé *ex vivo* par des chondrocytes, par exemple selon le procédé décrit plus haut.

10

L'injection peut être réalisée à l'aide d'un système comportant une seringue stérilisable et des embouts munis de pistons à usage unique, par exemple le système commercialisé par HAWE NEOS DENTAL, comprenant une seringue stérilisée à l'autoclave (réf. N° 440, Seringue Hawe-Centrix C-R<sup>R</sup>, Mark III) et des embouts (réf. N° 445).

15

Les figures et exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

#### **LEGENDE DES FIGURES :**

20

Les Figures 1A à 1C représentent l'activité MTS des chondrocytes cultivés pendant 24, 48 et 72 heures soit dans les conditions contrôles (absence d'hydrogel), soit au contact de l'hydrogel si-HPMC, soit en présence d'actinomycine D (5 µg/ml). SW1353 (Fig. 1A), C28/12 (Fig. 1B) et chondrocytes nasaux humains (Fig. 1C). \*p<0,001 comparé au contrôle à chaque temps.

25

Les Figures 2A à 2C représentent le dénombrement des chondrocytes cultivés pendant 24, 48 et 72 heures soit dans les conditions contrôles (absence d'hydrogel), soit au contact de l'hydrogel si-HPMC, soit en présence d'actinomycine D (5 µg/ml). SW1353 (Fig. 2A), C28/12 (Fig. 2B) et chondrocytes nasaux humains (Fig. 2C). \*p<0,001 comparé au contrôle à chaque temps.

30

#### **EXEMPLES :**

##### **Exemple 1 : préparation de l'hydrogel**

*Matériels :*

- HPMC E4M® (Colorcon- Dow Chemical, France)
- Glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTMS) (Acros, Belgique)
- HEPES (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
- 5 - NaOH (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France)
- NaCl (VWR International)
- HCl 0.1 M (Sigma Aldrich).
- Sérum de veau fœtal (SVF) (Dominique Dutscher, Brumath, France).

a) Synthèse de la poudre d'hydroxypropyl méthylcellulose silanisée (Si-  
10 HPMC)

Les synthèses sont réalisées sur des quantités de 240 grammes d'HPMC. Le polysaccharide sélectionné est l'E4M®. La synthèse est réalisée avec du glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTMS) dans un ballon de 6 litres en milieu hétérogène dans un solvant organique (Bourges et al., 2002). La synthèse est effectuée sous ébullition pendant 3 heures. La poudre d'HPMC silanisée est  
15 séchée une première fois à l'étuve pendant une nuit puis lyophilisée (Christ Alpha 1-4 ST).

b) Préparation de la solution d'hydroxypropyl méthylcellulose silanisée

20 Six grammes de poudre de Si-HPMC sont solubilisés dans 200 ml d'une solution de NaOH à 0.2 M. Ce mélange est agité pendant 48 heures. La solution de Si-HPMC est ensuite dialysée pendant 16h dans une solution de NaOH 0.09 M. Puis une deuxième dialyse est réalisée dans une solution de NaOH 0.09 M pendant 2 heures. Cette solution de Si-HPMC à 3% est ensuite aliquotée et  
25 stérilisée à la vapeur (121°C, 30 minutes).

c) Induction de la réticulation de l'hydrogel

L'hydrogel utilisé pour la culture cellulaire est préparé extemporanément en mélangeant, sous hotte à flux laminaire, 7.5 ml de solution de Si-HPMC avec 7.5 ml de tampon HEPES et supplémenté de 10% de SVF. Le tampon HEPES  
30 est préparé par dissolution de 3.1 g d'HEPES et 0.8g de NaCl dans une solution

d'HCl à 0.03M. Cette solution est ensuite aliquotée et stérilisée à la vapeur (121°C, 30 minutes).

Ce mélange HEPES/Si-HPMC est agité au Vortex 15 secondes puis centrifugé 2 minutes à 1200 rotations par minutes (rpm). Ce mélange est transféré en plaque de culture. Le milieu de culture est ajouté 1 heure après.

d) Caractérisation physique de l'hydrogel par Rhéologie

*Matériels et méthodes*

Afin de caractériser la réticulation de l'hydrogel, les inventeurs ont effectué la mesure de deux paramètres rhéologiques: le module dispersif  $G''$  (caractéristique des liquides) et le module conservatif  $G'$  (caractéristique des solides). Cette mesure est réalisée avec un rhéomètre (Rhéostress 300, Thermo Haake, Karlsruhe, Germany) équipé d'un cône plan de 60 mm de diamètre et de 1° d'angle (Cône plan C60/1 titan, Thermo Haake). L'entrefer entre la troncature et le plateau est de 0.053 mm. La mesure est réalisée en mode oscillatoire avec trois fréquences d'oscillations (1 Hz, 3.2 Hz et 10 Hz) et une contrainte imposée de 1 Pascal, à une température de 37°C et pendant 1 200 000 secondes (13.8journs). Les résultats sont exprimés en Pa.

*Résultats*

L'hydrogel présente les caractéristiques d'un liquide visqueux au moment de sa préparation. Lors de sa réticulation, ses caractéristiques physiques évoluent vers celles d'un gel. L'hydrogel préparé selon le mode de réalisation préféré, présenté à l'exemple 1, se compose, une fois la réticulation terminée (10 jours), de 1,5 % de polymère sec et de 98,5 % d'eau, une teneur en eau comparable à celle du cartilage. La taille calculée de la maille de l'hydrogel (0,22  $\mu\text{m}$ ) apparaît inférieure à la taille d'une cellule.

Dans le but de connaître les caractéristiques physiques de l'hydrogel, comme le point de gel qui correspond au début de la réticulation, le temps de réticulation et la taille de la maille de l'hydrogel, l'évolution en fonction du temps de la composante liquide ( $G''$ ) et de la composante élastique ( $G'$ ) a été mesurée, et ce, pour trois fréquences différentes. Donc à chaque fréquence correspond un couple  $G'/G''$ . La  $\text{Tan}\Delta$  de chaque couple a été tracée, ces trois courbes se

rejoignent en un point : le point de gel. La réticulation de l'hydrogel a débuté 33 minutes après sa préparation, et s'est achevée 244 heures plus tard (10 jours) moment où la composante élastique ( $G'$ ) atteint un plateau pour une valeur de 310 Pa. Cette valeur de la composante élastique nous a permis de calculer la

5 taille de la maille de l'hydrogel.

$$\xi = \left( \frac{KT}{G'} \right)^{\frac{1}{3}} = \left( \frac{1,38 \times 10^{-23} \times 300}{310} \right)^{\frac{1}{3}} = \left( \frac{4,14 \times 10^{-21}}{310} \right)^{\frac{1}{3}} = 23,7 \text{ nanomètres}$$

Dans les conditions de préparation décrites ci-dessus, la taille statistique moyenne de la maille de l'hydrogel ( $X_i$ ) était de 0,023  $\mu\text{m}$ .

