

UNIVERSITE DE NANTES

U.F.R. D'ODONTOLOGIE

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANTES

Ecole Doctorale Biologie-Santé

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement le

27 Juin 2013

Par

Sophie PORTRON

**MODULATION DE LA DIFFERENCIATION CHONDROGENIQUE :
APPLICATION EN INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE**

Devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

Farida DJOUAD

Chargée de Recherche INSERM, Montpellier.

Arnaud SCHERBERICH

Professeur Assistant Hôpital Universitaire, Bâle.

Directeur de thèse

Olivier GAUTHIER

Professeur ONIRIS Ecole Nationale Vétérinaire
Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes Atlantique.

Encadrante de thèse

Claire VINATIER

Chercheur associé Université de Nantes, Nantes.

Examineurs

Frédéric MAZURIER

Directeur de Recherche INSERM, Bordeaux.

Jérôme GUICHEUX

Directeur de Recherche INSERM, Nantes.

Membre invité

Laurent BECK

Chargé de Recherche INSERM, Nantes.

A mes grands-parents,

A mon Père et ma Mère,

A ma Sœur,

A mes amours,

A mes amis,

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens avant tout à adresser mes remerciements aux personnes qui ont accepté de juger ce travail.

Farida Djouad et Arnaud Scherberich pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Frédéric Mazurier et Jérôme Guicheux pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur.

Olivier Gauthier et Claire Vinatier pour avoir accepté de juger ce travail non seulement au quotidien mais également en ce jour particulier.

Laurent Beck pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce manuscrit et pour avoir accepté de juger ce travail en tant que membre invité.

Mes remerciements vont également vers les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail :

Pierre Weiss pour son accueil au sein du Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire-Unité INSERM 791.

Jérôme Guicheux pour avoir participé activement à ces travaux de thèse, pour ses conseils avisés et sa rigueur scientifique. Pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant au sein du groupe « Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology ».

Olivier Gauthier pour avoir dirigé cette thèse. Pour sa disponibilité, son soutien et la confiance qu'il a su m'accorder. Pour la pertinence de ses conseils au cours de ces années et lors de la correction de ce manuscrit.

Claire Vinatier pour avoir encadré cette thèse. Pour son soutien et sa présence même à distance ainsi que pour la rigueur dont elle a fait preuve lors de la correction de ce manuscrit.

Laurent Beck pour avoir contribué à la réalisation des derniers travaux de thèse, pour les conseils et le soutien qu'il a pu m'offrir.

Philippe Galéra, (EA 3214, Caen) et François Vallette, (INSERM U 892 / CNRS U 6299, Nantes) pour leurs précieux conseils et réflexions scientifiques lors de mes comités de thèse. Pour leurs contributions à l'avancée de ces travaux de thèse.

Je remercie également Julie Lesoeur, Sophie Sourice, Caroline Colombeix, Maïthé Perre, Martial Masson, Aurélie Ngo-van-do, acteurs présents et passés des plateformes « Histologie » et « Biologie Cellulaire et Moléculaire » de l'unité INSERM U 791.

Le service de chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique de la clinique Bretéché, et tout particulièrement Florence Lejeune pour m'avoir permis d'obtenir de précieux prélèvements tout au long de ma thèse ainsi que pour sa disponibilité et sa réactivité.

Edouard Hirchaud, Catherine Chevalier, Audrey Bihouée et Richard Redon de la plateforme puces à ADN Biogenouest (INSERM U 1087), pour leur aide dans la réalisation de mes expérimentations.

Lisa Oliver (INSERM U 892) et Patrice Naud (INSERM U 1087) pour leurs aides dans la réalisation des TLDA et pour m'avoir permise d'utiliser la chambre hypoxique.

Sylvia Collic-Jouault et Corinne Sinquin (IFREMER-Nantes) pour avoir produit les polysaccharides marins ainsi que pour leur participation scientifique à ces travaux.

Mike Maillason et Yannick Jacques (plateforme IMPACT-Biogenouest, INSERM U 892) pour la réalisation des mesures en résonance plasmonique de surface.

Christelle Volteau (plateforme de biométrie, CHU Nantes) pour ses précieux conseils en analyse statistique.

Nathalie Mazure et Jacques Pouysségur (INSERM U 1081, Nice) pour m'avoir fourni l'anticorps HIF-1alpha.

Sophie Conchon, Virginie Pichard et Jean-Paul Judor de l'unité INSERM 1064, ainsi qu'Isabelle Lamrissi-Garcia et Alice Bideyan (plateforme de vectorologie, INSERM U 1035) pour leurs aides dans la réalisation de nos expérimentations avec des particules lentivirales.

Les membres de l'Unité de Thérapeutique Expérimentale (faculté de médecine, Nantes) ainsi que les membres de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes - ONIRIS pour leurs aides dans la réalisation des expérimentations animales.

Je remercie enfin la Fondation Arthritis-Courtin, la Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée, la Fondation pour la Recherche Médicale, la Société Française de Rhumatologie, l'Agence Nationale pour Recherche, la région des Pays de la Loire, l'Université de Nantes, l'UFR d'Odontologie et l'INSERM pour leur soutien financier.

Je tiens à adresser également mes remerciements chaleureux à l'ensemble des membres du laboratoire INSERM U 791

Les « anciens » qui m'ont accompagnée lors de mes premiers pas au laboratoire : Emilie (Milou), Christophe (Kiki), Solmaz, Thomas, Jérôme, Sandrine, Mélanie (Mémé/Mèl), Lydie, Elise, Serge, et Jean- Michel. Mes remerciements vont également à Eva, Pauline, Nicolas, Vincent, Elsa, Greig, Laure, Olivier, Gildas, Maxence, Cécile, Carole, Johann, Charlotte, Fahed, Pierre-Gabriel, Maeva et toutes les nouvelles têtes qui contribuent à la convivialité de ce lieu.

Je remercie également Paul, Françoise, Sarah et Philippe pour leur soutien de tous les instants.

Mes remerciements vont également à ceux sans qui je n'aurai pas accompli cette thèse.

Vincent, Boris, Vanessa, Eloïse et Thomas.

Fabien (Constantin).

Elodie, Sandrine et Lucien, Julie et Cécile, Olivier, Julien, Raphy.

Mathilde, Nadège, Morgane, Nathalie, Maïté, Stéphanie M, Nolwenn, Stéphanie D, Nathalie : Les Super Copines. Et je n'oublie pas : Romain, Aurélien.

La Troupe d'Improvisation de Nantes « Les Komikazs » Magda, Isabelle, Florent, John, David, Jamix, Laurence, Pauline, Florent Junior, Eric, Marc, Karine, Axel, Fabrice, Elodie, Servanne, Careen, Frédéric, Maela.

Enfin, je te remercie Pierre-Antoine, pour ta patience, tes bons conseils, ton soutien et ton amour.

Liste des publications

- 1- C MERCERON, C VINATIER, **S PORTRON**, M MASSON, J AMIAUD, L GUIGAND, Y CHEREL, P WEISS, J GUICHEUX.

Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010 Feb 298:355-364 (IF. 3.817).

Sélectionné par Paul Insel comme "Highlights from the literature". *Physiology* (2010), 25:59-63.

- 2- C. MERCERON, **S. PORTRON**, M. MASSON, B. H. FELLAH, O. GAUTHIER, J. LESOEUR, Y. CHEREL, P. WEISS, J. GUICHEUX, C. VINATIER.

Cartilage tissue engineering: from hydrogel to mesenchymal stem cells. *Bio-Medical Materials and Engineering* 2010, Jan 1;20(3):159-66 (IF. 2.467).

- 3- C.MERCERON, **S. PORTRON**, M.MARTIAL, J. LESOEUR, V. GRIBEK, BH. FELLAH, O. GAUTHIER, P. WEISS, J. GUICHEUX*, C. VINATIER*.

Chondrogenic potential of differentially cultured human adipose-derived stem cells after in vivo transplantation with a cellulose hydrogel. *Cell Transplantation*. 2011 Feb 20 (10):1575-1588 (IF. 6.204) * *contribution équivalente*

- 4- C. MERCERON, **S. PORTRON**, C. VIGNES-COLOMBEIX, E. REDERSTORFF, M. MASSON, J. LESOEUR, S. SOURICE, C. SINQUIN, S. COLLIEC-JOUAULT, P. WEISS, C. VINATIER, J. GUICHEUX.

Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically over-sulphated polysaccharide of marine origin: potential application to cartilage regenerative medicine. *Stem Cells* 2012 March; 30(3):471-80 (IF: 7.747)

1^{er} Prix 2012 "Thierry Dubreuil" de la Structure Fédérative de recherche en santé François Bonamy-UMS INSERM 016.

- 5- **S. PORTRON**, C. MERCERON, N. MAILLARD, P. WEISS, G. GRIMANDI, C. VINATIER, J.GUICHEUX, O.GAUTHIER.

Stem cells and injectable biomaterials for the regenerative medicine of cartilage: the «chondrograft » consortium. *Ingénierie et Recherche BioMédicale* 2012 Apr 33(2) : 92-97 (IF. 0.304).

- 6- **S. PORTRON***, C. MERCERON*, O. GAUTHIER, J. LESOEUR, S. SOURICE, M. MASSON, B H. FELLAH, O. GEFFROY, E. LALLEMAND, P. WEISS, J. GUICHEUX*, C. VINATIER*.

Effects of an in vitro low-oxygen-tension preconditioning of MSC on their in vivo chondrogenic potential: application in cartilage tissue repair. *PLoS One* 2013 Apr 30;8(4):e62368 (IF: 4.092). * *contribution équivalente*

- 7- J. PEREIRA, **S. PORTRON**, B. DIZIER, C. VINATIER, M. MASSON, S. SOURICE, I. GALY-FAUROUX, P. CORRE, P. WEISS, AM FISCHER, J. GUICHEUX, D. HELLEY

Low molecular weight fucoidan enhances osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cell. *Eur Cells Mater*, en révision (IF: 3.028).

- 8- **S. PORTRON**, V. HIVERNAUD, C. MERCERON, J. LESOEUR, M. MASSON, O. GAUTHIER, C. VINATIER, L. BECK, J. GUICHEUX

Inverse regulation of early and late chondrogenic differentiation by oxygen tension defines cues for stem cell-based cartilage tissue engineering. En cours de soumission.

TABLE DES MATIERES

LISTES DES TABLEAUX.....	VI
LISTES DES FIGURES	VII
LISTES DES ABREVIATIONS.....	IX
INTRODUCTION Contexte et objectif de l'étude	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1 Cartilage articulaire : physiologie et pertes de substance.....	6
1.1 Chondrocyte articulaire	6
1.2 Matrice extracellulaire du cartilage articulaire	8
1.2.1 Composition de la matrice extracellulaire	8
1.2.2 Histologie du cartilage articulaire	11
1.3 Pertes de substance.....	12
1.3.1 Classification des pertes de substance.....	12
1.3.2 Réparation spontanée du cartilage articulaire	13
2 Chondrogenèse.....	14
2.1 Etapes de la chondrogenèse	15
2.1.1 Condensation des cellules souches mésenchymateuses et chondroprogéniteurs.....	15
2.1.2 Différenciation chondrocytaire	15
2.1.3 Prolifération des chondrocytes.....	16
2.1.4 Différenciation pré-hypertrophique et hypertrophique des chondrocytes.....	17
2.1.5 Différenciation terminale des chondrocytes hypertrophiques	19
2.2 La tension en oxygène, actrice de la chondrogenèse.....	20
3 Cellules chondrogéniques en ingénierie tissulaire du cartilage	23
3.1 Chondrocytes	23
3.1.1 Choix des chondrocytes isolés du cartilage de type hyalin	23
3.1.2 Applications et défis en clinique	24
3.2 Cellules stromales multipotentes.....	26

3.2.1	Propriétés biologiques	26
3.2.2	Choix des cellules stromales multipotentes.....	29
3.2.3	Applications et défis en clinique	31
4	Modulation de la différenciation chondrogénique	34
4.1	Dimensionnalité	34
4.1.1	Biomatériaux.....	35
4.1.2	Condensation cellulaire	37
4.2	Tension en oxygène.....	37
4.2.1	Facteurs de transcription HIF 1 et HIF 2.....	38
4.2.1.1	Structure	38
4.2.1.2	Mode d'action.....	39
4.2.1.3	Régulation	40
4.2.1.4	La sous-unité HIF-3alpha.....	43
4.2.1.5	Les facteurs de régulation	43
4.2.2	Tension en oxygène : modulateur de la différenciation chondrogénique.....	44
ARTICLE I : “Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells”		46
4.3	Facteurs bioactifs du milieu de culture chondrogénique	48
4.3.1	Additifs de base du milieu de culture chondrogénique	48
4.3.2	Additifs modulateurs du phénotype chondrogénique.....	49
4.3.2.1	Superfamille du TGF-béta.....	49
4.3.2.2	Facteurs de croissance des fibroblastes (FGF)	52
4.3.2.3	Facteurs de croissance apparentés à l’insuline (IGF)	52
4.3.2.4	Peptide apparenté à l’hormone parathyroïdienne (PTHrP).....	53
4.3.2.5	Modulateurs de la voie des Wingless	53
4.4	Contraintes mécaniques	54

ETUDES EXPERIMENTALES : Optimisation de l'utilisation de cellules stromales du tissu adipeux pour une application en ingénierie tissulaire du cartilage	56
1 Dimensionnalité	58
1.1 Problématique	58
ARTICLE II : "The effect of two- and three-dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells; after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel"	58
1.2 Résumé	58
1.3 Discussion	61
2 Tension en oxygène	64
2.1 Problématique	64
Article III : "Effects of an <i>in vitro</i> low oxygen tension preconditioning of adipose stromal cells on their <i>in vivo</i> chondrogenic potential: application in cartilage tissue repair"	65
2.2 Résumé	65
Article IV : "Inverse regulation of early and late chondrogenic differentiation by oxygen tension defines cues for stem cell-based cartilage tissue engineering"	68
2.3 Résumé	68
2.4 Discussion	71
3 Glycosaminoglycanes mimétiques	78
3.1 Problématique	78
Article V : "Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically over-sulphated polysaccharide of marine origin: potential application to cartilage regenerative medicine"	78
3.2 Résumé	78
3.3 Discussion	81
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	84
ARTICLE VI « Cellules souches et biomatériaux injectables pour la médecine régénératrice du cartilage : le consortium « chondrograft »	91

ANNEXE	92
ARTICLE VII “Cartilage tissue engineering: From hydrogel to mesenchymal stem cells”	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	94

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Biomatériaux commerciaux pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.

Tableau 2 : Principales caractéristiques des CSM issues de la moelle osseuse (MO-CSM) et du tissu adipeux (CSA). Adapté d'après Lindroos *et al* [230].

Tableau 3 : Etudes cliniques publiées évaluant les cellules stromales multipotentes isolées de la moelle osseuse pour le traitement des lésions cartilagineuses.

Tableau 4 : Etudes cliniques en cours évaluant les cellules stromales multipotentes isolées de la moelle osseuse (MO-CSM) ou du tissu adipeux (CSA) (www.clinicaltrials.gov).

Tableau 5 : Polymères utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage. D'après Vinatier *et al* [284].

Tableau 6 : Les effecteurs et leurs effets sur la régulation de l'expression et l'activité transcriptionnelle de HIF1 et de HIF2.

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Composition du cartilage articulaire. Modifiée d'après Aigner *et al* [13].

Figure 2 : Implication de HIF-1 dans la glycolyse anaérobie. HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1) ; GLUT 1 et 2 (Glucose transporteur 1 et 2) ; LDH (Lactate dehydrogenase) ; PDH (Pyruvate dehydrogenase) ; PDK (Pyruvate dehydrogenase kinase) ; ROS (Reactive oxygen Species).

Figure 3 : Matrice extracellulaire du cartilage. Représentation schématique simplifiée d'après Chen *et al* [29].

Figure 4 : Structure histologique du cartilage articulaire. Composition et organisation moléculaire. Modifiée d'après Clouet *et al* [56].

Figure 5 : Classification des lésions cartilagineuses selon l'IRCS. (www.cartilage.org)

Figure 6 : Etapes de la chondrogenèse. Modifiée d'après Goldring *et al*, Lefebvre *et al*, Shimizu *et al*, Vinatier *et al* [11,70-72].

Figure 7 : Technique de transplantation de chondrocytes autologues. Représentation schématique issue de la publication de Brittberg *et al* [162].

Figure 8 : Propriétés immunomodulatrices des CSM vis-à-vis : (a) des cellules présentatrices d'antigènes ; (b) des cellules B ; (c) des cellules T (d) des cellules NK non activées (e) des cellules NK activées. D'après De Miguel *et al* [190].

Figure 9 : Représentation schématique des composants du tissu adipeux. Schéma modifié à partir de Schaffler *et al* [238].

Figure 10 : Schéma de la structure protéique de HIF-alpha : zones et principales fonctions. D'après Gaber *et al* [343].

Figure 11 : Régulation par l'oxygène de la stabilité et de l'activité transcriptionnelle de HIF. Modifiée d'après Karuppagounder *et al* [354]

Figure 12 : Stimuli modulant l'activation des HIF ainsi que les fonctions directement régulées par HIF. D'après Gaber *et al* [343].

Figure 13 : Représentation schématique de la modulation de la différenciation chondrogénique par l'hypoxie et les facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2.

Figure 14 : Profil d'expression des TGF-béta, BMP, leurs récepteurs ainsi que les protéines Smad dans la plaque de croissance.

Figure 15 : Effets des voies de signalisation Smad2/3 et Smad1/5/8 sur la régulation du facteur transcription RUNX2. Représentation schématique d'après Van der Kraan *et al* [450].

LISTES DES ABREVIATIONS

ACI	autologous chondrocyte implantation
AH	acide hyaluronique
ALP	phosphatase alcaline
ARN	acide ribonucléique
ARNT	aryl-hydrocarbon nuclear translocator
BMP	bone morphogenetic protein
CFU-F	colony forming unit-fibroblastic
COMP	cartilage oligomeric matrix protein
CS	chondroïtine sulfate
CSA	cellules stromales adipeuses
CSM	cellules stromales multipotentes
DS	dermatane sulfate
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FIH	factor inhibiting hif
GAG	glycosaminoglycane
HDAC	histone deacetylase
HIF	hypoxia inducible factor
HRE	hypoxia response element
HS	héparane sulfate
IGF	insulin-like growth factor
IHH	indian hedgehog
IL	interleukine
ITS	insuline-transferrine-sélénite
KS	kératane sulfate
MEC	matrice extracellulaire
MEF2C	myocyte enhancer factor 2c
MGP	matrix gla protein
MMP	matrix metalloproteinase
OCN	ostéocalcine
P4-H	prolyl-4-hydroxylase
PDGF	platelet derived growth factor

PG	protéoglycane
PHD	prolyl-hydroxylase
PTHrP	parathyroïd hormone related peptide
ROS	reactive oxygen species
RUNX 2	runt domain transcriptional activator-2
SHH	sonic hedgehog
SOX	sex related y-type high-mobility-group box
TGF	transforming growth factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von hippel lindau
WNT	wingless related

INTRODUCTION

Contexte et objectif de l'étude

Le cartilage articulaire peut être le siège de nombreuses atteintes liées au vieillissement (arthrose), d'origine inflammatoire (polyarthrite rhumatoïde) ou d'origine traumatique (pertes de substance). L'établissement de ces atteintes conduit, à plus ou moins long terme, à une dégradation de sa matrice extracellulaire (MEC) et à une diminution de sa cellularité. Les affections du cartilage articulaire concernent aujourd'hui une part importante des populations vieillissantes et représentent donc un enjeu majeur de santé publique. Dans ce contexte, la communauté scientifique s'intéresse depuis de nombreuses années aux moyens de réparer le tissu cartilagineux.

Les techniques chirurgicales développées pour tenter de réparer les lésions cartilagineuses comme la chondroplastie abrasive, la micro fracture et la spongialisation [1] conduisent à la formation d'un tissu cartilagineux qui demeure fibreux et transitoire [2]. Parallèlement, la transplantation de tissus possédant des propriétés chondrogéniques comme les transplants de périoste, de périchondre et les greffes ostéochondrales (mosaïcplastie), a également été étudiée. Les nombreuses limites associées à ces techniques (instabilité de la greffe, calcifications, applications réduites aux lésions focales) ont finalement conduit au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques comme l'ingénierie tissulaire.

L'ingénierie tissulaire, discipline associant des cellules, des biomatériaux et des agents biologiquement actifs, est une alternative prometteuse aux techniques chirurgicales actuelles. Les stratégies d'ingénierie tissulaire aujourd'hui en clinique chez l'homme utilisent les chondrocytes articulaires comme source cellulaire. Cependant, l'utilisation de chondrocytes autologue présente des limites liées à leur dédifférenciation lors des étapes d'amplification *in vitro*, à leur activité métabolique qui demeure variable et à la morbidité du site donneur. Pour faire face à ces limites, les recherches se sont orientées vers l'utilisation d'une source alternative de cellules.

Parmi les cellules chondrogéniques potentielles, les cellules stromales multipotentes (CSM) présentent plusieurs avantages. En effet, elles sont capables de proliférer de manière quasi-infinie en culture et de pouvoir se différencier, entre autre, vers le phénotype chondrocytaire [3]. Sur la base de ces critères, les CSM sont donc considérées avec un grand intérêt pour l'ingénierie tissulaire. Plusieurs sources de CSM ont été identifiées à l'heure actuelle. Le tissu adipeux présente l'avantage d'être facilement prélevable, en large quantité et d'être particulièrement riche en CSM [4-6]. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à

l'utilisation de CSM isolées du tissu adipeux (CSA) dans le cadre d'une stratégie d'ingénierie tissulaire du cartilage.

Les études précliniques et cliniques ont montré le potentiel des CSM à réparer les lésions du cartilage articulaire. Cependant, le tissu néoformé ne possède pas les mêmes propriétés structurales et mécaniques que le cartilage sain et adhère peu aux tissus adjacents (pour revue [7,8]). La qualité du tissu de réparation étant dépendante du phénotype des cellules implantées, les deux défis majeurs relatifs à l'utilisation des CSM en ingénierie tissulaire du cartilage sont (i) la promotion de l'engagement des cellules dans la voie chondrogénique et (ii) le contrôle de leur différenciation chondrogénique [9]. Promouvoir l'engagement des CSM dans la voie chondrogénique est en effet primordiale pour assurer la néoformation d'un tissu cartilagineux de type hyalin (riche en collagène de type II et aggrécane) tout en s'affranchissant de la néoformation d'un tissu cartilagineux de type fibreux (riche en collagène de type I). Ce tissu fibreux ne possède en effet pas les mêmes propriétés mécaniques que le tissu hyalin, et risque à terme de se dégrader. Par ailleurs, il semble également indispensable de contrôler la différenciation chondrogénique, notamment pour prévenir l'apparition d'un phénotype hypertrophique. Ce phénotype est observé lors des phases terminales de la chondrogenèse et prédispose à la calcification et résorption de la matrice extracellulaire cartilagineuse comme cela peut être observé lors de l'ossification endochondrale mais aussi du développement de l'arthrose [10-12].

Ainsi, dans le but d'implanter des cellules capables de synthétiser une MEC cartilagineuse permettant de répondre aux contraintes mécaniques du cartilage articulaire, il apparaît donc primordial de potentialiser l'engagement et la différenciation chondrogénique précoce des CSM tout en prévenant la dérive hypertrophique de leur phénotype.

Dans ce contexte, l'objectif de ces travaux a été de développer des conditions de différenciation optimales pour moduler la différenciation chondrogénique des CSA en vue d'une application en ingénierie tissulaire du cartilage.

Dans une première partie, les généralités relatives au cartilage articulaire et aux stratégies d'ingénierie tissulaire de ce tissu seront présentées. Il y sera décrit comment la composition et l'organisation du cartilage articulaire participent à sa fonction hautement spécialisée. Les mécanismes gouvernant la différenciation des chondrocytes y seront également détaillés. Un intérêt particulier sera porté à l'ingénierie tissulaire du cartilage utilisant, comme source

cellulaire, les chondrocytes et plus particulièrement les CSM. Nous aborderons les applications et les défis cliniques actuels relatifs à l'utilisation des CSM en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. Enfin, il sera fait état des conditions de culture influençant la différenciation chondrogénique des CSM et précurseurs chondrocytaires. Les facteurs environnementaux détaillés seront la dimensionnalité, la tension en oxygène (article I), les additifs bioactifs du milieu chondrogénique ainsi que les contraintes mécaniques.

La deuxième partie expérimentale de ce travail de thèse s'intéressera à la modulation de la différenciation chondrogénique des CSA. Nous nous intéresserons aux effets de la culture en deux ou trois dimensions sur le potentiel chondrogénique de CSA *in vitro* et *in vivo* (article II). Par ailleurs, nous étudierons les effets modulateurs de la tension en oxygène (article III et V) et d'un polysaccharide marin sur la différenciation chondrogénique des CSA (article V).

Pour clore cette thèse, une conclusion générale récapitulera l'ensemble de ces travaux (article VI) et permettra d'aborder les perspectives d'application des effets modulateurs de ces facteurs environnementaux, d'une part dans la différenciation chondrogénique et d'autre part dans plusieurs pathologies du tissu cartilagineux.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

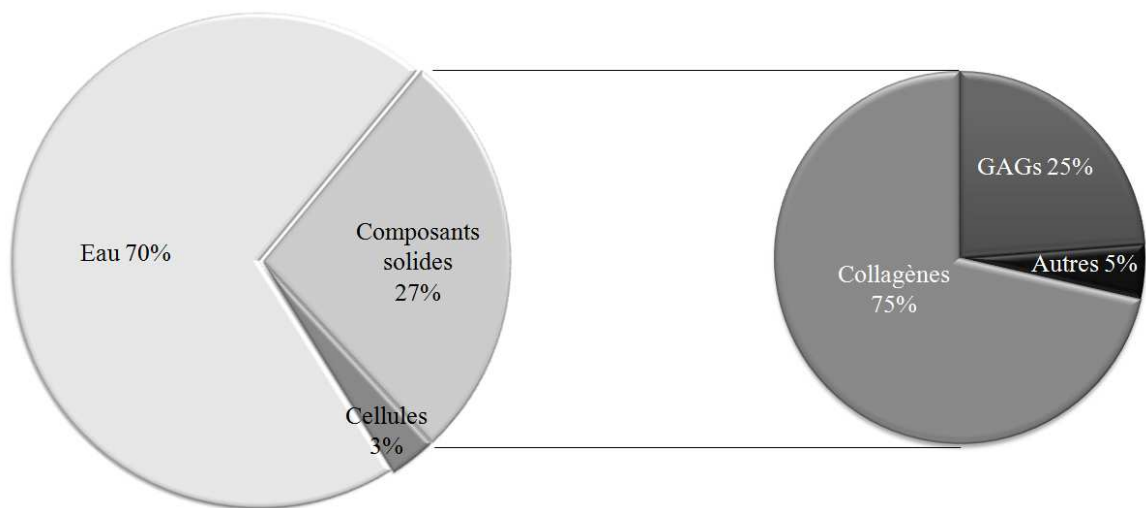


Figure 1 : Composition du cartilage articulaire. Modifiée d'après Aigner *et al* [13]

1 Cartilage articulaire : physiologie et pertes de substance

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif d'origine mésenchymateuse. Il est d'aspect blanc vitreux d'où son appellation de cartilage hyalin et est également retrouvé au niveau des jonctions costo-sternales, de la cloison nasale, du larynx, de la trachée et des bronches. Ce tissu a la particularité d'être avasculaire, alymphatique et aneural. Le cartilage articulaire est stable et se distingue ainsi du cartilage de transition de la plaque de croissance, synthétisé au cours de l'ossification endochondrale.

Le cartilage articulaire recouvre les extrémités des pièces osseuses où sa fonction est double : assurer le glissement des extrémités osseuses et permettre la transmission ainsi que l'amortissement des forces mécaniques. Sa capacité à subir des déformations réversibles est directement liée à sa composition et principalement à l'organisation des macromolécules qui le compose. La composition et l'organisation du cartilage articulaire sont essentielles pour conférer à ce tissu ses propriétés de résistance aux contraintes mécaniques, de flexibilité et d'élasticité. Ce tissu comporte un type cellulaire majoritaire, le chondrocyte, responsable de la synthèse et du renouvellement d'une matrice extracellulaire (MEC) riche et abondante. Le tissu cartilagineux est essentiellement constitué d'eau (70-80%) retenue dans une MEC composée de protéoglycanes, dont le constituant majoritaire, est l'agrécan et d'un réseau de fibres de collagène de type II, IX et XI. L'homéostasie de ce tissu est dépendante de la diffusion des nutriments et des molécules d'oxygène au travers de la MEC (Figure 1). Le gradient en oxygène croissant, des zones profondes vers les zones superficielles du cartilage, a un rôle clé dans le devenir des chondrocytes.

1.1 Chondrocyte articulaire

Le type cellulaire majoritaire du cartilage articulaire est le chondrocyte. Les chondrocytes ont une origine embryonnaire mésodermique comme les éléments cellulaires et tissulaires des membres [14]. Les chondrocytes articulaires présentent une morphologie normalement ronde ou polygonale, mais ils peuvent également présenter une morphologie aplatie ou discoïde en fonction de leur localisation au sein du cartilage articulaire. Ils présentent de nombreux lysosomes, vacuoles lipidiques et grains de glycogènes, dont la fonction n'est pas connue à ce jour. Les chondrocytes assurent à la fois la synthèse et le renouvellement de la MEC [14]. Ils synthétisent les macromolécules constitutives de la MEC ainsi que les enzymes responsables

de sa dégradation tels que cathepsines, métalloprotéinases, agrécanases et autres membres de la famille des ADAMTS (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin) [15]. Le métabolisme des chondrocytes est en permanence influencé par les conditions physico-chimiques de l'espace péri-cellulaire et par les contraintes mécaniques exercées sur le tissu. En effet, les forces cycliques qui s'appliquent sur le cartilage articulaire retentissent sur l'espace péri-cellulaire et induisent la modification des filaments d'actines du cytosquelette, pouvant ainsi faire varier l'expression de certains gènes. Il existe donc un lien direct entre l'environnement physico-chimique entourant les chondrocytes et leur activité métabolique [16].

Le phénotype des chondrocytes est également influencé par de nombreuses cytokines, vitamines, hormones et facteurs de croissance. Ainsi, la synthèse des constituants de la MEC est stimulée par le TGF-béta (transforming growth factor-beta), les BMP (bone morphogenic proteins) et l'IGF (insuline-like growth factor), et est inhibée par le TNF-alpha (tumor necrosis factor alpha) et les interleukines (IL-1, IL-6) par exemple.

Les chondrocytes sont nourris et oxygénés uniquement par la diffusion des nutriments et des molécules d'oxygène. Le cartilage articulaire étant non vascularisé, un gradient de tension en oxygène se forme en fonction de la diffusion des molécules d'oxygène et du taux de consommation de ces molécules par les cellules. Evalué par microélectrodes ioniques et corrélé par des modèles mathématiques, ce gradient varie de 5-7% d'oxygène à la surface articulaire à moins de 1% d'oxygène en zone profonde [17-19]. Le rôle de tension en oxygène sur l'homéostasie du cartilage articulaire a été mis en évidence dans l'étude *in vivo* de Gelse *et al.* Ces auteurs ont induit la dégradation des principaux effecteurs d'une faible tension en oxygène, HIF (Hypoxia Inducible Factor)-1alpha et HIF-2alpha, par l'injection d'un agent chimique (2-méthoxyestradiol) en site articulaire chez des souris saines. Après 12 semaines, le cartilage articulaire des souris traitées présente des signes d'arthrose (ostéophytes, perte de substance matricielle...). Ceci suggère l'implication des principaux médiateurs de la tension en oxygène dans l'homéostasie du cartilage articulaire [20].

L'environnement hypoxique influence le phénotype des chondrocytes en modulant l'expression des gènes codant pour (i) des enzymes responsables de la maturation des composants de la matrice extracellulaire (hydroxylases ou proteoglycan synthases) ; (ii) des médiateurs de l'inflammation ; (iii) des facteurs de transcription associés à la différenciation

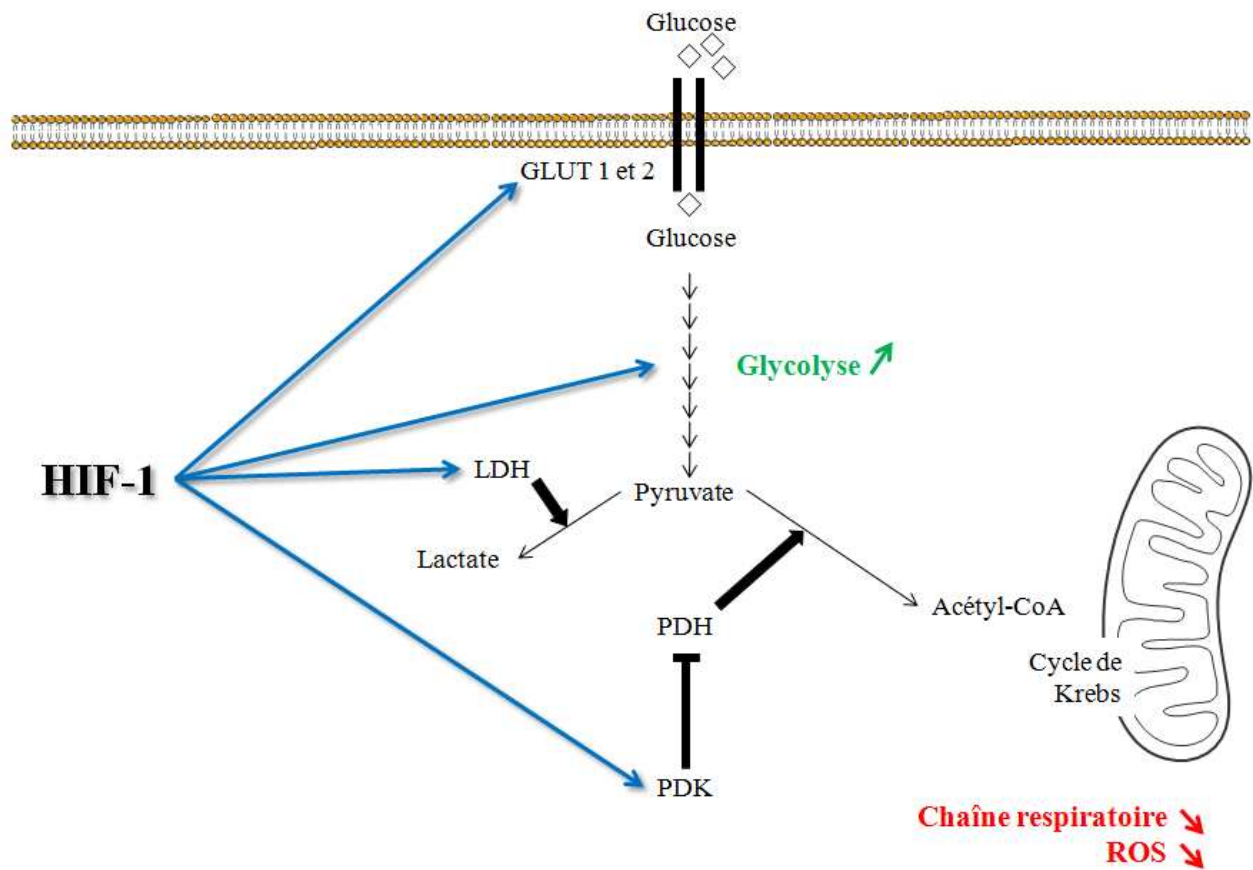


Figure 2 : Implication de HIF-1 dans la glycolyse anaérobie. HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1) ; GLUT 1 et 2 (Glucose transporteur 1 et 2) ; LDH (Lactate dehydrogenase) ; PDH (Pyruvate dehydrogenase) ; PDK (Pyruvate dehydrogenase kinase) ; ROS (Reactive oxygen Species).

chondrogénique (DEC1 : deleted in esophageal cancer 1 ; Dlx5 : distal-less homeobox 5 ou Mef2C : myocyte enhancer factor 2C) ; (iv) des facteurs de croissance tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), la chondromoduline ou les membres de la famille du TGF-béta ; (v) des récepteurs tels que le FGFR3 (Fibroblast Growth factor Recepteur 3) récepteur au FGF ou le DDR1 (Discoidin Domain Receptor 1) récepteur aux collagènes [21]. Par ailleurs, la faible tension en oxygène assure le maintien du phénotype chondrocytaire *in vitro*. Ces notions seront développées dans le paragraphe 4.2.2 portant sur la modulation du phénotype chondrogénique.

La faible tension en oxygène au sein de ce tissu conditionne et régule également le métabolisme énergétique anaérobie [22,23] (Figure 2). HIF-1 est le principal facteur de transcription régissant les mécanismes du métabolisme anaérobie [24]. HIF-1 stimule l'expression des transporteurs de glucose (GLUT1 et GLUT3) induisant une entrée massive de glucose [25]. HIF-1 stimule également l'expression de nombreuses enzymes glycolytiques, favorisant ainsi la production d'énergie par glycolyse. Parallèlement, HIF-1 joue un rôle clé dans la fonction respiratoire de la mitochondrie. HIF-1 induit l'expression de plusieurs enzymes, telles que PDK (pyruvate dehydrogenase kinase 1) et LDH (Lactate Dehydrogenase) [26]. L'augmentation de l'expression de PDK se traduit par une diminution de l'activité de la PDH (pyruvate dehydrogenase). Cette enzyme est responsable de la conversion du pyruvate en acetyl-CoA [27]. L'action de HIF-1 sur l'expression de la LDH est responsable de l'augmentation de la conversion du pyruvate en lactate [28].

En conséquence, HIF-1 *via* PDK et LDH, induit une diminution de l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs. La production d'énergie par la chaîne respiratoire mitochondriale en est inhibée [28] et la production de ROS (Reactive oxygen species) diminuée. Ainsi, en présence d'une faible tension en oxygène la cellule *via* les HIF adapte son métabolisme énergétique et régule la production des ROS, délétère à forte concentration.