10 Tableau 1 : Résultats de la caractérisation rhéologique de l'Hydrogel de Si-HPMC à 3%

Vol de solution de Si-HPMC	Vol Tampon	% Si-HPMC	% final de Si-HPMC	pH mélange	$G'$	$KT/G'$	$X_i (\xi)$ en micromètre	Point de gel en minutes
1	1	3,00%	1,50%	7,37	310	1,3355E-23	0,023	33

15 **Exemple 2 : Test de cytotoxicité de l'hydrogel**

## MATERIELS ET METHODES

### 2.1 Culture cellulaire

a) Lignées chondrocytaires

Matériels:

- 20
- Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Invitrogen corporation, Paisley, UK).
  - Milieu nutritif Ham's F12 (Invitrogen corporation).
  - Pénicilline/streptomycine (Invitrogen corporation)
  - L-glutamine (Invitrogen corporation)

- Trypsine/EDTA (Invitrogen corporation).

Les inventeurs ont utilisé les lignées de chondrocytes humains SW1353 et C28/12 respectivement dérivées d'un chondrosarcome humain (Mengshol et al., 5 2000) et de cartilage costal humain immortalisé par l'antigène T du virus simien 40 (Goldring et al., 1994). Ces cellules sont cultivées dans un mélange volume/volume de DMEM et Ham's F12 supplémenté avec 10% de SVF, 1% de pénicilline/streptomycine et 1% de L-Glutamine (DMEM/F12 complet) dans une atmosphère humide à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub>.

10 Le milieu de culture est renouvelé entièrement tous les deux jours. Lorsque les cellules atteignent 80-90 % de la confluence, elles sont traitées par 2 ml de Trypsine (0.025%) /EDTA (0.01 %). Après incubation 3 minutes à 37°C, la solution de trypsine/EDTA est collectée et centrifugée (8 min, 1200 rpm) en présence de 8 ml de milieux DMEM/F12 complet. Après élimination du 15 surnageant, le culot cellulaire est reconstitué avec 10 ml de DMEM/F12 complet. Les cellules sont ensuite dénombrées et réparties dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> à une densité de 10 000 cellules/cm<sup>2</sup>.

#### b) Chondrocytes primaires

20 - Isolement de chondrocytes nasaux humains

Matériels:

- Hank's balanced salt (HBSS, Invitrogen Corporation).
- Protéase (Pronase, Sigma-Aldrich).
- Collagénase type IV (Sigma-Aldrich).

25 Du cartilage nasal humain est prélevé après obtention du consentement éclairé de patients subissant une rhinoplastie reconstructrice. Le cartilage nasal est lavé cinq fois dans du Hank's Balanced Salts (HBSS) et découpé en copeaux sous hotte à flux laminaire. Les copeaux de cartilage sont ensuite incubés pendant 30 minutes à 37°C dans du HBSS contenant 1mg/ml de protéase. Les 30 copeaux sont ensuite rincés trois fois dans du HBSS, puis incubés pendant 4 heures et sous agitation dans du DMEM complet (10 % SVF, 1% Pénicilline/Streptomycine et 1% L-Glutamine) contenant 0.625 mg/ml de

collagénase. Le surnageant est centrifugé 5 minutes à 1400 rpm. Le culot est lavé une fois dans du HBSS, centrifugé (8 min, 1200 rpm) et resuspendu dans 10 ml de DMEM complet. Les cellules sont dénombrées et transférées en flacon de 25 cm<sup>2</sup> à une densité cellulaire de 10 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules sont  
5 maintenues en culture en atmosphère humide à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub>. Les milieux de culture sont renouvelés tous les deux jours. Lorsque les cellules atteignent 80-90 % de la confluence, elles sont traitées à la trypsine/EDTA comme décrit ci-dessus.

10 - Isolement de chondrocytes articulaires de lapin

Matériels:

- Hyaluronidase (Sigma-Aldrich).
- Trypsine (Sigma-Aldrich).
- collagénase type II de *Clostridium histolyticum* (290 U/mg, Sigma-  
15 Aldrich)
- Tamis cellulaire (Falcon, Franklin Lakes, USA).

Comme précédemment décrit par Ghayor et al., 2000, des lapins nouveaux-nés âgés de 12 ou 13 jours sont sacrifiés par dislocation cervicale après anesthésie. Sous hotte à flux laminaire, les pattes avant et arrière sont prélevées et  
20 débarrassées de leurs tissus mous. Les articulations des genoux et des épaules sont ensuite disloquées. A l'aide d'un scalpel, le cartilage articulaire est découpé en fines tranches et les copeaux obtenus sont placés dans du HBSS. Ces copeaux sont successivement incubés 10 minutes à 37°C dans 12 ml de HBSS contenant 0.05% de hyaluronidase, puis 15 minutes à 37°C dans 6 ml d'HBSS  
25 contenant 0.2% de trypsine. Après deux rinçages dans du HBSS, les copeaux sont transférés dans du HBSS à 0.2% de collagénase et incubés 30 minutes à 37°C.

Les copeaux subissent une dernière étape de digestion par incubation dans une solution de DMEM complet enrichi de 0.03% de collagénase pendant  
30 15 heures. Le produit de digestion est filtré sur tamis cellulaire, collecté et centrifugé (8 min, 1200 rpm). Le culot cellulaire est resuspendu dans 20 ml de DMEM complet. Les cellules sont dénombrées et transférées en flacon de 25 cm<sup>2</sup>

à une densité cellulaire de 10 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules sont finalement maintenues en culture en atmosphère humide à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub>. Les milieux de culture sont renouvelés tous les deux jours. Lorsque les cellules atteignent 80-90 % de la confluence, elles sont traitées à la trypsine/EDTA comme décrit ci-dessus.

## 2.2. Etude de la cytotoxicité de l'hydrogel

### a) Conditions expérimentales

#### Matériels:

- 10 - Plaque de culture 24 puits Corning-Costar (Corning BV, Schiphol-Rijk, The Netherlands).
- Actinomycine D (Sigma-Aldrich)
- DMSO (Sigma-Aldrich)
- Méthyle Tetrazolium Salt (MTS) (Cell Titer 96 MTS, Promega corporation, Madison, WI).
- 15 - Phényle Méthyle Sulfoxyde (PMS) (Sigma-Aldrich).
- Phosphate buffered salt (PBS, Invitrogen corporation)

Afin de déterminer la cytotoxicité de l'hydrogel, les chondrocytes primaires humains, les cellules SW1353 et C28/I2, sont répartis dans des plaques de culture 24 puits à une densité de 10 000 cellules par cm<sup>2</sup>. Après 24 heures d'incubation à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>, les cellules sont cultivées en présence (500 µl de Si HPMC par puits) ou en absence d'hydrogel (500 µl de milieu complet) pendant 24, 48, et 72 heures. Des cellules cultivées en absence d'hydrogel sont également traitées par de l'Actinomycine D (5 µg/ml) ou son excipient (DMSO) pour disposer d'un contrôle positif de cytotoxicité.