1.2 Matrice extracellulaire du cartilage articulaire

1.2.1 Composition de la matrice extracellulaire

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 (PG) et d'eau. La MEC du cartilage est donc principalement constituée de

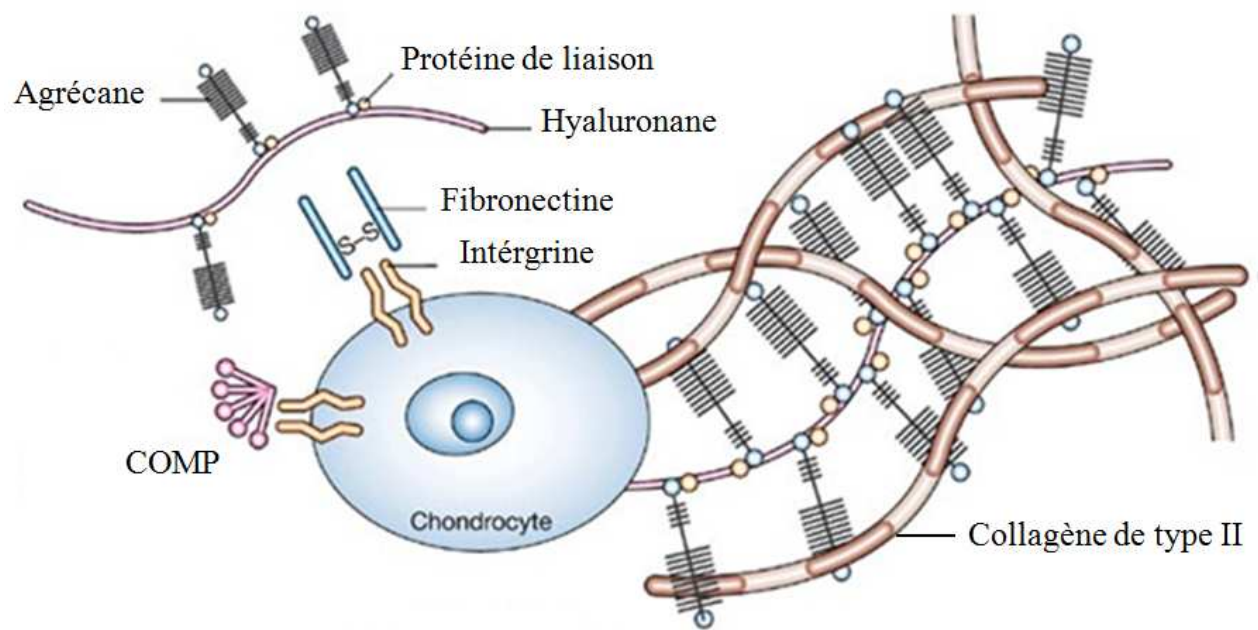


Figure 3 : Matrice extracellulaire du cartilage. Représentation schématique simplifiée d'après Chen *et al* [29].

fibres de collagène de type II, IX et XI dans lesquelles sont enchâssés des PG comme l'agrécan. Cette MEC, contient également des protéines non collagéniques comme la COMP (cartilage oligomeric matrix protein), des petits PG riches en leucine (SLRP) et des PG de surface (Figure 3).

Les fibres de collagène

Les fibres de collagène confèrent au tissu cartilagineux sa rigidité. Au sein du cartilage articulaire, douze collagènes ont été identifiés [30,31]. Parmi ces collagènes, nous nous intéresserons essentiellement aux collagènes de type I, II et X.

Le collagène de type I est présent en faible quantité à la surface du cartilage et dans l'os sous-chondral [32]. Il est composé de deux chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$.

Le collagène de type II est le constituant structurel majeur du cartilage articulaire puisqu'il constitue environ 25% du poids sec de la MEC et 80% des collagènes totaux de ce tissu [13]. Le collagène de type II est un homotrimère composé de trois chaînes $\alpha_1(\text{II})$. Il existe deux formes majoritaires de transcrit du gène *COL2A1*, les ARNm de type IIA et IIB. Les isoformes IIA et IIB diffèrent uniquement par la présence ou non de l'exon 2 qui peut subir un épissage alternatif [33]. Le collagène de type IIA est exprimé au cours du développement fœtal par les cellules préchondrogéniques et serait impliqué dans le remodelage, l'organisation et les interactions tissulaires [34,35]. En revanche, le collagène de type IIB est exprimé dans les chondrocytes matures et donc dans les tissus cartilagineux adultes [36].

Le collagène de type X est un homotrimère composé de trois chaînes $\alpha_1(\text{X})$. L'expression du gène du collagène X a été détectée dans les chondrocytes du cartilage articulaire arthrosique (ostéophytes et sclérose de l'os sous-chondral) [37]. Mais il est essentiellement exprimé au niveau de la plaque de croissance par les chondrocytes hypertrophiques et intervient dans le processus d'ossification endochondrale. Le collagène de type X est également exprimé au niveau du cal cartilagineux se formant lors du processus de réparation des fractures osseuses [38], au niveau de la jonction ostéochondrale (tidemark) [39] et en quantité moindre au niveau de la surface du cartilage articulaire sain [40].

Les protéoglycanes

Les protéoglycanes représentent 22 à 28 % du poids sec du cartilage articulaire adulte [41]. L'agrécan est le PG majoritairement présent au sein du cartilage à hauteur de 90%. Les PG

sont des macromolécules formées d'une protéine axiale sur laquelle se fixent des chaînes polysaccharidiques appelées glycosaminoglycanes (GAG).

Les protéines axiales constituent la grande diversité des PG. Plus d'une quarantaine de gènes a été identifié comme codant pour des protéines capables de porter des GAG, comme par exemple l'agrécan, le versican, la décorine, le syndécan...

La structure des GAG est fondée sur la répétition de disaccharides, dont l'une des unités osidiques est soit (i) un N-acétylgalactosamine (GalNAc) tels que l'héparane sulfate (HS) et le kératane sulfate (KS) ; (ii) un N-acétylglucosamine (GlcNAc) tels que la chondroïtine sulfate (CS) et le dermatane sulfate (DS). L'autre unité osidique est souvent un ose acide comme l'acide glucuronique ou l'acide iduronique, à l'exception du KS composé d'un galactose. Les GAG sont chargés négativement en raison des groupements sulfates [42] et carboxydrates greffés sur les unités osidiques [43].

L'acide hyaluronique (AH) est un GAG particulier car il n'est pas sulfaté et il ne se lie à aucune protéine axiale. Le disaccharide constitutif de l'AH est composé d'acide D-glucuronique et de D-glucosamine. L'AH est capable de retenir une quantité d'eau élevée ce qui lui confère ses propriétés lubrifiantes [44].

Au sein du cartilage articulaire, trois familles de PG sont représentées : (i) les hyalectanes, dont fait partie l'agrecane; (ii) les petits PG riches en leucine, sécrétés au niveau matriciel; (iii) les PG de la membrane basale [45]. Ces macromolécules sont chargées négativement et ainsi captent les molécules d'eau. L'eau ainsi accumulée et associée aux PG dans la MEC permet la répartition des contraintes mécaniques sur le cartilage [46]. Une autre des propriétés des PG est de stocker et de préserver des facteurs de croissance ou cytokines au sein de la MEC et de les rendre disponibles lors des phases de croissance, de différenciation ou de remodelage du tissu. Les PG peuvent aussi établir des interactions entre différentes protéines de la MEC et intervenir dans la régulation et l'organisation de celles-ci, notamment lors de l'ossification endochondrale [47]. Il existe également des PG localisés au niveau de la membrane cellulaire pouvant jouer un rôle dans la signalisation intracellulaire [48,49,50].

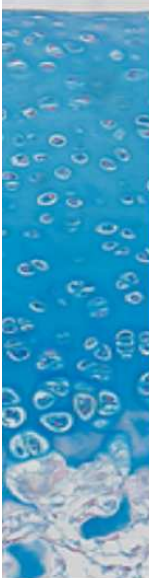
	Zones	Types de collagènes	Contenu en PG	Densité cellulaire et morphologie	Orientation des fibres de collagène	Tension en oxygène
	Tangentielle	I, II, III		+ Discoïdes et individualisés	Parallèle à la surface	
	Transition	II, IX, XI		++ Sphériques et individualisés	Aléatoire	
	Radiale	II, IX, XI		++ Sphériques et empilés en colonnes	Perpendiculaire à la surface	
	Calcifiée	X		+ Sphériques et hypertrophiques	Enchevêtrement	
	Os sous-chondral	I, III				
						

Figure 4 : Structure histologique du cartilage articulaire. Composition et organisation moléculaire. Modifiée d'après Clouet *et al* [56].

Les autres constituants

La structure, l'organisation et le maintien du tissu cartilagineux sont également dépendant de nombreux autres constituants tels que les intégrines [51], la fibronectine [52], l'annexine V [53], la lubricine [54] ou encore les thrombospondines [55].

1.2.2 Histologie du cartilage articulaire

La composition et l'organisation histologique du cartilage articulaire varient en fonction de l'âge mais également en fonction de sa profondeur par rapport à la surface. La fonction du cartilage articulaire est assurée par la composition biochimique de la MEC ainsi que par son organisation en zones distinctes. Quatre zones peuvent être distinguées en fonction de l'orientation des fibres de collagène, de la concentration en PG, ainsi que du volume et de la morphologie des cellules (Figure 4).

La zone tangentielle ou superficielle constitue la surface de glissement. Cette zone est en contact avec le liquide synovial et représente 5 à 10% de l'épaisseur du cartilage. Elle est essentiellement constituée de fibres de collagène de type I, II, III et pauvre en PG. Elle est recouverte de macromolécules, tel que l'acide hyaluronique ayant un rôle de lubrifiant. Les chondrocytes sont situés en profondeur de cette zone et sont plats, ellipsoïdaux orientés parallèlement à la surface articulaire [57]. Ils synthétisent des couches de collagène superposées (diamètre maximale des fibres : 30nm). Ces fibres sont également disposées parallèlement à la surface. Ainsi, en raison de cette organisation, cette zone résiste particulièrement bien aux forces de cisaillement. Les chondrocytes de la zone tangentielles synthétisent également la lubricine, glycoprotéine fortement impliquée dans la diminution des forçements de frottement [54]. Récemment, des précurseurs chondrocytaires ont été caractérisés dans la zone tangentielle [58]. Ces cellules sont clonogéniques, présentent une capacité de multipotence limitée par rapport aux CSM de la moelle osseuse, et sont capables de migrer sur un site lésé [59,60]. Le rôle et la fonction de ces progéniteurs endogènes ne sont pas clairement définis. Cependant, la proportion de précurseurs chondrocytaires est augmentée lorsque le cartilage est arthrosique. Cette observation suggère leur implication dans les processus de réparation [61].

La zone de transition permet d'absorber et de répartir les contraintes mécaniques. Les PG, les chondrocytes ainsi que les fibres de collagènes (type II, IX, XI) forment une couche non

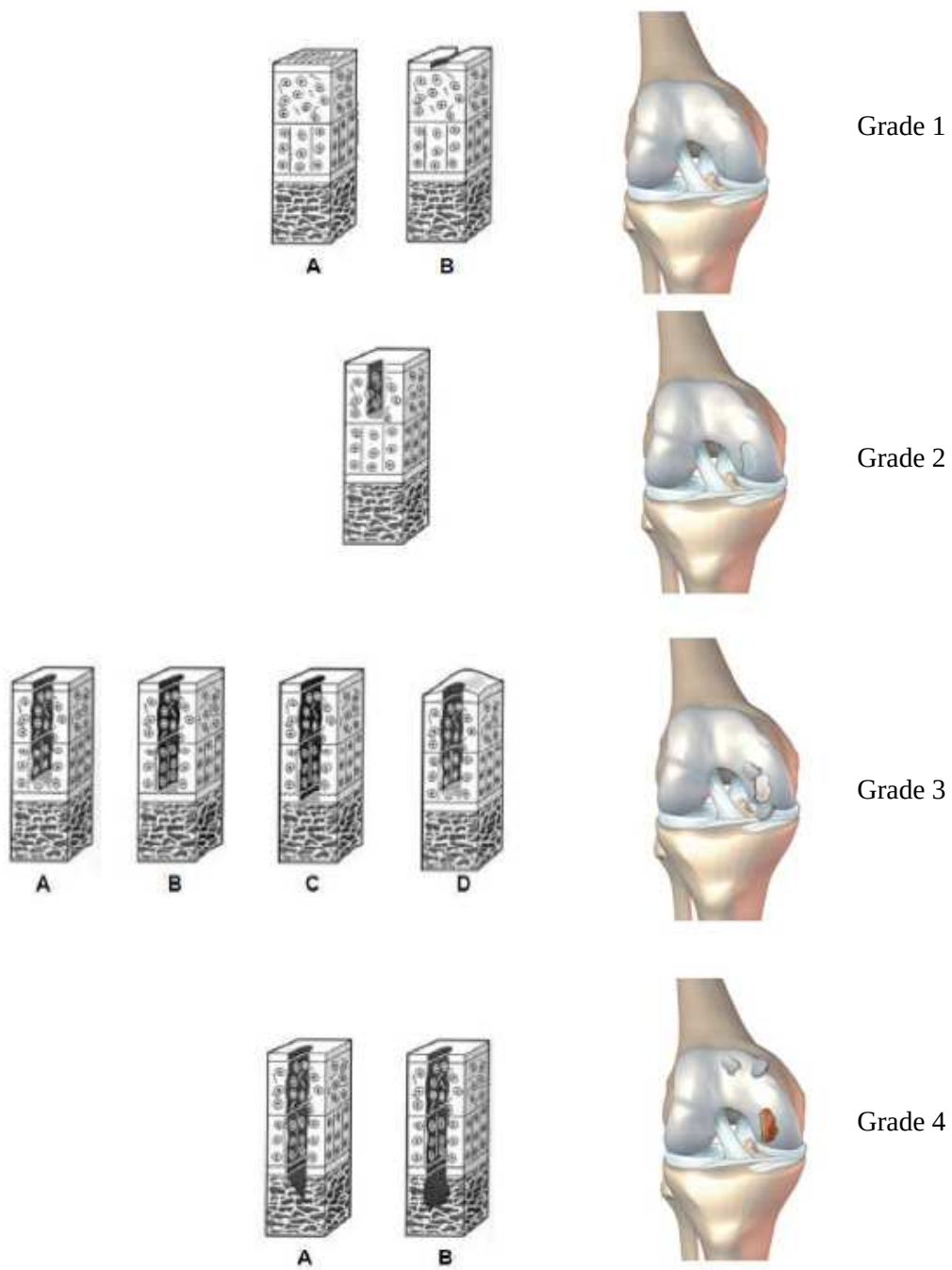


Figure 5 : Classification des lésions cartilagineuses selon l'ICRS. (www.cartilage.org)

orientée, moins dense et moins hydratée que la zone tangentielle. Elle représente 40 à 45 % de l'épaisseur du cartilage.

La zone radiale confère au cartilage ses propriétés de résistance aux forces de compression. La proportion de PG y est supérieure aux autres zones et les fibres de collagène ainsi que les chondrocytes organisés en colonnes, sont orientés perpendiculairement à la surface. Elle représente également 40 à 45 % de l'épaisseur du cartilage.

La zone calcifiée sépare le cartilage de l'os sous chondral. Cette zone représente 5 à 10 % de l'épaisseur du cartilage.

1.3 Pertes de substance

L'incidence des lésions chondrales, toutes natures confondues, est estimée à environ 60% au sein d'une population subissant un examen arthroscopique dont 67% sont de natures traumatiques [62]. L'arthrose ainsi que les maladies à composante majoritairement inflammatoire, tel que 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, même si toutefois, aujourd'hui la question reste posée notamment par la mise en évidence des propriétés immunomodulatrices des CSM [63].

1.3.1 Classification des pertes de substance

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 5).

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. Au grade 4A, la lésion s'étend jusqu'au travers de l'os sous-chondral. Enfin, le grade 4B correspond au grade 4A accompagné d'une cavitation de la lésion au niveau sous-chondral.

D'autres classifications des lésions cartilagineuses existent (Outerbridge ou Noyes), mais la classification ICRS reste l'une des plus utilisées [64].

1.3.2 Réparation spontanée du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire n'étant pas vascularisé, les défauts de grade 1 à 3, n'affectant que partiellement l'épaisseur du cartilage articulaire, ne sont pas capables de cicatriser par eux-mêmes. En revanche, un défaut de grade 4, atteignant la totalité de l'épaisseur du cartilage et atteignant l'os sous-chondral permet de déclencher un processus de réparation [65]. Ce dernier saigne et permet la formation d'un caillot sanguin riche en CSM qui comble le défaut. Ce caillot sanguin subit ensuite une étape de remodelage, lors de laquelle des vaisseaux sanguins envahissent le réseau de fibrine et les cellules fibroblastiques synthétisent une matrice fibreuse. Cette matrice fibreuse va donner lieu à la formation d'un tissu cicatriciel fibro-cartilagineux [66]. Ce tissu de réparation présente des propriétés biomécaniques et une composition en PG, collagène de type II et autres constituants de la MEC différentes de celles du cartilage articulaire sain. A long terme, ce tissu de réparation n'est pas stable et présente souvent des signes de détérioration (fibrillations, fissurations, fragmentations, irrégularités) conduisant à sa dégénérescence et à l'installation de lésions arthrosiques [67].

Les données présentées soulignent que les pertes de substance du cartilage articulaire ne se réparent pas lorsqu'elles affectent uniquement la partie cartilagineuse. 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 cartilagino-fibreux qui demeure transitoire. Les lésions du cartilage articulaire évoluent donc très souvent vers des lésions plus étendues de type arthrosique.

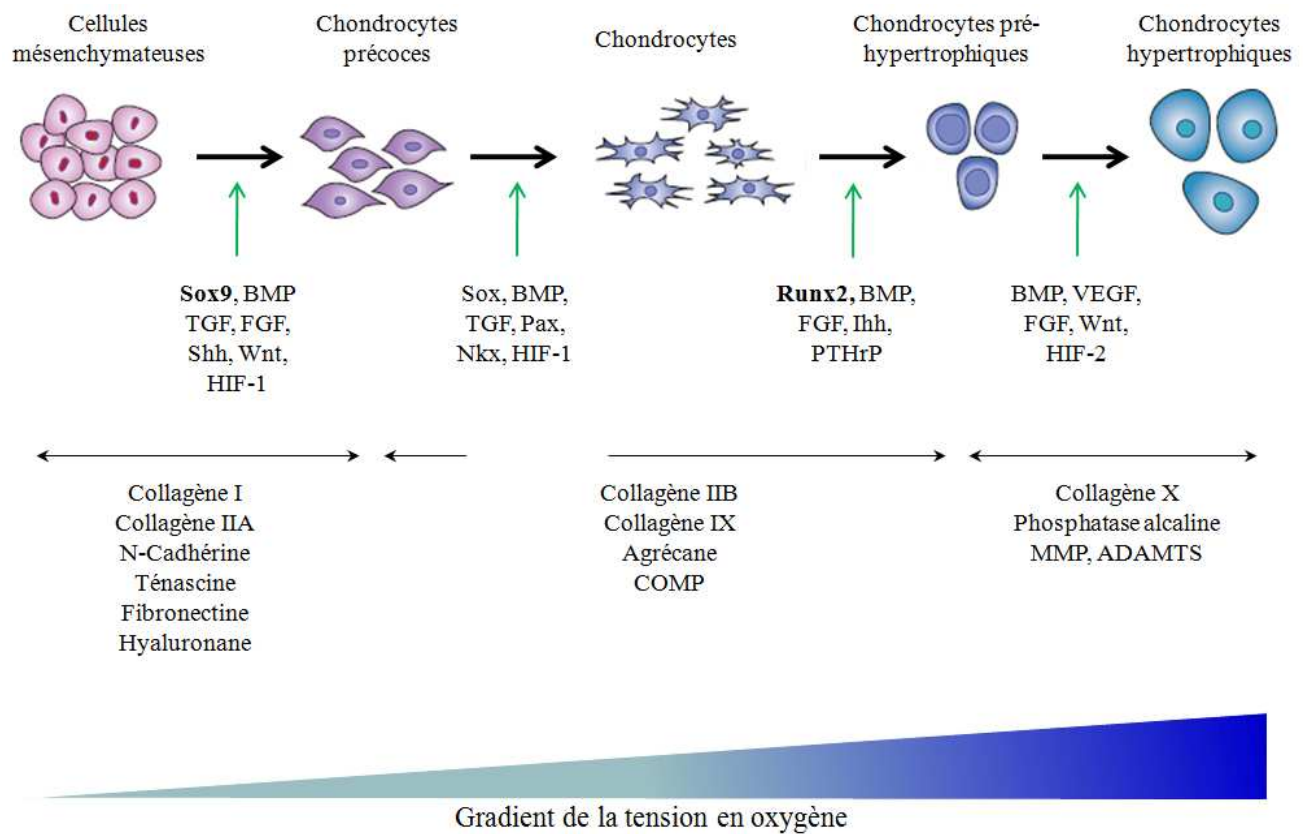


Figure 6 : Etapes de la chondrogenèse. Modifiée d'après Goldring *et al*, Lefebvre *et al*, Shimizu *et al*, Vinatier *et al* [11,70-72]

2 Chondrogenèse

La chondrogenèse est une succession d'évènements finement régulés au cours desquels des cellules non différenciées vont permettre la formation de cartilage. Les mécanismes impliqués dans la chondrogenèse sont essentiellement étudiés au niveau de la plaque de croissance et très peu au niveau du cartilage articulaire. La plaque de croissance joue un rôle essentiel dans le processus d'ossification endochondrale. Il s'agit d'une zone de cartilage transitoire (existante jusqu'à la maturation squelettique) responsable de la croissance des os longs. Le cartilage transitoire y est graduellement remplacé par de l'os.

Les cellules souches mésenchymateuses, impliquées dans la chondrogenèse, dérivent de trois sources [68] : (i) les cellules de la crête neurale, qui donneront les os craniofaciaux ; (ii) les cellules du sclérotome, qui formeront les os du squelette axial (côtes, vertèbres) ; (iii) les cellules de la somatopleure, qui formeront les os du squelette appendiculaire (membres).

La chondrogenèse décrite au cours de l'ossification endochondrale, peut se définir en distinguant les étapes suivantes :

- Migration des cellules mésenchymateuses de la somatopleure et agrégation
- Engagement et différenciation chondrogénique des cellules mésenchymateuses
- Maturation des chondrocytes : prolifération et maturation (synthèse de la MEC cartilagineuse)
- Mort programmée ou transdifférenciation en ostéoblastes des chondrocytes matures (minéralisation, angiogenèse et remplacement de la MEC cartilagineuse par de l'os)

La chondrogenèse est un processus régi par des éléments d'ordre temporel, spatial et mécanique. Le gradient de la tension en oxygène est un facteur clé de la régulation de la chondrogenèse et sera développé dans cette partie [69] (Figure 6).

Figure 6 : Etapes de la chondrogenèse. Modifiée d'après Goldring *et al*, Lefebvre *et al*, Shimizu *et al*, Vinatier *et al* [11,70-72].

2.1 Etapes de la chondrogenèse

2.1.1 Condensation des cellules souches mésenchymateuses et chondroprogéniteurs

Le processus de chondrogenèse débute par le recrutement et la migration des cellules mésenchymateuses sur le site présumptif de la squelettogénèse. Ces cellules vont proliférer et se condenser puis débiter un processus de différenciation chondrogénique [73].

Avant l'étape de condensation, les cellules mésenchymateuses sécrètent une MEC riche en hyaluronan et collagènes de type I et IIA [36] et réfractaire aux interactions cellulaires. La condensation s'initie par la dégradation du hyaluronan ainsi que la synthèse de deux molécules d'adhésion N-cadherin et N-CAM (neural cell adhesion molecule) permettant ainsi les interactions cellulaires. L'établissement de ces interactions est l'événement présumé le plus important pour initier la chondrogenèse. Aux interactions cellules-cellules s'ajoutent les interactions cellules-matrice. Ces interactions sont médiées par la fibronectine, COMP, tenascin et syndecan [74]. Le TGF-béta, un des signaux les plus précoces de la chondrogenèse, est impliqué dans la régulation de l'expression des molécules d'adhésions [75].

D'autres facteurs tels que WNT (Wingless-type MMTV integration site family), FGF, SHH (Sonic hedgehog) et BMP (Bone Morphogenic Protein) contrôlent les signaux de l'axe dorso-ventral et antéropostérieur nécessaires au développement de la matrice cartilagineuse [73,76]. De plus, ces facteurs influencent le devenir des cellules au centre des agrégats de condensation. Sous l'influence de ces facteurs, les cellules mésenchymateuses s'engagent vers un phénotype chondrogénique. Au niveau intracellulaire, leur engagement est médié principalement par le facteur de transcription SOX9 (sry-type high-mobility-group box) [77]. L'expression de SOX9 est indispensable au bon déroulement de la chondrogenèse [78,79] et son expression est maintenue jusqu'au stade pré-hypertrophique [80].

2.1.2 Différenciation chondrocytaire

La différenciation chondrocytaire se caractérise par le dépôt d'une MEC contenant des collagènes de type IIB, IX, XI ainsi que des protéoglycanes, tel que l'agrécan.

L'un des principaux acteurs de cette étape est le facteur de transcription SOX9. Ce facteur contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la chondrogenèse et dans la synthèse de la MEC notamment le collagène de type II [80] et l'agrécan [81]. Deux autres membres de la famille des SOX sont également indispensables à la chondrogenèse : L-SOX5 et SOX6 [79]. L'expression de la triade SOX9/L-SOX5/SOX6 est dépendante de la voie de signalisation des BMP [82]. D'autres facteurs sont capables de se fixer sur le promoteur de SOX9, tels PAX1, PAX9, NKX3.1, NKX3.2, HIF-1 et HIF-2, participant ainsi à la mise en place du phénotype chondrogénique.

2.1.3 Prolifération des chondrocytes

La phase de prolifération se caractérise par la forme et l'organisation des chondrocytes. Les chondrocytes prolifératifs sont aplatis, sphériques et s'organisent en colonnes. Cette organisation en colonne implique une polarisation de la cellule. La polarité cellulaire s'établit en réponse au gradient de ligands WNT dans la plaque de croissance [83]. Les voies de signalisation effectrices de WNT-5/PCP (Planar Cell Polarity) modifient le cytosquelette d'actine et la morphologie cellulaire par l'activation des petites GTPases Rac et Rho [84].

Au sein des 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 [85]. Puis les chondrocytes cessent de proliférer dès qu'ils atteignent le stade de différenciation pré-hypertrophique.

Le taux de prolifération des chondrocytes est déterminé par la balance des signaux BMP et FGF [86]. La BMP -7 (ou OP-1, osteogenic protein-1) est exprimée par les chondrocytes prolifératifs. L'effet des signaux des FGF dépendent notamment de l'expression de leurs récepteurs [87]. En effet, l'expression de FGFR3 est associée aux chondrocytes prolifératifs et est un régulateur important de leur prolifération [88,89]. Dans le cas d'achondroplasie humaine, la forme la plus courante de nanisme, l'expression d'un mutant du FGFR3 est constitutivement active [90,91]. L'inhibition de la prolifération des chondrocytes et l'accélération de leur différenciation hypertrophique conduisent à un retard de croissance.

D'autres facteurs de transcription 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 doubles mutantes (L-SOX5 et SOX6), alors que la zone pré-hypertrophique était présente [92,93]. SOX9, en revanche, semble inhiber la prolifération des chondrocytes. Les souris sur-exprimant SOX9 présentent, en effet, des colonnes de chondrocytes prolifératifs raccourcies [94].

RUNX2 (runt domain transcriptional activator-2 ou core binding factor $\alpha 1$:CBFA1) stimule la prolifération et l'organisation des chondrocytes en colonnes. Le facteur de transcription RUNX2 est ensuite exprimé dans les chondrocytes hypertrophiques. Les souris invalidées pour RUNX2 présentent une diminution de la prolifération des chondrocytes et une maturation chondrocytaire perturbée [95]. Ce rôle important de RUNX2 sur les chondrocytes prolifératifs est indirect et serait réalisé *via* une activation de l'expression d'IHH (Indian hedgehog) dans les chondrocytes pré-hypertrophiques. En effet, IHH a été montré stimulant la prolifération des chondrocytes en colonnes [96].

Au niveau des chondrocytes prolifératifs, l'expression d'IHH permet de réprimer la différenciation hypertrophique par induction de la production de PTHrP (Parathyroid hormone-related protein). En effet, l'activation de la voie de signalisation de PTHrP *via* le récepteur PTH/PTHrP (Ppr1) au niveau des chondrocytes prolifératifs et pré-hypertrophiques empêche la différenciation hypertrophique de cellules exprimant IHH [97].

Les chondrocytes prolifératifs sont résistants à l'invasion vasculaire par sécrétion de facteurs inhibiteurs de l'angiogenèse, tel que la chondromoduline-1 dont le promoteur est sous le contrôle de SOX9 [21,98].

2.1.4 Différenciation pré-hypertrophique et hypertrophique des chondrocytes

La différenciation des chondrocytes prolifératifs en chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques représente un changement phénotypique important. Les chondrocytes voient leur volume cytoplasmique augmenter de plus de 10 fois passant d'un volume de $1000 \mu\text{m}^3$ dans la zone proliférative à plus de $15000 \mu\text{m}^3$ dans la zone hypertrophique [99]. Cette augmentation de volume des chondrocytes hypertrophiques est due à l'expression d'un cotransporteur membranaire Na-K-2Cl (NKCC1) provoquant une augmentation de l'osmolarité intracellulaire et une captation d'eau extracellulaire pour compenser celle-ci [100,101].

Au stade pré-hypertrophique, les chondrocytes ont une activité de synthèse importante essentiellement orientée vers la production de protéines matricielles (collagènes de type II, IX et XI, agrécane, COMP...). De plus, les chondrocytes pré-hypertrophiques activent séquentiellement l'expression des gènes codants pour PTH (Parathyroid hormone), le récepteur de la PTHrP, IHH et le collagène X.

Au stade hypertrophique, les chondrocytes cessent d'exprimer les gènes précoces du cartilage et expriment les récepteurs de PTHrP et IHH. Les récepteurs à la PTHrP et à l'IHH stimulent l'expression du collagène X et du VEGF [102]. Dans le reste de la maquette cartilagineuse, la boucle de régulation négative PTHrP/IHH ainsi que les voies de signalisation FGF et BMP jouent un rôle important dans le contrôle du nombre de chondrocytes qui vont se différencier vers la pré-hypertrophie [103].

IHH, exprimé par les chondrocytes pré-hypertrophiques, inhibe la différenciation hypertrophique des chondrocytes et retarde la minéralisation. IHH stimule également la synthèse de PTHrP dans les chondrocytes périarticulaires. PTHrP bloque alors la différenciation des chondrocytes prolifératifs, ce qui diminue le nombre de chondrocytes pré-hypertrophiques et ainsi diminue l'expression d'IHH, créant ainsi une boucle de régulation négative [104].

L-SOX5 et SOX6 retardent la différenciation pré-hypertrophique, mais sont nécessaires à l'hypertrophie. Chez les souris invalidées pour L-SOX5 et SOX6, les chondrocytes pré-hypertrophiques ne deviennent pas hypertrophiques et n'expriment pas le collagène X [85]. L'expression de la triade L-SOX5/SOX6/SOX9 est réprimée dans les chondrocytes hypertrophiques, ce qui explique la perte d'expression des marqueurs précoces du cartilage observée lors de l'hypertrophie.

Plusieurs mécanismes contrôlent le passage des chondrocytes pré-hypertrophiques vers hypertrophiques. En effet, le chondrocyte pré-hypertrophique peut entrer en autophagie. Ce mécanisme prévient leur passage vers l'hypertrophie [105,106]. D'autre part, HDAC4 (histone deacetylase 4) exprimée au niveau des chondrocytes pré-hypertrophiques, dans les stades tardifs, empêche l'hypertrophie prématurée des chondrocytes en inhibant l'activité de RUNX2 [107]. Cette inhibition est levée par la fixation de MEF2C sur le promoteur de HDAC4 [108]. Le facteur transcription MEF2C apparaît nécessaire pour l'engagement précoce des chondrocytes vers l'hypertrophie. En effet, ce facteur de transcription active

directement le promoteur de COL10A1 et semble primordial pour la régulation spatiale et temporelle de l'expression de RUNX2, VEGF et COL10A1 [109].

Le facteur de transcription 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 [110]. Par ailleurs, RUNX2 stimule la synthèse de collagène X [111] et également l'expression d'IHH [112]. PTHrP intervient également sur la stabilité des facteurs de transcription RUNX2 et RUNX3 [113,114]. 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.

2.1.5 Différenciation terminale des chondrocytes hypertrophiques

Les chondrocytes hypertrophiques subissent un bouleversement phénotypique lors de l'étape de différenciation terminale. Lors de cette transition, les chondrocytes cessent d'exprimer le collagène X et expriment des gènes tels que les matrix metalloproteinases (MMP), les ADAMTS et les gènes de la famille SIBLING (Small Integrin-binding Ligand, N-linked Glycoprotein) comprenant : la dentin matrix protein 1 (DMP1), la bone sialoprotein (BSP), l'ostéopontine (OPN), la dentin sialophosphoprotein (DSPP) ainsi que la phosphatase alcaline (ALP). Ces marqueurs de la différenciation terminale sont également considérés comme des marqueurs ostéoblastiques. En effet, tout comme les ostéoblastes, les chondrocytes, lors de leur différenciation terminale, sont capables d'induire la minéralisation de la MEC grâce à l'expression de Ank (progressive ankylosis) qui a pour rôle d'exporter le PPi (pyrophosphate inorganique) intracellulaire vers le milieu extérieur [115]. Le PPi est ensuite dégradé en Pi sous l'action de l'ALP, faisant ainsi augmenter la concentration de Pi extracellulaire. Cette homéostasie PPi/Pi intervient dans la régulation de la différenciation terminale et l'apoptose des chondrocytes de la plaque de croissance [116].

L'ossification de la matrice cartilagineuse implique l'invasion du périchondre et de la zone hypertrophique par les vaisseaux sanguins. Ce mécanisme implique le remodelage intense de la MEC [117]. Les chondrocytes hypertrophiques expriment des enzymes responsables de la dégradation de la matrice cartilagineuse (MMP, ADAMTS) [118] et du facteur angiogénique VEGF [119]. La MMP-13 (collagénase 3) semble indispensable à la dégradation et à l'invasion de la MEC par les vaisseaux sanguins. En effet, la MMP-13 est responsable du clivage du collagène de type II [120] et les souris déficientes pour MMP-13 présentent une

augmentation de l'épaisseur de la zone hypertrophique et un retard de minéralisation, due à une accumulation de collagène interstitiel [121].

Les facteurs angiogéniques VEGF 120, VEGF 164 et VEGF 188 sont exprimés par les chondrocytes prolifératifs, pré-hypertrophiques, sous l'action du facteur de transcription HIF-1alpha et chondrocytes hypertrophiques sous l'action du facteur de transcription RUNX2 [122]. Dans les chondrocytes hypertrophiques, RUNX2 stimule l'expression de VEGF en se fixant directement sur son promoteur ou indirectement, en induisant l'expression de HIF1-alpha [123,124]. Les récepteurs pour VEGF, VEGFR1 et VEGFR2, sont exprimés différemment par les chondrocytes de la plaque de croissance [102]. En effet, ils ne sont pas exprimés dans les phases précoces de la différenciation [125]. Ceci suggère que VEGF exerce une activité angiogénique uniquement dans la zone hypertrophique [126-128].

Ensuite, la majorité des chondrocytes meurt par apoptose [129]. Le remodelage de la MEC cartilagineuse ainsi que sa vascularisation sont indispensables à la migration et à la différenciation des ostéoblastes et ostéoclastes qui vont progressivement remplacer la matrice cartilagineuse par de l'os.

2.2 La tension en oxygène, actrice de la chondrogenèse

Lors de la chondrogenèse, les cellules sont soumises à un gradient de tension en oxygène de la périphérie de la plaque de croissance vers le centre hypoxique [130].

La tension en oxygène est un facteur environnemental clé qui régule le métabolisme énergétique, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire [22,131,132].

HIF-1 et HIF-2, facteurs de transcription indispensables à la chondrogenèse

Les effets de la tension en oxygène sont principalement médiés par les facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2. Ces facteurs de transcription sont des hétérodimères constitués de deux sous-unités : HIF-alpha et HIF-béta. Contrairement à la sous-unité bêta, la stabilité de la sous-unité alpha est dépendante de la tension en oxygène. La sous-unité alpha est dégradée en condition normoxique et stabilisée en condition hypoxique (les mécanismes de régulation seront développés paragraphe 4.2.1).

La sous-unité HIF-1alpha est exprimée à tous les stades de la chondrogenèse mais semble principalement active dans les phases précoces de différenciation. La délétion conditionnelle

de HIF-1alpha dans les cellules mésenchymateuses des membres n'induit pas de modification du phénotype au stade précoce du développement (E12.5) [133]. En revanche, la délétion conditionnelle de HIF-1alpha dans les chondrocytes de la plaque de croissance, induit une mort cellulaire massive, un retard de différenciation chondrogénique et par conséquent un retard de croissance [130]. Le facteur de transcription HIF-1alpha ne semble donc pas indispensable pour la condensation des cellules mésenchymateuses. HIF-1alpha assure la survie des chondrocytes et est nécessaire pour l'engagement des cellules mésenchymateuses.

HIF-2alpha est principalement localisée dans la zone hypertrophique de la plaque de croissance. La délétion conditionnelle de HIF-2alpha cause un retard modeste et transitoire du développement endochondrale, *via* un mécanisme non élucidé à ce jour [134,135]. Cependant, les fonctions de HIF-2alpha au cours de la chondrogenèse semblent être indépendantes de sa régulation par l'oxygène [134].

L'analyse des phénotypes invalidés pour les principaux effecteurs de la tension en oxygène, HIF-1alpha et HIF-2alpha, met en évidence l'importance de l'oxygène au cours de la chondrogenèse.

Tension en oxygène et prolifération des chondrocytes

L'hypoxie inhibe la prolifération des chondrocytes au cours de la chondrogenèse. Ceci a été mis en évidence par deux modèles *in vivo*. Dans le modèle de souris déficientes en HIF-1alpha, décrit précédemment, le taux de prolifération des chondrocytes est augmenté [130]. Ces observations ont été corrélées par le modèle de souris déficientes en pVHL (protein von Hippel Lindau). pVHL est une E3-Ubiquitine ligase responsable de la dégradation des HIF-alpha par le protéasome. Dans ce modèle, HIF-1alpha et HIF-2alpha sont donc stabilisées. La plaque de croissance des souris mutantes est faiblement cellularisée et l'expression de la cycline dépendante kinase p57 qui favorise la sortie du cycle cellulaire, est augmentée [136]. De plus, lorsque les chondrocytes de la plaque de croissance expriment une forme mutée de pVHL et HIF-1alpha, l'inhibition de la prolifération des chondrocytes est levée [136]. Ces travaux montrent que HIF-1alpha régule négativement la prolifération des chondrocytes de la plaque de croissance. Ces données sont corrélées par des études *in vitro* mettant en évidence l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S et l'inhibition de la prolifération cellulaire, de façon HIF dépendant [137]. Cependant, le mécanisme précis de la régulation de la prolifération des chondrocytes de la plaque de croissance par HIF-1alpha reste encore à établir.

Tension en oxygène et survie des chondrocytes

Au cours de la différenciation chondrogénique, le VEGF est exprimé et sécrété de façon croissante, dès les premières phases de différenciation jusqu'à la phase d'hypertrophie. La délétion conditionnelle de VEGF dans les chondrocytes de la plaque de croissance induit une mort cellulaire massive. Le VEGF semblerait donc indispensable à la survie cellulaire au cours de la chondrogenèse [125]. Cependant, le rôle de VEGF exprimé par les chondrocytes en condition hypoxie est encore mal connu. En effet, les récepteurs au VEGF, VEGFR1 et VEGFR2 ne sont pas exprimés par les chondrocytes prolifératifs, alors que leurs corécepteurs neuropilin-1 et 2 et VEGFR3 qui ne fixent pas le VEGF [138] sont exprimés par les chondrocytes prolifératifs [125,139]. Ces données suggèrent que soit le VEGF diffuse au travers de la plaque de croissance pour induire l'angiogenèse des tissus environnants (e.g. périchondrium) [140], soit il agit localement sur la survie des chondrocytes mais de façon indépendante des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2. Ce mécanisme reste encore à élucider.

L'autophagie peut être analysée comme un processus de survie cellulaire. En effet, la cellule provoque la dégradation de ses propres composants membranaires et cytoplasmiques pour se fournir en énergie [141,142]. En conditions hypoxiques, la mise en place de l'autophagie est dépendante des voies de signalisation de l'AMPK (AMP-Activating Protein Kinase) et BNIP3 (Bcl-2 adenovirus Elanineteen kilodalton interacting protein 3) / BINP3L (BNIP3 like protein) [143,144]. Cependant, dans les chondrocytes pré-hypertrophiques, seule la voie AMPK a été mise en évidence. L'activité enzymatique de l'AMPK, de par son action inhibitrice des voies mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), stimule l'entrée en autophagie des chondrocytes pré-hypertrophiques. L'AMPK est sensible au statut énergétique de la cellule et majoritairement activée par la diminution du ratio énergétique ATP/AMP [145]. En condition hypoxique et indépendamment du ratio ATP/AMP, la stabilisation de l'AMPK est induite par HIF-1 et par les ROS (Reactive Oxygen Species), produit par la mitochondrie en conditions hypoxiques [146,147].

De façon intéressante et à l'inverse de HIF-1, HIF-2 régule négativement l'autophagie [148]. HIF-2 favoriserait ainsi le passage des chondrocytes pré-hypertrophiques vers l'hypertrophie.

3 Cellules chondrogéniques en ingénierie tissulaire du cartilage

Les lésions ou pertes de fonction d'organes ou tissus provoquent des changements structuraux et métaboliques entraînant une importante morbidité voire même, en fonction de l'organe affecté, la mort [149]. Aux côtés des thérapies existantes telles que la médication, la pose de dispositifs médicaux ou de prothèses, émerge le concept d'ingénierie tissulaire. 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 [150]. Trois composants sont essentiels en ingénierie tissulaire, les matrices ou biomatériaux, les cellules et les morphogènes. Avec sa faible cellularité et sa matrice avasculaire, le cartilage articulaire est considéré comme un bon candidat pour l'ingénierie tissulaire [151].

Le choix de la composante cellulaire est conditionné par la nécessité de régénérer une MEC aux propriétés biochimiques et biomécaniques les plus proches possibles de celles du tissu à remplacer. De plus, la source idéale de cellules doit être facilement prélevable et en quantité adaptée. Plusieurs sources sont étudiées à ce jour dont les chondrocytes, les CSM adultes, embryonnaires ou pluripotentes induites (iPS) [152]. Pour des questions d'éthiques liées à l'utilisation des CSM embryonnaires ainsi que des questions législatives pour l'utilisation de cellules génétiquement modifiées (iPS) en clinique, ces deux items ne seront pas abordés dans ces paragraphes.

3.1 Chondrocytes

3.1.1 Choix des chondrocytes isolés du cartilage de type hyalin

Le chondrocyte est la source cellulaire la plus évidente pour réparer les lésions cartilagineuses. Ces cellules ont un métabolisme adapté aux conditions environnementales du tissu cartilagineux (métabolisme anaérobique), sont mécanosensibles, capables de sécréter les protéines qui constituent et remodelent la matrice extracellulaire du cartilage. Les chondrocytes ont été isolés à partir de cartilage de type hyalin (articulaire, septum nasal ou costaux) et de type élastique (cartilage auriculaire) [153]. Cependant, chaque type de chondrocytes forme un tissu *in vitro* et *in vivo* présentant les mêmes caractéristiques que son tissu d'origine [153,154]. Par conséquent, les chondrocytes issus du cartilage auriculaire de type élastique, forment un tissu qui ne présente pas les caractéristiques structurales et fonctionnelles du cartilage articulaire de type hyalin. Dans un objectif d'ingénierie tissulaire

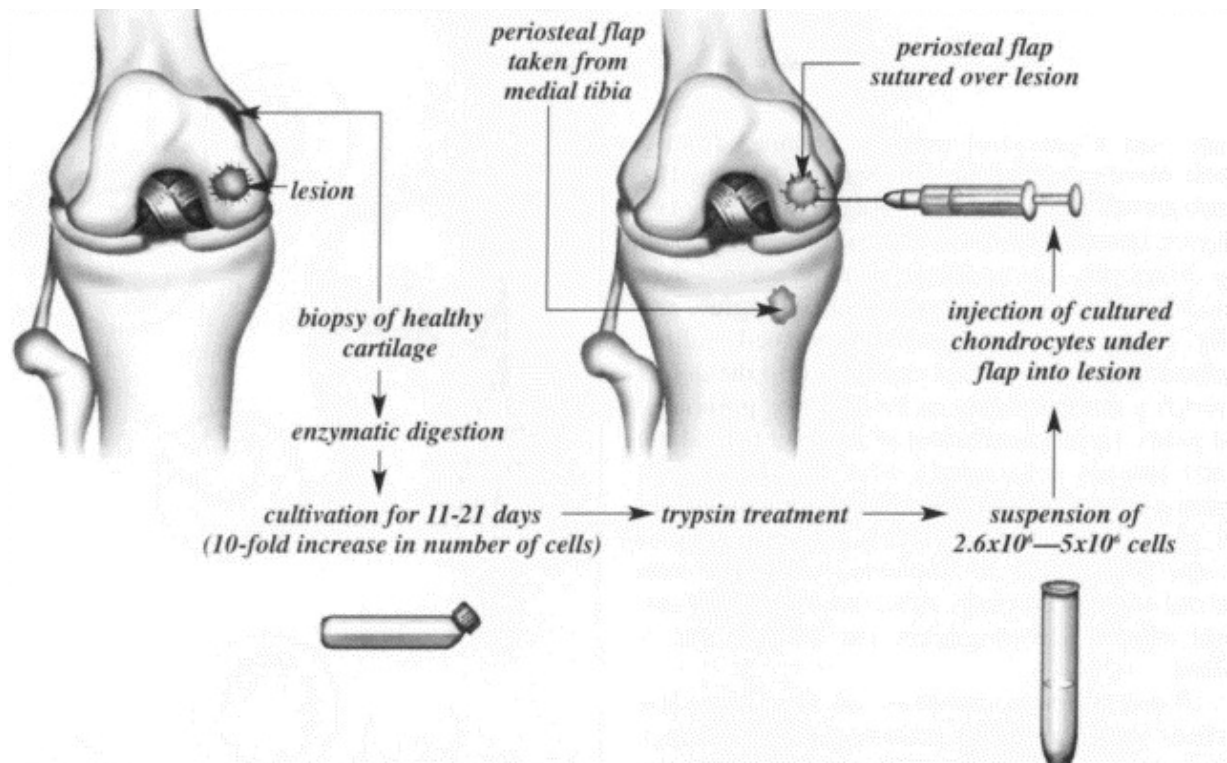


Figure 7 : Technique de transplantation de chondrocytes autologues. Représentation schématique issue de la publication de Brittberg *et al* [162].

du cartilage articulaire, l'utilisation de chondrocytes issus du cartilage hyalin semble plus pertinente. Les sources pouvant être envisagées sont le cartilage nasal, costal ou articulaire. Cependant, quelles que soient leurs origines, l'utilisation des chondrocytes présente des limites importantes. L'une de ces limites est liée à la dédifférenciation des chondrocytes lorsqu'ils sont cultivés en monocouche. Cette instabilité phénotypique se traduit par une perte de l'expression et de la synthèse de l'agrécan et du collagène de type II au profit du collagène de type I [155]. De plus, les chondrocytes prélevés sur un site donneur âgé et/ou pathologique sont métaboliquement moins actifs [156-158]. Cependant, la dédifférenciation et l'activité métabolique des cellules prélevées peuvent être contrecarrées par la culture cellulaire au sein de bioréacteurs, en trois dimensions, en présence de facteurs de croissance ou encore en présence d'un environnement pauvre en oxygène [159-161]. Finalement, l'utilisation des chondrocytes présente une autre limite non négligeable, relative à la morbidité du site donneur.

3.1.2 Applications et défis en clinique

L'application en clinique humaine des chondrocytes pour traiter les lésions cartilagineuses a pour la première fois été réalisé par Brittberg *et al* en 1994 [162]. Cette méthode consiste à prélever des chondrocytes autologues en zone saine et non portante. Après une étape d'amplification en culture cellulaire, les chondrocytes sont implantés sous un lambeau de périoste qui recouvre la lésion cartilagineuse (1,6 à 6,5 cm² de diamètre) (Figure 7). L'implantation autologue de chondrocyte (ACI) présente des résultats satisfaisant à courts et moyen terme (1 à 9 ans) : une diminution de la douleur, une nette amélioration des fonctionnalités ainsi que la formation d'un tissu de type hyalin [163].

Cependant, cette procédure présente certaines limites liées à (i) la complexité chirurgicale en deux temps opératoires, (ii) l'hypertrophie du lambeau périosté, qui constitue la première cause de ré-opération [164], (iii) la fuite des chondrocytes implantés au travers des sutures du lambeau de périoste, (iv) une mauvaise distribution des cellules au sein du défaut, (v) l'implantation de chondrocytes dédifférenciés après une étape de culture cellulaire en monocouche, (vi) la délamination et enfin, (vii) le remodelage des tissus adjacents [165,166].

Pour faire face à ces limites, les nouvelles générations d'ACI associent les chondrocytes à un biomatériau. Ces biomatériaux apportent un environnement tridimensionnel aux chondrocytes, favorisant ainsi le maintien du phénotype chondrocytaire.

Tableau 1: Biomatériaux commerciaux pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.

	Polymère	Produit commercial	Site internet
Polymère naturel			
Hydrogel	Alginate	CARTIPATCH (Lyon, France)	www.tbf-lab.com
	Collagène	CaReS / CaReS-1S (Krems, Australie); Carticel (Cambridge, USA) ; PureCol / VitroCol / Nutragen (Salt Lake City, USA)	www.arthro-kinetics.com www.genzyme.com www.glycosan.com
	Fibrine	Tissucol (Deerfield, IL)	www.baxter.fr
	Hyaluronate	HyStem / Extracel / Glycosil (Salt Lake City, USA)	www.glycosan.com
	Chitosan	BST-CarGel (Quebec, Canada)	www.biosyntech.com
	Peptide	Puramatrix(Cambridge, MA)	www.bdbiosciences.com
Matrice	Collagène	Maïx (Matricel, Hezzenrath, Germany) MACI (Bridgewater, USA) Chondro-Gide (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland) Atelocollagen® (Koken Co. Ltd, Tokyo, Japan)	http://www.sanofi.co.uk http://www.kokenmpc.co.jp
	Hyaluronate	Hyaff-11 (Salt Lake City, USA) Hyalograft C (Bedford, MA)	www.glycosan.com www.glycosan.com
Polymère synthétique			
Hydrogel	PVA poly(vinyl alcohol)	SaluCartilage (Smyrna, GA)	www.salumedia.com
	PEG Poly(ethylene glycol)	Chondux (Foster City CA)	www.biomet.fr
Co-polymère			
Hydrogel	Fibrinogène et acide hyaluronique	BioCart II (Waltham , MA)	www.histogenics.com
	Fibrogène et poly(ethylene glycol)	Gelrin C (Haifa, Israel)	www.regentis.co.il
Matrice	polyglycolic (PGA) / polylactic (PLA) acid (polyglactin, vicryl) et polydioxanone	Bio-Seed_-C (Biotissue Technologies, Freiburg, Germany)	http://www.orabone.de

Ils peuvent être utilisés pour l'étape de culture en trois dimensions *in vitro*, comme vecteur lors de l'implantation ou pour substituer le lambeau de périoste. De nombreux biomatériaux sont disponibles commercialement. Ils peuvent être classés en deux catégories : les biomatériaux à base de polymères naturels ou les biomatériaux à base de polymères synthétiques (Tableau 1).

Les biomatériaux à base de polymères naturels disponibles pour une application clinique dans la technique ACI sont soit à base de collagène de type I et III : Maïx[®] (Matricel, Hezzenrath, Germany) ; MACI[®] (Bridgewater, USA) ; Chondro-Gide[®] (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland) ; Atelocollagen[®] (Koken Co. Ltd, Tokyo, Japan) ou soit à base d'acide hyaluronique : Hyaff-11[®] (Salt Lake City, USA) et Hyalograft C[®] (Bedford, MA).

Un seul biomatériau à base de polymères synthétiques est disponible en clinique Bio-Seed-C[®] (Biotissue Technologies, Freiburg, Germany). Bio-Seed-C[®] est à base de polyglycolic (PGA) / polylactic (PLA) acid (polyglactin, vicryl) et polydioxanone.

Actuellement de nouveaux biomatériaux sont en cours de tests cliniques. A titre d'exemples, BioCart II[®] (Waltham, MA) est une matrice à base de fibrine et d'acide hyaluronique. Les chondrocytes sont prélevés et cultivés au sein de cette matrice en présence de sérum autologue et FGF2. BioCart II[®] est disponible en Israël et en cours d'étude clinique de phase II aux Etats-Unis. CARTIPATCH[®] (TBF, Lyon, France) est un hydrogel à base d'agarose-alginate. Cet hydrogel se façonne au défaut permettant un comblement optimal des zones lésées. Il permet également une répartition homogène des chondrocytes dans le défaut. CARTIPATCH[®] est en étude clinique de phase III.

De nouvelles stratégies ACI sont également en cours de développement. Actuellement, la stratégie novatrice NeoCart[®] (Waltham, USA) consiste à former un implant synthétisé *in vitro* composé d'un biomatériau à base de collagène de type III associé à des chondrocytes autologues. Cet implant est ensuite cultivé au sein d'un bioréacteur avant implantation.

NeoCart[®] est en cours d'étude clinique de phase III aux Etats-Unis. Par ailleurs, dans le but de préserver l'intégrité et la fonctionnalité du cartilage articulaire hyalin, l'utilisation en clinique de chondrocytes nasaux est en cours de développement. L'étude portée par Marcel Jakob teste l'association de chondrocytes nasaux autologues avec un biomatériau à base de collagène de type I et III. Cette stratégie est actuellement en étude clinique de phase I en

Suisse (NCT01605201 : Tissue Engineered Nasal Cartilage for Regeneration of Articular Cartilage (Nose2Knee).

3.2 Cellules stromales multipotentes

Les cellules stromales multipotentes (CSM) peuvent être isolées en grande quantité à partir de nombreux tissus adultes et présentent l'avantage de pouvoir être utilisées dans des conditions autologues. L'utilisation des CSM semble être une solution intéressante pour dépasser les limites liées au prélèvement et à l'amplification des chondrocytes. Elles sont utilisées en clinique dans plusieurs applications dont le domaine ostéo-articulaire [7].

Les propriétés biologiques des CSM permettent d'envisager leur utilisation pour le traitement de défauts cartilagineux focaux où l'engagement des CSM vers un phénotype chondrogénique semble primordial pour la survie des cellules *in vivo* ainsi que la régénération du tissu [167,168]. Dans le cas d'atteintes arthrosiques, la stratégie semble s'orienter sur l'implantation de CSM, en se fondant sur leurs propriétés sécrétrices. En effet, les CSM ont la capacité de moduler leur environnement, en sécrétant un large spectre de molécules bioactives, regroupées sous le terme de sécrétome. La sécrétion de ces facteurs peut avoir des effets immunorégulateurs, angiogéniques, anti-inflammatoires, anti-fibrotiques et anti-apoptotiques. Ces propriétés ont d'ailleurs montré leur efficacité lors d'études cliniques chez l'homme [169-171].

3.2.1 Propriétés biologiques

Les CSM ont été isolées à partir de nombreux tissus adultes (moelle osseuse [3], pulpe dentaire [172], membrane synoviale [173], tissu adipeux [174,175], muscle squelettique [176] ou fœtaux (fluide amniotique [177], placenta [178], sang de cordon ombilical [179]). En raison des diverses sources tissulaires, de l'hétérogénéité des populations et des différentes techniques d'isolation, il n'existe pas de marqueur spécifique des CSM. Cependant en 2006, le comité de l'ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) a décrit les caractéristiques minimales permettant de définir les CSM [180,181]:

- l'adhérence cellulaire au plastique
- un phénotype cellulaire défini en cytométrie de flux par la présence ou l'absence d'antigènes de surface (plus de 95% des cellules doivent exprimer CD 105 : endogline; CD 73 : ecto 5'nucleotidase; CD 90 : THYMocyte differentiation antigen-1)

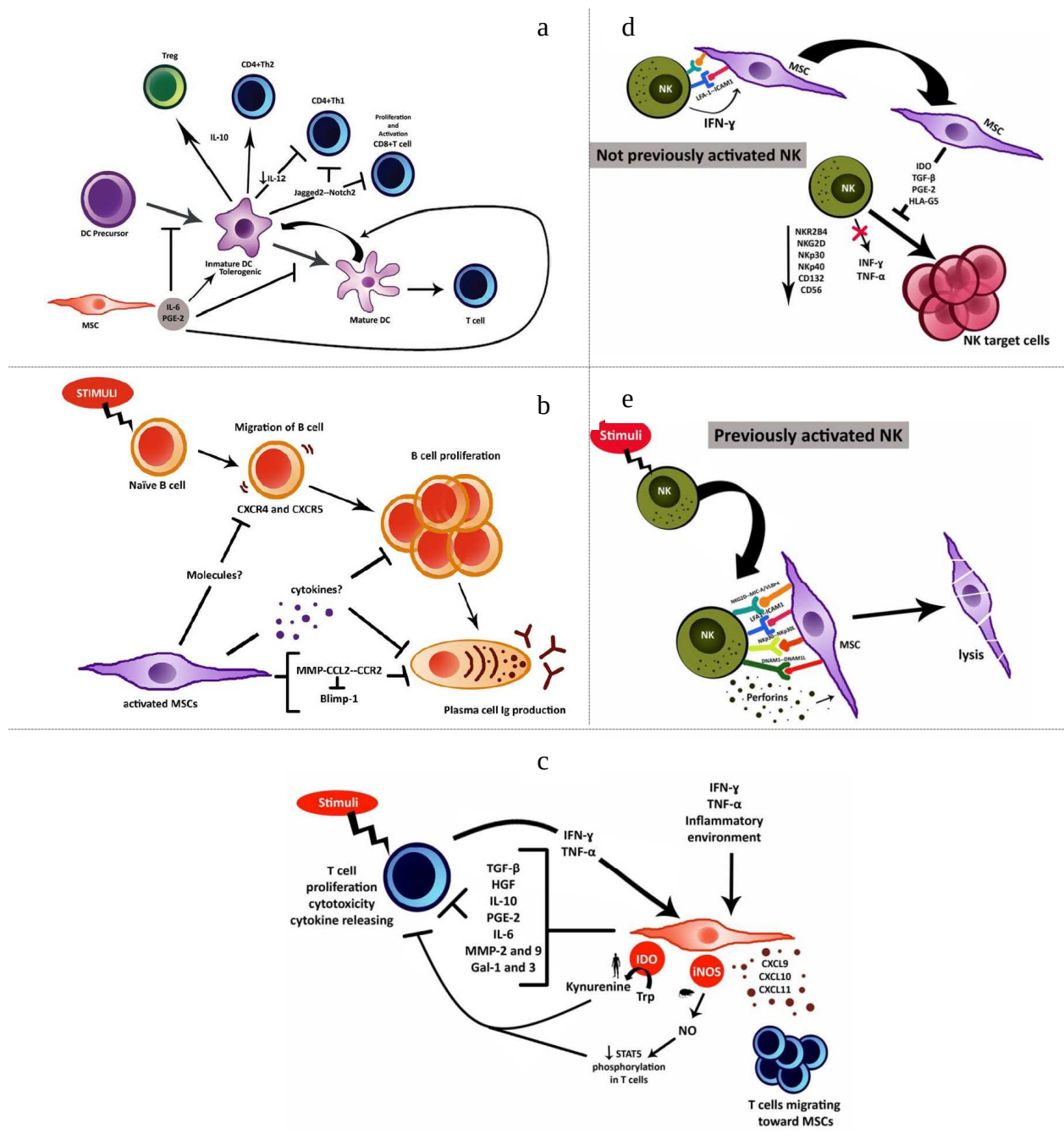


Figure 8 : Propriétés immunomodulatrices des CSM vis-à-vis : (a) des cellules présentatrices d'antigènes ; (b) des cellules B ; (c) des cellules T (d) des cellules NK non activées (e) des cellules NK activées. D'après De Miguel *et al* [190].

- la capacité de différenciation vers au minimum trois voies de différenciations majeures: ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes

Les CSM prolifèrent, s'auto-renouvellent et sont multipotentes, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de générer tous les types cellulaires du feuillet embryonnaire dont elles sont issues. Ainsi les CSM peuvent se différencier vers un phénotype chondrogénique. Des populations de CSM ayant un potentiel chondrogénique ont été identifiées dans la plupart des organes [182]. Il est intéressant de noter la grande disparité entre les potentiels de différenciation des CSM en fonction de leur tissu d'origine [183]. En effet, les CSM isolées de la membrane synoviale semblent présenter un meilleur potentiel chondrogénique au regard d'autres sources cellulaires, telles que les cellules issues de la moelle osseuse (MO-CSM) ou du tissu adipeux (CSA) [184]. Par ailleurs, il existe également une disparité au sein des CSM issues du même tissu, mise en évidence par la différence de potentialité des cellules issues d'un même clone [185,186].

Effets immunomodulateurs

Aujourd'hui un nombre considérable de travaux relatent les effets pléiotropiques des CSM sur le système immunitaire. Les CSM sont actuellement appliquées en clinique pour traiter les maladies auto-immunes sévères, le rejet d'organe ou la maladie aiguë du greffon contre l'hôte (GvHD : Graft versus Host Disease) [187].

Les CSM sont dites immunoprivilégiées car bien qu'elles expriment le CMH-I (HLA-A, B et C), elles n'expriment que très peu le CMH-II (HLA-DR) et n'expriment pas les molécules de costimulation CD80/B7-1, CD86/B7-2 et CD40, habituellement présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) [188,189].

Fonctionnellement, les CSM ont un rôle régulateur de l'inflammation au niveau des effecteurs de l'immunité innée et adaptée (Figure 8).

Les **Cellules Présentatrices d'Antigènes** (CPA) jouent un rôle précoce dans la réponse immunitaire innée. Les CSM, par la sécrétion d'IL-6 et PGE-2 peuvent prévenir la maturation des CPA en agissant sur la prolifération, la maturation et la fonction des CPA. Ceci a été mis en évidence par deux observations : (i) en présence de CSM, les CPA n'augmentent pas l'expression du CMH-II, des molécules de co-stimulation (CD80/B7-1, CD86/B7-2 et CD40) ainsi que du récepteur de chemotactisme CCR7 [191]; (ii) en présence de CSM, les CPA diminuent leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-12 et TNF-alpha et sont capables

de sécréter la cytokine anti-inflammatoire IL-10 [192-195]. De plus, les CSM peuvent induire la réversion du phénotype CPA mature vers un phénotype immature [195,196]. Ceci suggère une induction de la tolérance des CPA par les CSM.

Les **cellules NK** (Natural Killer) induisent la cytotoxicité (perforins, Fas-ligand et granzyme) des cellules infectées et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires TNF-alpha et IFN-gamma principalement [197]. Lorsque les cellules NK ne sont pas activées, l'interaction avec les CSM induit la sécrétion d'IFN-gamma par les cellules NK, ce qui a pour conséquence l'activation des propriétés immunomodulatrices des CSM. Ainsi, les CSM activées peuvent prévenir la maturation des NK et donc diminuer la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. En revanche, lorsque les cellules NK sont activées, elles sont capables d'induire la mort des CSM [198-200].

La prolifération, la différenciation, la maturation des **lymphocytes B** ainsi que la production des anticorps sont inhibées en présence de CSM *in vitro* [201-204]. De plus, la migration des lymphocytes B (diminution de l'expression des récepteurs CXCR4 et CXCR5) semble inhibée en présence de CSM [205].

Les CSM inhibent également la prolifération et l'activation des **lymphocytes T** (CD4⁺ et CD8⁺), *via* l'absence de CMH-II et des molécules de co-stimulations. La réduction de la prolifération des lymphocytes T est due à l'inhibition par les CSM de la cycline D2 provoquant ainsi l'arrêt en phase G0 du cycle cellulaire [206]. Les CSM favorisent également la survie des lymphocytes T [207]. De plus, par leur action sur le profil sécrétoire des lymphocytes T, les CSM favorisent le passage d'une réponse pro-inflammatoire vers une réponse anti-inflammatoire (réduction de la sécrétion de l'INF-gamma, IL-2, TNF-alpha et augmentation de la sécrétion de IL-4) [193].

Effets trophiques : le sécrétome

Les effets observés, après injection de CSM, semblent être dus non seulement aux propriétés immunomodulatrices des CSM mais également à leurs effets trophiques. Ces effets semblent influencer majoritairement l'environnement local et le potentiel régénérateur des cellules résidentes [208-214]. Le sécrétome des CSM, soit l'ensemble des facteurs de croissance sécrétés dans le milieu extracellulaire, a un impact bénéfique démontré sur l'homéostasie des tissus et des organes. Récemment, de nombreuses études se sont intéressées au sécrétome des CSM et ont démontré son intérêt pour l'ingénierie tissulaire [215-217]. En effet, lorsque les CSM sont administrées au niveau de tissu lésé, leur activité trophique, de par leur sécrétome,

Tableau 2 : Principales caractéristiques des CSM issues de la moelle osseuse (MO-CSM) et du tissu adipeux (CSA). Adapté d’après Lindroos *et al* [230].

Caractéristiques		MO-CSM	CSA
Origine embryonnaire		Mésoderme et crête neurale	
Tissu		Moelle osseuse	Tissu adipeux
Sélection		Adhérence au plastique	
Marqueurs antigéniques	CD49a	+	+
	CD49b	-	+
	CD73	+	+
	CD90	+	+
	CD105	+	+
	CD106	+	-
	CD271	+	+
	CD34	-	-
CFU-F		>0.001%	>5%
Taux de renouvellement		20-50 populations de doublement	40-88 populations de doublement
Potentiel de différenciation		Adipogénique, chondrogénique, ostéogénique	

comprend : (i) un effet anti-fibrotique et anti-apoptotique (ii) une stimulation du recrutement, de la rétention, de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs intrinsèques ; (iii) une atténuation du stress oxydatif [218-220].

Ainsi, les CSM semblent prévenir la destruction du cartilage en sécrétant de nombreux facteurs bioactifs ou en se différenciant en chondrocyte [221],[222]. En effet, la co-culture de CSM en présence de chondrocytes arthrosiques permet la différenciation chondrogénique des CSM et ce en absence de facteurs de croissance [223]. *In vivo*, l'implantation de MO-CSM autologues dans une articulation de chèvre, ayant subi une ablation du ménisque médial et du ligament croisé antérieur, ont montré un effet chondroprotecteur et une régénération du tissu méniscal [224]. Dans un modèle expérimental de lapin arthrosique, l'implantation de CSM au sein d'un biomatériau à base d'acide hyaluronique, améliore significativement la qualité du tissu cartilagineux formé. De plus, la formation d'ostéophytes et la perte de protéoglycane sont diminuées [225]. Chez l'humain, huit études cliniques sont en cours de recrutement pour tester l'efficacité de l'injection de CSM dans une articulation arthrosique.

Les effets anti-fibrotiques des CSM ont été mis en évidence *in vitro* et *in vivo* [226]. Les CSM induisent une diminution de l'expression des collagène I et III et stimulent l'expression des métalloprotéinases 2 et 9. Des facteurs tels que HGF (Hepatocyte Growth Factor), BMP-7 ou adrenomedulline ont été suggérés comme impliqués dans la fonction anti-fibrotique des CSM [227]. Cependant, peu d'informations sur la médiation et les mécanismes impliqués dans ces effets observés sont actuellement disponibles.

L'identification à haut débit des molécules sécrétées permettrait de décrire et comprendre les effets trophiques des CSM lors de leur implantation au niveau de sites articulaires lésés [228].

3.2.2 Choix des cellules stromales multipotentes

En ingénierie tissulaire du cartilage, les CSM étudiées sont principalement isolées de la moelle osseuse ou du tissu adipeux [229]. Les principales caractéristiques de ces deux sources cellulaires sont résumées dans le tableau 2.

Cellules stromales multipotentes isolées de la moelle osseuse

Chez l'homme, les premières CSM ont été isolées à partir de la moelle osseuse dans les années 1960 et appelées « colony-forming unit-fibroblast » pour leur morphologie fibroblastique et pour leur capacité à former des colonies de cellules [231].

Les CSM peuvent être isolées à partir de moelle osseuse provenant de la crête iliaque et plus rarement de la partie supérieure du sternum (manubrium). L'obtention de la moelle osseuse requiert un geste chirurgical assez invasif. Le prélèvement se fait sous anesthésie générale et le volume prélevé de moelle osseuse est limité. La moelle osseuse totale contient une population cellulaire hétérogène : elle est composée de cellules souches hématopoïétiques et de CSM [232,233]. Le rendement d'obtention des CSM est de l'ordre de 0,001% à 0,0001% du nombre total de cellules nucléées [3].

Cellules stromales multipotentes isolées du tissu adipeux

Depuis ces 10 dernières années, il est reconnu que le tissu adipeux n'est pas seulement un réservoir énergétique mais également un tissu riche en CSM. Les CSA ont été pour la première fois isolées et caractérisées en 2001 par Zuk *et al* [174,175]. Depuis, le développement des études sur les CSA a conduit à de multiples dénominations de ces cellules. L'appellation fut harmonisée en 2004 par l'International Federation of Adipose Therapeutics and Science (IFATS) qui a adopté le terme ASC (Adipose Stem/Stromal Cells) ou en français CSA [234].

Le tissu adipeux sous-cutané présente l'avantage d'être largement disponible, d'être facilement prélevable par lipoaspiration et en grande quantité. La lipoaspiration se fait sous anesthésie générale et est considérée comme une chirurgie mini-invasive [235]. Cette technique est moins coûteuse et moins invasive que le prélèvement de moelle osseuse. L'intérêt d'utiliser un tissu riche en cellules stromales et prélevable en grande quantité réside dans le fait de limiter l'étape d'amplification et ainsi de préserver la multipotence des cellules isolées [236].

Les techniques de prélèvement de graisse ont connu un essor considérable notamment pour des applications en chirurgie plastique ou reconstructive (après mastectomie due à un cancer du sein par exemple). Le tissu adipeux est majoritairement prélevé au niveau de la région abdominale, de la région trochantérienne ou de la face interne des genoux. La méthode couramment utilisée est dite de « Coleman ». Elle consiste à déstructurer le tissu par aspiration sous infiltration de sérum contenant un vasoconstricteur (adrénaline) additionné ou non d'un anesthésique local (lidocaïne). L'idée de Coleman est de séparer les cellules graisseuses intactes, qui seront greffées, des autres éléments qui ne sont pas greffables [237]. Ces dernières années de nombreuses techniques de lipoaspiration se sont développées dans ce sens.

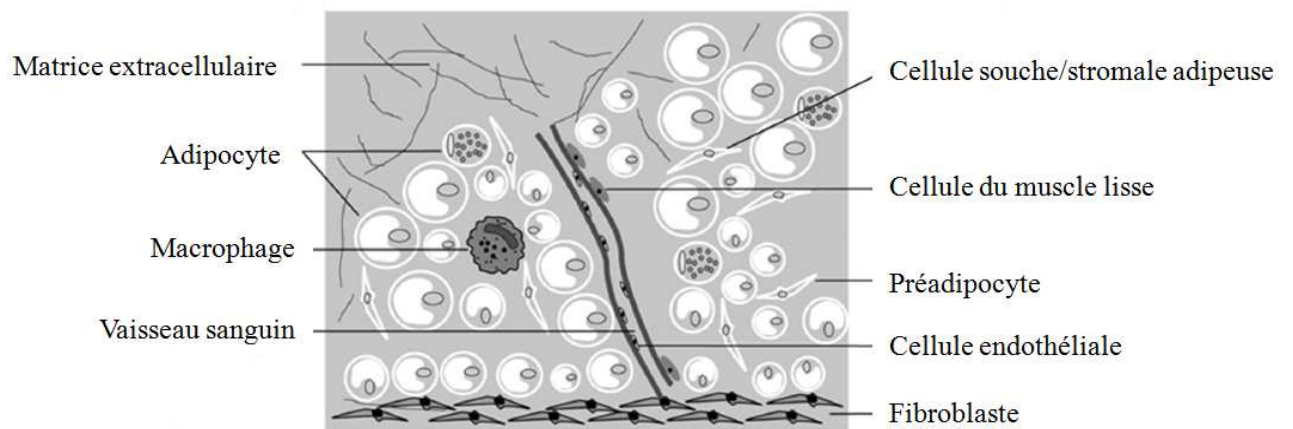


Figure 9: Représentation schématique des composants du tissu adipeux. Schéma modifié à partir de Schaffler *et al* [238].

La Fraction Stromale Vasculaire (FSV) contient une population de cellules hétérogènes comprenant des péricytes (3-5%), des cellules endothéliales (10-20%), des CSA, des cellules de la lignée hématopoïétique (lymphocytes, granulocytes et éventuellement des macrophages / 25-45%) ainsi que des cellules stromales (15-30%) parmi laquelle 0,01 à 0,1% de CSA (Figure 9) [230,238-240]. La caractérisation de la FSV a récemment été publiée par l'*International Federation for Adipose Therapeutics and Science* (IFATS) et l'*International Society for Cellular Therapy* (ISCT) [241]. Le degré d'hétérogénéité dépendant principalement de la zone de prélèvement du tissu ainsi que du protocole d'isolation de la FSV du tissu adipeux [4-6].

3.2.3 Applications et défis en clinique

L'application clinique des CSM est soumise à une réglementation stricte. Les réglementations GMP (Good Manufacturing Practice) définissent les bonnes pratiques pour produire des CSM de grade clinique [242]. Les méthodes et conditions doivent être suivies tout au long de la période de culture pour assurer et maintenir la fonctionnalité des cellules (viabilité, morphologie, phénotype, taux de prolifération et capacité de différenciation) et la stabilité du génome (caryotype et expression des télomérases) [243]. Par ailleurs, la réglementation européenne considère aujourd'hui les CSM issues de la moelle osseuse et du tissu adipeux, comme des produits de thérapie innovante. Ceci permet de faciliter le développement de nouvelles approches, d'assurer la sécurité et la qualité des produits ainsi qu'un accès au marché de l'union européenne.

Les MO-CSM restent aujourd'hui les cellules les mieux caractérisées. Ainsi, le potentiel chondrogénique *in vitro* et *in vivo* des MO-CSM est admis et largement étudié. L'ensemble des études cliniques utilisant les MO-CSM présente un bilan positif montrant une amélioration des symptômes cliniques (douleur et mobilité). Cependant, il apparaît difficile de comparer ces études. Elles ne sont pas homogènes en termes de nombre de cellules implantées, de type de biomatériau utilisé et des temps d'observation (Tableau 3). De plus, seule une étude clinique est réalisée en comparaison à l'implantation autologue de chondrocytes. Cette étude ne montre pas de différence significative des scores cliniques (ICRS et IKDC) entre les patients traités par l'implantation de chondrocytes ou de MO-CSM [244]. Les études cliniques actuellement en cours sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 3 : Etudes cliniques publiées évaluant les cellules stromales multipotentes isolées de la moelle osseuse pour le traitement des lésions cartilagineuses.

Publication et type d'étude	Défaut	Patients	Traitement	Biomatériau	Isolation et culture des MSC	Résultats
Wakitani <i>et al</i> 2004 Etude de cas	Lésion du cartilage totale. Patelle	Femme (31 ans) Homme (48 ans)	Après multiples perforations de l'os sous-chondral, les cellules amplifiées sont implantées sous un lambeau de périoste ($1,4 \times 10^7$ cellules)	Membrane gélifiée de collagène	Adhérence au plastique; 20 jours d'amplification	Entre 7 semaines et 2 mois : Histologie montre un tissu lisse. 6 mois : symptômes cliniques améliorés et ce maintenus pendant 4-5ans. 1-2 ans : arthroscopie et histologie montrent la formation d'un tissu de type fibrocartilagineux. 4-5 ans : augmentation de la capacité motrice (marche et course)
Adachi <i>et al</i> 2005 Etude de cas	Lésion du cartilage totale et atteinte de l'os sous-chondral	Homme (21 ans)	Cellules amplifiées sont implantées en association avec le biomatériau ($1,15 \times 10^6$)	Céramique d'hydroxy-apatite	Adhérence au plastique. 24 jours d'amplification	A 1 an : formation d'un tissu fibrocartilagineux, les symptômes cliniques sont améliorés et maintenus jusqu'à 2 ans
Wakitani <i>et al</i> 2007 Etude de cas	Lésion du cartilage totale Patelle. Lésions : 0,7 à 4,2 cm ²	2 hommes (43 et 45 ans); 1 Femme (32 ans)	Après multiples perforations de l'os sous-chondral, les cellules amplifiées sont implantées sous un lambeau de périoste (5×10^6 cellules/mL)	Gel de collagène de type I	Adhérence au plastique, CD14-, CD34-, HLA-DR-, CD 29+, CD 44+, CD 105+ ; 20 jours d'amplification	A 7 mois : les symptômes cliniques sont améliorés et maintenus de 17 à 27 mois. A 12 mois : arthroscopie et histologie montrent la formation d'un tissu fibrocartilagineux. IRM montre un recouvrement complet du défaut

Tableau 3 (suite) : Etudes cliniques publiées évaluant les cellules stromales multipotentes isolées de la moelle osseuse pour le traitement des lésions cartilagineuses.

Publication et type d'étude	Défaut	Patients	Traitement	Biomatériau	Isolation et culture des MSC	Résultats
Kuroda <i>et al</i> 2007 Etude de cas	Lésion du cartilage totale. Zone portante. Condyle fémoral médian	Homme, athlète (31 ans)	Cellules amplifiées sont implantées sous un lambeau de périoste (5×10^6 cellules/mL)	Gel de collagène de type I	Adhérence au plastique, CD14-, CD34-, HLA-DR-, CD73+, CD 90+, CD105+ ; 20 jours d'amplification	A 7 mois : le défaut est recouvert d'un tissu lisse de type hyalin. A 12 mois : les symptômes cliniques sont améliorés et le niveau d'activité sportif précédent est retrouvé. Irrégularités dans la zone régénérée (MRI)
Haleem <i>et al</i> 2010 Etude de cas	Lésion du cartilage totale. Zone non portante. Lésions de 3 à 12 cm ² . Condyle fémoral	4 hommes ; 1 femme (27 à 37 ans)	Après multiple perforations de l'os sous-chondral, cellules sont amplifiées avant d'être implantées sous un lambeau de périoste (2×10^6 cellules/mL).	Colle de fibrine	Adhérence au plastique. CD73+, CD34- et CD45- ; 10 jours d'amplification	A 12 mois : tous les patients ont une amélioration des symptômes. IRM montre un défaut entièrement comblé, sans discontinuité avec le tissu adjacent
Nejadnik <i>et al</i> 2010 Etude comparative	Lésion du cartilage totale	36 patients traités ACI et 36 patients traités MO-CSM	Cellules amplifiées sont implantées sous un lambeau de périoste (2×10^6 cellules/mL)	Non indiqué	Adhésion au plastique	A 2 ans : l'ensemble des patients ont une amélioration des symptômes cliniques, aucune différence entre les deux traitements

Tableau 4 : Etudes cliniques en cours évaluant les cellules stromales multipotentes isolées de la moelle osseuse (MO-CSM) ou du tissu adipeux (CSA) (www.clinicaltrials.gov).