### b) Test MTS

Ce test colorimétrique mesure la capacité des mitochondries des cellules vivantes à oxyder le sel de tétrazolium MTS en formazan. Le produit coloré formé est proportionnel à l'activité déshydrogénase des mitochondries. La mesure de l'absorbance permet donc de quantifier la viabilité cellulaire. Après 24, 48, et 72 heures d'incubation dans les conditions décrites ci-dessus, les cellules sont

lavées avec du milieu complet et incubées 1 heure à 37°C en présence de 100 µl de réactif MTS contenant 48µg/ml de PMS et 2mg/ml de MTS. La mesure d'absorbance à 490 nm est réalisée par un lecteur de microplaque (MRX, Dynatech Laboratories, VWR international). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité MTS par rapport aux conditions contrôles (cellules cultivées en absence d'hydrogel).

c) **Dénombrement cellulaire**

Après 24, 48 et 72 heures d'incubation dans les conditions précisées ci-dessus, le milieu de culture avec ou sans hydrogel est aspiré et remplacé par 200 µl de trypsine/EDTA. Les cellules sont incubées 2 minutes en atmosphère humide à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub>. Les cellules sont ensuite collectées et centrifugées (8 min, 1200 rpm) en présence de 2 ml de milieu de culture complet. Le culot est resuspendu dans 2 ml de milieu de culture complet et les cellules sont dénombrées après coloration vitale par une solution de Bleu Trypan (0.04% dans PBS) sur cellule de Malassez. Les résultats sont exprimés en nombre total de cellules par puits.

## **RESULTATS**

### **2.3 Caractérisation des Chondrocytes nasaux humains**

Afin de caractériser le phénotype des cellules isolées de cartilage nasal humain, les inventeurs ont étudié par RT-PCR l'expression de certains marqueurs du phénotype chondrocytaire après isolation et au cours d'une culture en monocouche. Cette étude montre que les chondrocytes nasaux fraîchement isolés (P0) exprimaient le collagène II, l'Aggrécane, et le collagène X mais également le collagène I. Lors des différents passages, les inventeurs ont observé une modification de l'expression de ces différents gènes. L'expression du collagène de type II a diminué entre P0 et P3. L'aggrécane a présenté une baisse de son expression entre P0 et P1. Le collagène X était faiblement exprimé par les chondrocytes fraîchement isolés, son expression n'était plus détectable à P3. En revanche, l'expression du collagène de type I a augmenté fortement entre P2 et P3.

Ces résultats montrent que les chondrocytes nasaux fraîchement isolés exprimaient le collagène II, l'aggrécane et le collagène X. L'expression de ces marqueurs chondrocytaires a diminué en culture monocouche et s'est accompagnée d'une forte augmentation de l'expression du collagène de type 1.

5

## 2.4 Cytotoxicité de l'hydrogel

### a) Mesure de l'activité MTS des chondrocytes cultivés au contact du gel :

Pour déterminer l'effet cytotoxique de l'hydrogel sur les chondrocytes, les inventeurs ont réalisé un dosage de l'activité MTS sur les lignées cellulaires SW1353 et C28/I2 et sur les chondrocytes humains nasaux après 24h, 48h et 72 heures de culture au contact de l'hydrogel Si-HPMC.

Les résultats ont montré que l'activité MTS n'était pas modifiée par la présence de l'hydrogel. En effet, il n'a pas été observé de différence significative, pour les chondrocytes SW1353, C28/I2 et les chondrocytes humains, entre les conditions de cultures contrôles et les cultures réalisées au contact de l'hydrogel. En revanche, l'actinomycine-D, inhibiteur de la transcription, utilisée ici comme contrôle positif de la cytotoxicité a entraîné une diminution significative de l'activité MTS dès 24 heures. L'activité MTS des chondrocytes SW1353, C28I2 et isolés du cartilage nasal humain après 24 heures en présence d'actinomycine D a diminué respectivement de 72%, 69% et 86% (figures 1A à 1C).

Ces résultats montrent que l'hydrogel n'a pas affecté l'activité MTS ni des chondrocytes SW1353 et C28/I2, ni des chondrocytes nasaux humains.

### 25 b) Dénombrement au bleu trypan:

Afin de déterminer l'influence de l'hydrogel sur la prolifération cellulaire, les inventeurs ont réalisé un dénombrement cellulaire à l'aide d'une coloration au bleu trypan. Cette coloration permet de distinguer les cellules vivantes (blanches) des cellules mortes (bleues). Ce dénombrement est effectué après 24h, 48h et 72 heures de culture au contact de l'hydrogel pour les lignées cellulaires SW1353 et C28/I2 et pour les chondrocytes nasaux humains (figures 2a à 2C).

Il n'a pas été observé de différence significative entre le nombre de chondrocytes SW1353, C28/I2 et chondrocytes nasaux humains cultivés dans les conditions contrôles et lors d'une culture réalisée au contact de l'hydrogel de Si-HPMC. En revanche, l'actinomycine-D a entraîné une diminution significative du nombre de cellules dès 24 heures. Le nombre de chondrocytes SW1353 a diminué de 88%, le nombre de chondrocytes C28/I2 a diminué de 81% après 24 heures d'incubation avec l'actinomycine D. Les chondrocytes nasaux humains ont enregistré une diminution de 43% après 24h de traitement par l'actinomycine D.

Ces résultats montrent que l'hydrogel n'a pas entraîné de modification de la prolifération que ce soit pour les chondrocytes SW1353, les chondrocytes C28/I2 ou les chondrocytes nasaux humains.

15

### **Exemple 3 : Culture des chondrocytes dans l'hydrogel**

#### **3.1 Observation des chondrocytes en culture tridimensionnelle**

### **MATERIELS ET METHODES**

#### **20 Conditions expérimentales**

Matériels:

- Cell tracker green (CTG) (Molecular probes, Leiden, The Netherlands).

- Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) (Molecular probes) .

25 Les chondrocytes articulaires de lapins, les cellules SW1353 et les C28/I2, sont mis en suspension dans l'hydrogel à raison de 1 million de cellules/ml d'hydrogel. 500 µl de ce mélange sont déposés dans des puits de plaques de culture 24 puits. Les cellules sont ensuite cultivées en présence de milieu complet pendant 48h, 96 h, 1 semaine et deux semaines. Parallèlement, un  
30 contrôle positif de mort cellulaire est réalisé par addition d'une solution d'actinomycine D à 5µg/ml. Les cellules cultivées au sein de l'hydrogel sont

observées grâce au cell tracker green (CTG) et ethidium homodimer1 (EthD-1). Le CTG est un produit incolore qui diffuse librement au travers des membranes cellulaires. Il est ensuite transformé dans le cytoplasme par la glutathione S-transférase en un produit fluorescent incapable de ressortir de la cellule. Le CTG produit une fluorescence verte dans les cellules vivantes. L'EthD-1 est un agent intercalant de l'ADN dont la fluorescence augmente de 40 fois après fixation sur les acides nucléiques. Il ne pénètre que dans les cellules présentant des dommages membranaires. L'emploi conjoint de ces deux colorants permet une colocalisation des cellules vivantes (coloration verte) et des cellules mortes (coloration rouge) (Magne et al., 2003). Le milieu de culture est aspiré et remplacé par 400 µl d'une solution de CTG à 5 µM dans du milieu de culture complet. Les cellules sont ensuite incubées 1h à 37°C. La solution de CTG est ensuite remplacée par du milieu complet et les cellules sont à nouveau incubées 30 minutes à 37°C. Après un rinçage au PBS, les cellules sont traitées 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière par 400 µl d'une solution d'EthD-1 à 1µM dans du milieu complet sans SVF. Le milieu est finalement enlevé, l'hydrogel est aspiré et monté entre lame et lamelle. Les images sont obtenues par microscopie épifluorescente (Axioplan, Zeiss, Jena, Germany) et sont enregistrées à l'aide d'une caméra numérique DC30 (Kappa opto-electronics Gmbh, Gleichen, Germany).