Phase	Pathologie	Cellules implantées	Nombre de patients estimé	Biomatériau	Investigateur principal et institution	Références
I-II	Gonarthroses de grade II et III	MO-CSM autologue	15	N/A	Robert Soler, MD Institut de Teràpia Regenerativa Tissular	NCT01227694
I-II	Arthrose	MO-CSM allogénique	30	N/A	Javier García-Sancho, MD, PhD University of Valladolid, Scientific Park	NCT01586312
I	Défaut focaux	MO-CSM autologue ou chondrocyte	50	Membrane commerciale	Lars Engebretsen, MD, PhD Oslo University Hospital	NCT00885729
N/A	Défaut focaux et arthrose	MO-CSM autologue	50	Biomatériaux à base de collagène et d'hydroxyapatite	Michel Assor, MD Knee and Lower Limb Institute, Marseille, France	NCT01159899
I-II	Défaut osteochondral	MO-CSM autologue	25	Lambeau de périoste autologue	Abdel Aziz El Singergy, M.D Department of Orthopedic Surgery Cairo University School of Medicine	NCT00891501
II	Arthrose	MO-CSM autologue	50	N/A	Ya Mohammad Hassan Shukur, MD National University of Malaysia	NCT01459640
I	Arthrose	MO-CSM autologue	30	N/A	Domingo Garay Mendoza, MD Hospital Universitario Dr. Jose E. Gonzalez	NCT01485198
I	Arthrose	CSA	18	N/A	Christian Jorgensen, MD University Hospital, Montpellier	NCT01585857
I-II	Arthrose	CSA	500	N/A	Kristin Comella United States	NCT01739504

Deux études cliniques publiées évaluent l'effet de l'implantation des CSA dans un contexte arthrosique [245,246]. Actuellement deux études cliniques sont en cours pour le traitement de défauts focaux (Tableau 4).

Des études cliniques randomisées, avec une importante cohorte de patients devraient nous permettre de conclure sur la pertinence clinique de l'utilisation des CSM en ingénierie tissulaire du cartilage.

Toutefois, ces études mettent en évidence les défis relatifs à l'application clinique des CSM. Ces défis sont principalement liés aux caractéristiques du patient, à l'étape de culture cellulaire ainsi qu'au contrôle de la différenciation chondrogénique.

Caractéristiques du patient

Les caractéristiques du patient peuvent influencer la qualité et la fonctionnalité des CSM [247,248]. L'âge apparaît comme le facteur le plus évident, la détérioration des tissus au cours de la vie serait notamment relative à la diminution de l'efficacité des CSM. En effet, lorsque l'âge augmente, le taux de prolifération des CSM diminue. Ceci peut être dû au raccourcissement des télomères et à une augmentation du nombre de CSM présentant des marqueurs de la sénescence (β -galactosidase, p21, lipofuscine, suppresseur de tumeur TP53...) [249-252]. Cependant, les travaux de recherche sur les iPS ont récemment montré que la sénescence et l'âge relatif des cellules peuvent être réversibles, en induisant l'expression forcée de six facteurs de transcription (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, NANOG et LIN28) dans des cellules fibroblastiques issues d'un donneur âgé de 74 ans [253].

La région anatomique de prélèvement influence également le taux de prolifération des CSM. Par exemple, les CSA issues du tissu adipeux sous-cutané présentent le taux de prolifération le plus élevé [254].

Culture cellulaire

La plupart des protocoles d'études précliniques et cliniques ont une étape d'amplification des CSM *in vitro* avant implantation. L'amplification des CSM présente deux inconvénients majeurs : l'instabilité chromosomique des CSM *in vitro* et l'utilisation de sérum bovin. Cependant, les données relatives aux risques de développement de cancers suite à l'implantation de CSM sont controversées [255-258]. Wakitani *et al* ont montré, par le suivi 41 patients pendant 5 à 137 mois après l'implantation de MO-MSCs en site articulaire, aucune

formation de tumeur [259]. En revanche, la mise en contact des CSM à du sérum bovin *in vitro* peut présenter des risques pour le patient, tels que le transfert de molécules bioactives pouvant induire une réaction immunitaire, le transfert des bactéries, virus ou prions et peut-être des zoonoses [260,261]. De plus, la variabilité entre les lots influence la reproductibilité des résultats, la composition du sérum n'étant ni caractérisée ni standardisée. Comme le sérum apporte les additifs (protéines, cytokines, facteurs de croissance...) indispensables à l'amplification cellulaire, des alternatives au sérum bovin sont développées tels que le sérum humain ou le plasma riche en plaquettes [262,263].

La différenciation chondrogénique des CSM

Le contrôle et/ou le stade de la différenciation chondrogénique des CSM à implanter est primordiale [264]. En effet, *in vitro* et *in vivo*, lors que les MO-CSM sont induites dans la voie chondrogénique, les marqueurs du phénotype chondrogénique, hypertrophique et fibroblastique sont détectés [12,265-268]. Le phénotype hypertrophique est caractéristique de la phase terminale de différenciation des chondrocytes de la plaque de croissance et est également observé dans un tissu cartilagineux arthrosique [10]. Les chondrocytes hypertrophiques, par la sécrétion de la MMP13 et de la phosphatase alcaline en outre, induisent la dégradation et la minéralisation de la MEC. Par conséquent, cette différenciation chondrogénique « anormale » peut conduire à la formation d'une matrice extracellulaire dont les propriétés mécaniques sont inférieures au tissu cartilagineux. Ceci pose la question du devenir, de la stabilité et la fonctionnalité du tissu cartilagineux de réparation à long terme.

La capacité de différenciation hypertrophique des CSM a fait l'objet d'études récentes dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse, l'objectif étant ici de mimer la réparation osseuse de type endochondrale [269-272].

4 Modulation de la différenciation chondrogénique

En ingénierie tissulaire du cartilage, l'utilisation de cellules, chondrocytes ou CSM, nécessite d'assurer l'engagement et la stabilité du phénotype chondrocytaire. Cependant, l'engagement et la stabilité du phénotype chondrocytaire de cellules, chondrocytes ou CSM, semblent nécessaires. En effet, la dérive hypertrophique de ce phénotype conduit à la résorption et la minéralisation de la MEC, rendant compliqué son utilisation. *In vivo*, la stabilité phénotypique à long terme et la fonctionnalité de la MEC formée sont les conditions indispensables à une réparation du cartilage hyalin efficace et durable. La difficulté réside donc dans le fait de trouver le juste équilibre entre promotion de la différenciation chondrogénique et prévention de l'apparition d'un phénotype hypertrophique.

Certains facteurs ont été décrits comme jouant un rôle dans l'induction et/ou le maintien du phénotype chondrocytaire tels que la dimensionnalité des conditions de culture, la tension en oxygène, la composition du milieu de culture ou encore la mise sous contraintes mécaniques. Le développement de bioréacteurs, visant à combiner ces différents paramètres a été considéré avec intérêt. Les bioréacteurs représentent en effet, des systèmes de culture tridimensionnelle dynamiques [273] permettant un contrôle strict et la reproductibilité des conditions de culture (température, pH, tension en oxygène), un ensemencement homogène de biomatériaux par agitation, un renouvellement et une élimination des déchets cellulaires [274]. Les bioréacteurs permettent également l'application de contraintes mécaniques de différentes natures (compression, cisaillement), mimant les conditions physiologiques [275]. Enfin, ils présentent l'avantage de permettre la culture à grande échelle dans des conditions de grade clinique [276].

4.1 Dimensionnalité

Il est bien établi que les cellules résident, prolifèrent et se différencient *in vivo* dans un environnement tridimensionnel complexe.

La culture en trois dimensions constitue un facteur essentiel à la différenciation cellulaire. A titre d'exemple, cultiver les chondrocytes en monocouche conduit à la perte du phénotype, accompagnée par l'apparition d'un phénotype fibroblastique avec une augmentation du collagène de type I. Cependant, ce processus est réversible par un passage en trois dimensions

Tableau 5 : Polymères utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage. D’après Vinatier *et al* [284].

Polymère naturel protéique	Fibrine	[285]
	Fibres de soie	[286]
	Collagène	[287]
Polymère naturel polysaccharidique	Chondroïtine sulfate	[288]
	Acide hyaluronique	[289-291]
	Alginate	[292-294]
	Chitosane et ses dérivées	[295]
	Cellulose	[296,297]
Polymère synthétique	Poly lactic-co-glycolic	[298,299]
	Polyethyleneglycol	[300-302]
	Polyvinyl alcool	[303]

[277,278]. Ces observations soulignent le rôle clé de la culture en trois dimensions dans le maintien et la restauration du phénotype chondrocytaire.

La culture en trois dimensions favorise l'organisation de la MEC avec la synthèse de la matrice péri-cellulaire, riche en collagène de type VI [279]. Cette structure particulière regroupant matrice péri-cellulaire-chondrocyte, appelée chondron, confère aux cellules un microenvironnement crucial pour le développement et le maintien du tissu cartilagineux [280].

Ainsi, les stratégies d'ingénierie tissulaire utilisent la culture en trois dimensions de chondrocytes et de CSM, dans le but d'apporter un microenvironnement favorable aux cellules et de favoriser les interactions cellule-cellule et cellule-matrice.

4.1.1 Biomatériaux

La culture cellulaire en trois dimensions peut être réalisée à l'aide de biomatériaux. La structure de la MEC peut guider les changements morphologiques et l'organisation spatiale des cellules [281]. Par exemple, une MEC dense oriente l'engagement des CSM dans une voie chondrogénique [282,283]. Ces biomatériaux en plus d'apporter un réseau tridimensionnel, laissent diffuser les molécules d'oxygène et les nutriments propices à la modulation de la différenciation chondrogénique.

En ingénierie tissulaire, les biomatériaux développés sont à base de polymères naturels ou synthétiques (tableau 5). Les polymères naturels peuvent moduler la différenciation chondrogénique en interagissant soit avec les récepteurs à la surface cellulaire tel que le CD44, soit avec les facteurs morphogéniques, pouvant ainsi potentialiser leurs actions. Quant à eux, les polymères synthétiques n'offrent que peu ou pas d'interactions avec la cellule. De nombreux travaux portent sur la fonctionnalisation de ces polymères synthétiques afin d'apporter un microenvironnement favorable à la différenciation chondrogénique des cellules encapsulées [152].

De nombreux biomatériaux à base de polymères naturels d'acide hyaluronique (AH) sont développés pour une application en ingénierie tissulaire du cartilage [289-291,304,305]. L'AH est un GAG naturel présent dans la MEC cartilagineuse. Il se fixe à la membrane cellulaire *via* son récepteur CD44. L'interaction CD44-AH est indispensable au cours des phases précoces de la chondrogenèse. La modification de cette interaction induit un retard de

condensation des cellules mésenchymateuses et par conséquent une diminution de la synthèse du collagène de type II et de l'agrécan [306]. De plus, l'interaction CD44-AH a un rôle clé dans la mise en place et le maintien de la matrice péri-cellulaire du chondrocyte, par la rétention et la fixation d'agrégats de PG à la membrane cellulaire [307-309]. Par conséquent, les biomatériaux à base de polymère d'AH, en favorisant les interactions cellule-matrice, contribuent à la différenciation chondrogénique et au maintien de ce phénotype. En clinique humaine, Hyalograft-C[®] (Glycosan, Bedford, MA) biomatériau à base d'AH, est utilisé en association avec des chondrocytes autologues, pour traiter les lésions du cartilage articulaire. Par ailleurs, ces biomatériaux à base d'AH favorisent également la différenciation chondrogénique des CSM *in vitro* [310] ainsi que la formation d'un tissu de réparation cartilagineux après implantation en association avec des CSM au niveau de défauts ostéochondraux chez le lapin [311].

Le chondroïtine sulfate (CS) est un polymère naturel, constituant de la MEC cartilagineuse, également étudié en ingénierie tissulaire. Contrairement à l'AH, le CS est un GAG sulfaté. Les GAG sulfatés créent un microenvironnement à la périphérie des cellules en interagissant avec les facteurs de croissance. Ils permettent ainsi de moduler la biodisponibilité des facteurs de croissance, de les protéger contre la dégradation protéasique ainsi que de stabiliser leur interaction avec leur récepteur [312]. La bio-fonctionnalité des facteurs de croissance est essentielle pour induire de façon optimale la différenciation chondrogénique de CSM. Ainsi, les biomatériaux à base de CS favorisent le maintien du phénotype des chondrocytes et potentialisent la différenciation chondrogénique de CSM en présence de milieu d'induction [288,313]. De façon intéressante, au sein de biomatériaux à base de CS, la sécrétion de collagène de type X par les CSM, semble être diminuée. Le phénotype chondrogénique des CSM semble être stabilisé [314]. Ceci suggère que ces biomatériaux favorisent la formation d'une MEC de type hyalin.

La fonctionnalisation des polymères synthétiques permet de favoriser les interactions des cellules avec leur environnement. Le peptide mimétique du collagène (CMP) crée des interactions physiques entre les fibres de collagènes. Ces interactions permettent de concentrer à la périphérie des cellules encapsulées, les collagènes nouvellement synthétisés [315,316]. Ainsi, Lee *et al*, montrent que des chondrocytes encapsulés au sein d'un hydrogel de polyéthylenglycol-CMP produisent une MEC plus abondante et plus riche en GAGs et

collagènes que des chondrocytes encapsulés dans un hydrogel de PEG non fonctionnalisé [317].

L'augmentation de charges négatives à la surface d'un hydrogel à base de polymère synthétique favorise la forme sphérique des cellules et stimule l'expression et l'accumulation du collagène de type II et d'agrécan dans la MEC [318].

4.1.2 Condensation cellulaire

La seconde stratégie pour cultiver des cellules en trois dimensions, n'utilise pas de biomatériaux. Les cellules sont placées dans un environnement tridimensionnel en forçant leur agrégation pour favoriser les interactions cellule-cellule. Il s'agit de la culture en micromasses [319,320], pellets [321,322] ou gouttes suspendues (hanging drop) [323]. Ce mode de culture a pour but de mimer l'étape de condensation cellulaire se déroulant dans les phases précoces de la chondrogenèse *in vivo*. Les molécules d'adhésion, telles que les cadhérines, immunoglobulines et sélectines sont impliquées dans la médiation du signal intracellulaire suite aux interactions entre les cellules. Dans les chondrocytes, la plus étudiée est la N-cadhérine, c'est une glycoprotéine dont la liaison est homophile et calcium dépendante. Après fixation du calcium, la partie extracellulaire N-terminale de la N-cadhérine change de conformation et se lie avec une autre N-cadhérine. La partie intracellulaire, liant les complexes β , γ caténines, transmet un signal par modification du cytosquelette d'actine ainsi que l'activation de nombreuses voies de signalisation, dont la voie WNT fortement impliquée dans la chondrogenèse [324,325].

4.2 Tension en oxygène

La réponse aux variations de la tension en oxygène est une fonction basique des organismes. La tension en oxygène physiologique est significativement inférieure à la tension en oxygène ambiante et n'est pas homogène au sein de l'organisme [326,327]. Une fois captées par les protéines héminiques, les molécules d'oxygène sont transportées dans l'organisme par les globules rouges et diffusent du vaisseau sanguin vers le tissu. La diffusion des molécules d'oxygène crée un gradient en oxygène. Ce gradient est essentiel au cours de l'embryogenèse, dans le maintien de la pluripotence des cellules souches ainsi que dans les processus de cicatrisation [328]. Considérant l'oxygène en tant que molécule essentielle à la vie, les organismes ont su s'adapter en développant des systèmes de régulation entre hypoxie et

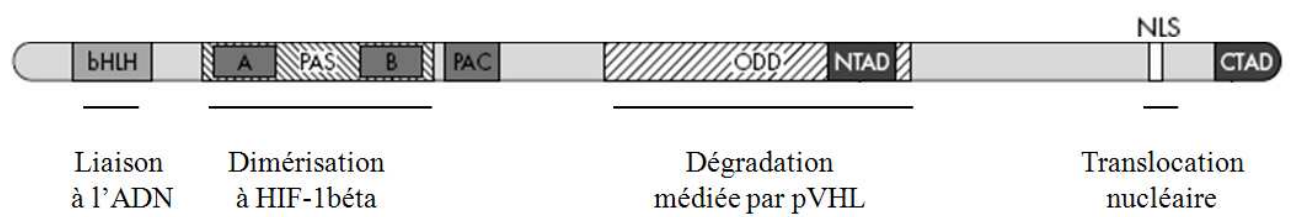


Figure 10 : Schéma de la structure protéique de HIF-alpha : zones et principales fonctions.
D'après Gaber *et al* [343].

hyperoxie [329]. Les principaux médiateurs intracellulaires activés en réponse à une diminution de la tension en oxygène sont les facteurs de transcription HIF. Les HIF sont présents dans toutes les cellules de mammifère et leur séquence est hautement conservée, ce qui témoigne de leur importance.

Au cours de la chondrogenèse et au sein du cartilage articulaire, le gradient de la tension en oxygène régule le métabolisme énergétique, la survie ainsi que le phénotype cellulaire.

4.2.1 Facteurs de transcription HIF 1 et HIF 2

4.2.1.1 Structure

Le facteur de transcription HIF est un complexe hétérodimère constitué de deux sous-unités : HIF alpha, sous-unité régulatrice et HIF bêta, sous-unité constitutive. Ces deux sous-unités font partie de la famille bHLH/PAS, par le domaine en N-terminal essentiel pour la liaison à l'ADN (bHLH [*basic Helix loop Helix*]) ainsi que le domaine de dimérisation (PAS [*Per-Arnt-Sim*]). Les HIF alpha sont au nombre de trois HIF-1alpha, HIF-2alpha et HIF-3alpha, codés par trois gènes situés sur des loci différents. Parmi les sous-unités alpha, HIF-1alpha et HIF-2alpha (aussi nommé EPAS-1) sont les plus étudiés. La sous-unité bêta est également appelée Aryl-hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT) [330]. Il existe également trois isoformes de la sous-unité bêta (HIF-1bêta, HIF-2bêta et HIF-3bêta) codés par trois gènes indépendants [331]. La sous-unité HIF-1bêta est impliquée dans la réponse aux xénobiotiques, par liaison au récepteur intracellulaire AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) [332]. L'ensemble des sous-unités alpha peut se lier à l'ensemble des sous-unités bêta mais avec des affinités différentes [134].

- Structure des sous-unités HIF-1alpha et HIF-2alpha

Le gène *HIF1A* est localisé dans la région 14q21-q24 et comporte 15 exons. La protéine HIF-1alpha qui en résulte est composée de 826 acides aminés [333].

Le gène *HIF2A* est présent sur le locus 2p21-p16 et est constitué de 16 exons. La protéine qui en résulte, HIF-2alpha comporte 874 acides aminés.

Les protéines HIF-1alpha et HIF-2alpha ont une homologie de séquence de 48% [334]. Elles ont en commun les domaines suivants (Figure 10) :

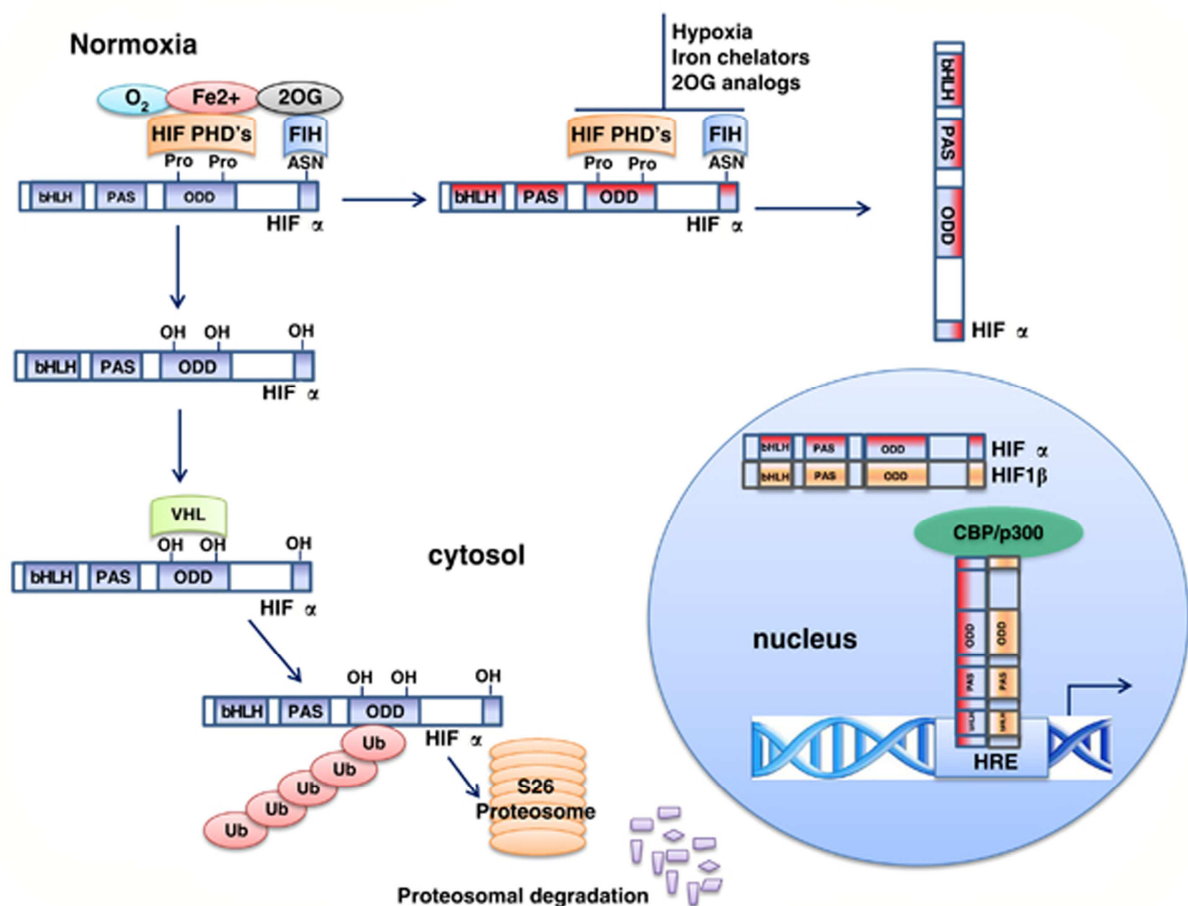


Figure 11 : Régulation par l'oxygène de la stabilité et de l'activité transcriptionnelle de HIF. Modifiée d'après Karuppagounder *et al* [354]

- bHLH (*basic Helix loop Helix*) situé dans la région N-terminale; domaine indispensable à la liaison à l'ADN et qui participe également à la stabilisation de la liaison avec HIF-1bêta [335-337].
- PAS (*Per Arnt Sim*) : domaine nécessaire à la liaison à HIF-1bêta [335]. Ce domaine est séparé en deux : PAS A (HIF-1alpha : AA 106-156) et PAS B (HIF-1alpha : AA 249-299).
- PAC (PAS Associated C-terminal domain) : domaine ayant un rôle dans la dimérisation avec HIF-1bêta et dans la liaison à l'ADN [337].
- ODD (Oxygen-Dependant Degradation Domain) : domaine responsable de la dégradation de la protéine en normoxie [338]. Ce domaine contient une séquence PEST (riche en Proline (P), Acide Glutamique (E), Sérine (S) et Thréonine (T)), séquence commune aux protéines instables et rapidement dégradée [333].
- Deux domaines de transactivation en C-terminal (TAD) : un situé dans la région N-Terminale (N-TAD), l'autre situé dans la région C-Terminale (C-TAD). Le domaine C-TAD contient également deux séquences PEST [339].
- NLS (Nuclear Localization Signals) présent dans la région C-terminale [340].

Les différences de structures entre HIF-1alpha et HIF-2alpha résident principalement dans la partie N-TAD. Le domaine N-TAD contribue à la liaison des facteurs de transcription HIF au promoteur [341,342].

4.2.1.2 Mode d'action

Lorsque la sous-unité HIF-alpha est stabilisée dans le cytoplasme, elle transloque dans le noyau grâce à la séquence NLS. Au sein du noyau, une sous-unité HIF-alpha se dimérise avec une sous-unité HIF-bêta pour constituer un hétérodimère HIF. La formation de l'hétérodimère transactive spécifiquement les gènes dont le promoteur comporte la séquence « Hypoxia Response Element » (HRE : 5'RCGTG3') [344]. Au niveau nucléaire, l'activité transcriptionnelle des HIF est régulée par leur liaison à des co-facteurs (Figure 11).

Le complexe CBP/p300 (CREB binding protein/p300) se fixe au domaine CAD de la sous-unité HIF-alpha et stabilise HIF [345]. Cette interaction est indispensable pour l'activité transcriptionnelle de HIF [346]. Un régulateur négatif de l'activité de HIF, CITED2

Tableau 6 : Les effecteurs et leurs effets sur la régulation de l'expression et l'activité transcriptionnelle de HIF1 et de HIF2.

Régulation		Effecteurs	Effets	Références
Expression des gènes HIF-1 et EPAS1		NFκB	Augmentation de l’expression	[355]
		Erg1	Augmentation de l’expression	[356]
Post-transcription		miR-17-19 / miR199a	Inhibe la traduction de l’ARNm	[357,358]
		aHIF	Inhibe la traduction de l’ARNm	[359,360]
Post- traduction	Hydroxylation	PHD	Induit la reconnaissance de HIF-alpha par pVHL/ubiquitine ligase E3	[361-363]
		FIH	Inhibe la liaison la liaison à l’ADN	[364-366]
	Acétylation	ARD1	Favorise la reconnaissance de HIF alpha par pVHL/ubiquitine ligase E3	[367]
		SSAT2	Favorise la reconnaissance de HIF alpha par pVHL/ubiquitine ligase E3	[368]
	Phosphorylation	SIRT1	Stimule l’activité transcriptionnelle de HIF alpha	[369,370]
		MAPK	Induit la stabilisation de HIF alpha et son activité transcriptionnelle	[371,372]
		Pi3K		
	Ubiquitine	HAF	(i) Induit la polyubiquitinylation de HIF-1alpha, indépendamment de la voie pVHL (ii) Favorise la stabilisation de HIF-2alpha et augmente son activité transcriptionnelle	[373]
		Hsp70/CHIP	Induit la dégradation par le protéasome de HIF-1alpha, pas HIF-2alpha	[374,375]
Activité transcriptionnelle		complexe CBP/p300	Se fixe au domaine CAD de HIF-alpha Cette interaction est indispensable pour l’activité transcriptionnelle de HIF	[345]
		CITED2	CITED2 agit en se liant à p300. Cette liaison inhibe l’interaction entre p300 et HIF-alpha	[347]
		SRC-1 et TIF2	Stimule l’activité transcriptionnelle de HIF	[350]
		HSP90	En se liant au domain PAS-A, HSP90 inhibe la dégradation des HIF alpha par le protéasome.	[351]
		RACK1	En se liant au domain PAS-A, RACK1 induit la dégradation des HIF alpha par le protéasome.	[376]

(CBP/p300-interacting transactivators with glutamic acid (E) and aspartic acid (D)-rich tail 2) agit en se liant à p300. Cette liaison inhibe l'interaction entre p300 et la sous-unité HIF- α [347]. De façon intéressante, l'expression de CITED2 est induite en hypoxie par l'action de HIF [348,349]. Ceci suggère une boucle de régulation négative de l'action des HIF.

De plus, deux co-activateurs ayant une activité histone acétylase et appartenant à la famille des p160/SRC-1 ont été décrits : SRC-1 et TIF2 [350].

La stabilité du complexe HIF peut être également régulée par la protéine HSP90 (Heat-Shock Protein 90) et RACK1 (Receptor of Activated Protein Kinase C) en condition normoxique [351].

Les formes tronquées de HIF-1 α dues à un épissage alternatif du transcrit n'ont pas d'activité transcriptionnelle mais participent à la régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 [352,353].

4.2.1.3 Régulation

La régulation des sous-unités HIF-1 α et HIF-2 α en condition hypoxique a lieu principalement au niveau de la stabilité protéique, néanmoins de récentes données montrent également un rôle non négligeable de la régulation transcriptionnelle et traductionnelle. Les principaux effecteurs négatifs et positifs sont résumés dans le tableau 6.

Régulation de l'expression de HIF-1 α et HIF-2 α

Bien que l'expression des gènes *HIF1A* et *HIF2A* soit constitutive (dépendante de Sp1 [377]), leur niveau d'expression varie en fonction du type cellulaire et du type de stimuli. La présence d'une séquence HRE sur le promoteur du gène *HIF1A* et *HIF2A* suggère un mécanisme d'auto-rétrocontrôle [378]. Par ailleurs, NF- κ B et Egr1, en réponse à un stress oxydatif ou hypoxique respectivement, augmentent le niveau d'expression de *HIF1A* [355,356].

Régulation post-transcriptionnelle

La dégradation des HIF peut être médiée par un ARN antisens naturel (aHIF), qui entraîne la dégradation des ARNm de HIF -1 α mais pas HIF-2 α . Le promoteur de aHIF possède plusieurs séquences HRE. Son expression est ainsi induite par les facteurs de transcription

HIF-1 et HIF-2. Ainsi aHIF participe à un mécanisme de rétrocontrôle négatif des HIF-1alpha en condition d'hypoxie prolongée [359,360].

La dégradation des transcrits de HIF-1alpha est également médiée par deux miRNA décrits, miR-17-19 et miR-199a [357,358].

Modification post-traductionnelle :

Hydroxylation

La stabilité des protéines HIF-alpha est dépendante de leur degré d'hydroxylation. L'hydroxylation est principalement médiée par les deux types d'hydroxylase : les membres de la famille des PHD (Prolyl Hydroxylases) ainsi que des FIH (Factor Inhibiting HIF).

Les PHD de type 1, 2 ou 3 sont capables d'hydroxyler deux résidus proline hautement conservés (P402/P564 pour HIF-1alpha ; P405/P531 pour HIF-2alpha) et situés dans le domaine ODD [361-363]. L'activité des PHD requiert la présence de cofacteurs que sont l'oxygène, le fer (Fe^{2+}), le 2-oxoglutarate et l'ascorbate [379,380]. Le taux de renouvellement des PHD et leur capacité à hydroxyler des sous-unités HIF-alpha n'est pas un élément limitant dans l'induction de la dégradation des HIF alpha [381]. Il est également intéressant de noter que les PHD n'ont pas la même affinité pour HIF-1alpha ou HIF-2alpha. Dans différents modèles de lignées cellulaires humaines, PHD2 semble cibler HIF-1alpha préférentiellement alors que PHD3 ciblerait HIF-2alpha [382]. L'hydroxylation de ces résidus induit l'interaction des sous-unités alpha avec la pVHL (Von-Hippel Lindau protein). La pVHL est reconnue par la E3 ligase. Les sous-unités alpha sont ensuite dirigées vers le protéasome après poly-ubiquitination [383].

L'hydroxylation, par l'asparagyl-hydroxylase FIH, d'un résidu asparagine (N803 pour HIF-1alpha ; N847 pour HIF-2alpha) situé dans le domaine CAD, inhibe la liaison de HIF alpha à ses co-activateurs (le complexe CBP/p300 et le complexe p160/SCR-1) nécessaire pour la liaison à l'ADN [364-366,384]. Comme pour les hydroxylases PHD, FIH requiert la présence de co-facteurs tels que Fe^{2+} , 2-oxoglutarate et ascorbate. FIH semble hydroxyler l'asparagine située sur HIF-2alpha avec une meilleure efficacité que l'asparagine située sur HIF-1alpha [385]. De plus, FIH semble avoir une meilleure affinité *in vitro* pour les molécules d'oxygène que les PHD [385]. Par conséquent, lorsque la tension en oxygène diminue, les PHD sont les premières enzymes à être inhibées.

L'hydroxylation des résidus S551, T552, L562, Y565 sur HIF-1alpha semble également avoir un rôle dans sa stabilité [361,362,386,387]. En revanche aucune autre hydroxylation n'a été décrite pour HIF-2alpha.

Acétylation/Déacétylation

La reconnaissance des HIF alpha par le pVHL est également facilitée par l'acétylation d'un résidu lysine (K523 pour HIF-1alpha ; non défini pour HIF-2alpha) situé dans le domaine ODD [367]. Les enzymes responsables de cette modification peuvent être ARD1 (arrest-defective 1) ou SSAT2 (Spermidine/Spermine N-acetyltransferase-2) [368].

La stabilisation des protéines HIF-alpha est également modulée par les sirtuines, classe d'enzymes desacétylase d'histone NAD-dépendantes : SIRT1. Leur expression est induite spécifiquement par HIF-2alpha [388]. L'acétylation par SIRT1 de HIF-1alpha [370] et HIF-2alpha [369] stimule leur activité transcriptionnelle en condition hypoxique.

Phosphorylation

La phosphorylation de HIF-1alpha par les MAPK stabilise la protéine et favorise son activité transcriptionnelle [389]. Plusieurs stimuli, dont l'hypoxie, peuvent activer les MAPK (ERK 1/2) et PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase). La MAPK p42/44 phosphoryle HIF-1alpha (deux résidus sérine : S641/S643) et HIF-2alpha (résidu non défini) [371,372]. ERK 1/2 et JNK peuvent également ajouter un phosphate sur HIF-alpha [390].

Plusieurs travaux rapportent également une régulation épigénétique, et par SUMOylation, par S-nitrosylation et neddylation mais qui ne seront pas développée ici [391-397].

Ubiquitine ligase : différences de régulation des sous-unités HIF alpha

Indépendamment de la voie pVHL, deux ubiquitines ligases ont récemment été identifiées comme des régulateurs spécifiques de la stabilisation protéique de HIF-1alpha ou HIF-2alpha : HAF et CHIP.

HAF (Hypoxia-associated-factor) est un modulateur spécifique de l'efficacité transcriptionnelle des HIF-alpha. HAF entraîne la dégradation de HIF-1alpha par poly-ubiquitination et ce indépendamment de la voie pVHL [373]. HAF peut également se lier à HIF-2alpha, sur un site différent du site de la fixation à HIF-1alpha. A l'inverse, HAF favorise la stabilisation de HIF-2alpha et augmente son activité transcriptionnelle [398]. De façon très intéressante, l'expression de HAF diminue en conditions d'hypoxie aiguë et augmente en conditions

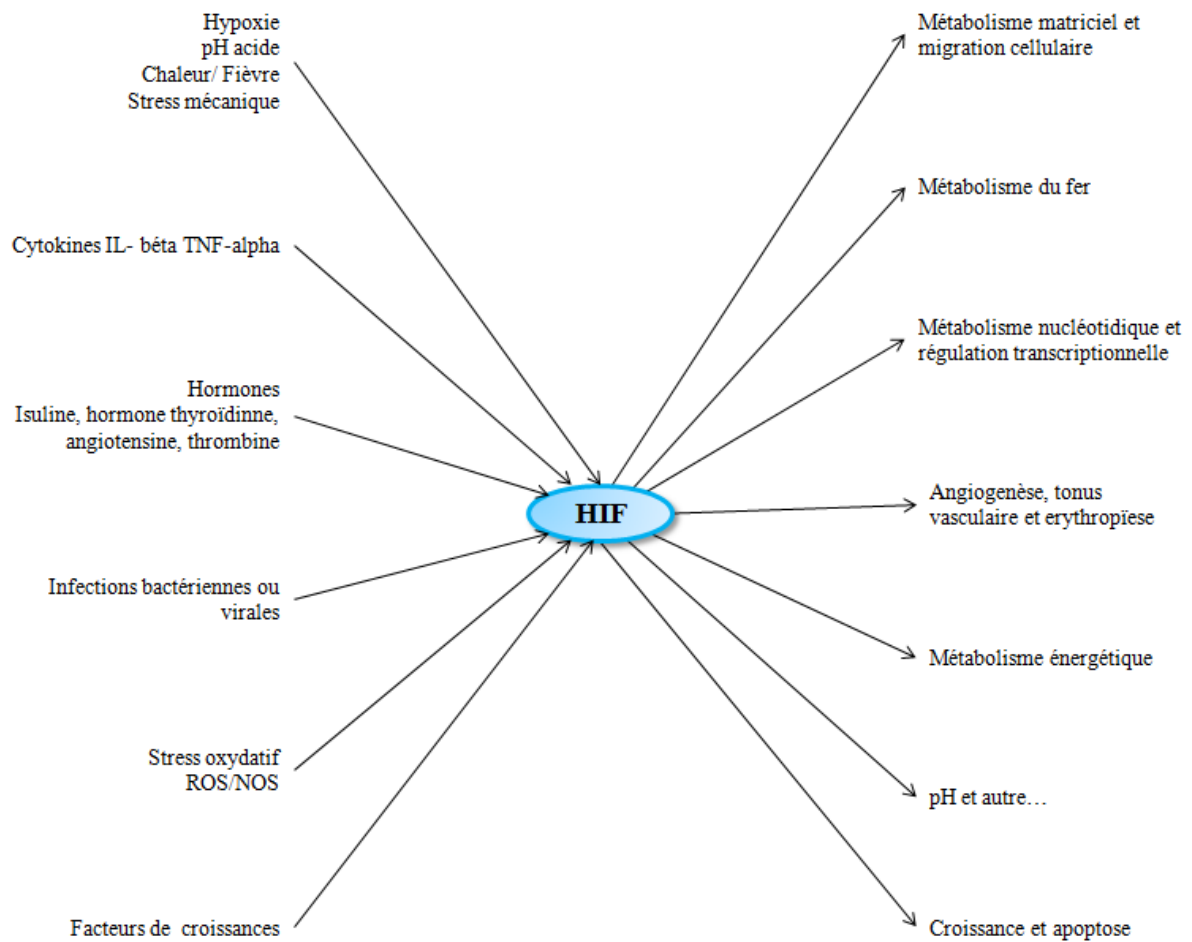


Figure 12 : Stimuli modulant l'activation des HIF ainsi que les fonctions directement régulées par HIF. D'après Gaber *et al* [343].

d'hypoxie prolongée. Ainsi, ces données proposent un modèle permettant d'expliquer le passage de HIF-1alpha vers HIF-2alpha en condition d'hypoxie prolongée.

Le complexe Hsp70/CHIP (Heat-shock protein 70/ carboxyl terminus of Hsp70-Interacting Protein) en condition d'hypoxie prolongée favorise la dégradation par le protéasome de HIF-1alpha mais pas de HIF-2alpha [374,375].

4.2.1.4 La sous-unité HIF-3alpha

Aujourd'hui, nos connaissances sur HIF-3alpha sont encore incomplètes mais il semblerait que HIF-3alpha agisse comme un régulateur négatif de la transcription des gènes cibles de HIF-1alpha et HIF-2alpha [399]. HIF-3alpha a une structure similaire à HIF-1alpha et HIF-2alpha. La différence majeure est l'absence du domaine C-TAD [400]. Le locus d'expression de HIF-3alpha est soumis à de nombreux épissages alternatifs [401]. Parmi les variantes, la protéine tronquée la plus décrite est IPAS (inhibitory domain PAS protein) chez la souris [402] ou HIF3alpha2 chez l'homme [403,404]. Cette protéine ne possède pas de séquence de transactivation mais peut se lier à HIF-1bêta. Ainsi IPAS/HIF3a2 est en compétition avec HIF-1alpha et HIF-2alpha pour la liaison à HIF-1bêta. De façon intéressante, Makino *et al* ont montré que le complexe HIF-1 peut se lier au promoteur de IPAS et induire son expression [399]. Ceci met en évidence la présence d'un mécanisme de rétrocontrôle négatif de la voie des HIF alpha.

4.2.1.5 Les facteurs de régulation

La tension en oxygène est l'effecteur principal de régulation des HIF. La demi-vie des sous-unités alpha est très courte en condition normoxique, inférieure à 5 minutes [405,406]. Malgré leur haute homologie de séquence et de structure, l'activation de HIF-1alpha et HIF-2alpha s'effectue avec une sensibilité différente. HIF-1alpha est actif pendant de courtes périodes (2 à 24h) et stimulé en condition d'hypoxie sévère ou anoxie (<0.1% O₂) alors que HIF-2alpha est actif après 48-72 heures et à des tensions en oxygène avoisinant les 5% [407].

Cependant, d'autres facteurs tels que les hormones, les phospholipides, certains facteurs de croissance, certaines cytokines (IL-1bêta, TNF-alpha), le pH, la concentration en calcium/calcineurine, en ions ferreux, en ascorbate... modulent aussi l'expression, la stabilité ou l'activité du complexe HIF en situation de normoxie [343] (Figure 12).

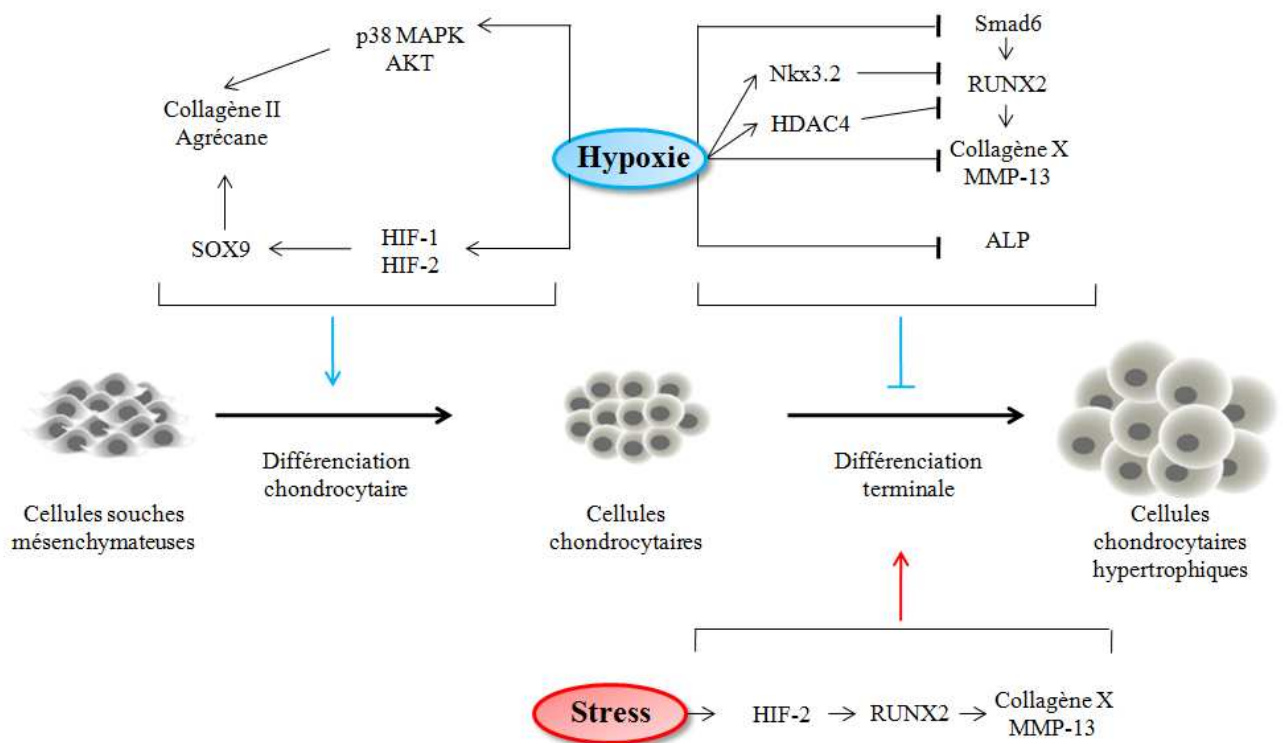


Figure 13 : Représentation schématique de la modulation de la différenciation chondrogénique par l’hypoxie et les facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2.

4.2.2 Tension en oxygène : modulateur de la différenciation chondrogénique

L'hypoxie assure le maintien du phénotype chondrocytaire *in vitro* [408-412]. Des données en ce sens ont permis de constater que la culture en hypoxie de chondrocytes articulaires favorise la production d'agrécan, de collagène de type II, *via* la stimulation de l'expression de SOX9 [21], tout en diminuant l'expression des marqueurs de la dédifférenciation tels que les collagènes de type I et III [413]. L'hypoxie favorise l'expression de SOX9 par la fixation de HIF-1 et HIF-2 sur son promoteur [414,415] (Figure 13).

Une faible tension en oxygène favorise la maturation de la MEC cartilagineuse [416]. Plusieurs études montrent que l'hypoxie augmente le taux de synthèse des collagènes *in vitro* et *in vivo* [417,418,419] et au sein de la plaque de croissance [131]. L'hydroxylation des prolines sur les chaînes de pro-collagène, par l'action des collagen prolyl-4-hydroxylases I et II (C-P4HaI et C-P4HaII), est essentielle à l'organisation en triple hélice des fibres de collagène. Les hydroxylases C-P4HaI et C-P4HaII ont pour cofacteur l'oxygène, mais sont néanmoins capables de fonctionner à des taux d'oxygène faibles [420]. De plus, l'expression des ARNm codant pour les sous-unités alpha de C-P4HaI et C-P4HaII est augmentée en condition hypoxique *via* le facteur de transcription HIF-1, non HIF-2 [421,422].

Les effets d'une faible tension en oxygène sur le phénotype chondrogénique de CSM ont également été décrits. En effet, l'amplification de CSM en condition hypoxique stimule leur engagement dans la voie chondrogénique. Ces conditions de culture miment l'environnement hypoxique auquel les cellules mésenchymateuses sont soumises dans les phases précoces de la chondrogenèse [423,424]. De même, la culture de CSM en présence d'une faible tension en oxygène favorise leur différenciation chondrogénique [425,426-429]. Cependant, peu d'études se sont intéressées aux mécanismes impliqués dans la différenciation chondrogénique des CSM en condition hypoxique. Kanichai *et al* et Robin *et al* ont montré une augmentation de l'expression de SOX9 en condition hypoxique dépendante du facteur de transcription HIF-1alpha. Dans ces conditions, les voies de signalisation p38MAPK et AKT sont stimulées [415,430]. Par ailleurs, Hirao *et al* ont observé que la stimulation de la différenciation chondrogénique en condition hypoxique est également médiée par p38MAPK mais indépendamment de SOX9 [431]. Pour finir, Duval *et al* ont montré que la stimulation de l'expression de HIF-1alpha dans des MO-CSM *in vitro*, prévient la formation d'une matrice minéralisée après implantation en site sous-cutané chez la souris nude [432].

Par ailleurs, la culture en condition hypoxique de chondrocytes et de CSM induites dans la voie chondrogénique prévient leur différenciation hypertrophique. Ce processus implique une diminution de l'expression de RUNX2 médiée par une induction de HDAC4, oxygène-dépendante [108], une répression de Smad6 [431] et l'induction de l'activité transcriptionnelle de Nkx3.2 [433,434] (Figure 13). Le mécanisme de transition d'un phénotype chondrocytaire vers un phénotype hypertrophique semble être corrélé à une commutation de l'activité de transcription de HIF-1 vers HIF-2 [435]. En effet, il a été démontré que HIF-2 est hautement exprimé dans les chondrocytes hypertrophiques [436] et certainement impliqué dans les processus cataboliques liés à l'arthrose. Au sein des chondrocytes hypertrophiques et arthrosiques, HIF-2 induit l'expression du collagène de type X, de la MMP-13 et du VEGF en se fixant directement à leur promoteur. Cependant, l'activation de HIF-2alpha semble être majoritairement induite par les facteurs de stress, tel que l'inflammation [134,437] (Figure 13).

L'hypoxie semble donc clé moduler la différenciation chondrogénique. Cette considération a fait l'objet d'un article publié dans l'*American Journal of Physiology-Physiopathology*, où nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux effets de la tension en oxygène sur la différenciation ostéochondrogénique de CSA.

ARTICLE I : “Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells”

-American Journal of Physiology-Cell Physiology-

Les cellules isolées de la fraction stromale du tissu adipeux humain (CSA) sont une source cellulaire autologue prometteuse pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. La différenciation chondrogénique des CSA peut être induite par un milieu de culture inducteur et un environnement tridimensionnel. Etant donné que l'os est vascularisé et que le cartilage ne l'est pas, la tension en oxygène a été suggérée comme pouvant être un régulateur de la différenciation ostéochondrogénique. Cette étude s'est attachée à définir les effets de la tension en oxygène sur le potentiel ostéochondrogénique des CSA. Pour cela, les CSA ont été cultivées en présence de milieu ostéogénique ou chondrogénique pendant 28 jours, en monocouche ou au sein d'un environnement tridimensionnel « pellet » sous des tensions en oxygène de 5 ou 20%. Leur différenciation a été évaluée par RT-PCR en temps réel (collagène de type II, agrécane, Runx2 et ostéocalcine). La différenciation chondrogénique a été examinée par coloration au bleu alcian et immunomarquage afin de mettre en évidence la présence respective de glycosaminoglycanes sulfatés et de collagène de type II. La différenciation ostéogénique a également été évaluée par coloration des dépôts calciques au rouge alizarine et par mesure de l'activité de la phosphatase alcaline.

Lorsque les CSA sont exposées à une faible tension en oxygène en présence de milieu chondrogénique, l'expression des marqueurs chondrogéniques est augmentée. Au contraire, les expressions de Runx2 et de l'ostéocalcine, la minéralisation de la matrice ainsi que l'activité de la phosphatase alcaline sont diminuées de manière drastique en condition hypoxique et ce malgré leur culture en présence de milieu ostéogénique.

Nos résultats suggèrent fortement que l'hypoxie favorise la différenciation chondrogénique des CSA, tandis qu'elle semble altérer leur potentiel ostéogénique. Ainsi, nos données mettent en évidence le rôle régulateur de la tension en oxygène dans les processus de différenciation chondrogénique et ostéogénique des CSA.

Ces données pourraient nous permettre d'exploiter le potentiel des CSM en ingénierie tissulaire afin de remplacer ou de restaurer la fonction des tissus ostéo-articulaires.

ARTICLE I

Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells

Christophe MERCERON, Claire VINATIER, Sophie PORTRON, Martial MASSON, Jérôme AMIAUD, Lydie GUIGAND, Yan CHEREL, Pierre WEISS, Jérôme GUICHEUX

- AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-CELL PHYSIOLOGY - 2010

Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells

Christophe Merceron,^{1,2} Claire Vinatier,^{1,2,4} Sophie Portron,¹ Martial Masson,^{1,2} Jérôme Amiaud,³ Lydie Guigand,³ Yan Chérel,³ Pierre Weiss,^{1,2} and Jérôme Guicheux^{1,2}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U791, Laboratoire d'ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire, Group "Physiopathology of Skeletal Tissues and Cartilage Engineering," ²Université de Nantes, UFR Odontologie, and ³Ecole Nationale Vétérinaire, Institut National de la Recherche Agronomique UMR 703, Nantes; and ⁴Graftys SA, Aix en Provence, France

Submitted 2 September 2009; accepted in final form 11 November 2009

Merceron C, Vinatier C, Portron S, Masson M, Amiaud J, Guigand L, Chérel Y, Weiss P, Guicheux J. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C355–C364, 2010. First published November 25, 2009; doi:10.1152/ajpcell.00398.2009.— Human adipose tissue-derived stem cells (hATSC) have been contemplated as reparative cells for cartilage engineering. Chondrogenic differentiation of hATSC can be induced by an enriched culture medium and a three-dimensional environment. Given that bone is vascularized and cartilage is not, oxygen tension has been suggested as a regulatory factor for osteochondrogenic differentiation. Our work aimed at determining whether hypoxia affects the osteochondrogenic potential of hATSC. hATSC were cultured in chondrogenic or osteogenic medium for 28 days, in pellets or monolayers, and under 5% or 20% oxygen tension. Cell differentiation was monitored by real-time PCR (COL2A1, aggrecan, Runx2, and osteocalcin). The chondrogenic differentiation was further evaluated by Alcian blue and immunohistological staining for glycosaminoglycans (GAGs) and type II collagen, respectively. Osteogenic differentiation was also assessed by the staining of mineralized matrix (Alizarin Red) and measurement of alkaline phosphatase (ALP) activity. The expression of chondrogenic markers was upregulated when hATSC were exposed to hypoxia in chondrogenic medium. Conversely, osteocalcin expression, mineralization, and ALP activity were severely reduced under hypoxic conditions even in the presence of osteogenic medium. Our data strongly suggest that hypoxia favors the chondrogenic differentiation of hATSC as evidenced by the expression of the chondrogenic markers, whereas it could alter their osteogenic potential. Our results highlight the differential regulatory role of hypoxia on the chondrogenic and osteogenic differentiation processes of hATSC. These data could help us exploit the potential of tissue engineering and stem cells to replace or restore the function of osteoarticular tissues.

adipose tissue-derived stem cells; osteochondrogenesis

CARTILAGE IS A HIGHLY SPECIALIZED tissue that surrounds the ends of long bones. It is composed of a unique cell type, the chondrocyte, that is responsible for the synthesis of an abundant extracellular matrix essentially composed of type II, IX, and XI collagens and proteoglycans (1, 2). Because of the avascular nature of cartilage, chondrocytes are continuously exposed to a hypoxic environment with an oxygen level ranging from 2% to 7% (34).

Articular cartilage is frequently damaged through aging, trauma, and degenerative diseases. These impairments often

result in further extracellular matrix degradation and ultimately in the loss of joint function. The absence of vasculature prevents reparative cells from penetrating the tissue and maintaining its integrity. As a result, damaged articular cartilage demonstrates limited capacity for spontaneous repair. Thus the repair of damaged cartilage remains a clinical challenge. To address this issue, cell-based therapies and tissue engineering have become subjects of particular interest. Consequently, increasing attention is being leveled at the development of cell-based therapies for articular cartilage repair.

Mesenchymal stem cells (MSC) have recently been considered as potential reparative cells for articular cartilage repair. MSC have been historically identified in bone marrow (5, 18, 29) and subsequently isolated from various other tissues such as adipose tissue and synovial membrane (6, 10, 16). Adipose tissue is abundant in the organism and easy to harvest (9, 43, 44). Moreover, human adipose tissue-derived stem cells (hATSC) have demonstrated their ability to differentiate toward the adipogenic, myogenic, osteogenic, and chondrogenic lineages (7, 35, 41). hATSC express typical cell surface markers such as CD29, CD44, CD90, and CD105 and lack CD34 and CD45 (8). The chondrogenic differentiation of hATSC is thought to mimic the chondrogenesis occurring in the growth plate during the endochondral ossification process (28). During this process, MSC aggregate and differentiate into chondrocytes that synthesize a hyaline matrix, serving as a scaffold for the formation of the epiphyseal growth plate (23). These events, which precede the degradation of the cartilaginous matrix by metalloprotease secreted by terminally differentiated chondrocytes, occur within a hypoxic environment (33). When matrix is invaded by blood vessels, the tissue becomes oxygenated, osteoblasts are subsequently produced from blood flow, and these initiate the calcification of the cartilaginous matrix to form bone (for review see Ref. 21).

Given that bone is vascularized whereas cartilage is not, oxygen tension has been suggested as a regulatory factor for osteogenic and chondrogenic differentiation. On one hand, extremely low oxygen tensions ranging from 1% to 2% have been shown to dramatically inhibit the osteochondrogenic potential of bone marrow and adipose tissue-derived MSC (24, 32). On the other hand, little is known about the effects of oxygen tension at more physiological levels (3–8%) on both osteogenic and chondrogenic differentiation and particularly of adult MSC.

We were therefore interested in determining whether a physiological low oxygen tension (5%) could differentially regulate the in vitro osteochondrogenic potential of hATSC. To

Address for reprint requests and other correspondence: J. Guicheux, INSERM U791, Laboratoire d'ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire (LIOAD), Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France (e-mail: jerome.guicheux@inserm.fr).

address this issue, we first characterized MSC isolated from human adipose tissue for their propensity for self renewal, their expression of cell surface markers, and their ability to differentiate into osteogenic and chondrogenic lineages. Thereafter, we investigated the effects of 5% O₂ on the osteochondrogenic potential of hATSC.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Cell culture plastic wares were purchased from Corning (Schiphol-Rijk, The Netherlands). Collagenase crude type IA, red blood cell lysis buffer, Trypan blue, sodium L-ascorbate, vitamin D₃, insulin-transferrin-selenite (ITS) medium supplement, dexamethasone, Alizarin Red S, Alcian blue, and 2-amino-2-methyl-1-propanol were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Hanks' balanced salt solution (HBSS), Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (4.5 g/l) (DMEM), phosphate-buffered saline (PBS), penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA (0.05%-0.53 mM), L-glutamine, and the SuperScript III kit were obtained from Invitrogen (Paisley, UK). Brilliant SYBR Green Master Mix was obtained from Stratagene (La Jolla, CA). PCR primers were synthesized by MWG Biotech (Ebersberg, Germany). Fetal calf serum (FCS) was from Dominique Dutcher (Brumath, France). Monoclonal antibodies against human type II collagen and β -glycerophosphate were purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Anti-human CD29 and CD105 FITC-conjugated antibodies and CD44, CD90, CD34, and CD45 phycoerythrin (PE)-conjugated antibodies were obtained from Becton Dickinson (Franklin Lake, NJ). An RNeasy micro kit was purchased from Qiagen (Courtaboeuf, France). Transforming growth factor (TGF)- β 1 was obtained from PeproTech (London, UK). Coomassie Plus Assay reagent was purchased from Pierce (Rockford, IL). Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (STREPTA PER) was obtained from Dako (Glostrup, Denmark). All other chemicals were obtained from standard laboratory suppliers and were of the highest purity available.

Cell Isolation

hATSC cells were isolated by collagenase digestion of lipoaspirates obtained from three different patients undergoing abdominal plastic surgery who had provided prior informed consent (4, 13). All protocols were approved by the ethical committee. Briefly, lipoaspirates were washed extensively with HBSS to remove debris. Washed aspirates were treated with collagenase (0.025%) in HBSS for 1 h at 37°C with gentle agitation. The collagenase was inactivated by addition of an equal volume of DMEM containing 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine, and 10% FCS (control medium). The digested product was then centrifuged at 250 g for 5 min to separate adipocytes from stromal cells. The supernatant was removed, and the cell pellet was resuspended in the control medium and filtered through a 70- μ m nylon mesh filter. The filtrate was centrifuged, and the cell pellet was resuspended in red blood cell lysis buffer. The lysis reaction was halted by addition of the control medium. The cell suspension was centrifuged, and the pellet was finally resuspended in the control medium and plated at 5×10^4 cells/cm² in 75-cm² culture flasks. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air, and the culture medium was replaced 24 h after seeding to remove nonadherent cells. Thereafter, the culture medium was renewed every 2–3 days. To prevent spontaneous differentiation, hATSC primary cultures [passage (P)0] were grown to 90% confluence and then detached from the cell culture flask with trypsin-EDTA.

Characterization

Proliferation assay. hATSC were plated at a density of 1×10^4 cells/cm² in 24-well plates and maintained in the control medium.

Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air. The culture medium was changed every 2–3 days. At the indicated times, cells were treated with trypsin and counted with Trypan blue exclusion dye. hATSC from P0 to P3 were monitored over a 14-day period for each passage. As described above, a proliferation assay was also performed on hATSC that had been cultured for two passages, in the presence of osteogenic medium and under normoxic or hypoxic conditions over a 28-day period.

Clonogenic assay for fibroblastoid-like colony formation. hATSC were plated at a density of 10 cells/cm² in 100-mm petri dishes and cultured in the presence of the control medium. After 14 days, cells were rinsed with prewarmed PBS, fixed, and stained at room temperature with 0.5% crystal violet in methanol for 30 min and afterwards gently rinsed with PBS. Colonies were counted with a phase-contrast light microscope, and aggregates of >50 stained hATSC were considered as positive for fibroblastoid-like colony formation (CFU-F) (31).

Flow cytometry. hATSC were characterized by flow cytometry using anti-human CD29 and CD105 FITC-conjugated antibodies and anti-human CD44, CD90, CD34, and CD45 PE-conjugated antibodies (Becton Dickinson). The adherent hATSC were detached with trypsin-EDTA, centrifuged for 1 min at 1,200 g, and resuspended in PBS-BSA (1%)-sodium azide (5%). Aliquots containing 2×10^5 hATSC were incubated with primary antibodies for 15 min at 4°C. The suspended hATSC were washed and then analyzed with a FACSCalibur fluorescence-activated cell sorter (Becton Dickinson). For each sample, 10,000 events were acquired and analyzed with CELLQUEST software. Results were expressed as the percentage of positive cells by comparison with the isotype-matched negative control antibodies on histogram plots.

Osteogenic Differentiation

Culture. For in vitro osteogenic differentiation of hATSC, cells at P2 were seeded at a density of 1×10^4 cells/cm² in six-well plates and cultured in the presence of either control or osteogenic medium for 28 days. Osteogenic medium was composed of the control medium supplemented with 10 mM β -glycerophosphate, 50 μ M sodium L-ascorbate, and 10 nM vitamin D₃. hATSC were maintained at 37°C in a humidified atmosphere either in normoxic (5% CO₂ and 95% air) or hypoxic (5% CO₂, 90% N₂, and 5% O₂) conditions. Media were changed every 2–3 days.

Calcium deposition. Calcium deposition was detected with Alizarin Red S staining as previously described (22). Briefly, hATSC cultured as described above were washed with cold PBS and stained with 2% Alizarin Red S solution for 2 min. Stained cells were extensively washed with deionized water to remove any nonspecific precipitation. The positive red staining represents the deposition of a calcified matrix on the differentiated cells.

Alkaline phosphatase activity. ALP activity was evaluated on hATSC cultured for osteogenic differentiation as previously described (15). After the indicated time, cells were washed twice with ice-cold PBS and scraped in a 0.2% aqueous solution of Nonidet P-40. The cell suspension was then sonicated on ice for 30 s and centrifuged for 5 min at 4°C. Aliquots of supernatants were subjected to a protein assay with Pierce Coomassie Plus Assay reagent to determine the protein quantities. ALP activity was assessed at pH 10.3 in 0.1 M 2-amino-2-methyl-1-propanol containing 1 mM MgCl₂. *p*-Nitrophenylphosphate at 10 mM was used as a chromogenic substrate for an optical density reading at 405 nm. Results were expressed as nanomoles of inorganic phosphate per minute per milligram of protein.

Chondrogenic Differentiation

Culture. For in vitro chondrogenic differentiation, 5×10^5 hATSC at P2 were placed into a 15-ml polypropylene tube containing 1 ml of control medium. They were then centrifuged for 5 min at 250 g. The tubes were fitted with vented caps to permit gas exchange, and the cell pellets were maintained at 37°C in a humidified atmosphere contain-

ing 5% CO₂ and 95% air. After 24 h, pellets of hATSC were divided into two experimental groups and cultured either in the presence of control or chondrogenic medium. The chondrogenic medium was composed of serum-free DMEM supplemented with 6.25 µg/ml insulin, 6.25 µg/ml transferrin, 6.25 µg/ml sodium selenite (ITS), 50 nM sodium L-ascorbate, 10⁻⁸ M dexamethasone, and 10 ng/ml TGF-β1. Culture media were changed every 2–3 days for 28 days (3).

For in vitro hypoxic differentiation, hATSC were cultured as described above and placed at 37°C in a humidified atmosphere and inside a tri-gas incubator (Binder, Tuttlingen, Germany) containing 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂.

Glycosaminoglycan production. The production of sulfated glycosaminoglycans (GAGs) was investigated on pellets by Alcian blue staining. Pellets were washed with ice-cold PBS and fixed for 20 min in 100% ethanol. Pellets were then stained at room temperature with 0.1% Alcian blue solution in 0.1 M HCl. After overnight incubation, the solution was discarded and the pellets were rinsed with 0.1 M HCl to eliminate nonspecific staining. Photographs were obtained with a stereomicroscope.

Histology and immunohistochemistry. Pellets were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections (5 µm thick) were deparaffinized with toluene, rehydrated through a graded series of ethanol, and rinsed in distilled water. Each section was stained with Alcian blue and Masson's trichrome as previously described (39). A three-step visualization system was used (Dako LSAB) for the immunohistochemistry. Briefly, paraffin sections were mounted on pre-treated slides, deparaffinized, rehydrated, and rinsed in distilled water. Sections were incubated for 10 min with newly diluted 3% H₂O₂ solution to inactivate internal peroxidases, followed by trypsin digestion for 10 min. After digestion, slides were incubated for 20 min with 2% diluted goat serum for blocking. Slides were then immunoblotted with the primary monoclonal mouse antibody against human type II collagen at 1/100 in PBS for 1 h at room temperature. Incubation with biotin-labeled anti-mouse antibody for 30 min was followed by 30 min of incubation with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin. Antibody binding was visualized with diaminobenzidine (DAB), and the nuclei were counterstained with hematoxylin. Human nasal cartilage was used as a positive control. As a negative control, sections were processed with identical protocols, but omitting the primary antibody. Sections were then visualized with a light microscope (Zeiss Axioplan 2, Göttingen, Germany), with immunopositive areas exhibiting brown staining.

Real-Time Polymerization Chain Reaction

For real-time PCR analysis, total RNA was extracted with the RNeasy micro kit in accordance with the manufacturer's instructions. After DNase digestion, RNA was quantified with a UV-spectrophotometer (Nanodrop ND-1000, Labtech, Palaiseau, France) and quality was determined with the Agilent Bioanalyzer 2100 system. Five hundred nanograms of RNA per sample was reverse transcribed with the SuperScript III kit in a total volume of 30 µl. Complementary DNA (cDNA) was amplified in a total volume of 25 µl of PCR reaction mix containing 12.5 µl of Brilliant SYBR Green Master Mix (1×) and 30 nM of SYBR Green reference dye. The sequence and concentration of each primer set are provided in Table 1. The real-time polymerase chain reaction was carried out in a MX3000P

real-time PCR system (Stratagene) under the following conditions: 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 1 min at 60°C, and 30 s at 72°C. The efficiency and specificity of each primer set were confirmed with standard curves of threshold cycle (C_t) values versus serial dilution of total RNA and melting profile evaluation. C_t were normalized to β-actin to control for cDNA quantification differences. Results are reported as relative expression levels.

Statistical Analysis

Each experiment was repeated at least three times with similar results. Results are expressed as means ± SE of triplicate determinations. Comparative studies of means were performed by using one-way ANOVA followed by a post hoc test (Fisher's protected least significant difference), with statistical significance at *P* < 0.05.

RESULTS

Cell Characterization

Before investigating their differentiation potential, we sought to characterize MSC isolated from human adipose tissue. With this aim, hATSC were evaluated for their ability to proliferate in culture, for their propensity to self-renew by forming fibroblastic colonies, and for their expression of typical stem cell surface markers by flow cytometry. To evaluate the self-renewal potential of hATSC, CFU-F assays were performed. This assay revealed the ability of 1.13 ± 0.13% of the cells isolated from the stromal vascular fraction of human adipose tissue to form colonies. In addition, we observed that the proliferation of hATSC was constant and not influenced by the number of passages (data not shown), with a doubling time of 5.15 ± 0.79 days. To further characterize hATSC, the expression of a number of surface markers associated with adult stem cell phenotype was assessed by flow cytometry from P0 to P2. No expression of CD34 and CD45, markers of the hematopoietic and monocyte/macrophage lineages, respectively, was observed along the different passages (data not shown). In contrast, throughout the different passages, an increasing proportion of hATSC were found to express CD29, CD44, CD90, and CD105. These data reflect an enrichment of the global population in cells expressing MSC surface markers (Fig. 1). Together, these results demonstrate that human adipose tissue contains a population of cells able to proliferate in culture, to self-renew, and to express surface markers typical of adult stem cells.

Multidifferentiation Potential

A key characteristic of MSC is also their ability, with adequate stimuli, to differentiate into multiple lineages such as the osteogenic and chondrogenic lineages. For osteogenesis, hATSC were cultured in a monolayer for a 28-day period in the presence of osteogenic medium as described in MATERIALS AND METHODS. Osteogenic differentiation was evaluated by the dep-

Table 1. Sequences of primer couples and concentrations used for real-time PCR

Gene	Gene Bank Accession No.	Sequence	Concentration, nM	Base Pairs
β-Actin	NM_001101	Fwd 5'-CGGGACCTGACTGACTACCTC-3'	300	197
		Rev 5'-TCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	600	
Aggrecan	NM_001135	Fwd 5'-TTCCTGGTGTGGCTGCTGTC-3'	900	95
		Rev 5'-TTCTGGCTCGGTGGTGAATC-3'	900	
COL2A1	NM_001844	Fwd 5'-TCTGCGACGACATAATCTGTGAAG-3'	300	99
		Rev 5'-CAGGGCGAGGTCAGTTGGG-3'	300	

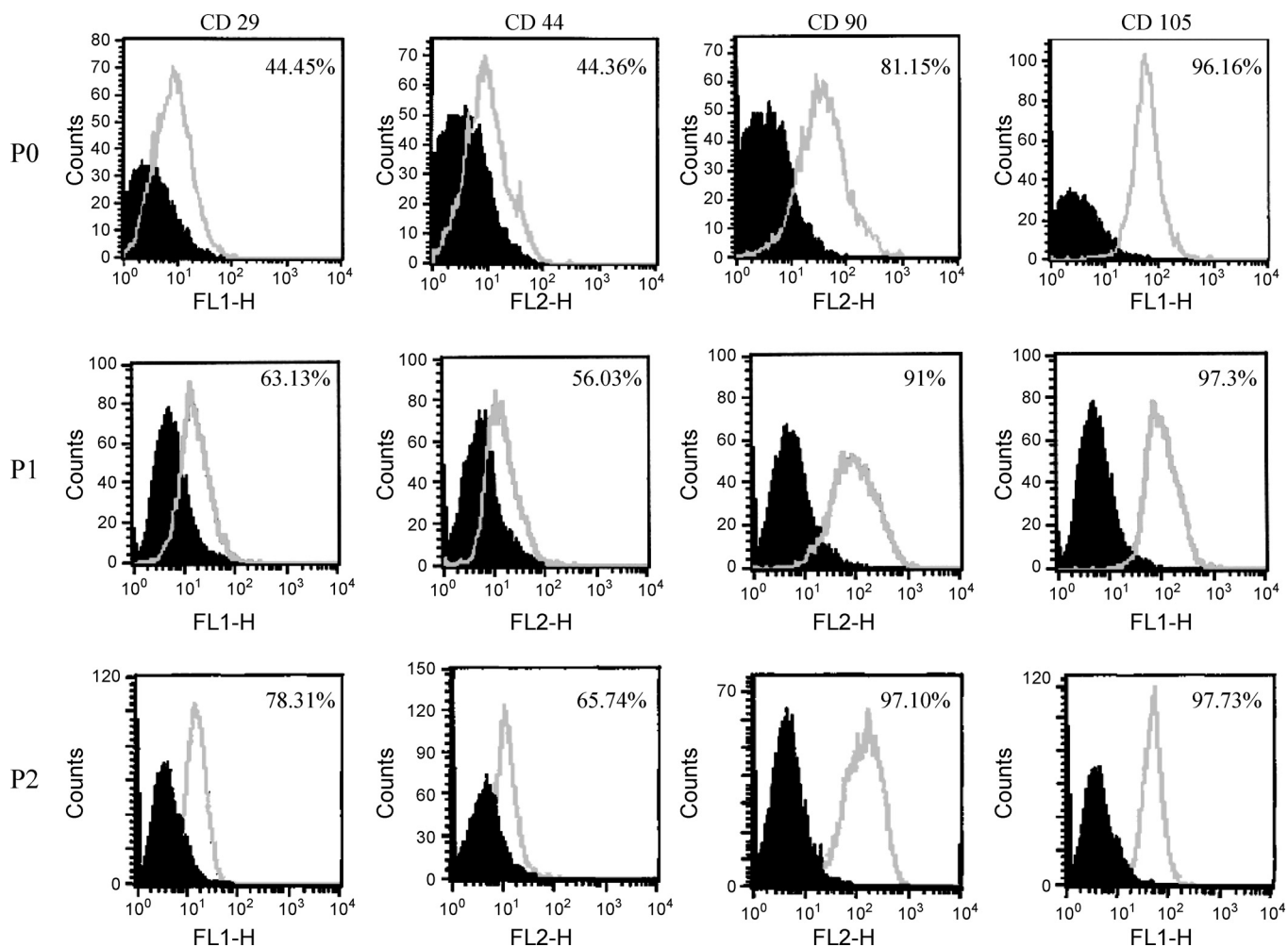


Fig. 1. Characterization of human adipose tissue-derived stem cells (hATSC): flow cytometric analysis of hATSC for CD29, CD44, CD90, and CD105 expression. hATSC were cultured in monolayer, in control medium, and under normoxic conditions until confluence; 10,000 events were scored. Results are expressed as % of positive cells in the whole population on representative histogram plots ($n = 3$).

osition of a calcified matrix demonstrated by Alizarin Red staining. Alizarin Red-positive staining was detected as early as *day 14* of culture and gradually increased until *day 28* for cells cultured in the presence of osteogenic medium compared with cells cultured in the control medium (Fig. 2A). In addition, measurements were made of ALP activity, a typical marker of the osteogenic conversion of MSC. After 28 days, ALP activity was approximately five times higher in hATSC cultured in osteogenic medium than in control medium with 377.14 ± 19.78 and 76.26 ± 5.76 nmol $P_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$, respectively (Fig. 2B). On a transcriptional level, differentiated hATSC exhibited a 4-fold increase and a 1.7-fold increase for Runx2 and osteocalcin mRNA expression, respectively, compared with control hATSC. These data highlight how hATSC can potentially differentiate into ALP-positive cells that are able to mineralize and express Runx2 and osteocalcin, two major osteoblast-related genes.

For chondrogenic differentiation, hATSC were cultured in a pellet culture system in the presence of chondrogenic medium or control medium for a 28-day period. GAG production was evaluated within the whole pellets by Alcian blue staining. Pellets cultured in chondrogenic medium appeared positive for

GAG accumulation, as early as *day 7* and up to *day 28* (Fig. 3A). To highlight the production of a cartilaginous matrix, pellet sections were immunostained for the presence of type II collagen. Only pellets cultured in the presence of chondrogenic medium displayed positive brown staining, demonstrating the presence of type II collagen (Fig. 3B). The expression of the transcripts encoding aggrecan and COL2A1 was also evaluated by real-time PCR. The expressions of these mRNAs exhibited 6.25 ± 0.24 - and 10.71 ± 0.32 -fold increase, respectively, for aggrecan and type II collagen in chondrogenic medium compared with control conditions (absence of chondrogenic medium) (Fig. 3C). These data clearly indicate that hATSC are able to differentiate toward the chondrogenic lineage when grown in the presence of a chondrogenic medium.

Effects of Hypoxia on Osteogenic Differentiation

Given the putative role of oxygen tension in the osteogenic and chondrogenic differentiation processes, we sought to assess the impact of hypoxia on the osteogenic differentiation of hATSC. For this purpose, hATSC were cultured in a monolayer for 28 days in osteogenic medium and under normal

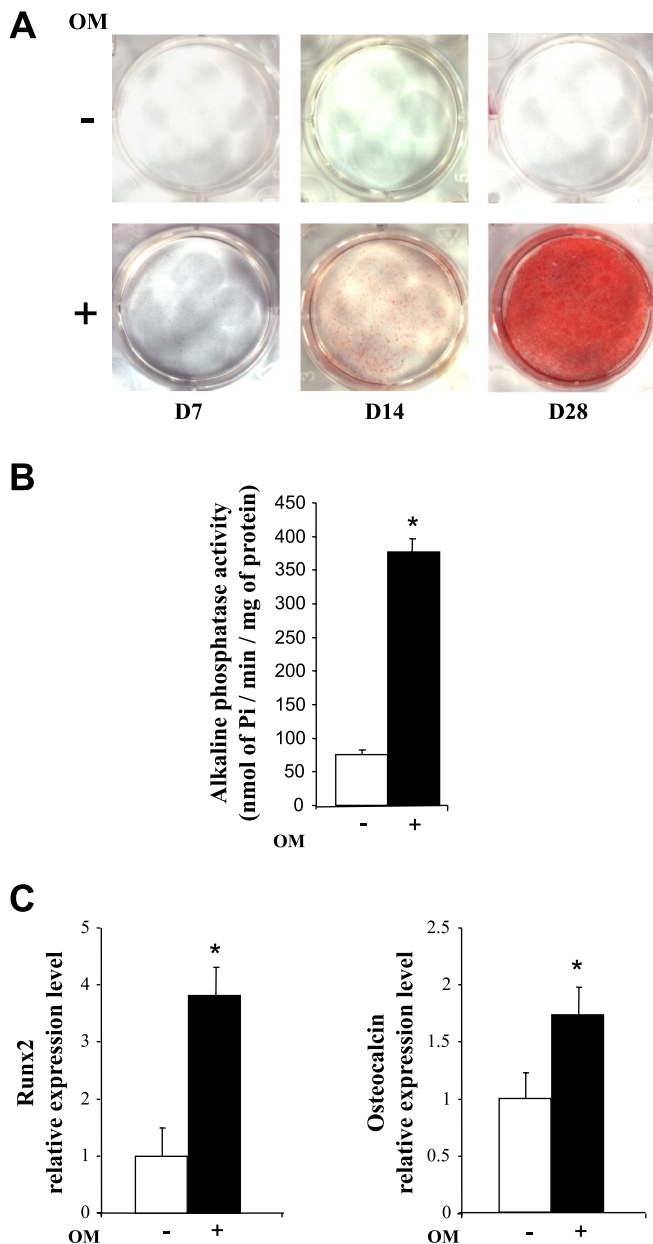


Fig. 2. Osteogenic differentiation of hATSC. **A**: calcium deposition was investigated at day (D)7, D14, and D28 by Alizarin Red staining. hATSC were cultured in the absence (–) or presence (+) of osteogenic medium (OM). **B**: alkaline phosphatase activity was measured at 28 days. Results are expressed as means $\pm$ SE ($n = 3$). $*P < 0.05$ compared with control condition in the absence of OM. **C**: phenotype of hATSC after 28 days of osteogenic differentiation. Expressions of the osteogenic markers Runx2 and osteocalcin were investigated by real-time PCR. Results are expressed as relative expression level compared with the control condition in the absence of OM. $*P < 0.05$.