Les cellules dans le gel ont également été visualisées par microscopie confocale inversée à balayage laser (IFR 26, Caroline Vignes-Colombeix) après 24, 48 et 72 h de culture comme détaillé ci-dessus. Le microscope confocale crée une image nette en éliminant les signaux n'appartenant pas au plan focal. Ce microscope possède une platine porte-objet pouvant se déplacer dans l'axe Z, ce qui permet de faire varier le plan focal et ainsi de visualiser différents plans de l'échantillon. La fluorescence du CTG a été repérée en utilisant le détecteur de la fluorescéine isothiocyanate (FITC:  $\lambda_{ex}$  = 488 nm;  $\lambda_{em}$  collectée = 490-560 nm). La fluorescence de EthD-1 est visualisée par le détecteur de la rhodamine (TRITC:  $\lambda_{ex}$  = 568 nm;  $\lambda_{em}$  collectée = 570-700 nm).

## RESULTATS

Dans le but d'observer le développement des chondrocytes lors d'une culture tridimensionnelle au sein de l'hydrogel, les inventeurs ont effectué des colorations (CTG et EthD-1) sur les chondrocytes SW1353, C28/I2 et sur des chondrocytes articulaires de lapin. Ils ont ensuite observé les chondrocytes en  
5 microscopie à fluorescence. Au sein de l'hydrogel, les chondrocytes SW1353, les C28/I2 ou les chondrocytes articulaires de lapin ont présenté une forme arrondie et étaient fortement colorés en vert par le cell tracker green. De rares cellules apparaissaient colorées en rouge. Les chondrocytes SW1353, C28I2 et articulaires de lapins se sont développés en trois dimensions dans l'hydrogel en  
10 formant des nodules dont le nombre et la taille augmentaient en fonction du temps de culture.

Afin de proposer une observation tridimensionnelle des cellules cultivées dans l'hydrogel, ils ont complété leurs observations par de la microscopie confocale. Seules les observations des cellules C28I2 sont reportées dans ce  
15 travail. La microscopie confocale a montré les mêmes résultats que ceux obtenus précédemment en microscopie fluorescente classique. Les cellules se développent sous forme de nodules. Les cellules traitées à l'actinomycine D pendant 48h ont présenté une forte coloration rouge. De rares cellules conservaient une coloration verte. Ces résultats indiquent que dans nos  
20 conditions de culture, la double coloration cell tracker green/ethyidium homodimer-1 a permis de différencier les cellules vivantes des cellules mortes. Les observations des chondrocytes SW1353, des chondrocytes nasaux humains et des chondrocytes articulaires de lapin sont en cours d'analyse.

L'ensemble de ces résultats montrent que les chondrocytes SW1353,  
25 C28/I2 et les chondrocytes articulaires de lapin ont conservé leur viabilité en culture tridimensionnelle au sein de l'hydrogel.

### **3.2 Analyse du phénotype chondrocytaire**

30 Afin d'analyser le phénotype chondrocytaire, l'expression des messagers codant pour certains marqueurs des chondrocytes a été recherchée par RT-PCR.

a) Conditions expérimentales

Matériels :

- Trizol® reagent (Invitrogen Corporation).

Afin de caractériser le phénotype des cellules isolées du cartilage nasal  
5 humain, une fraction des cellules fraîchement isolées est congelée en présence  
de Trizol® (passage 0; P0). L'autre fraction cellulaire est répartie à raison de 10  
000 cellules/cm<sup>2</sup> dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup>. Les cellules sont repiquées toutes  
les semaines dans les conditions décrites précédemment (chapitre a)). Après 1, 2  
et 3 passages, les cellules sont congelées à -80°C en présence de Trizol®  
10 (Passage 1 (P1), 2 (P2), et 3 (P3)).

Les chondrocytes fraîchement isolés de cartilage articulaire de lapins sont  
répartis à raison de 1 million de cellules/ml d'hydrogel et 2ml de ce mélange sont  
déposés dans des puits de plaque de culture 6 puits. Les cellules sont ensuite  
cultivées pendant 3 semaines avant congélation en présence de Trizol® .

15

b) Extractions des ARN totaux

Matériels :

- Chloroforme (VWR).
- Isopropanol (Sigma Aldrich).
- 20 - Ethanol (VWR).
- Agarose (Promega Corporation)
- bromure d'ethidium (BET) (Promega corporation)
- Tris Borate EDTA (TBE) (Invitrogen corporation)

Les cellules sont décongelées sur de la glace, grattées puis la solution de  
25 Trizol® est collectée et centrifugée pendant 10 minutes à 12 000 rpm et à 4°C.  
La phase supérieure est prélevée et additionnée de 200 µl de chloroforme puis  
vortexée 15 secondes. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante,  
les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 12 000 rpm et à 4°C. La phase  
aqueuse est prélevée et les ARNs totaux sont précipités par centrifugation  
30 (12000 rpm, 15 minutes, 4°C) en présence de 500 µl d'isopropanol. Le  
surnageant est prélevé et le culot est lavé avec de l'éthanol 75 % puis séché. Les  
ARNs totaux sont repris dans 20 µl d'eau. La quantité d'ARNs isolée est ensuite

évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm. Les concentrations d'ARNs sont finalement ajustées à 1 µg/µl. Afin de vérifier l'intégrité des ARNs extraits, 500 ng d'ARNs totaux sont séparés par électrophorèse sur gel d'Agarose à 1% dans du tampon TBE contenant du BET. La migration s'effectue à 100V pendant 30 minutes. Les ARNs totaux sont visualisés à l'aide d'un transilluminateur UV.

c) Analyse des transcrits par RT-PCR

- Traitement à la DNAase

Matériels :

- Désoxyribonucléase I (DNAse I) 5U/µl (Invitrogen Corporation)
- 10 - Tampon de DNAse I 10X (Invitrogen Corporation)
- Acide Ethylène diamine tétra acétique (EDTA) 25 mM (Invitrogen Corporation).

Deux µg d'ARN sont prélevés et additionnés d'1 µl de tampon de DNAse I 10X, 1 µl de DNAse I (5U/µl) et le volume est ajusté à 10µl avec de l'eau stérile. Les échantillons sont ensuite incubés 15 minutes à température ambiante. La réaction est arrêtée par l'addition de 1µl d'EDTA 25 mM et le produit de la réaction est placé 10 minutes à 65°C.

- Transcription inverse (RT)

20 Matériels:

- Désoxynucleotide triphosphate (dNTP) 10 mM (Invitrogen Corporation).
- Amorces hexanucléotidiques à 0.5µg/µl (Random Hexamers, Promega Corporation hexaprimer C1181).
- 25 - Avian Myeloblastosis virus reverse transcriptase (AMV-RT) 10U/µl (Promega Corporation).
- Tampon AMV-RT 5X (Promega corporation)
- RNAse inhibitor ( RNAsine) 400U/µl (Promega Corporation).

A chaque échantillon préalablement traité à la DNAase, sont ajoutés 3µl de dNTP à 10 mM, 3µl d'amorces hexanucléotidiques, 6µl de tampon AMV-RT , 1µl d'AMV-RT, 1µl de RNAsine et le volume est ajusté à 30 µl avec de l'eau

stérile. La transcription inverse est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (Eppendorf Mastercycler, VWR) dans les conditions suivantes : 10 minutes à 25°C, 50 minutes à 42°C et 10 minutes à 95°C. La solution d'ADN complémentaire simple brin (ADNc) ainsi obtenue est ensuite stockée à -20°C jusqu'à son utilisation pour la réaction de PCR.