(20% O_2) or hypoxic (5% O_2) conditions. Calcium deposition evaluated by Alizarin Red staining appeared to decrease when cells were cultured in hypoxic conditions as opposed to those cultured in normoxia (Fig. 4A). This effect of a 5% O_2 tension on osteogenic differentiation was also observed on ALP activity, which was significantly reduced in hypoxia (Fig. 4B). To ascertain whether the expression of transcripts was also affected by oxygen tension, we analyzed the levels of Runx2 and osteocalcin mRNA by real-time PCR. A significant decrease

was observed for Runx2 and osteocalcin mRNA levels under low oxygen tension.

To find out whether the negative effect of a 5% hypoxia on osteogenic differentiation could be due to a decrease in cell viability or function (40, 42), we investigated the effect of hypoxia on cell proliferation and protein synthesis during the osteogenic differentiation of hATSC. The proliferation assay using Trypan blue exclusion dye (Fig. 5A) and the total amount of protein measured with the Coomassie Plus Protein Assay reagent (Fig. 5B) revealed that neither cell viability nor global protein synthesis was affected by oxygen tension. Indeed, no significant difference in the number of cells or in the global amount of protein was detectable between normoxic and hypoxic conditions. Considered together, these data strongly suggest that a 5% O_2 tension exerts a negative effect on the osteogenic differentiation potential of hATSC without affecting global protein synthesis and cell viability.

Effects of Hypoxia on Chondrogenic Differentiation

Oxygen tension also plays a major regulatory role in the appearance and the maintenance of a chondrogenic phenotype during embryological development (33). We were therefore interested in investigating the effect of oxygen tension on the chondrogenic differentiation of hATSC. With this aim, hATSC were cultured in pellets in the presence of chondrogenic medium for 28 days under normal (20%) or low (5%) oxygen tension. Chondrogenic differentiation was evaluated at the level of type II collagen and aggrecan mRNAs by real-time PCR. For both of these chondrogenic markers, there was no significant difference due to the exposure to 20% or 5% O_2 (Fig. 6A). To investigate the production of cartilaginous matrix components, pellets sections were stained with Alcian blue and Masson's trichrome as well as immunostained for type II collagen. Alcian blue staining appeared positive under both oxygen tensions, indicating the presence of GAG. In contrast, Masson's trichrome staining and type II collagen immunostaining only appeared highly positive for the pellets cultured under 5% oxygen tension (Fig. 6B). To further analyze the positive effect of oxygen tension on the synthesis of type II collagen, a time course experiment was performed to evaluate the expression of mRNA encoding for type II collagen at 7, 14, 21, and 28 days of chondrogenic differentiation in the presence of 20% or 5% oxygen, as reported above. Our data indicate that type II collagen expression in normoxia was detectable at day 28. Interestingly, under hypoxia, type II collagen mRNA expression was observed 7 days earlier, with a detectable expression as early as day 21 (Fig. 6C). Together, these results suggest that a 5% O_2 tension does not dramatically influence aggrecan expression and GAG synthesis, whereas it favors an early expression of type II collagen and its consequent production within the matrix.

DISCUSSION

Tissue engineering strategies for the treatment of cartilage defects are geared toward the use of alternative sources to chondrocytes, and particularly adult MSC (38). Adult MSC have been isolated from numerous tissues such as bone marrow (5, 18, 29), periosteum (6, 25), synovial tissue (26), and fat (10, 16). Adipose tissue is abundant and easily harvestable by liposuction and therefore could be a potential source of mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering. However, the optimal culture conditions required for the commitment of

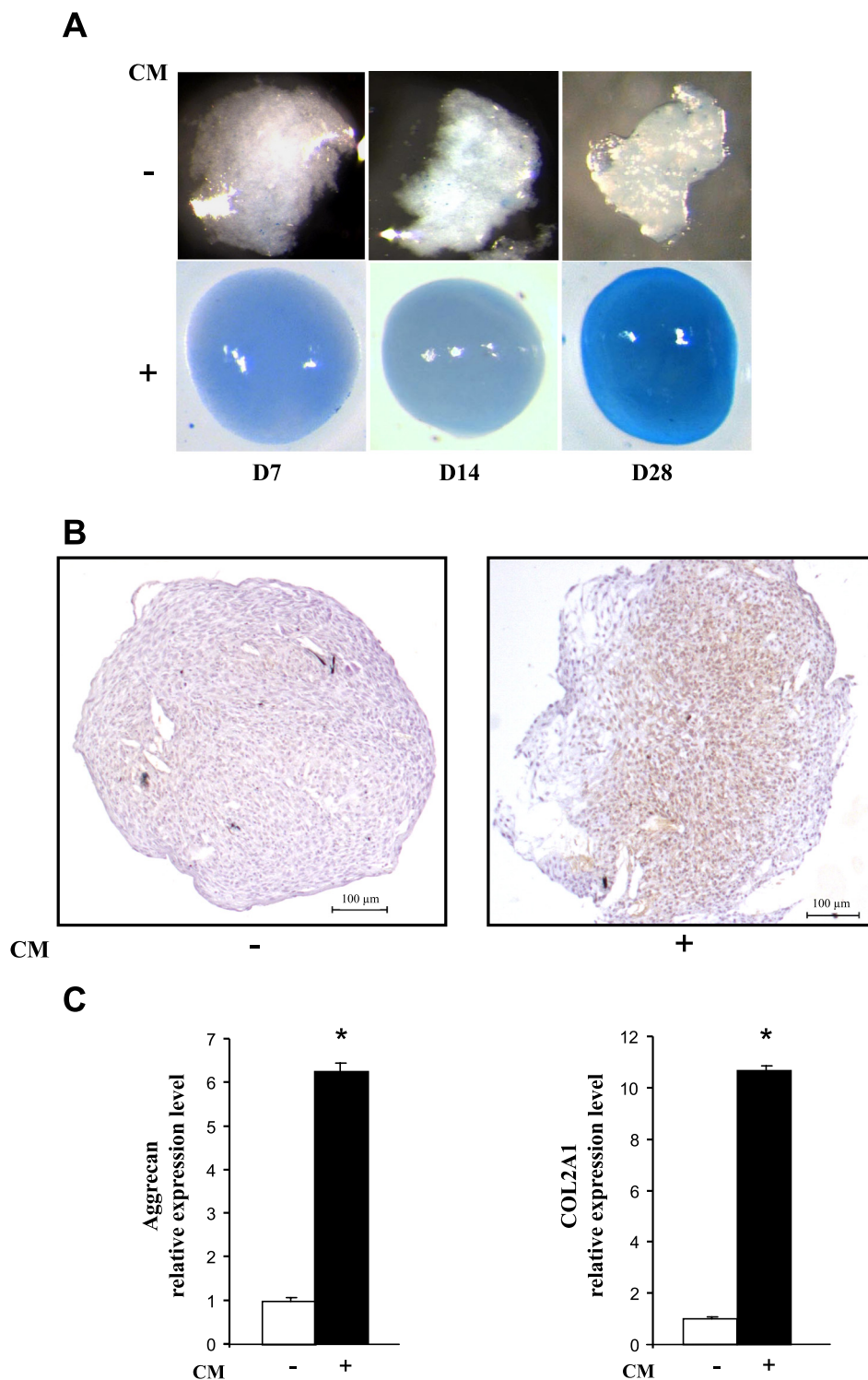


Fig. 3. Chondrogenic differentiation of hATSC: hATSC were cultured in pellets for 7, 14 and 28 days in the absence (–) or presence (+) of chondrogenic medium (CM). **A**: sulfated glycosaminoglycan (GAG) production. Production of GAGs was investigated at D7, D14 and D28 of chondrogenic differentiation by Alcian blue staining. Original magnification $\times 20$. **B**: type II collagen immunostaining after 28 days of chondrogenic differentiation of hATSC. **C**: phenotype of hATSC after 28 days of chondrogenic differentiation. Expressions of the chondrogenic markers aggrecan and COL2A1 in hATSC were investigated by real-time PCR. Results are expressed as relative expression level compared with the control condition in the absence of CM. * $P < 0.05$.

MSC derived from fat toward the chondrogenic lineage have yet to be defined. In particular, the role of oxygen tension as an environmental factor useful for triggering MSC differentiation still remains to be determined. Within this context, the objective of this study was to investigate the effects of low (5%) and high (20%) oxygen tension on the osteogenic and chondrogenic differentiation of hATSC.

The interest of the first set of experiments was to characterize the cell population isolated from human lipoaspirates and

their ability to proliferate, to self-renew, to express a typical MSC set of surface markers, and finally to differentiate toward the osteogenic and chondrogenic lineages. As described above, hATSC demonstrated their ability to proliferate in culture after different passages. Their self-renewal potential was also estimated by CFU-F assay, and the rate of cells permitting colonies ($1.13\% \pm 0.13$) was in accordance with those reported for adult MSC (12). In addition, hATSC surface marker expression was evaluated, and a typical MSC pattern was detected (7, 41,

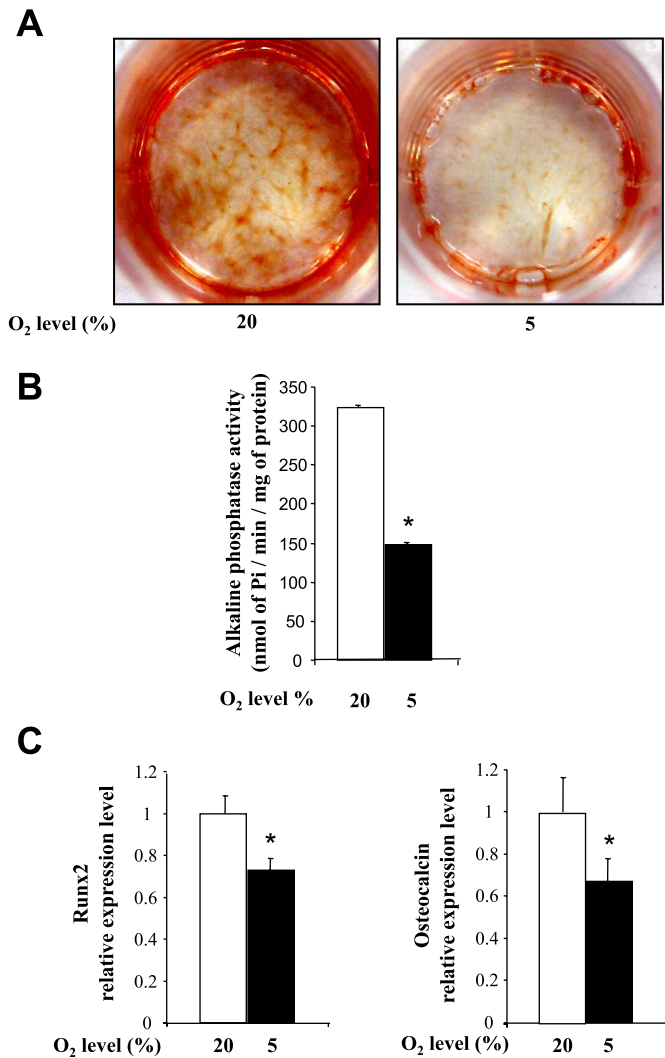


Fig. 4. Effects of 5% O₂ hypoxia on osteogenic differentiation potential of hATSC: hATSC were cultured in monolayer for 28 days in the presence of osteogenic medium under normoxic (20%) or hypoxic (5%) conditions. **A**: calcium deposition was evaluated by Alizarin Red staining. **B**: alkaline phosphatase activity was measured at 28 days. Results are expressed as means $\pm$ SE ($n = 3$). * $P < 0.05$ compared with normoxic condition. **C**: phenotype of hATSC after 28 days of osteogenic differentiation under normoxic or hypoxic condition. Expression levels of the osteogenic markers Runx2 and osteocalcin were evaluated by real-time PCR. Results are expressed as relative expression level compared with normoxic condition. * $P < 0.05$.

43). hATSC were positive for CD29, CD44, CD90, and CD105 and negative for CD34 and CD45 from P0 to P2. The expression of CD34, a hematopoietic stem cell marker (14), in adipose-derived stem cells appears to be controversial in the literature. Although some authors have reported a high level of CD34 expression (11, 27, 30), this molecule was absent in our cultured hATSC. Another point to emphasize is the fact that as the number of passages increased, so did the proportion of positive cells for each surface marker within the global population. This could be explained by the enrichment of the cell population in MSC, given the ability of MSC to proliferate rapidly in culture. Moreover, hATSC exhibited both osteogenic and chondrogenic differentiation potentials, suggesting their multipotentiality. When placed in osteogenesis-specific conditions, this cell population was able to commit to an osteoblastic

phenotype, as shown by the accumulation of a calcified matrix, an increased ALP activity, and the expression of osteogenic markers (Runx2 and osteocalcin). When placed in chondrogenic conditions, hATSC were also able to undergo a chondrogenic differentiation, as shown by the accumulation of sulfated GAGs and type II collagen within the matrix and the expression of COL2A1 and aggrecan mRNAs.

After having demonstrated the ability of hATSC to differentiate toward the osteogenic and the chondrogenic lineages, we sought to evaluate the regulatory role that hypoxia could play in both these differentiation pathways. First, we focused on the effects of hypoxia on the osteogenic differentiation of hATSC. A 5% O₂ environment seemed to negatively regulate the osteogenic potential of hATSC by decreasing matrix mineralization, ALP activity, and the expression of Runx2 and osteocalcin mRNAs, as has been also described with bone marrow MSC cultured under extremely low oxygen tension (1%) (32). Interestingly, and contrarily to the reported effects of a 1% hypoxia, the negative effects of a 5% hypoxia on osteogenesis are not likely to be the result of a deleterious effect on general cell functions. Indeed, our data indicate that hypoxia significantly affects neither cell viability nor protein synthesis. These data strongly suggest that specific levels of oxygen tension may influence osteogenic differentiation, prob-

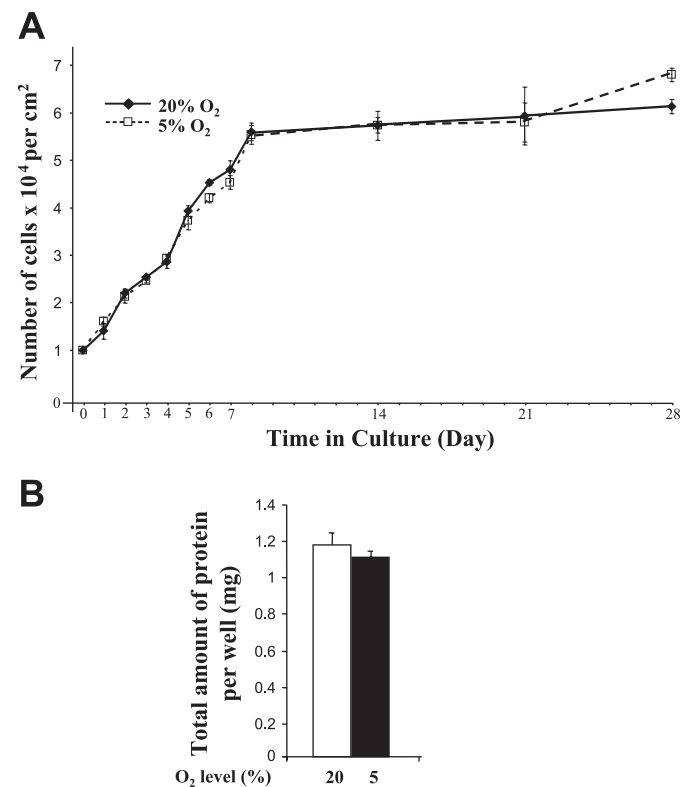


Fig. 5. Effects of 5% O₂ hypoxia on proliferation and protein synthesis of hATSC during osteogenic differentiation. **A**: evolution of hATSC number as a function of time. hATSC were cultured for the indicated times in monolayer culture in osteogenic medium and under normoxic ($\blacklozenge$) or hypoxic ($\square$) condition. Cell numbers per square centimeter were evaluated with Trypan blue exclusion dye staining. Results are expressed as means $\pm$ SE. **B**: total amount of protein per well was measured with the Coomassie Plus Protein Assay reagent. The amount of protein was investigated after 28 days of osteogenic differentiation under normoxia (20%) or hypoxia (5%). Results are expressed as means $\pm$ SE in milligram of protein per well.

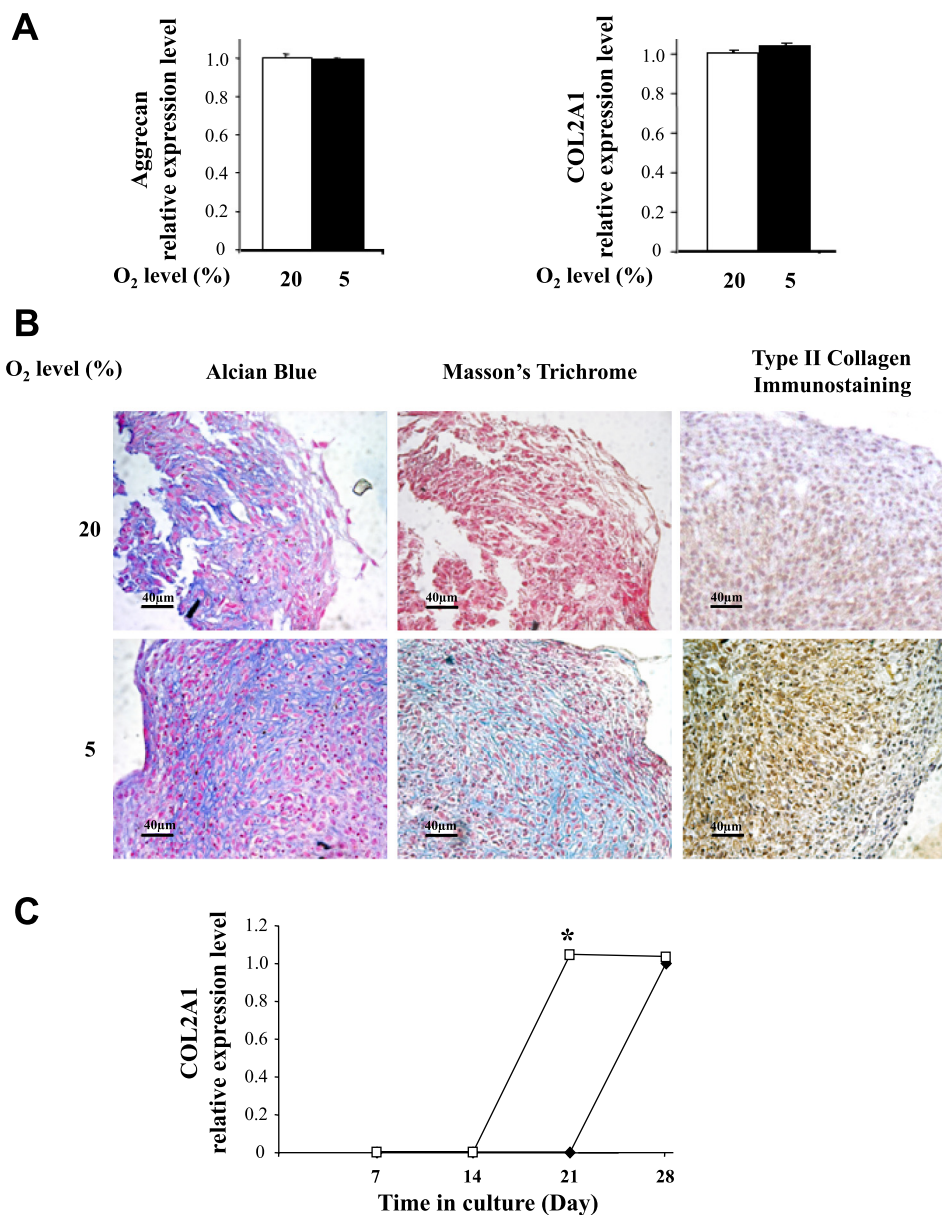


Fig. 6. Effects of 5% O₂ hypoxia on the chondrogenic differentiation potential of hATSC. hATSC were cultured in pellets for 28 days in the presence of chondrogenic medium under normoxic (20%) or hypoxic (5%) condition. **A**: phenotype of hATSC after 28 days of chondrogenic differentiation under normoxia (20%) or hypoxia (5%). Real-time polymerase chain reaction analysis was performed for the chondrogenic markers aggrecan and COL2A1. Results are expressed as relative expression level compared with the normoxic condition. **B**: histological analysis of pellet sections. The presence of sulfated GAGs, total collagens, and type II collagen was investigated by Alcian blue staining, Masson's trichrome, and type II collagen immunostaining, respectively. **C**: evolution of chondrogenic differentiation. hATSC were cultured in pellets in the presence of chondrogenic medium for the indicated times and under normoxic (20%) (◆) or hypoxic (5%) (□) conditions. Expression level of COL2A1 was evaluated at the indicated times. Results are expressed as relative expression level compared with the normoxic condition on the same day. **P* < 0.05.

ably through finely tuned molecular mechanisms. Such mechanisms, however, merit clarification.

In contrast to osteogenic differentiation, no differences in COL2A1 and aggrecan mRNA expression levels were detected after 28 days of culture regardless of the oxygen tension applied. Interestingly, only cells cultured under hypoxic conditions produced type II collagen in their extracellular matrix, a typical component of the cartilaginous matrix. These data led us to hypothesize that a 5% O₂ tension could stimulate an early expression of type II collagen in hATSC. To address this issue, we performed a time course experiment that clearly indicates that hypoxia induces the expression of type II collagen 1 week earlier than 20% O₂ tension. Subsequently, after 28 days, hATSC cultured under hypoxic conditions have probably accumulated larger amounts of type II collagen in their extracellular matrix than hATSC cultured under normoxic conditions. Consistently, it has been reported that embryonic stem cells cultured under hypoxic conditions enhance their synthesis of

cartilage protein and biochemical functionality (19). Oxygen tension can therefore be considered a specific regulatory factor that differentially affects the osteogenic and chondrogenic differentiation of MSC. The underlying molecular mechanisms involved in these differential effects of hypoxia are likely to involve members of the hypoxia-inducible factor (HIF) family. These transcription factors are among the most significant regulators of oxygen sensing in mammals. The role of HIF family members in the maintenance and expression of a chondrogenic phenotype is well acknowledged (20). Conversely, although hypoxia has been reported to induce a downregulation of Runx-2 expression through a histone deacetylase 4-mediated mechanism (17, 37), the role of HIF family members in the control of osteogenic differentiation has still not yet been fully ascertained and calls for further attention.

Our data may be relevant to the development of an osteo-articular tissue engineering strategy. Indeed, the association of adult MSC with three-dimensional scaffolding biomaterials is

probably the most promising strategy for bone tissue repair. However, the oxygen diffusion process, which is restricted to 100–200 μm , drastically limits the supply of oxygen and nutrients to the cells. Consequently, MSC seeded into scaffolds experience some degree of hypoxia, which may not only limit their survival (32) but also inhibit their osteogenic potential. When a high oxygen supply is required, such as for MSC-mediated bone regeneration, engineered tissue must be vascularized through the development of a capillary network. Additional strategies for enhancing vascularization of bone engineered grafts are under investigation. These include scaffold design (porosity, interconnectivity), the inclusion of angiogenic factors, or prevascularization of the engineered constructs (36).

While vascularization-mediated oxygenation of tissue engineered grafts is a major issue for bone repair, the avascular nature of cartilage probably makes this tissue a more appropriate target for biomaterial-assisted regenerative medicine. Consistently, our data strongly uphold the hypothesis that low oxygen tension, such as that experienced by MSC when seeded in biomaterials, may trigger their chondrogenic commitment required for proper cartilage tissue regeneration.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors also gratefully acknowledge Dr. F. Lejeune, K. Rouger, R. Josien, M. Heslan, S. Rémy, and I. Anegon for their helpful assistance.

GRANTS

This study was supported by grants from the “foundation Arthritis Courtin,” the “Société Française de Rhumatologie,” “ANR young researchers project scartifold,” ANR Tecsan “Chondrograft,” the “fondation de l’avenir pour la recherche médicale appliquée,” and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U791. C. Merceron received a fellowship from “Région Pays de la Loire.”

DISCLOSURES

The authors are not aware of financial conflict(s) with the subject matter or materials discussed in this manuscript with any of the authors, or any of the authors’ academic institutions or employers.

REFERENCES

- Aigner T, Stove J. Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Delivery Res* 55: 1569–1593, 2003.
- Archer CW, Francis-West P. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 401–404, 2003.
- Bunnell BA, Estes BT, Guilak F, Gimbale JM. Differentiation of adipose stem cells. *Methods Mol Biol* 456: 155–171, 2008.
- Bunnell BA, Flaas M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45: 115–120, 2008.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641–650, 1991.
- De Bari C, Dell’Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44: 1928–1942, 2001.
- De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174: 101–109, 2003.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315–317, 2006.
- Dragoo JL, Samimi B, Zhu M, Hame SL, Thomas BJ, Lieberman JR, Hedrick MH, Benhaim P. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br* 85: 740–747, 2003.
- Erickson GR, Gimbale JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 763–769, 2002.
- Festy F, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Pequignat AM, Gonthier MP, Munstun A, Hoarau JJ, Cesari M, Roche R. Surface protein expression between human adipose tissue-derived stromal cells and mature adipocytes. *Histochem Cell Biol* 124: 113–121, 2005.
- Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 24: 150–154, 2006.
- Gimbale JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100: 1249–1260, 2007.
- Gratama JW, Orfao A, Barnett D, Brando B, Huber A, Janossy G, Johnsen HE, Keeney M, Marti GE, Preijers F, Rothe G, Serke S, Sutherland DR, Van der Schoot CE, Schmitz G, Papa S. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* 34: 128–142, 1998.
- 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* 18: 2060–2068, 2003.
- Guilak F, Awad HA, Fermor B, Leddy HA, Gimbale JM. Adipose-derived adult stem cells for cartilage tissue engineering. *Biorheology* 41: 389–399, 2004.
- Hirao M, Tamai N, Tsumaki N, Yoshikawa H, Myoui A. Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J Biol Chem* 281: 31079–31092, 2006.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41–49, 2002.
- Koay EJ, Athanasios KA. Hypoxic chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells enhances cartilage protein synthesis and biomechanical functionality. *Osteoarthritis Cartilage* 16: 1450–1456, 2008.
- Lafont JE, Talma S, Hopfgarten C, Murphy CL. Hypoxia promotes the differentiated human articular chondrocyte phenotype through SOX9-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 283: 4778–4786, 2008.
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 46–62, 2008.
- Magne D, Bluteau G, Lopez-Cazaux S, Weiss P, Pilet P, Ritchie HH, Daculsi G, Guicheux J. Development of an odontoblast in vitro model to study dentin mineralization. *Connect Tissue Res* 45: 101–108, 2004.
- Magne D, Julien M, Vinatier C, Merhi-Soussi F, Weiss P, Guicheux J. Cartilage formation in growth plate and arteries: from physiology to pathology. *Bioessays* 27: 708–716, 2005.
- Malladi P, Xu Y, Chiou M, Giaccia AJ, Longaker MT. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C1139–C1146, 2006.
- Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res* 195: 492–503, 1991.
- Nishimura K, Solchaga LA, Caplan AI, Yoo JU, Goldberg VM, Johnstone B. Chondroprogenitor cells of synovial tissue. *Arthritis Rheum* 42: 2631–2637, 1999.
- Noel D, Caton D, Roche S, Bony C, Lehmann S, Casteilla L, Jorgensen C, Cousin B. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res* 314: 1575–1584, 2008.
- Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, Aigner T, Richter W. 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, 2006.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–147, 1999.
- Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose

- lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109: 656–663, 2004.
31. **Pochampally R.** Colony forming unit assays for MSCs. *Methods Mol Biol* 449: 83–91, 2008.
 32. **Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, Pujol JP, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, Petite H.** Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone* 40: 1078–1087, 2007.
 33. **Provot S, Schipani E.** Fetal growth plate: a developmental model of cellular adaptation to hypoxia. *Ann NY Acad Sci* 1117: 26–39, 2007.
 34. **Rajpurohit R, Koch CJ, Tao Z, Teixeira CM, Shapiro IM.** Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism. *J Cell Physiol* 168: 424–432, 1996.
 35. **Rider DA, Dombrowski C, Sawyer AA, Ng GH, Leong D, Hutmacher DW, Nurcombe V, Cool SM.** Autocrine fibroblast growth factor 2 increases the multipotentiality of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26: 1598–1608, 2008.
 36. **Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA.** Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 26: 434–441, 2008.
 37. **Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, McAnally J, Pomajzl C, Shelton JM, Richardson JA, Karsenty G, Olson EN.** Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 119: 555–566, 2004.
 38. **Vinatier C, Gauthier O, Fatimi A, Merceron C, Masson M, Moreau A, Moreau F, Fella B, Weiss P, Guicheux J.** An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnol Bioeng* 102: 1259–1267, 2009.
 39. **Vinatier C, Magne D, Moreau A, Gauthier O, Malard O, Vignes-Colombeix C, Daculsi G, Weiss P, Guicheux J.** Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *J Biomed Mater Res A* 80: 66–74, 2007.
 40. **Wang DW, Fermor B, Gimble JM, Awad HA, Guilak F.** Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 204: 184–191, 2005.
 41. **Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V, Richter W.** Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum* 48: 418–429, 2003.
 42. **Zhu W, Chen J, Cong X, Hu S, Chen X.** Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24: 416–425, 2006.
 43. **Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JJ, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH.** Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279–4295, 2002.
 44. **Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH.** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211–228, 2001.



4.3 Facteurs bioactifs du milieu de culture chondrogénique

La multiplicité des origines cellulaires, des modes et conditions utilisés dans le cadre de la différenciation chondrogénique de CSM nécessite l'élaboration de milieux de différenciation adaptés. La composition du milieu de différenciation chondrogénique n'est pas définie de manière absolue. Il existe une grande diversité de facteurs morphogéniques pouvant entrer dans sa composition, et utilisés dans des concentrations variables.

4.3.1 Additifs de base du milieu de culture chondrogénique

Le milieu le plus couramment utilisé pour la différenciation chondrogénique, au regard de la littérature, est le "DMEM-high glucose" (4,5g/L), supplémenté en acide ascorbique, insuline, dexaméthasone et TGF-béta1 ou TGF-béta3 [438]. Une grande proportion des études exclut le sérum de la composition du milieu de différenciation. Il a été rapporté que l'absence de sérum dans le milieu d'induction permet une meilleure différenciation des CSM [439]. L'usage d'un milieu sans sérum permet également une formulation mieux contrôlée, reproductible et adaptée à l'usage clinique.

L'acide ascorbique est un composant majeur du milieu de différenciation chondrogénique. L'ascorbate est un cofacteur essentiel des prolyl-lysyl-hydroxylases [440]. Ce sont les enzymes clés intervenant dans la synthèse des collagènes. Il a été démontré que l'ascorbate, en plus de réguler la synthèse des collagènes, favorise la synthèse d'agrécan [441].

L'insuline *via* l'activation des récepteurs à l'insuline et l'insulin-like growth factor (IGFR) joue un rôle majeur dans la chondrogenèse, en stimulant l'activité anabolique de cellules chondrogéniques [442].

La dexaméthasone est un glucocorticoïde de synthèse capable d'activer la différenciation chondrogénique de CSM de manière dose et temps dépendant [443]. Cette hormone de synthèse semble potentialiser l'effet de facteurs de croissance [444] et a notamment pour effets d'augmenter l'expression du facteur de transcription Sox9 et la synthèse des protéines matricielles comme les collagènes de type II, IX et XI ainsi que celle de l'agrécan ou de COMP dans des chondrocytes ou des CSM [445,446].

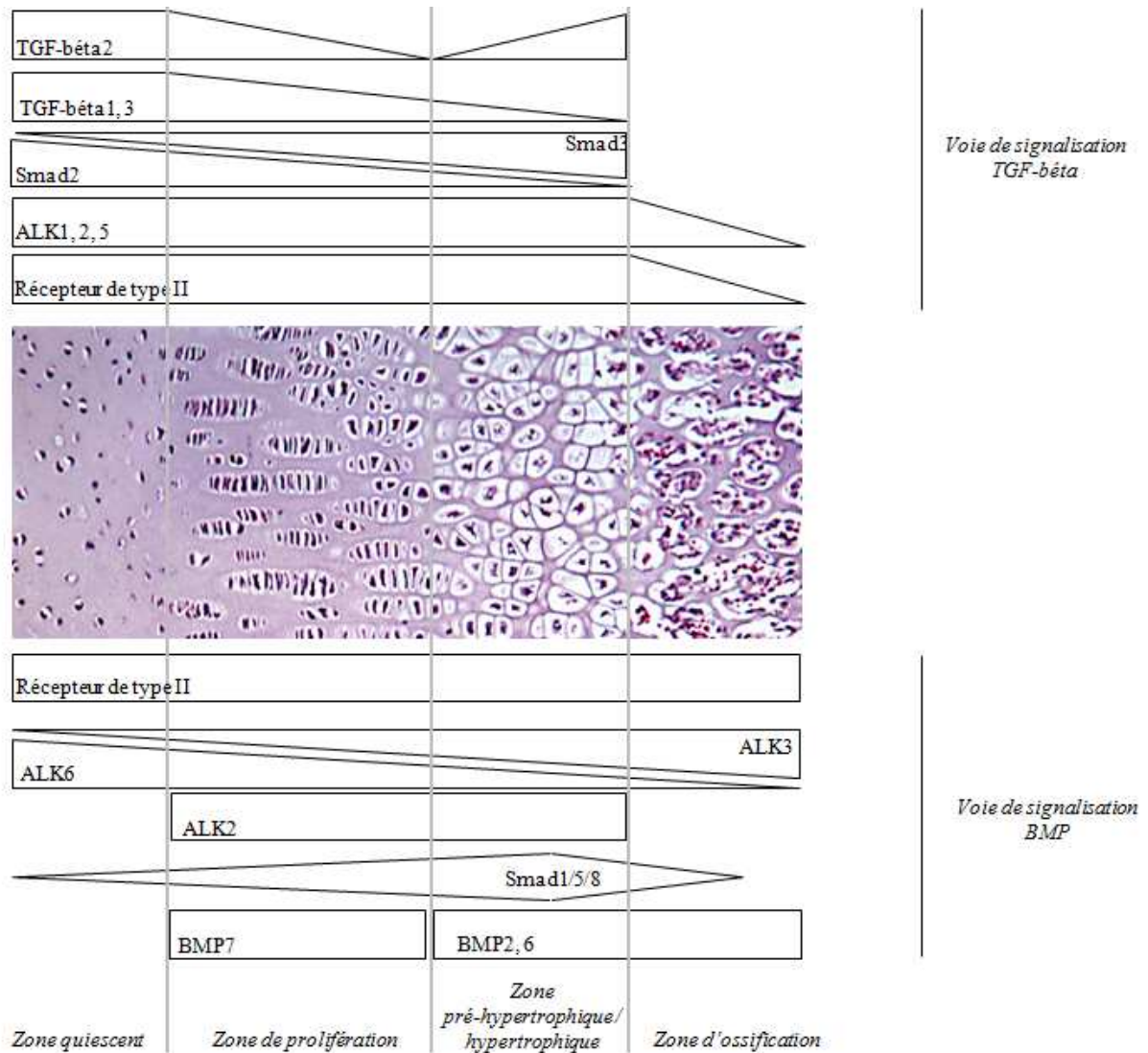


Figure 14 : Profil d'expression des TGF-béta, BMP, leurs récepteurs ainsi que les protéines Smad dans la plaque de croissance.

4.3.2 Additifs modulateurs du phénotype chondrogénique

Le choix des additifs pour moduler le phénotype chondrogénique est fondé principalement sur les études des facteurs décrits au cours de la chondrogenèse de la plaque de croissance. Les mécanismes responsables de la formation et du maintien du cartilage articulaire étant mal connus à ce jour. Récemment, Johnson *et al* ont identifié la kartogenin comme un stimulateur de la différenciation chondrogénique de MO-CSM, agissant *via* une nouvelle voie de signalisation. La kartogenin se lie à la filamine A et perturbe la liaison de la filamine A avec le facteur de transcription CBFb (core-binding factor b subunit). L'injection intra-articulaire de kartogenin prévient le développement de l'arthrose chez la souris en modulant les cellules endogènes. La kartogenin protège également les chondrocytes des effets des cytokines pro inflammatoires [447]. Cette étude démontre l'intérêt d'identifier les voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie du cartilage articulaire afin non seulement de définir de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de pathologies du cartilage mais aussi de développer de nouvelles stratégies d'ingénierie tissulaire.

Actuellement, les stratégies d'ingénierie tissulaire utilisent principalement les membres de la famille du TGF-béta, FGF, IGF, WNT ou la PTHrP connus pour leurs rôles au cours du processus de différenciation chondrogénique et hypertrophique [448].

4.3.2.1 Superfamille du TGF-béta

La superfamille du TGF-béta est composée d'une trentaine de membres que l'on retrouve dans tout le règne animal, dont les TGF-béta, les activines, les BMP et les mycostatines [449]. Ils transmettent un signal intracellulaire par l'interaction de deux récepteurs membranaires : récepteur de type I (ALK : Activin receptor Like Kinase) et de type II. L'activation de ces récepteurs transmet un signal *via* les MAPK (ERK, JNK, p38MAPK) ou *via* les protéines Smad. ALK4, 5, 7 activent les voies de signalisation Smad 2/3 et ALK1, 2, 3, 6 activent les voies de signalisation Smad 1/5/8 [450]. Les TGF-béta se fixent aux récepteurs ALK4, 5, 7 et les BMP se fixent aux récepteurs ALK1, 2, 3, 6. Les membres de la superfamille du TGF-béta agissent à tous les stades de la chondrogenèse [451]. Le profil d'expression au sein de la plaque de croissance de ces acteurs met en évidence leur implication au cours de la chondrogenèse [452,453] (Figure 14).