- Réaction de polymérase en chaîne (PCR)

Matériels :

- Amorces oligomériques spécifiques (MWG Biotech, Courtaboeuf, France).
- Tampon Taq polymérase 10X (Invitrogen Corporation).
- Taq polymérase 5U/μl (Invitrogen Corporation).
- MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen Corporation).

La PCR est réalisée à partir de 2 μl de solution de cDNA auxquels sont ajoutés 0,5 μl d'amorce sens et 0,5 μl d'amorces antisens à 100ng/μl, 5 μl de tampon de taq polymérase, 1.5 μl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 μl de taq polymérase et 40 μl d'eau. Les réactions de PCR sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur (Eppendorf Mastercycler) dans les conditions suivantes : 3 minutes de dénaturation à 94°C suivi de 30 cycles de 20 secondes à 94°C (dénaturation), 20 secondes à 60°C (hybridation) et 20 secondes d'élongation à 72°C. La réaction de PCR est achevée par 10 minutes d'élongation à 72°C. Les résultats de cette étude présentent des produits de PCR obtenus dans la phase exponentielle d'amplification. La séquence des amorces, les températures d'hybridation et la taille des amplicons sont précisées dans le tableau 2 ci dessous.

Tableau 2 : Séquence des amorces, température d'hybridation et taille des amplicons pour les gènes référencés.

Gènes	Séquences des amorces Sens (S) et anti-sens (AS)	Tm	Taille amplicons
actine humaine	S 5'-TCTCCATGTCGTCCCAGTTG-3' AS 5'-AGTCTTCCCCCTCCATCGTTG-3'	60°C	164 pb
Collagène II (alpha 1) humain	S 5'-GGCAATAGCAGGTTACGTACA-3' AS 5'-GAGGCGTGAGGTCTTCTGTGA-3'	60°C	108 pb

et lapin			
Aggrécane humain et lapin	S 5'-CCCTGGCAATGATGGCACTGTTC-3' AS 5'-TGGCAATGATGGCACTGTTC-3'	60°C	117 pb
Collagène I (alpha 2) humain	S 5'-CATGGAAACCGTGGTCAAAC-3' AS 5'-ACCAGCGATACCAGGCAGAC-3'	60°C	186 pb
Collagène X humain et lapin	S 5'-CAAGGCACCATCTCCAGGAA-3' AS 5'-GCATTTGGTATCGTTCAGCGT-3'	60°C	131 pb
Collagène I (alpha 1) lapin	S 5'-GATGCGTTCAGTTCGAGTA-3' AS 5'-GGTCTCCGGTGGTCTTGTA-3'	55°C	312 pb

d) Séparation sur gel d'agarose

La séparation électrophorétique des produits d'amplification PCR a été réalisée sur gel d'agarose à 2% dans du tampon Tris Borate EDTA (TEB) 1X. Les bandes sont révélées par du bromure d'éthidium à l'aide d'un trans-illuminateur UV. La taille des amplicons est référencée dans le tableau 2.

d) Analyse densitométrique semi-quantitative des gels d'agarose.

L'intensité des bandes obtenues sur les gels d'agarose à 2% (gènes d'intérêts et gène de référence) a été estimée à l'aide du logiciel Leica Q500 (Leica Imagine Systems, Cambridge, UK) permettant l'analyse semi-quantitative par densitométrie des transcrits amplifiés aux différentes conditions expérimentales. Les résultats sont exprimés comme le ratio gène d'intérêt/gène de référence en unité arbitraire.

15

## RESULTATS

Afin de vérifier le maintien du phénotype des chondrocytes articulaires de lapin en culture tridimensionnelle au sein de l'hydrogel, ils ont évalué par RT-PCR l'expression des transcrits codant pour le collagène de type II, l'aggrécane et le collagène X. Parallèlement, l'expression du collagène de type I a également été recherchée.

Lors d'une culture en monocouche, les inventeurs ont observé une diminution de l'expression du collagène de type II, de l'aggrécane et du collagène de type X. A près trois semaines de culture le collagène de type II demeurait

faiblement exprimé, alors que le collagène de type X et l'aggrécane n'étaient plus détectables. Parallèlement, nos résultats montrent que l'expression du collagène de type I est augmentée après trois semaines de culture en monocouche.

A l'inverse, lorsque les cellules sont cultivées en trois dimensions dans l'hydrogel pendant trois semaines, l'expression du collagène de type II, de l'aggrécane et du collagène de type X sont maintenues. L'expression du collagène de type I n'est pas apparue stimulée.

Ces résultats indiquent que la culture tridimensionnelle des chondrocytes articulaires de lapin permet le maintien de l'expression des marqueurs chondrocytaires (collagène II, aggrécane et collagène X).

#### **Exemple 4 : étude de la redifférenciation des chondrocytes en culture tridimensionnelle**

Dans le but d'étudier la redifférenciation des chondrocytes en culture tridimensionnelle dans l'hydrogel préparé à l'exemple 1, des chondrocytes nasaux humains et articulaire de lapin fraîchement isolés ont été cultivés en monocouche pendant 4 semaines, puis en trois dimensions dans l'hydrogel et parallèlement en monocouche pendant 4 semaines.

Les ARN totaux ont été extraits à chaque passage lors des cultures en monocouche et à 2, 3 et 4 semaines pour les cultures tridimensionnelles. L'expression du collagène de type II et l'aggrécane marqueurs spécifiques du phénotype chondrocytaire, mais aussi le collagène de type I marqueurs de la dédifférenciation des chondrocytes ont été recherchés par RT-PCR.

Les résultats montrent que les chondrocytes fraîchement isolés expriment le collagène de type II, le collagène de type I et l'aggrécane. L'expression de ces marqueurs est modifiée lors de la culture en monocouche, l'expression du collagène II et de l'aggrécane diminue lors des différents passages jusqu'à disparaître au bout de trois passages, alors que l'expression du collagène de type I augmente fortement dès le premier passage et reste fortement exprimé lors des différents passages. Les chondrocytes semblent donc s'être dédifférenciés au bout de trois passages en culture monocouche. Ensuite, lors de la culture tridimensionnelle de ces chondrocytes dans l'hydrogel, les

résultats ont montré une augmentation de l'expression du collagène de type II ainsi que de l'agrécane mais également une diminution de l'expression du collagène de type I. Ces résultats suggèrent que les cellules ont retrouvé un phénotype chondrocytaire dans l'hydrogel.

5 Ces résultats indiquent que l'hydrogel utilisé permet la redifférenciation de chondrocytes préalablement dédifférenciés.

### **Tests statistiques**

Toutes les expériences ont été réalisées en triple. Chaque expérience a  
10 été réalisée deux fois. Les résultats sont exprimés comme la moyenne +/- l'écart type. Les études comparatives de moyennes ont été effectuées en utilisant le test Anova. Les résultats sont considérés comme significativement différents pour  $p < 0,05$ .

15

### **Exemple 5 : implantation sous-cutanée de chondrocytes nasaux**

Des hydrogels ont été préparés comme décrit aux exemples précédents, intégrant des chondrocytes humains dérivés de cartilage nasal (CNH). Ils ont  
20 ensuite été implantés en site sous-cutané chez la souris nude, et laissés pendant trois semaines.