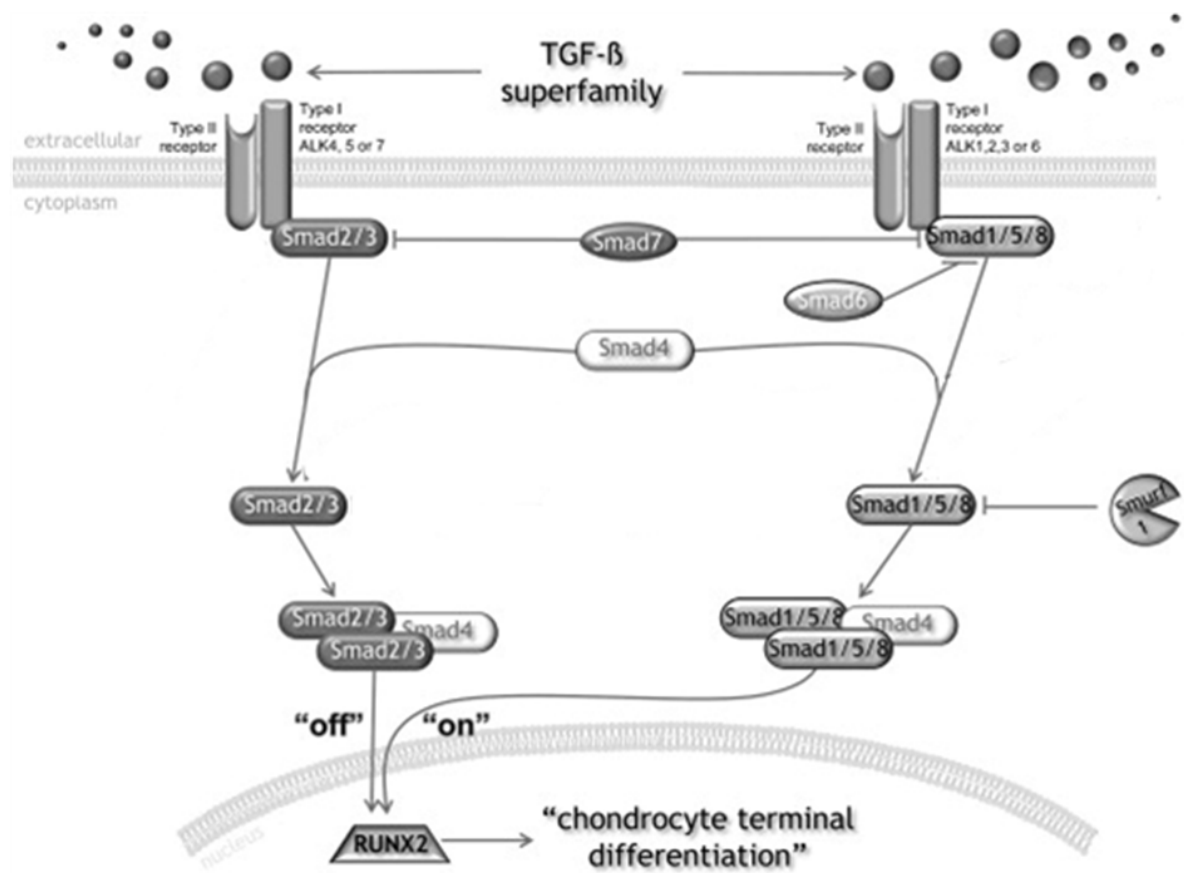


Figure 15 : Effets des voies de signalisation Smad2/3 et Smad1/5/8 sur la régulation du facteur transcription RUNX2. Représentation schématique d'après Van der Kraan *et al* [450]

Le TGF-béta stimule l'expression de la N-cadhérine, favorisant ainsi la condensation et l'engagement des CSM vers un phénotype chondrogénique. La différenciation chondrogénique des CSM induites par le TGF-béta est dépendante des voies MAPK. Les MAPK stimulent la prolifération des CSM, la synthèse des protéines matricielles [454] et régulent la voie WNT [75].

La voie Smad2/3 induit la différenciation chondrogénique en formant un complexe avec SOX9 pour activer l'expression des marqueurs du phénotype chondrogénique [455]. L'expression du collagène de type II est ainsi stimulée par le TGF-béta [456]. De plus, les voies Smad2/3 inhibent la différenciation hypertrophique des chondrocytes de la plaque de croissance [457]. En effet, les souris dont la protéine Smad3 est mutée ont un développement anormal et une augmentation du nombre de chondrocyte hypertrophique dans la plaque de croissance [458] (Figure 15).

A l'inverse, les voies Smad1/5/8 sont requises pour la différenciation hypertrophique. En effet, les souris déficientes pour Smad1 et 5 présentent un sévère déficit en chondrocytes hypertrophiques [460]. De plus, la stimulation des expressions de Smad6 et Smurf1, inhibiteurs de la voie de signalisation Smad1/5/8, inhibe l'hypertrophie des chondrocytes de la plaque de croissance [461]. La différenciation hypertrophique de MO-CSM est également inhibée lorsque les voies Smad1/5/8 sont bloquées [462]. La différenciation hypertrophique étant majoritairement contrôlée par RUNX2, il est intéressant de noter l'interaction des voies Smad avec ce facteur de transcription [463,464]. La formation du complexe Smad1/RUNX2 est essentielle pour l'activité transcriptionnelle de RUNX2 alors que l'association de Smad3 avec RUNX2 inhibe ses fonctions [465,466] (Figure 15).

Les membres de la superfamille du TGF-béta sont donc des facteurs clés de la régulation de la différenciation chondrogénique.

En ingénierie tissulaire du cartilage, les membres de la superfamille du TGF-béta majoritairement utilisés sont les TGF-béta1 et 3 ainsi que les BMP2, 6 et 7 [467]. Leurs effets sur la différenciation chondrogénique, observés *in vitro*, varient en fonction de la source tissulaire des CSM, de la dose utilisée, du temps d'exposition des cellules à ces facteurs ainsi que de leurs interactions avec les autres composants du milieu de culture (pour revue consulter : [152,438,467,468]). Il est largement décrit et admis que les membres de la

superfamille du TGF- β induisent la différenciation chondrogénique des CSM. Par ailleurs, la différenciation hypertrophique est également régulée par certains membres de cette famille.

Le retrait du TGF- β du milieu d'induction après 14 jours de culture et l'ajout de facteurs tels que l'hormone triiodothyronine, favorise la différenciation hypertrophique des CSM [268]. Cependant, les CSM maintenues en présence de TGF- β expriment également les marqueurs du phénotype hypertrophique [267,469]. Par conséquent, bien que les TGF- β semblent prévenir la différenciation hypertrophique, probablement *via* l'activation des voies de signalisation smad2/3, ils ne semblent pas suffisant pour inhiber totalement l'apparition de ce phénotype.

De façon intéressante, les BMP semblent avoir différents effets sur la différenciation hypertrophique des cellules chondrogéniques. C'est le cas pour les BMP2 et 7. En effet, les récents travaux de Caron *et al* ont montré que la BMP7 inhibe la différenciation hypertrophique de chondrocytes de la plaque de croissance (ATDC5), de chondrocytes articulaires ainsi que de CSM engagées dans la voie chondrogénique. Ces auteurs montrent que l'effet inhibiteur de la BMP7 du phénotype hypertrophique est médiée par le facteur de transcription Nkx3.2. En effet, Nkx3.2 inhibe l'expression de RUNX2 en se fixant à son promoteur [470]. A l'inverse, ils montrent que la BMP2 induit la différenciation hypertrophique de ces types cellulaires. Les auteurs n'ont cependant pas étudié les voies de signalisation Smad et MAPK [471]. De plus, il semble intéressant de confronter ces données aux travaux de Knippenberg *et al* qui montrent qu'un traitement de courte durée (15minutes) des CSM par la BMP2 ou BMP7 favorise, respectivement, leur engagement soit dans la voie ostéogénique soit chondrogénique [472]. Par conséquent, la BMP2 semble être pro-ostéoblastique alors que la BMP7 semble être pro-chondrogénique.

Pour finir, Hennig *et al* ont comparé l'effet du TGF- β 1, en association avec la BMP6, sur la différenciation chondrogénique de CSM issues de la moelle osseuse et du tissu adipeux. Ils montrent que contrairement aux MO-CSM, la présence de BMP6 est nécessaire pour induire un phénotype chondrogénique des CSA par le TGF- β 1 comparable aux MO-CSM. La BMP6 stimule l'expression du récepteur de type I aux TGF- β , faiblement exprimé par les CSA. Cependant, la différenciation chondrogénique des CSA stimulées par le TGF- β 1 et la BMP6 *in vitro* conduit à la formation d'une matrice composée de collagène de type X et minéralisée *in vivo* [473].

4.3.2.2 Facteurs de croissance des fibroblastes (FGF)

La famille des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) comprend 22 membres [474]. L'importance des FGF au cours du développement squelettique est mise en évidence par le nombre de chondrodysplasies ou craniosynostoses attribuées aux mutations spécifiques des gènes codant pour les récepteurs au FGF, FGFR-1, -2 et -3 [475].

Le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) est un agent hautement mitogène et largement utilisé en ingénierie tissulaire du cartilage pour stimuler la prolifération cellulaire. Il favorise également la différenciation chondrogénique, mise en évidence par le traitement au FGF-2 d'explants de cartilage [476], d'explants de périoste [477] ou de chondrocytes [478] par exemple. En effet, la liaison du FGF-2 aux récepteurs FGFR1-4 active la voie MAPK/ERK conduisant à l'augmentation de l'expression de SOX9 [479].

Le traitement des CSM pendant la phase de prolifération favorise également la différenciation chondrogénique [311,480] alors que son ajout pendant l'induction de la différenciation semble inhiber leur différenciation chondrogénique [481]. Ce dernier point est notamment contesté par l'étude de Chiou *et al.* Ces auteurs ont montré que l'ajout de FGF-2 au milieu chondrogénique stimule la synthèse de collagène de type II et de GAG [482].

L'utilisation d'autres membres de la famille du FGF, FGF-4, -6, -8 et -9 peut être envisagée pour stimuler la prolifération cellulaire [483].

4.3.2.3 Facteurs de croissance apparentés à l'insuline (IGF)

La famille des facteurs de croissance apparentés à l'insuline (IGF) comprend deux peptides hormonaux (IGF-1 et IGF-2), leurs récepteurs IGFR-1 et IGFR-2 ainsi que des régulateurs de l'activité des IGF : six protéines capables de se lier aux IGF (IGF-binding protein ou IGFBP) et de multiples protéinases qui régulent l'activité de l'IGF [484]. L'IGF-2 a un rôle majeur au cours du développement embryonnaire et fœtal, alors que l'IGF-1 est fortement impliqué dans les processus de réparation du cartilage. En effet, l'IGF-1 est considéré comme un médiateur essentiel de l'homéostasie du cartilage. Il participe à l'anabolisme de la MEC en augmentant la synthèse de PG et de collagène de type II *in vitro* et *in vivo* [485] et favorise la prolifération et la survie des chondrocytes [486].

Ainsi, l'ajout d'IGF-1 à des chondrocytes en monocouche ou à un explant de cartilage articulaire a un effet anabolique et réduit la réponse catabolique [487-489]. Par ailleurs, IGF-1 induit la prolifération et la différenciation chondrogénique des CSM [490].

Dans un modèle de défaut cartilagineux chez le cheval, l'IGF-1 seul est capable d'induire la migration des chondrocytes. Associé à l'implantation de chondrocytes, il semble améliorer la réparation tissulaire [491].

Cependant, la réponse des chondrocytes à l'IGF-1 diminue avec l'âge ou dans un contexte d'arthrose, probablement en raison d'une augmentation de l'expression des IGFBP [492] qui diminuent ou préviennent ainsi la liaison des IGF à leurs récepteurs [493].

4.3.2.4 Peptide apparenté à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP)

Le PTHrP est un membre de la famille des hormones parathyroïdiennes. Il est un agent modulateur de la différenciation chondrogénique [97]. Au sein de la plaque de croissance, il participe à la régulation de la chondrogenèse en association avec IHH. Le PTHrP inhibe IHH, inducteur de la prolifération et de la maturation des chondrocytes jusqu'au stade hypertrophique [494,495]. *In vitro*, le PTHrP stimule la prolifération des chondrocytes *via* l'inhibition de p57 [496]. De plus, l'effet inhibiteur du PTHrP sur le phénotype hypertrophique serait médié par son action sur l'activité transcriptionnelle de RUNX2 *via* la voie de signalisation PKA [113].

Le PTHrP induit la différenciation chondrogénique de CSM issues de la moelle osseuse et du tissu adipeux, *via* la stimulation du promoteur de SOX9. Cependant, son effet sur l'expression du collagène de type II semble être dose-dépendant [154,496]. De façon intéressante, l'expression des collagènes de type X et I ainsi que l'expression du facteur de transcription RUNX2 par les CSM cultivées *in vitro* sont inhibées en présence de PTHrP [496,497]. Ces résultats suggèrent que cette hormone non seulement stimule la différenciation chondrogénique des CSM mais également prévient le phénotype fibroblastique et hypertrophique.

4.3.2.5 Modulateurs de la voie des Wntless

Les membres de la famille Wntless (WNT) sont des glycoprotéines riches en cystéines d'environ 350 acides aminés sécrétées dans le milieu extracellulaire. Cette famille contient plus de 20 membres [498]. Les WNT exercent leurs effets par l'activation de voies

canoniques, bêta-caténine dépendantes ou non canoniques, bêta-caténine indépendantes. De nombreux membres de la famille des WNT régulent le développement squelettique en jouant un rôle dans le contrôle de la mise en place du phénotype chondrogénique et hypertrophique. Neuf gènes *WNT* sont exprimés dans la plaque de croissance, *WNT-4*, *-5a*, *-5b*, *-10b* et *-11* à un niveau élevé et *WNT-2b*, *-7b*, *-9a* et *-10a* à un niveau plus faible [499]. La différenciation chondrogénique est bloquée par WNT-1, WNT-4, WNT-7a, WNT-8 et stimulée par WNT-5a et WNT-5b. Par ailleurs, WNT-5a et WNT-5b régulent la prolifération des chondrocytes et leur maturation en chondrocytes hypertrophiques [500,501].

L'activation de la bêta-caténine participe à la mise en place du phénotype hypertrophique en favorisant l'expression de RUNX2 [502] et en diminuant l'activité transcriptionnelle de SOX9 [94]. Récemment, Leijten *et al* ont identifié FRZB (frizzled-related protein) et DKK1 (dickkopf-1) deux inhibiteurs des voies de signalisation WNT et la protéine GREM (gremlin-1), inhibitrice des BMP, comme marqueurs de cartilage articulaire. L'ajout de ces trois facteurs au milieu chondrogénique réduit de façon significative l'expression du collagène de type X et de la phosphatase alcaline [69]. Ainsi, le blocage de la voie bêta-caténine réduit la différenciation chondrogénique hypertrophique *in vitro* [503].

4.4 Contraintes mécaniques

Les contraintes mécaniques exercées sur les articulations sont essentielles au développement et à l'homéostasie du cartilage articulaire. Dans un contexte physiologique, le cartilage articulaire est soumis à différents types de contraintes : compression, pression hydrostatique, tension et cisaillement [504]. Ces contraintes de différente nature jouent un rôle primordial dans le processus de différenciation et l'activité anabolique des chondrocytes en favorisant la synthèse des protéines matricielles et en participant à leur organisation [505]. L'importance des contraintes mécaniques au cours de l'ossification endochondrale a été mise en évidence par plusieurs études *in vitro*. En absence de contraintes mécaniques, il n'y a pas de formation d'un second centre d'ossification. Par opposition, 12 heures de compression dynamique induisent la formation d'une zone hypertrophique et minéralisée [506].

Il a également été démontré *in vitro*, que la sollicitation d'explants de cartilage ou de cellules en culture par des contraintes mécaniques dans une gamme d'intensités et de fréquences physiologiques stimulait la production et l'organisation des composants de la matrice tout en préservant l'apparition d'un phénotype hypertrophique [507-510]. En effet, une force de

compression physiologique, cyclique et intermittente favorise un profil d'expression des gènes chondrogéniques et ce également en absence de TGF-béta [511,512]. La différenciation hypertrophique est également influencée par les contraintes mécaniques. Par exemple, les forces de cisaillement augmentent l'expression des marqueurs hypertrophiques, cet effet serait médié par RUNX2 [513,514].

ETUDES EXPERIMENTALES :

**Optimisation de l'utilisation de cellules stromales du
tissu adipeux pour une application en ingénierie
tissulaire du cartilage**

L'ingénierie tissulaire est considérée comme un outil prometteur pour la réparation des lésions du cartilage articulaire. La stratégie développée au laboratoire INSERM U 791 consiste à combiner des cellules chondrogéniques à un hydrogel d'hydroxypropyl méthylcellulose silanisée (HPMC-Si). Cet hydrogel injectable et auto-réticulant a déjà démontré son potentiel préclinique en ingénierie tissulaire du cartilage lorsqu'il est associé à des chondrocytes autologues, notamment d'origine nasale [278,296,297]. L'utilisation de chondrocytes présentant certaines limites (morbidité du site donneur, perte du phénotype en culture), nous avons souhaité améliorer notre stratégie en associant cet hydrogel à des cellules stromales multipotentes isolées du tissu adipeux (CSA). Cependant, les stratégies d'ingénierie tissulaire du cartilage utilisant les CSM comme cellules réparatrices se heurtent à une problématique majeure: l'engagement et le contrôle de la différenciation chondrogénique [7-9]. La population de CSA étant hétérogène, le potentiel chondrogénique de cellules isolées d'un même tissu est variable. Ainsi, stimuler leur engagement semble nécessaire afin d'implanter une proportion élevée de cellules différenciées et de s'affranchir de la formation d'un tissu fibreux. Par ailleurs, une fois engagée dans la voie chondrogénique, le contrôle de leur différenciation semble indispensable pour prévenir l'apparition du phénotype hypertrophique, responsable de la minéralisation et de la dégradation de la MEC cartilagineuse.

Dans ce contexte, l'objectif de nos travaux fut de déterminer des conditions de différenciation optimales afin d'orienter les CSA vers un phénotype chondrogénique stable et de favoriser ainsi la synthèse d'une matrice cartilagineuse de type hyalin.

D'un point de vue physiologique, les chondrocytes sont soumis à un environnement particulier qui conditionne leur activité biologique. Tout d'abord, *in vivo* les chondrocytes résident dans un environnement tridimensionnel complexe riche en macromolécules hydrophiles comme les GAG qui régulent finement la biodisponibilité des morphogènes au sein de la MEC. [14]. De plus, le cartilage articulaire n'étant pas vascularisé, ces cellules ont développées des adaptations fonctionnelles permettant le maintien de leurs activités dans un environnement faible en oxygène [17,22].

En transposant ces observations à la culture de CSM, nous avons émis l'hypothèse que les facteurs environnementaux telles que la dimensionnalité, la tension en oxygène ou encore la

richesse en GAG pourraient moduler et/ou stabiliser la différenciation chondrogénique des CSA.

1 Dimensionnalité

1.1 Problématique

La culture en trois dimensions de CSM apporte un microenvironnement favorable à la différenciation chondrogénique en stimulant les interactions cellule-cellule et cellule-matrice [277,278]. La différenciation chondrogénique des CSM est communément induite par un système de culture tridimensionnel en « pellet » qui favorise ces interactions.

Par ailleurs, la composition du milieu de culture est également un élément clé pour l'induction et le contrôle du phénotype chondrogénique [438]. Nous nous sommes également demandé dans quelle mesure le milieu d'induction peut influencer la formation d'un tissu chondrogénique *in vivo*.

Dans le but de déterminer les paramètres de culture cellulaire et un procédé d'association des cellules avec l'hydrogel HPMC-Si compatibles avec une procédure facilement applicable à l'ingénierie tissulaire du cartilage, notre premier objectif a été d'étudier l'impact de la culture en deux ou trois dimensions en présence ou non du milieu d'induction sur le potentiel chondrogénique des CSA *in vitro* et *in vivo*.

ARTICLE II : “The effect of two- and three-dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells; after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel”

-Cell Transplantation -

1.2 Résumé

Lorsque le cartilage articulaire est lésé, il ne se répare pas spontanément. L'utilisation de CSM en association avec un hydrogel a donc été prise en considération afin de réparer ces défauts cartilagineux. L'objectif de cette étude est de déterminer les conditions optimales de culture des CSA ainsi que de définir un procédé d'implantation facilement applicable en

ingénierie tissulaire du cartilage. Pour cela, l'influence de la différenciation chondrogénique des CSA *in vitro* (deux ou trois dimensions et présence ou non du milieu d'induction) sur leur capacité à former du cartilage *in vivo* en association avec un hydrogel HPMC-Si a été étudié. Les CSA ont été caractérisées pour leur prolifération, l'expression des marqueurs de surface et leur multipotence. Le potentiel de différenciation chondrogénique *in vitro* des CSA, cultivées au sein de l'hydrogel HPMC-Si en présence de milieu contrôle ou chondrogénique, a été évalué par la mesure des niveaux d'expression de *COL2A1*, *ACAN*, *COMP* et *SOX9* par PCR en temps réel. Des colorations au bleu alcian et immunomarquage pour le collagène de type II ont également été réalisées.

Afin de déterminer si les CSA différenciées dans la voie chondrogénique *in vitro*, peuvent former un tissu cartilagineux *in vivo*, des CSA cultivées en monocouche ou en trois dimensions (pellets) et en présence ou non du milieu d'induction, ont été associées à l'hydrogel HPMC-Si et implantées en site sous-cutané chez la souris nude. La formation de cartilage a été évaluée histologiquement par coloration au bleu alcian et immunomarquage pour le collagène de type II.

Nos données démontrent que les CSA sont capables de proliférer et de s'auto-renouveler. Les CSA expriment également les marqueurs de surface typiques des CSM et sont capables de se différencier vers les lignages adipo- ostéo et chondrogéniques. Les analyses par PCR en temps réel et histologiques indiquent que l'hydrogel HPMC-Si permet la différenciation chondrogénique des CSA en présence de milieu inducteur, comme l'indique l'augmentation du niveau d'expression des marqueurs chondrogéniques. De plus, l'analyse histologique des implants montre que, quelles que soient les conditions de différenciation *in vitro* des CSA (monocouche ou pellet), elles ont la capacité de former un tissu cartilagineux *in vivo*, comme l'indique la présence de glycosaminoglycanes sulfatés et de collagène de type II.

Cette étude suggère qu'une induction de la différenciation chondrogénique en monocouche *in vitro* est suffisante pour obtenir la formation de tissu cartilagineux *in vivo*.

ARTICLE II

The effect of two- and three-dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells; after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel

Christophe MERCERON, Sophie PORTRON, Martial MASSON, Julie LESOEUR, Borhane Hakim FELLAH, Olivier GAUTHIER, Olivier GEFFROY, Pierre WEISS, Jérôme GUICHEUX* Claire VINATIER*

*Equally contributing authors

-CELL TRANSPLANTATION-2011

The Effect of Two- and Three-Dimensional Cell Culture on the Chondrogenic Potential of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells After Subcutaneous Transplantation With an Injectable Hydrogel

Christophe Merceron,*† Sophie Portron,*† Martial Masson,*† Julie Lesoeur,*†
Borhane Hakim Fellah,*†‡¶ Olivier Gauthier,*†‡ Olivier Geffroy,*†§ Pierre Weiss,*†
Jérôme Guicheux,*†¹ and Claire Vinatier*†¶¹

*INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), UMRS 791, Université de Nantes, Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire, Group STEP "Skeletal tissue Engineering and Physiopathology,"

Faculté de chirurgie dentaire, Nantes Cedex 1, France

†PRES-UNAM, UFR Odontologie, Université de Nantes, Nantes, France

‡Ecole Nationale vétérinaire de Nantes (ONIRIS), Service de chirurgie expérimentale (CRIP),

Atlanpôle-La Chantrerie, Nantes Cedex 3, France

§Ecole Nationale vétérinaire de Nantes (ONIRIS), service de chirurgie équine, Atlanpôle-La Chantrerie, Nantes Cedex 3, France

¶Graftys SA-Eiffel Park-Bâtiment D-415, Aix en Provence Cedex 3, France

Articular cartilage is an avascular tissue composed of chondrocytes, a unique cell type responsible for abundant matrix synthesis and maintenance. When damaged, it never heals spontaneously under physiological circumstances. Therefore, the delivery of mesenchymal stem cells using hydrogel has been considered for cartilage repair. This study aims at investigating the influence of *in vitro* chondrogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells (hATSCs) on *in vivo* cartilage formation when associated with a cellulose-based self-setting hydrogel (Si-HPMC). hATSCs were characterized for their proliferation, surface marker expression, and multipotency. The *in vitro* chondrogenic potential of hATSCs cultured within Si-HPMC in control or chondrogenic medium was evaluated by measuring COL2A1, ACAN, SOX9, and COMP expression by real-time PCR. Alcian blue and type II collagen staining were also performed. To determine whether *in vitro* chondrogenically differentiated hATSCs may give rise to cartilage *in vivo*, cells differentiated as a monolayer or in pellets were finally associated with Si-HPMC and implanted subcutaneously into nude mice. Cartilage formation was assessed histologically by alcian blue and type II collagen staining. Our data demonstrate that hATSCs exhibited proliferation and self-renewal. hATSCs also expressed typical stem cell surface markers and were able to differentiate towards the adipogenic, osteogenic, and chondrogenic lineages. Real-time PCR and histological analysis indicated that Si-HPMC enabled chondrogenic differentiation of hATSCs in inductive medium, as demonstrated by increased expression of chondrogenic markers. In addition, histological analysis of implants showed that chondrogenically differentiated hATSCs (monolayers or pellets) have the ability to form cartilaginous tissue, as indicated by the presence of sulphated glycosaminoglycans and type II collagen. This study therefore suggests that an *in vitro* induction of hATSCs in 2D was sufficient to obtain cartilaginous tissue formation *in vivo*. Si-HPMC associated with autologous hATSCs could thus be a significant tool for regenerative medicine in the context of cartilage damage.

Key words: Tissue engineering; Cartilage; Hydrogel; Human adipose-derived stem cells (hATSCs); Chondrogenic differentiation

INTRODUCTION

Articular cartilage (AC) is a highly specialized connective tissue that covers the end of bone and forms the smooth surface on joints. It is composed of chondro-

cytes, a unique cell type responsible for an abundant extracellular matrix (ECM) synthesis and maintenance (13). This matrix is composed of collagens and proteoglycans, mainly type II, IX, and XI collagens and aggrecan (1,24). The collagen network gives AC its shape

Received July 29, 2010; final acceptance December 21, 2010. Online prepub date: February 3, 2011.

¹These authors provided equal contribution to this work.

Address correspondence to Prof. Jérôme Guicheux, Ph.D., INSERM U 791, Laboratoire d'ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire (LIOAD), Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France. Tel: +33 240412919; Fax: +33 240083712; E-mail: jerome.guicheux@inserm.fr

and strength, while proteoglycans contribute to hydrophilicity and resistance to mechanical stress.

AC is an avascular and aneural tissue (25,44) and, as a consequence, damaged or degenerative AC never heals spontaneously under normal circumstances. Therefore, damage to the articular surface is irreversible and may lead to long-term joint degeneration.

Surgical treatments such as subchondral drilling or autologous periosteum (34), perichondrium (10), and osteochondral (30) tissue transplants were initially considered in early studies. However, none of these techniques resulted in a complete regeneration of native cartilage (22,25,38). Consequently, the development of cell-based therapies for the regeneration of AC has recently been contemplated (51). Among the various cell-based therapies that have been investigated, autologous chondrocyte transplantation (ACT) (11) is currently the only one that is FDA approved. This technique, however, has significant limitations such as donor site morbidity and the dedifferentiation of chondrocytes towards a fibroblastic phenotype in monolayer culture (7). Consequently, this invasive surgery ultimately leads to the formation of fibrous transitory cartilage that is biochemically and biomechanically inferior to healthy articular cartilage.

For these reasons, much research has focused on finding alternative sources of cells for cartilage repair. This research has led to the identification of autologous mesenchymal stem cells (MSCs) as candidate cells for the regeneration of tissues or organs. Their self-renewal, long-term viability, and multilineage differentiation potential make them particularly suitable. Adult MSCs were initially isolated from bone marrow (4,28,33) and characterized for their ability to proliferate in culture and to differentiate into a wide variety of cell types in response to the appropriate culture system (32). However, bone marrow sampling is an uncomfortable and painful procedure and the heterogeneity of the sample, which contains both hematopoietic and mesenchymal stem cells, reduces the number of MSCs obtained. Adipose tissue, like bone marrow, derives from the embryonic mesenchyme and contains multipotent cells (56). This tissue type has the advantage of being obtained under local anesthesia with relatively little discomfort and less donor site morbidity. It also contains MSC in larger numbers than in bone marrow (27). Human adipose-derived stem cells (hATSCs) have also been shown to have multilineage potential, forming bone, cartilage, and fat (3,55). hATSCs therefore provide a promising alternative to chondrocytes and bone marrow MSCs for cartilage tissue engineering (23,46).

Tissue engineering strategies combining environmental factors and biomaterials to induce the commitment of MSCs to a chondrogenic phenotype show considerable

promise as a mean of regenerating cartilage (35). Three-dimensional cultures within biomaterials are known to provide a suitable environment for the induction and maintenance of the chondrogenic phenotype (14,15,51,52). To date, various biomaterials have been evaluated for cartilage repair, including protein-based, polysaccharide-based, and synthetic matrices (25). Unfortunately, some of these have been reported to induce inflammatory responses *in vivo*. Within this context, we have developed a self-setting hydrogel consisting of silanized hydroxypropylmethyl cellulose (Si-HPMC) (8). Si-HPMC hydrogel has previously been shown to stimulate the chondrogenic potential of chondrocytes both *in vitro* in 3D culture and *in vivo* (47,49,50).

Given these data, we became interested in the potential breakthrough that the association of hATSCs and Si-HPMC could make in the development of biomaterial-assisted cell therapy for cartilage repair.

This study therefore aimed at investigating the influence of the *in vitro* chondrogenic differentiation conditions of hATSCs on *in vivo* cartilage formation when associated with Si-HPMC hydrogel. We first characterized MSCs isolated from human adipose tissue for their propensity to self-renew, to express cell surface markers, and to differentiate into adipogenic, osteogenic, and chondrogenic lineages. Next, we evaluated the *in vitro* chondrogenic potential of hATSCs cultured within Si-HPMC hydrogel. To conclude, we investigated the ability of a hybrid construct combining hATSCs and Si-HPMC hydrogel to form neocartilage *in vivo*. To this end, hATSCs were predifferentiated *in vitro* in monolayers or pellets prior to injection with Si-HPMC into subcutaneous pockets in nude mice.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) E4M1 was purchased from Colorcon-Dow chemical (Bougival, France). Glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) was obtained from Acros (Geel, Belgium). Cell culture plastic wares were purchased from Corning BV (Schipol-Rijk, The Netherlands). Hank's balanced sodium salt (HBSS), Dulbecco's modified Eagle medium high glucose (DMEM, 4.5 g/L), phosphate-buffered saline (PBS), penicillin/streptomycin, trypsin/EDTA (0.05%/0.53 mM), L-glutamine, and superscript III kit were obtained from Invitrogen Corporation (Paisley, UK). 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), collagenase crude type IA, red blood cell lysis buffer, trypan blue, sodium L-ascorbate, vitamin D₃, insulin transferrin sodium selenite (ITS) media supplement, dexamethasone, 1-methyl-3-isobutylxanthine (IBMX), indomethacin, crystal violet, alizarin red S, alcian blue, and Oil

Red O were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Rosiglitazone was obtained from Cayman chemical (Ann Arbor, MI). Brilliant® SYBR® Green Master Mix was obtained from Stratagene (La Jolla, CA). PCR primers were synthesized by MWG Biotech (Ebersberg, Germany). Fetal calf serum (FCS) was purchased from Dominique Dutscher (Brumath, France). Monoclonal antibody directed against human type II collagen was purchased from MP Biomedicals (Solon, OH). β -Glycerolphosphate was obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Anti-human CD29 and CD105 fluorescein isothiocyanate-conjugated antibodies and CD44, CD49d, CD90, CD34, and CD45 phycoerythrin-conjugated antibodies were obtained from Becton Dickinson (Franklin Lake, NJ). Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) was obtained from PeproTech Inc. (London, UK). Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (STREPTA PER) was obtained from Dako (Glostrup, Denmark). An RNeasy micro kit was purchased from Qiagen (Courtaboeuf, France). All other chemicals were obtained from standard laboratory suppliers and were of the highest purity available.

Characterization of Human ATSC

Cell Isolation. hATSCs were isolated by collagenase digestion of lipoaspirates obtained from three different patients undergoing liposuction and who had given their informed consent. All protocols were approved by the French national ethical committee. Briefly and as previously described (20,36), lipoaspirates were washed extensively with HBSS to remove debris. Washed lipoaspirates were treated with collagenase (0.025%) in HBSS for 1 h at 37°C with gentle agitation. The collagenase treatment was inactivated by adding an equal volume of DMEM containing 1% penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine, and 10% FCS (control medium). The digested product was then centrifuged at $250 \times g$ for 5 min to separate adipocytes from stromal cells. The supernatant was removed and cells were resuspended in the control medium and filtered through a 70- μ m nylon mesh filter. The filtrate was centrifuged and cells resuspended in red blood cell lysis buffer. The lysis reaction was stopped by adding control medium. The suspension was centrifuged and cells were finally resuspended in control medium and plated at 5×10^4 cells/cm² in 75-cm² culture flasks. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air and the culture medium was replaced 24 h after seeding to remove nonadherent cells. Thereafter, the culture medium was renewed every 2–3 days. To prevent spontaneous differentiation, hATSC primary cultures (P0) were grown to 90% confluence and then detached from

the cell culture flask using trypsin/EDTA. For all subsequent experiments hATSCs were used at passage 2.

Proliferation Assay. hATSCs were plated at a density of 1×10^4 cells/cm² in 24-well plates and maintained in control medium. Cells were detached daily with trypsin/EDTA and counted using trypan blue exclusion dye. hATSCs from P0 to P3 were monitored over a 14-day period for each passage. Results were expressed as doubling time. Cell doubling time (DT) and cell doubling number (CD) were calculated from counts (N_f : final cell number, N_i : initial cell number) and cell culture time (CT) according to the following 2 formulae: $CD = \ln(N_f/N_i)/\ln(2)$, and $DT = CT/CD$.

Clonogenic Assay for Fibroblastoid-Like Colony Formation (CFU-F). hATSCs were plated at a density of 10 cells/cm² in 100-mm petri dishes and cultured in the presence of control medium. After 14 days, cells were rinsed with prewarmed PBS, fixed, and stained at room temperature with 0.5% crystal violet in methanol for 30 min and afterwards gently rinsed with PBS. Colonies were counted using a phase contrast light microscope and aggregates of >50 stained hATSCs were considered as positive for CFU-F (40). Results were expressed as the percentage of cells able to form colonies.

Flow Cytometry. hATSCs (from P0 to P2) were characterized by flow cytometry using anti-human CD29 and CD105 FITC-conjugated antibodies and anti-human CD44, CD49d, CD90, CD34, and CD45 PE-conjugated antibodies (36). The adherent hATSCs were detached using trypsin/EDTA, centrifuged for 1 min at $1,200 \times g$, and resuspended in PBS/BSA (1%)/sodium azide (5%). Aliquots containing 2×10^5 hATSCs were incubated with antibodies for 15 min at 4°C. The suspended hATSCs were washed and then analyzed using a FACSCalibur fluorescence-activated cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ). For each sample, 10,000 events were acquired and analyzed using CELLQUEST software. Results were expressed as the percentage of positive cells compared with the isotype-matched negative control antibodies on histogram plots.

Multipotent Cell Differentiation Assay

For the in vitro adipogenic differentiation of hATSCs, cells were seeded at a density of 3×10^4 cells/cm² in six-well plates and cultured either in the presence of control or adipogenic medium for 14 days. The adipogenic medium consisted of the control medium supplemented with 1 μ M dexamethasone, 0.5 mM IBMX, 200 μ M indomethacin, 10 μ g/ml insulin, 10 μ g/ml transferin, 10 ng/ml sodium selenite, and 5 μ M rosiglitazone. hATSCs were maintained at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂ and 95% air). Media were changed every 2–3

days. Adipogenesis of hATSCs was assessed by staining cells with Oil Red O for the lipid droplet detection. hATSCs cultured as described above were washed with ice-cold PBS and fixed in 10% formalin successively for 5 min and 1 h with fresh formalin at room temperature. The formalin was then discarded and the wells rinsed with 60% isopropanol. Once the wells had completely dried, 0.35% Oil Red O solution in 60% isopropanol was added for 10 min. Stained cells were extensively washed with deionized water to remove any nonspecific staining. Samples were visualized using a light microscope (Zeiss Axioplan 2, Göttingen, Germany) with red staining, indicating the presence of lipid droplets.

For the *in vitro* osteogenic differentiation of hATSCs, cells were seeded at a density of 1×10^4 cells/cm² in six-well plates and cultured either in the presence of control or osteogenic medium for 28 days, as previously described (36). The osteogenic medium was composed of the control medium supplemented with 10 mM β -glycerophosphate, 50 μ M sodium L-ascorbate, and 10 nM vitamin D₃. hATSCs were maintained at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂ and 95% air). Media were changed every 2–3 days. Osteogenesis was evaluated by the deposition of calcified matrix that was detected using Alizarin Red S staining as previously described (36). Briefly, hATSCs cultured as described above were washed with cold PBS and stained with 2% Alizarin Red S solution for 2 min. Stained samples were extensively washed with deionized water to remove nonspecific staining. Samples were visualized using a light microscope with red staining, indicating the presence of calcium deposits.

For the *in vitro* chondrogenic differentiation of hATSCs, 5×10^5 cells were placed into a 15-ml polypropylene tube containing 1 ml of control medium, as previously reported (36). They were then centrifuged for 5 min at $250 \times g$. The tubes were fitted with vented caps to permit gas exchange, and the cell pellets were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air. After 24 h, pellets of hATSCs were divided into two experimental groups and cultured either in the presence of control (CT) or chondrogenic (CH) medium. The chondrogenic medium was composed of serum-free control medium supplemented with 1% L-glutamine, 6.25 μ g/ml insulin, 6.25 μ g/ml transferrin, 6.25 ng/ml sodium selenite (ITS), 50 nM sodium L-ascorbate, 10^{-8} M dexamethasone, and 10 ng/ml TGF- β 1. Culture media were changed every 2–3 days for 28 days (12).

Chondrogenesis was evaluated by the production of sulphated glycosaminoglycans (GAG). GAG production was investigated on pellets by alcian blue staining. Pellets were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections (5 μ m thick) were deparaffinized with toluene, rehydrated through a graded series of etha-

nol, and rinsed in distilled water. Sections were then stained with alcian blue. Samples were visualized using a light microscope (Zeiss Axioplan 2, Göttingen, Germany) (36). Alcian blue staining indicated the presence of sulphated GAG.

Three-Dimensional Chondrogenic Differentiation of hATSCs Into Si-HPMC Hydrogel

Preparation of Si-HPMC Hydrogel. As previously described, the synthesis of Si-HPMC was performed by grafting 14.24% of 3-glycidioxypropyltrimethoxysilane onto E4M1 in heterogeneous medium (9). 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, 20 min). To allow the formation of a reticulated hydrogel, the solution was finally mixed with 0.5 volume of 0.26 M HEPES buffer. Final product is a viscous liquid at pH 7.4, allowing cell incorporation. The mixture cell/hydrogel then reticulates in approximately 30 min as described previously (9,21).