Les expériences ont été menées dans les cinq conditions suivantes :

- 1) chondrocytes nasaux humains cultivés en trois dimensions dans l'hydrogel pendant 15 jours avant implantation.
- 25 2) chondrocytes nasaux humains cultivés 15 jours en monocouche avant implantation *via* l'hydrogel.
- 3) chondrocytes nasaux humains fraîchement isolés et implantés *via* l'hydrogel.
- 4) fibroblastes de prépuce humain cultivés 15 jours en monocouche  
30 avant implantation *via* l'hydrogel.
- 5) hydrogel seul.

Lors de la récupération des implants, les inventeurs ont pu constater que trois semaines après implantation, les implants étaient toujours bien visibles. L'hydrogel ne s'est donc pas résorbé durant ces trois semaines. Les analyses histologiques ont montré la présence de nodules de chondrocytes positifs pour la coloration bleu Alcian au sein de l'hydrogel, ceci pour les trois conditions contenant des CNH (conditions 1, 2 et 3). L'ensemble de ces résultats nous a donc montré que l'hydrogel de Si-HPMC permettait la néoformation d'un tissu de type cartilagineux après trois semaines *in vivo*.

**BIBLIOGRAPHIE**

- 5           - Bourges et al., 2002a, General properties of silated hydroxyethylcellulose for potential biomedical applications, *Biopolymers* **63**(4) :232-8
- Bourges X, Weiss P, Daculsi G, Legeay G, 2002b Synthesis and general properties of silated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of  
10 biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci* **99**(3):215-28
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L 1994 Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* **331**(14):889-95
- Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R 2003 Tissue engineering  
15 and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol* **22**(1):81-91
- Ghayor C, Herrouin JF, Chadjichristos C, Ala-Kokko L, Takigawa M, Pujol JP, Galera P 2000 Regulation of human COL2A1 gene expression in chondrocytes. Identification of C-Krox-responsive elements and modulation by phenotype alteration. *J Biol Chem* **275**(35):27421-38
- 20           - Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, Arbisser JL, Apperley JF 1994 Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* **94**(6):2307-16
- Hunziker EB 2002 Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*  
25 **10**(6):432-63
- Magne D, Bluteau G, Faucheux C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, Pilet P, Rouillon T, Caverzasio J, Weiss P, Daculsi G, Guicheux J 2003 Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization : possible implication of apoptosis in the regulation of  
30 endochondral ossification. *J Bone Miner Res* **18**(8):1430-42
- Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE 2000 Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear

factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. Arthritis Rheum **43**(4):801-11

- Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ 1993 Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am **75**(4):532-53

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un hydrogel d'hydroxyéthylcellulose (HEC) silanisée ou  
5 d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) silanisée, auto-réticulant en fonction du  
pH, pour la culture tridimensionnelle *ex vivo* de chondrocytes.

2. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle l'hydrogel est  
susceptible d'être obtenu par réaction d'HEC ou d'HPMC avec un composé de  
10 formule (1) :



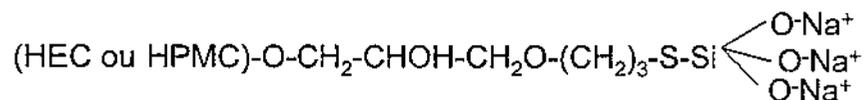
où X représente un atome d'halogène ou un groupe hydrocarboné à  
fonction époxy, notamment en C<sub>2-20</sub>, et Z est choisi parmi un atome d'hydrogène,  
un métal alcalin et un groupe alkyle, notamment en C<sub>1-5</sub>.

15

3. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, dans laquelle  
l'HEC ou l'HPMC porte des groupes latéraux silanolate ou précurseurs de  
silanolate de métal alcalin ou d'ammonium représentant de 0,5 à 5% du poids  
sec total de l'HEC ou l'HPMC.

20

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, l'hydrogel étant  
constitué d'un polymère de formule simplifiée :



5. Procédé *ex vivo* de préparation d'un complexe de cellules intégrées  
25 dans un hydrogel, complexe destiné à être injecté dans un site cartilagineux, ledit  
procédé comprenant le mélange *ex vivo* de chondrocytes avec un hydrogel  
d'hydroxyéthylcellulose (HEC) silanisée ou d'hydroxypropylméthylcellulose  
(HPMC) silanisée, autoréticulant en fonction du pH, dans un tampon biologique  
au pH approprié pour la réticulation de l'hydrogel, dans des conditions et une  
30 durée appropriées pour l'intégration et la culture tridimensionnelle des  
chondrocytes dans l'hydrogel.

6. Procédé *ex vivo* de préparation d'un complexe de cellules intégrées dans un hydrogel, complexe destiné à être injecté dans un site cartilagineux, ledit procédé comprenant le mélange *ex vivo* de cellules indifférenciées capables de  
 5 différenciation chondrogénique avec un hydrogel d'hydroxyéthylcellulose (HEC) silanisée ou d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) silanisée, autoréculant en fonction du pH, dans un tampon biologique au pH approprié pour la réticulation de l'hydrogel, dans des conditions et une durée appropriées pour l'intégration et la culture tridimensionnelle des chondrocytes issus de la différenciation desdites  
 10 cellules indifférenciées, dans l'hydrogel.

7. Procédé selon la revendication 5, comprenant les étapes *ex vivo* suivantes :

15 - l'amplification de chondrocytes en monocouche, sur un support solide ;

- la récolte des chondrocytes amplifiés, dédifférenciés de par leur amplification en monocouche ;

- le mélange des chondrocytes amplifiés dédifférenciés avec l'hydrogel dans un tampon biologique au pH approprié pour la réticulation de l'hydrogel, ce qui  
 20 conduit à l'intégration des chondrocytes au sein de l'hydrogel et à leur redifférenciation.

8. Procédé selon l'une des revendications 5 à 7, dans lequel l'hydrogel est susceptible d'être obtenu par réaction d'HEC ou d'HPMC avec un composé de  
 25 formule (1) :

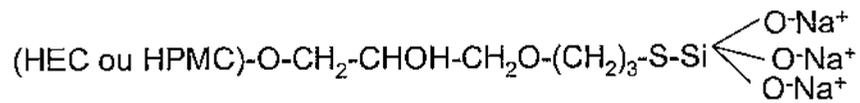


où X représente un atome d'halogène ou un groupe hydrocarboné à fonction époxy, notamment en C<sub>2-20</sub>, et Z est choisi parmi un atome d'hydrogène, un métal alcalin et un groupe alkyle, notamment en C<sub>1-5</sub>.

9. Procédé selon l'une des revendications 5 à 8, dans lequel l'HEC ou l'HPMC porte des groupes latéraux silanolate ou précurseurs de silanolate de

métal alcalin ou d'ammonium représentant de 0,5 à 5% du poids sec total de l'HEC ou l'HPMC.

10. Procédé selon l'une des revendications 5 à 9, l'hydrogel étant constitué  
5 d'un polymère de formule simplifiée :



1/2

FIG. 1

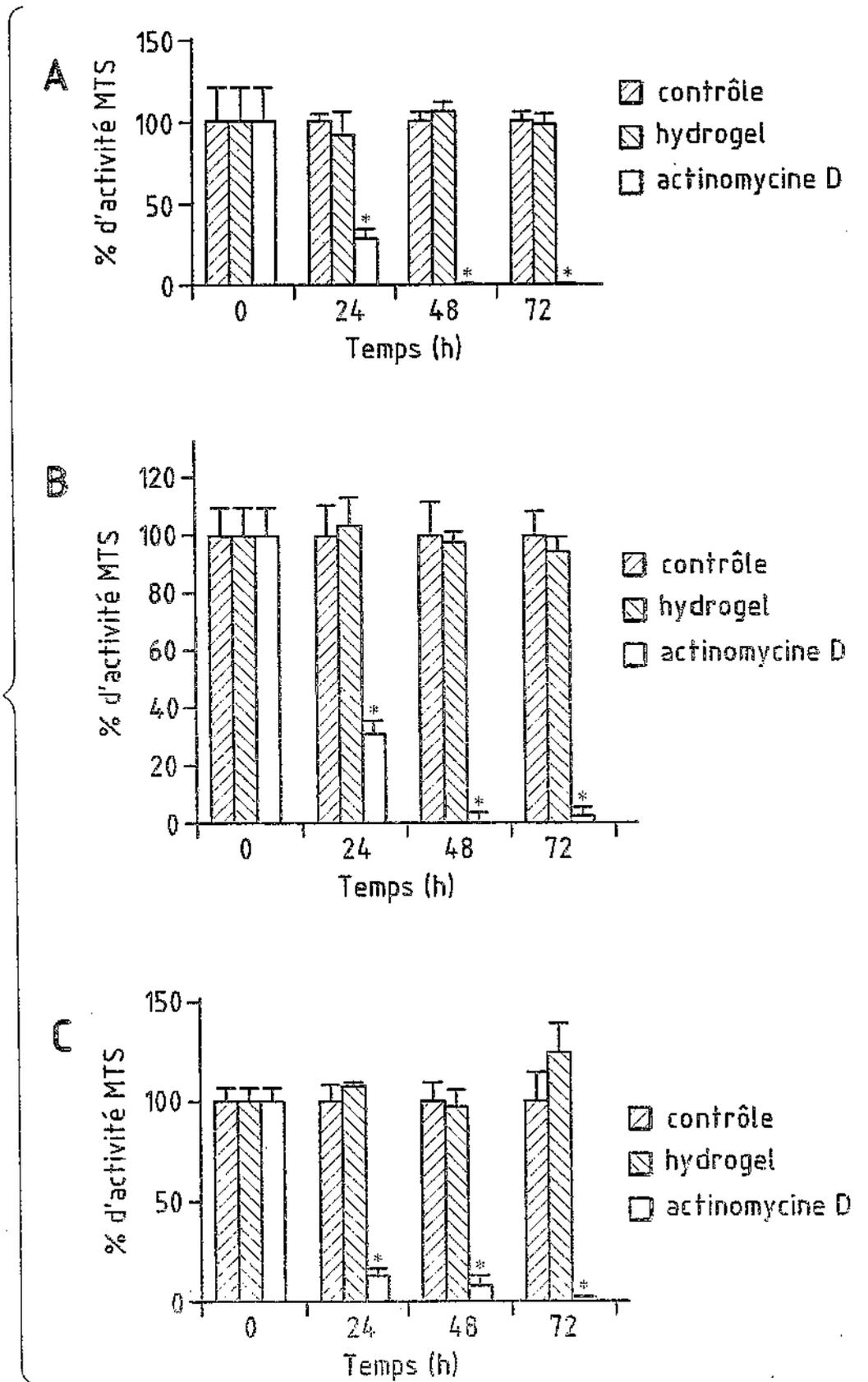
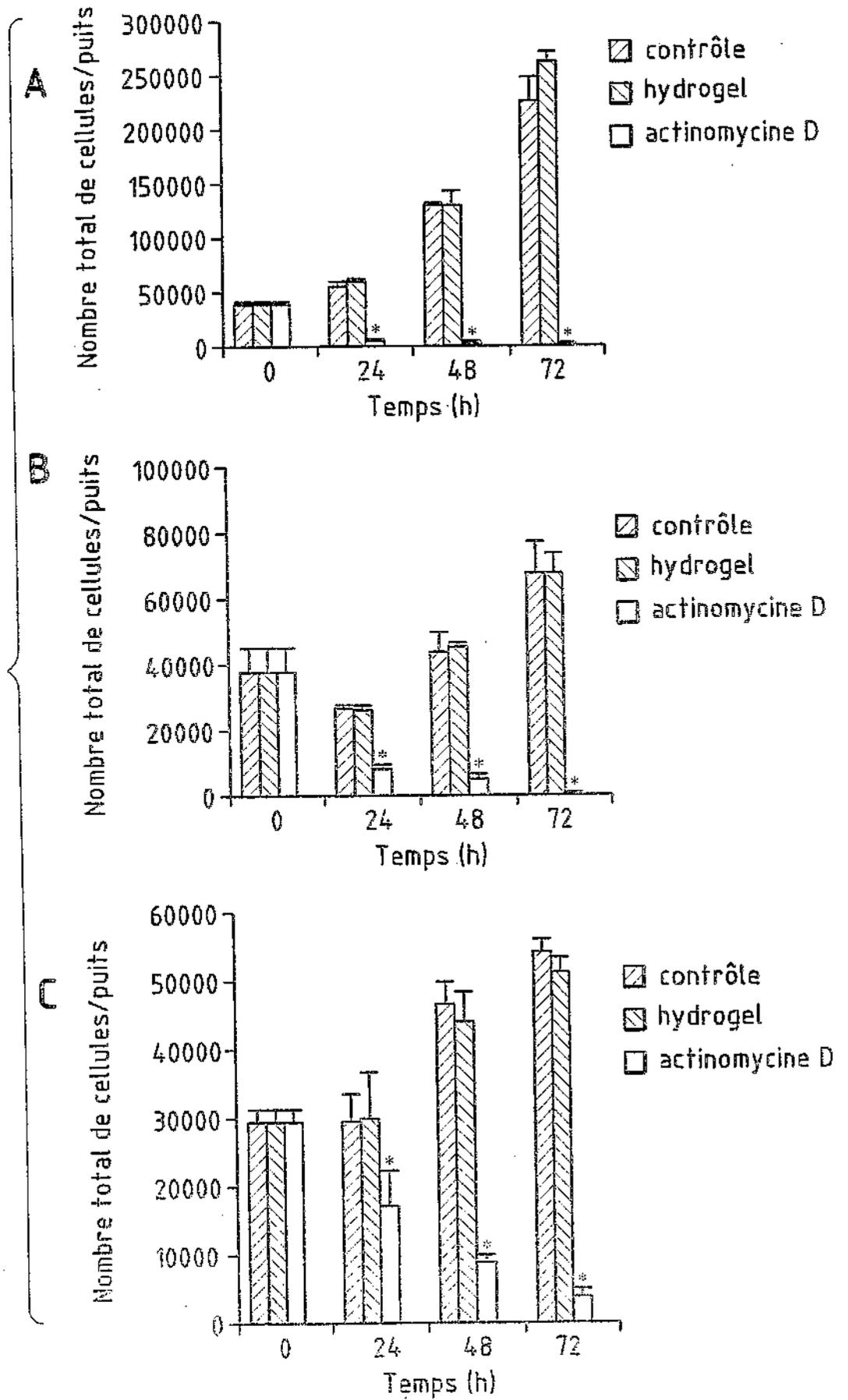


FIG.2



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/FR2004/002844

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 7 A61L27/46 A61L27/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 7 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97/05911 A (DACULSI GUY ;DUPRAZ ANNE (FR); WEISS PIERRE (FR); CENTRE NAT RECH) 20 February 1997 (1997-02-20) cited in the application the whole document	1-10
A	US 6 129 761 A (HUBBELL JEFFREY A) 10 October 2000 (2000-10-10) cited in the application the whole document	1-10

 Further documents are listed in the continuation of box C.

 Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 March 2005

Date of mailing of the international search report

05/04/2005

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Trifilieff-Riolo, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/002844

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9705911	A	20-02-1997	FR 2737663 A1	14-02-1997
			AT 214292 T	15-03-2002
			AU 707039 B2	01-07-1999
			AU 6704296 A	05-03-1997
			CA 2226304 A1	20-02-1997
			DE 69619830 D1	18-04-2002
			DE 69619830 T2	12-09-2002
			DK 843562 T3	21-05-2002
			EP 0843562 A1	27-05-1998
			ES 2173306 T3	16-10-2002
			WO 9705911 A1	20-02-1997
			JP 11510076 T	07-09-1999
			JP 3597541 B2	08-12-2004
			NO 980504 A	06-04-1998
			PT 843562 T	30-08-2002
			US 6001394 A	14-12-1999
			ZA 9606635 A	05-02-1998
US 6129761	A	10-10-2000	AU 720569 B2	08-06-2000
			AU 6048596 A	30-12-1996
			CA 2223932 A1	19-12-1996
			EP 0835143 A1	15-04-1998
			JP 11505734 T	25-05-1999
			WO 9640304 A1	19-12-1996

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/002844

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
 CIB 7 A61L27/46 A61L27/50

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
 CIB 7 A61L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
 EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 97/05911 A (DACULSI GUY ; DUPRAZ ANNE (FR); WEISS PIERRE (FR); CENTRE NAT RECH) 20 février 1997 (1997-02-20) cité dans la demande le document en entier	1-10
A	US 6 129 761 A (HUBBELL JEFFREY A) 10 octobre 2000 (2000-10-10) cité dans la demande le document en entier	1-10

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

\*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

\*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

\*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

\*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

\*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 mars 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/04/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Trifilieff-Riolo, S

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2004/002844

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication			
WO 9705911	A	20-02-1997	FR 2737663 A1	14-02-1997			
			AT 214292 T	15-03-2002			
			AU 707039 B2	01-07-1999			
			AU 6704296 A	05-03-1997			
			CA 2226304 A1	20-02-1997			
			DE 69619830 D1	18-04-2002			
			DE 69619830 T2	12-09-2002			
			DK 843562 T3	21-05-2002			
			EP 0843562 A1	27-05-1998			
			ES 2173306 T3	16-10-2002			
			WO 9705911 A1	20-02-1997			
			JP 11510076 T	07-09-1999			
			JP 3597541 B2	08-12-2004			
			NO 980504 A	06-04-1998			
			PT 843562 T	30-08-2002			
			US 6001394 A	14-12-1999			
			ZA 9606635 A	05-02-1998			
			US 6129761	A	10-10-2000	AU 720569 B2	08-06-2000
						AU 6048596 A	30-12-1996
						CA 2223932 A1	19-12-1996
EP 0835143 A1	15-04-1998						
JP 11505734 T	25-05-1999						
WO 9640304 A1	19-12-1996						

Auteur : VINATIER Claire

Directeur de thèse : GUICHEUX Jérôme

Soutenue le 22 Juin 2007

**Thèse : Doctorat d'Université, Nantes (2007)**

.....

THERAPIE CELLULAIRE DU CARTILAGE ARTICULAIRE : TRANSFERT DE CELLULES AUTOLOGUES PAR DES BIOMATERIAUX INJECTABLES.

Les lésions dégénératives du cartilage articulaire affectent une part importante de la population et représentent un enjeu majeur de santé publique. Le cartilage articulaire, tissu non vascularisé, possède de faibles capacités de réparation spontanée. Pour promouvoir la réparation de ce tissu, l'amplification et le transfert de chondrocytes autologues par un biomatériau apparaît prometteur. Dans ce but, nous avons développé un hydrogel auto réticulant à base d'hydroxypropyl méthylcellulose silanisée (HPMC-Si). Lors d'une première étude, nous avons démontré que notre hydrogel HPMC-Si permettait la prolifération de chondrocytes, la production de GAG sulfatés et l'expression des principaux marqueurs chondrocytaires (collagène II et agrécane). Dans un deuxième temps, nous avons démontré que cet hydrogel associé à des chondrocytes nasaux humains était capable de former un tissu cartilagineux en sites sous-cutanés chez la souris *nude*. Dans un troisième temps, la transplantation de chondrocytes nasaux autologues associés à l'HPMC-Si dans des défauts cartilagineux, en site articulaire chez le lapin, a permis la formation d'un tissu de réparation cartilagineux de nature hyaline. Le cartilage nasal et l'hydrogel HPMC-Si semblent donc être respectivement une source de cellules et une matrice de choix pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Parmi les stratégies actuelles en ingénierie tissulaire du cartilage, la validation de nouvelles sources de cellules autologues, en particulier les cellules souches mésenchymateuses adultes, font l'objet de recherches intenses. Ces travaux pourraient déboucher sur l'ouverture de nouvelles fenêtres thérapeutiques en médecine régénérative.

CELL THERAPY OF ARTICULAR CARTILAGE: TRANSFER OF AUTOLOGOUS CELLS WITH INJECTABLE BIOMATERIALS

Degenerative joint diseases affect a significant part of the population and thus represent a major stake of public health. It is well known that the intrinsic repair capacity of articular cartilage is limited. To promote the repair of this tissue, amplification and transfer of autologous chondrocytes using a three-dimensional matrix appear promising. In this attempt, we developed a self-setting and three-dimensional matrix consisting of a silanized cellulose derivative (Si-HPMC). Firstly, we have shown that Si-HPMC enabled the proliferation of articular chondrocytes and the expression of the main chondrocytic markers during a three-dimensional culture *in vitro*. Secondly, we have demonstrated that our Si-HPMC hydrogel containing human nasal chondrocytes allowed the production of a cartilage-like extracellular matrix containing Glycosaminoglycans and type II collagen in subcutaneous site in nude mice. Thereafter, the formation of hyaline-like repair cartilage containing type II collagen and glycosaminoglycans have been achieved after the transplantation of Si-HPMC containing autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. Our data indicated that Si-HPMC is a valuable matrix, and that nasal cartilage is a clinically relevant cell source for tissue engineering. Recently, the use of mesenchymal stem cells (MSC) as an alternative cell source for cartilage tissue engineering has been contemplated. This use of MSC could allow to open new therapeutic windows in regenerative medicine.

.....

**Discipline** : Ingénierie tissulaire / Biologie cellulaire

**Mots clés** :

Cartilage articulaire, hydrogel, thérapie cellulaire, ingénierie tissulaire, biomatériaux, chondrocytes