Culture of hATSCs in Si-HPMC. As previously described hATSCs were collected and gently mixed with Si-HPMC hydrogel, prepared (49) at a density of 2×10^6 cells/ml of hydrogel. The hATSC/Si-HPMC mixture (1 ml) was seeded in 12-well plates and incubated at 37°C and 5% CO₂. After a 2-h incubation, control medium was added. After 24 h, hATSC/Si-HPMC constructs were separated into two experimental groups and cultured either in the presence of control or chondrogenic medium. hATSCs were maintained at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂ and 95% air) for 21 days. Media were changed every 2–3 days.

Analysis of the Chondrogenic Differentiation of hATSCs. For real-time PCR analysis, total RNA was extracted from the construct samples using an RNeasy micro kit in accordance with the manufacturer's instructions. After DNase I digestion, RNA was quantified using a UV-spectrophotometer (Nanodrop ND-1000, Labtech, Palaiseau, France) and the quality was determined with the Agilent Bioanalyser 2100 system. One microgram of RNA per sample was reverse-transcribed using the superscript III kit in a total volume of 20 μ l. Complementary DNA (cDNA) was amplified in a total volume of 25 μ l PCR reaction mix containing 12.5 μ l of Brilliant® SYBR® Green Master Mix (1 $\times$) and 30 nM of SYBR green reference dye. The sequence and concentration of each primer set are provided in Table 1. The real-time PCR was carried out in a MX3000P® real-time PCR system (Stratagene) under the following conditions: 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 1 min at 60°C, and 30 s at 72°C. The efficiency and specificity of each primer set were confirmed with standard curves of cycle threshold (Ct) values versus serial dilu-

Table 1. Sequences of Primer Pairs, Gene Bank Accession Numbers Used for Real-Time RT-PCR Analysis, and Size of PCR Products

Gene	Gene Bank Accession Number	Sequence	Base Pairs (bp)
β -ACTIN	NM_001101	Forward 5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3' Reverse 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'	97
Type II collagen (<i>COL2A1</i>)	NM_001844	Forward 5'-TGTCAGGGCCAGGATGTC-3' Reverse 5'-ATCATTATACCTCTGCCCATCC-3'	63
Aggrecan (<i>ACAN</i>)	NM_001135	Forward 5'-CCTCCCCTTCACGTGTAAAA-3' Reverse 5'-GCTCCGCTTCTGTAGTCTGC-3'	64
Sex determining region Y-box 9 (<i>SOX9</i>)	NM_000346	Forward 5'-GTACCCGCACTTGCACAAC-3' Reverse 5'-TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC-3'	72
Cartilage oligomeric matrix protein (<i>COMP</i>)	NM_000095	Forward 5'-GCACCGACGTCAACGAGT-3' Reverse 5'-TGGTGTGATACAGCGGACT-3'	63

tion of total RNA and melting profile evaluation. Cycle thresholds were normalized to β -actin to control for cDNA quantification differences. Results were reported as relative expression levels.

For histological and immunohistological analysis, as described above, construct samples were prepared in the same manner as pellets. Tissue sections were stained with alcian blue and immunostained for type II collagen as previously described (36). Human nasal cartilage sections were used as a positive control. As a negative control, sections were processed using identical protocols, but omitting the primary antibody. Sections were then visualized using a light microscope with immunopositive areas exhibiting brown staining.

In Vivo Chondrogenic Potential of hATSCs

To investigate whether constructs associating Si-HPMC and hATSCs enable the formation of a cartilaginous tissue in vivo, we implantated constructs into subcutaneous pockets of 1-month-old nude mice (Swiss nude mice, Charles River, L'Arbresle, France). hATSCs were cultured in monolayers (10,000 cells/cm²) (2D) or in pellets (3D) in the presence of control or chondrogenic medium for 3 weeks. At the end of the culture period, cells or pellets were histologically processed for alcian blue staining. Samples were also processed for transcript analysis by real-time PCR as described above.

For implantation into nude mice, human ATSC were cultured for 3 weeks in monolayers (10,000 cells/cm²) (2D) or in pellets (3D) in the presence of control or chondrogenic medium. Cells cultured in 2D were individualized and collected by trypsin/EDTA treatment, an additional digestion step using collagenase was needed to properly disrupt the pellets. Briefly, pellets were

treated with collagenase (0.25 mg/ml) in HBSS for 30 min at 37°C under constant stirring. Collagenase was inactivated by adding an equal volume of control medium. Pellets were then disrupted through repeated pipetting. Cells were finally centrifuged at 250 × g for 5 min. Individualized hATSCs (5 × 10⁵) were gently mixed with 250 μ l of Si-HPMC hydrogel prior its reticulation and implanted subcutaneously into nude mice as previously described (48). Si-HPMC was also exclusively implanted and used as a negative control. Primary horse nasal chondrocytes (HoNC) were associated (5 × 10⁵ HoNC/250 μ l Si-HPMC) with Si-HPMC and injected subcutaneously to serve as a positive control. According to a protocol modified from (47), HoNC were isolated from the nasal cartilage of an 18-month-old adult female horse. Briefly, the nasal septum was 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 HoNC were plated at a density of 1 × 10⁴ cells/cm² in 25-cm² culture flasks and cultured in control medium. The cells were maintained for 21 days at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and the culture medium was changed every 2–3 days.

The six different conditions (hATSCs cultured in 2D CT, 2D CH, 3D CT, 3D CH, HoNC, and Si-HPMC alone) were tested in triplicate and nine animals received implants (two implants per animal). Animal care was provided at the experimental therapeutic unit of the Nantes medical school in compliance with European directives for conducting animal experiments. Animals were sacrificed 5 weeks after implantation and the sam-

ples were processed histologically as described above. A double-blind randomized scoring was performed by two well-versed independent examiners on each section ($n = 3$ per replicate) to evaluate the nodule density, the alcian blue staining and the type II collagen immunostaining intensity (a score from 0 to 4 for each criterion with the highest score awarded reflecting the best condition).

Statistical Analysis

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

RESULTS

Cell Characterization

Firstly, we aimed at characterizing mesenchymal stem cells isolated from the stromal vascular fraction (SVF) of human adipose tissue for their ability to proliferate and to self-renew. To this end, the ability of hATSCs to proliferate in culture as well as their propensity to self-renew by forming fibroblastic colonies was evaluated at different passages (from P0 to P2). hATSCs were found to exhibit fibroblast-like morphology and were able to proliferate with a doubling time of 5.15 ± 0.79 days. Moreover, this proliferation rate was constant over time and number of passages (data not shown). In addition, $1.13 \pm 0.13\%$ of cells from the SVF were able to form colonies, as measured by CFU-F assay.

Secondly, mesenchymal stem cells are known to express typical surface markers. Therefore, the expression of cell surface markers associated with adult stem cell phenotype was investigated by flow cytometry on hATSCs from passages 0 and 2. The hATSCs strongly expressed the stem cell markers CD29, CD44, CD49d, CD90, and CD105 (Fig. 1) but were negative for the hematopoietic and macrophage/monocyte cell markers CD34 and CD45 (Fig. 1). Considered together, these data demonstrate that the SVF of human adipose tissue contains a cell population exhibiting adult stem cell features such as the ability to proliferate in culture, to self-renew, and to express typical surface markers.

Multidifferentiation Potential

As described previously (36), another major characteristic of adult MSCs is their ability to differentiate towards multiple lineages. Adipogenesis, osteogenesis, and chondrogenesis are the three differentiation pathways most commonly described for MSCs. Consequently, to evaluate their multilineage differentiation potential, hATSCs were differentiated towards adipogenesis, os-

teogenesis, and chondrogenesis. Cells cultured in control medium were negative for lipid droplet detection (Fig. 2a). In contrast to this, hATSCs treated for 14 days with adipogenic medium exhibited positive Oil Red O staining, revealing the presence of vacuoles containing neutral lipids (Fig. 2b). After a 28-day period, control cultures did not form cell aggregates and were negative for mineral deposition (Fig. 2c). As expected, in the presence of osteogenic medium, hATSCs formed cell nodules positively stained by alizarin red, demonstrating the deposition of a mineralized matrix (Fig. 2d). Finally, control cells cultured in pellet did not show specific staining (Fig. 2e), whereas chondrogenically differentiated hATSCs displayed positive alcian blue staining (Fig. 2f), demonstrating a high content of sulphated GAG. Taken together, these results highlight the *in vitro* adipogenic, osteogenic, and chondrogenic potential of hATSCs.

In Vitro Chondrogenic Potential of hATSCs in Si-HPMC

Prior to testing the ability of hATSC to form cartilage *in vivo* when transplanted with Si-HPMC, we sought to investigate whether hATSCs could differentiate towards the chondrogenic lineage when cultured three-dimensionally within Si-HPMC hydrogel. For this purpose, hATSCs were cultured within Si-HPMC hydrogel in the presence of chondrogenic or control medium for a 28-day period. The expression of transcripts encoding *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*, and *COMP* was evaluated by real-time PCR. The expression levels of these mRNA substantially increased for hATSCs cultured in chondrogenic medium compared to the control condition, with a significant 8-, 123-, 4.5-, and 36-fold increase for *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*, and *COMP*, respectively (Fig. 3A). The production of a cartilaginous matrix was also evaluated by alcian blue staining for the presence of sulphated GAG (Fig. 3B, a, b) as well as the specific detection of type II collagen by immunostaining (Fig. 3B, c, d). The histological evaluation demonstrated that only hATSCs cultured in chondrogenic medium displayed nodules positive for sulphated GAG (Fig. 3B, b) and type II collagen (Fig. 3B, d).

Taken together, these data demonstrate that the Si-HPMC hydrogel provides a three-dimensional environment allowing for the *in vitro* differentiation of hATSCs towards the chondrogenic lineage.

In Vivo Cartilaginous Tissue Formation

To determine whether *in vitro* differentially cultured hATSCs can comparably give rise to cartilaginous tissue, we subsequently conducted an *in vivo* implantation experiment. hATSCs were cultured for a 3-week period in monolayers (2D) or pellets (3D) and in the presence

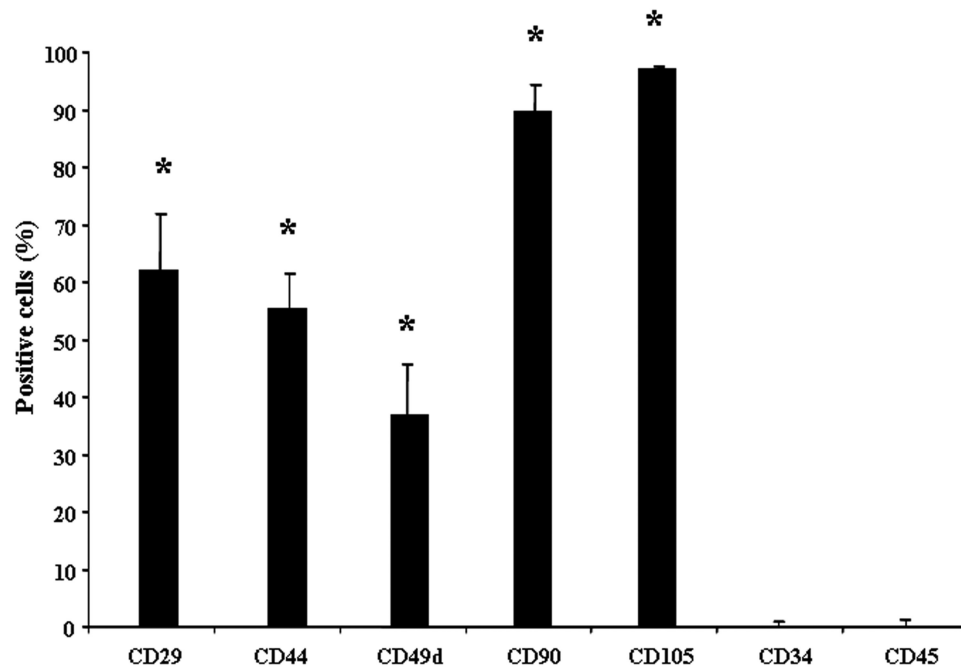


Figure 1. Characterization of human adipose tissue-derived stem cells (hATSCs) at P2. Flow cytometric analysis of hATSC for CD29, CD44, CD49d, CD90, CD105, CD34, and CD45 expression. Cytometric analysis was performed as described in the Materials and Methods section. Results are expressed as the percentage of positive cells in the whole population ($n = 3$). * $p < 0.05$ compared with the isotype-matched control antibodies.

of control or chondrogenic medium. After the 3-week period of in vitro culture, chondrogenic differentiation of hATSCs was investigated. Moreover, hATSCs from the same experiment were injected in association with Si-HPMC into subcutaneous pockets of nude mice for a 5-week period.

To find out whether differentially cultured hATSCs express mRNA encoding the major phenotypic chondrocyte markers, the levels of *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*, and *COMP* transcripts were investigated by RT-PCR. Overall, the expression level of all the chondrogenic markers measured was the highest for cells cultured in pellets and in the presence of chondrogenic medium (Fig. 4A). In fact, the expression levels of *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*, and *COMP* were significantly higher in 3D chondrogenic than in 2D chondrogenic and 3D control conditions. Of note, inductive medium favored the expression of chondrogenic markers (*COL2A1* and *COMP*) regardless of whether hATSCs were grown in monolayers or pellets. In addition, 3D culture was found to stimulate *COL2A1* and *SOX9* independently of the presence of control or chondrogenic medium. To further document the chondrogenic differentiation of hATSCs, we also assessed whether hATSCs produced GAG. The histological analysis revealed that hATSCs cultured in monolayers were unable to synthesize GAG even in the

presence of chondrogenic medium (Fig. 4B). On the contrary, the hATSCs cultured in pellets and in the presence of chondrogenic medium expressed GAG (Fig. 4C, b). We therefore next analyzed the production of type II collagen in these conditions. The accumulation of this typical cartilage matrix protein was shown for the 3D-cultured and chondrogenically differentiated hATSC (Fig. 4C, d). These results indicate that only 3D pellet culture in the presence of chondrogenic medium supports the concomitant production of GAG and type II collagen in the ECM.

Ultimately, in order to ascertain whether hATSCs from the same experiment were able to form cartilaginous tissue in vivo, they were injected in association with Si-HPMC into the subcutaneous pockets of nude mice. After 5 weeks of implantation, the mice were sacrificed and explant sections were stained with alcian blue as well as immunostained for type II collagen. The histological examination revealed the formation of nodules for hATSCs that had been cultured in the presence of chondrogenic medium as either monolayers (2D) (Fig. 5A, c, d) or pellets (3D) (Fig. 5A, g, h). These nodules exhibited positive alcian blue staining and type II collagen immunostaining, suggesting the production of a cartilaginous matrix. On the contrary, in the presence of control medium (Fig. 5A, a, b, e, f), no nodule

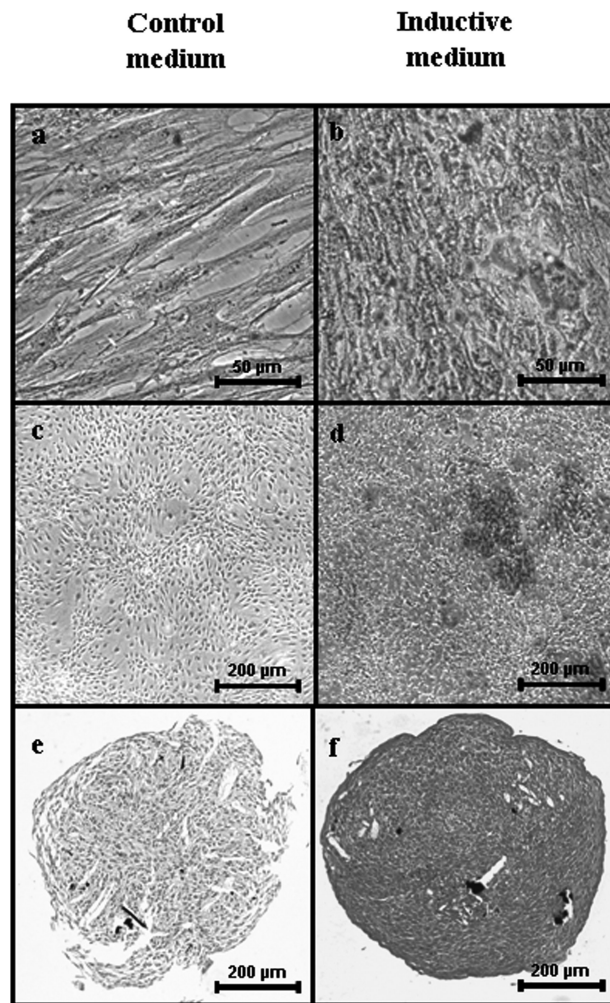


Figure 2. Histological analysis of the multilineage differentiation capacity of hATSCs. Human ATSCs were cultured in control medium (a, c, e) or in inductive adipogenic (b), osteogenic (d), and chondrogenic (f) medium as indicated in the Materials and Methods section. Adipogenesis was detected by the formation of neutral lipid vacuoles stainable with Oil Red O (a, b). Scale bar: 50 μ m. Osteogenesis was demonstrated by the deposition of a mineralized matrix indicated by alizarin red staining (c, d). Scale bar: 200 μ m. Chondrogenesis was evaluated after 28 days in pellet culture by alcian blue staining (e, f). Scale bar: 200 μ m.

formation could be detected. Primary horse nasal chondrocytes used as positive controls were also implanted and displayed chondrocyte nodule formation containing sulphated GAG and type II collagen (Fig. 5A, I, j). Si-HPMC used exclusively as a negative control did not show tissue formation (data not shown). To quantitatively assess the formation of nodules and the production of sulphated GAG and type II collagen, a histological scoring system was elaborated. Such scoring confirmed a significant difference between hATSC cul-

tured in monolayers or in pellets and in chondrogenic medium in comparison to their respective controls (Fig. 5B). Of note, while the histological features of the nodules were different, no statistical difference was observed between the 2D and 3D groups for the same culture medium (Fig. 5B). These results indicate that hATSCs cultured in chondrogenic medium, regardless of its dimension, and associated with Si-HPMC hydrogel, are able to form nodules with cartilaginous features, in a subcutaneous site.

DISCUSSION

When damaged, AC always fails to heal spontaneously under physiological circumstances. Therefore, injuries are irreversible and may lead to cartilage degeneration and to loss of joint function. Within this context, strategies associating autologous MSC such as hATSCs and biomaterials show considerable promise for repairing articular cartilage.

In the present study, our objectives were to investigate whether a Si-HPMC hydrogel could be a suitable scaffold for (i) supporting hATSC chondrogenic differentiation in vitro and (ii) allowing the transplantation of differentially precommitted cells and the formation of a cartilaginous tissue in nude mice.

In a first set of experiments, we sought to characterize adherent cells from the stromal vascular fraction of human adipose tissue. Proof of their proliferation, self-renewal, expression of typical MSC surface markers as well as their capacity for multilineage differentiation was obtained by our study. These results indicate that hATSCs display several stem cell characteristics (17). Our subsequent objective was to associate hATSCs with Si-HPMC hydrogel for cartilage tissue engineering. To this end, the question was firstly posed as to whether Si-HPMC may be a suitable scaffold for supporting the chondrogenic differentiation of hATSCs. When placed in chondrogenic conditions, hATSCs cultured within Si-HPMC hydrogel were still able to undergo chondrogenic differentiation. The major chondrocyte phenotypic markers, *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*, and *COMP*, were found to be expressed at the mRNA level. Moreover, sulphated GAGs and type II collagen were accumulated within the extracellular matrix. These data demonstrate that Si-HPMC hydrogel is a biomaterial providing a 3D environment able to support the in vitro chondrogenic differentiation of hATSCs. This beneficial effect of 3D culture within Si-HPMC hydrogel is in all likelihood due to its ability to allow rounded cell morphology, one of the characteristics critical to obtaining the chondrocytic phenotype (2,19). Additionally, it is well known that a 3D environment involving cell/cell or cell/matrix interactions is required for proper chondrogenic differentiation (7,19,29,31). Moreover, 3D culture within ma-

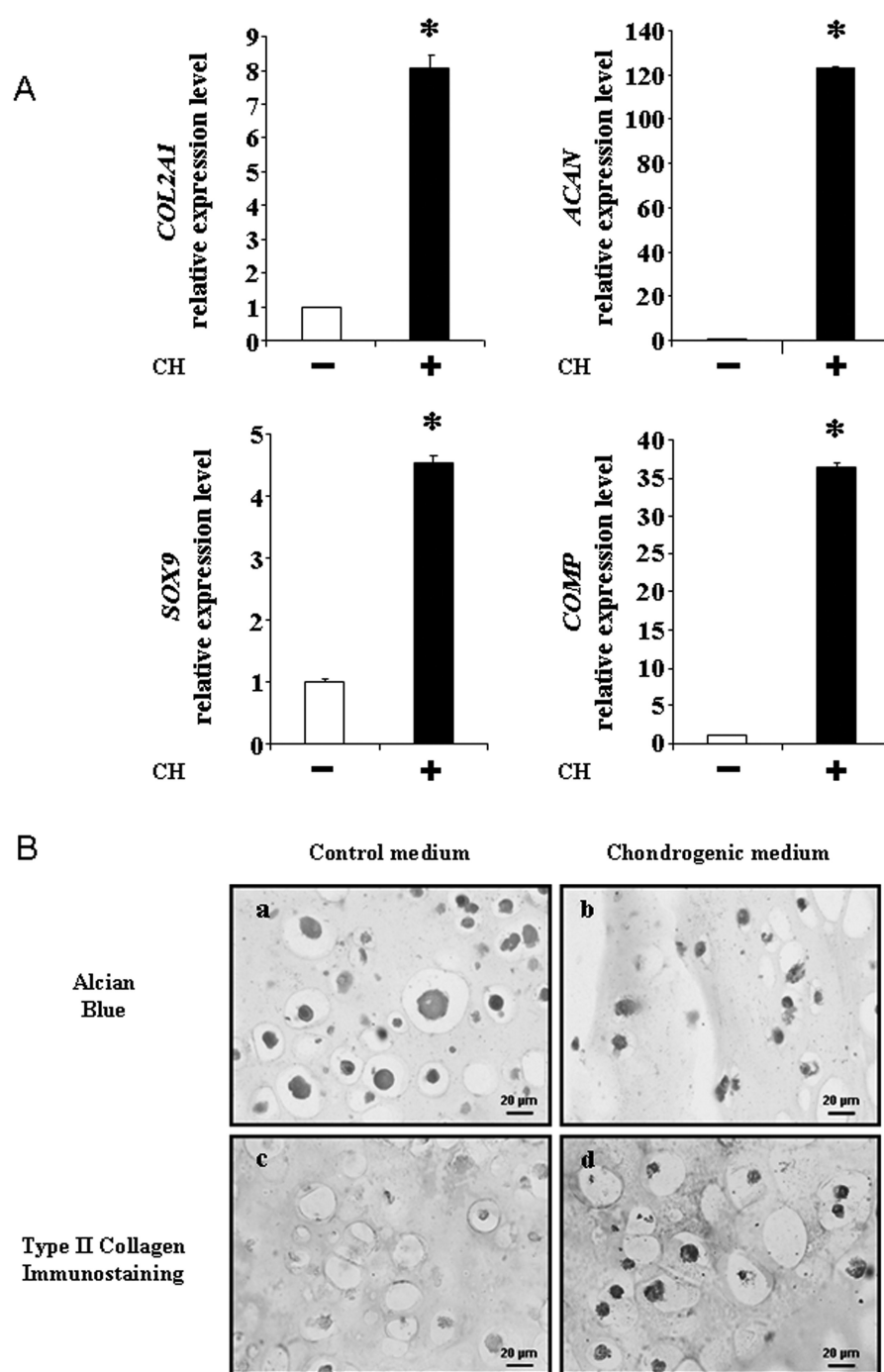


Figure 3. Analysis of the chondrogenic differentiation of hATSCs cultured in Si-HPMC. (A) Analysis of the expression levels of transcripts encoding for *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*, and *COMP* after 28 days of three-dimensional chondrogenic differentiation of hATSCs within Si-HPMC hydrogel. Expressions of the chondrogenic markers *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*, and *COMP* were investigated by real-time PCR, as described in the Materials and Methods section. Results are expressed as relative expression level compared to the control condition in the absence of chondrogenic medium. * $p < 0.05$. (B) Histological and immunohistological analysis of hATSCs after 21 days of three-dimensional chondrogenic differentiation within Si-HPMC hydrogel. The presence of sulphated glycosaminoglycans and type II collagen was investigated by alcian blue staining (a, b) and type II collagen immunostaining (c, d) respectively. Scale bar: 20 μm .

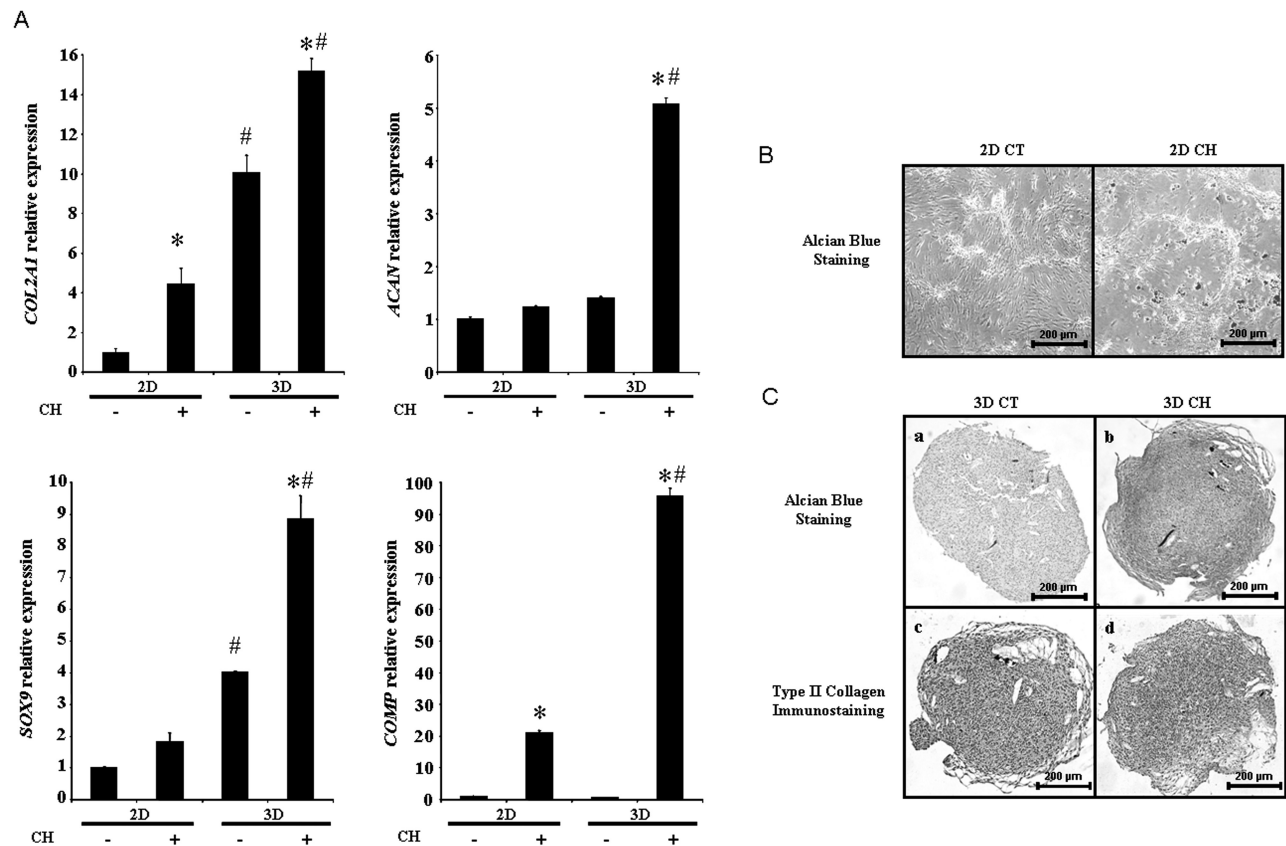


Figure 4. Analysis of 2D and 3D differentiation of hATSCs. (A) Analysis of the expression levels of transcripts coding for *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*, and *COMP* in hATSCs after 21 days of chondrogenic differentiation in monolayer or three-dimensional pellet culture. Expression of the chondrogenic markers *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*, and *COMP* was investigated by real-time PCR. Results are expressed as relative expression level compared to the control condition in the absence of chondrogenic medium. * $p < 0.05$ compared to control medium (-) for the same dimension and # $p < 0.05$ compared to 2D dimension for the same medium. (B) Histological and immunohistological analysis of hATSC after 21 days of chondrogenic differentiation in monolayer culture. The presence of sulphated glycosaminoglycans was investigated by alcian blue staining. Scale bar: 200 μ m. (C) Histological and immunohistological analysis of hATSC after 21 days of chondrogenic differentiation in three-dimensional pellet culture. The presence of sulphated glycosaminoglycans and type II collagen was investigated by alcian blue staining (a, b) and type II collagen immunostaining (c, d), respectively. Scale bar: 200 μ m.

trix can also be a more potent differentiation cue for MSCs than standard induction cocktails, as has been previously demonstrated for osteogenesis and adipogenesis (5,6,16).

The ideal biomaterial for stem cell-based cartilage tissue engineering should not only allow the maintenance of the chondrocyte differentiation state or the chondrogenic differentiation of MSCs but should also enable their transplantation via a mini-invasive surgical protocol in vivo.

Consequently, to decipher whether Si-HPMC hydrogel could represent this ideal scaffold, we investigated its ability to support the transfer of hATSC and the formation of cartilage tissue in vivo. In a first attempt, among the various in vitro conditions tested (2D CT, 2D CH, 3D CT, and 3D CH), the question was to know

which one might meet the efficient criteria to form cartilage tissue and its feasibility within the context of a cartilage tissue engineering application. Based on our real-time RT-PCR and histological analyses, hATSCs cultured in 3D CH were considered the most suitably committed cells as compared to those cultured in 2D or in 3D but in the absence of chondrogenic medium. These results are in accordance with the numerous studies using pellet culture systems to examine the in vitro chondrogenesis of MSC (41,42).

Interestingly, after 5 weeks in vivo, hATSCs cultured in chondrogenic medium, either in 2D or 3D, exhibited positive staining for sulphated GAG and type II collagen and were comparably scored. In contrast, noninduced hATSCs (without chondrogenic medium), grown in monolayers or 3D pellets, failed to exhibit sulphated

GAG and type II collagen production. Consistently, a 3D matrix alone appears insufficient to initiate the chondrogenic differentiation of hATSC in the absence of a specific induction medium. On the contrary, cartilaginous tissue formation was achieved with hATSCs treated with a chondrogenic medium in both 2D monolayer and 3D pellet culture. Furthermore, while hATSCs cultured in 2D chondrogenic medium failed to achieve complete chondrogenic differentiation in vitro, once in vivo within Si-HPMC they gave rise to a cartilaginous tissue to the same extent as hATSCs predifferentiated in 3D. The discrepancy of nodule appearance between 2D CH, 3D CH, and HoNC, however, requires careful anal-

ysis. It seems reasonable to speculate that as a function of their origins and commitment stages, cells do not probably respond to 3D environment and biomaterial properties (stiffness, elasticity?) in the same manner (18). This intriguing point should be paid further attention. The 3D pellet culture system is widely used to induce chondrogenic differentiation in vitro (26) albeit that a number of serious drawbacks have to be surmounted so that 3D pellet culture can be considered for clinical application. Firstly, this MSC pellet culture system mimics the endochondral ossification process. It has thus been demonstrated that the in vitro chondrogenesis of MSCs is characterized by the induction of a broad

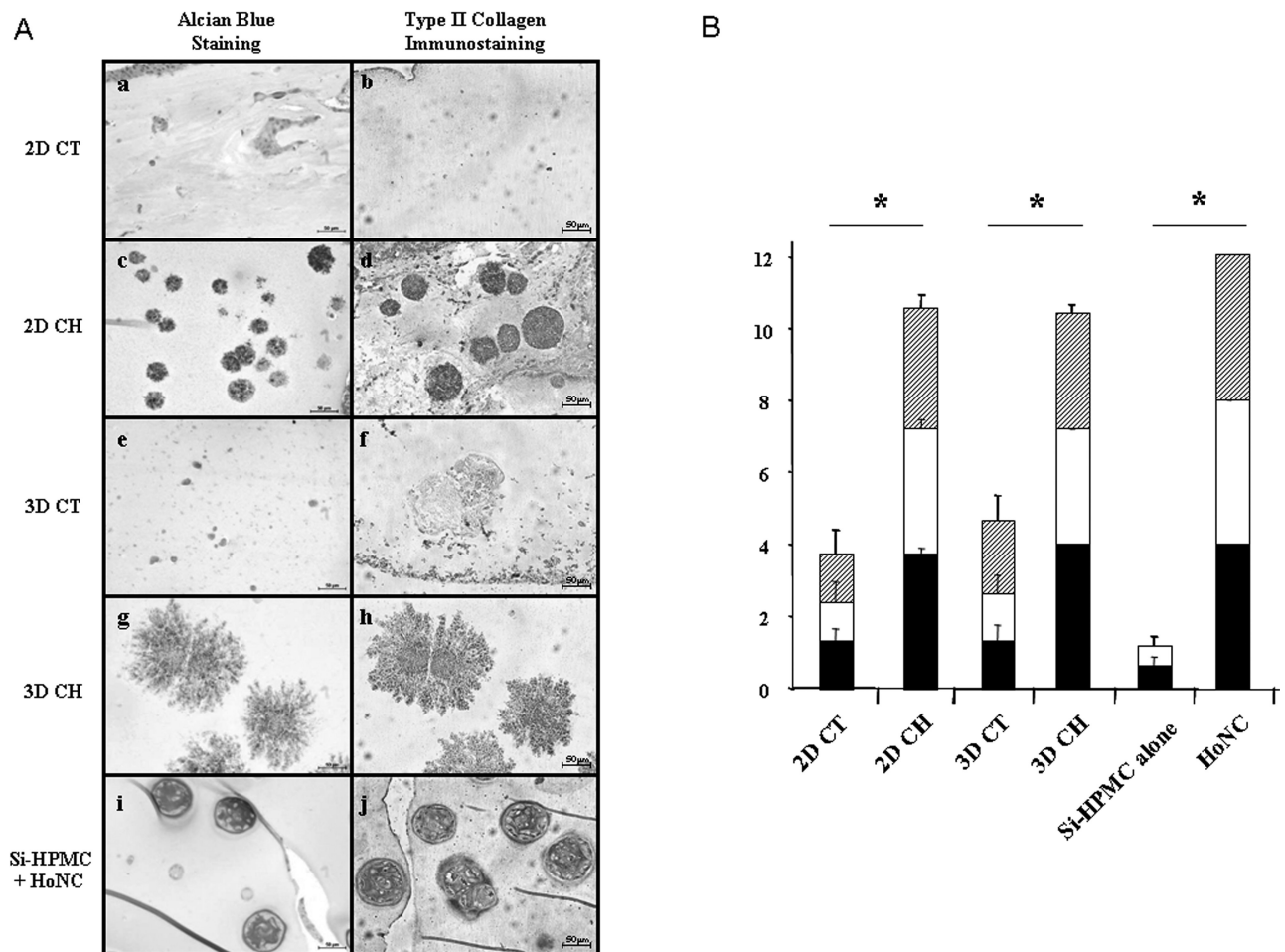


Figure 5. Cartilaginous tissue formation of hATSCs after subcutaneous implantation into nude mice. (A) Histological and immunohistological analysis of hATSC/Si-HPMC subcutaneous implants. hATSC cultured either in monolayers (2D) or in pellets (3D) in the presence of control (CT) or chondrogenic (CH) medium for 21 days were associated with Si-HPMC and implanted subcutaneously into nude mice for 5 weeks. Horse nasal chondrocytes (HoNC) associated with Si-HPMC were used as a positive control. Histological sections were stained with alcian blue (a, c, e, g, i) and immunostained for type II collagen (b, d, f, h, j). Scale bar: 50 μ m. (B) Histological scoring of hATSC/Si-HPMC subcutaneous implants. Histological sections were evaluated for nodule density (black), alcian blue staining intensity (white), and type II collagen immunostaining intensity (striped). Three sections of each condition were randomly and double-blindly scored (score from 0 to 4 for each criterion: 0, absence; 1, low; 2, intermediate; 3, marked; 4, intense). * $p < 0.05$ compared with the respective control medium. # $p < 0.05$ compared with the respective 2D condition.

panel of hyaline cartilage molecules concomitant with early onset of hypertrophic markers such as COL10A1 and alkaline phosphatase (ALP), markers for terminal differentiation (MMP-13), and osteoblasts (osteopontin and bone sialoprotein II) (37,43,53,54). This phenomenon could ultimately cause extensive in vivo calcification of the ECM, vascular invasion, and thus instability of the ectopic transplants (39). However, the long-term phenotypic stability along with the functional suitability in vivo and the adoption of a nonhypertrophic chondrocyte phenotype are paramount for an effective and sustained cartilage repair. Secondly, it is necessary to individualize the cells by disrupting the pellets in order to associate them evenly in the biomaterial. This is a limiting step for clinical application.

The rather similar histological scoring obtained for 3D- and 2D-induced hATSCs suggests that chondrogenic medium could initiate the chondrogenic commitment of hATSCs, even in monolayer culture. This discrepancy observed between the in vitro and in vivo results may arise from different commitment stages in vitro, which were waived after 5 weeks in a favorable in vivo environment within Si-HPMC. It seems therefore reasonable to assume that a simple commitment of hATSCs towards the chondrogenic phenotype in vitro would be sufficient to enable cells to undergo chondrogenic differentiation, once placed in favorable conditions in vivo. The subcutaneous site is however rather far from a cartilage repair situation due to the lack of mechanical constraints that are known to favor chondrogenic commitment of MSCs (45). Therefore, further studies must be performed and should address the propensity of hATSCs, induced chondrogenically or not, to repair a load-bearing AC defect when implanted with Si-HPMC.

In summary, our study demonstrates that hATSCs are able to differentiate towards the chondrogenic lineage in vitro when cultured in a 3D environment in pellets or within a polysaccharide hydrogel, and to form cartilaginous tissue in vivo. Moreover, this study suggests that an in vitro 2D commitment of hATSCs would be sufficient to obtain cartilaginous tissue formation in vivo, which could provide an easier use of hATSCs for cartilage tissue engineering strategies. The long-term objective of this study is to develop a clinically relevant cartilage tissue engineering procedure using hATSCs as a source of autologous chondrogenic cells and Si-HPMC as a vehicle able to maintain these cells and foster chondrogenesis at the damaged site. Further experiments in suitable animal cartilage lesion models therefore require further attention.

ACKNOWLEDGMENTS: This study was financed by grants from the "foundation Arthritis Courtin," the "Société Française de Rhumatologie," "ANR young researchers, project scartifold," ANR Tecsan "Chondrograft," the "fondation de l'avenir

pour la recherche médicale appliquée," and the INSERM U791. C.M. and S.P. received a fellowship from "Région Pays de la Loire, program Bioregos I and Bioregos II." The authors also gratefully acknowledge Dr. F. Lejeune (clinique Brétéché Nantes), K. Rouger (INRA UMR 703-ENVN), R. Josien, M. Heslan, S. Rémy, I. Anegon (INSERM U643) for their helpful assistance in flow cytometry experiments, and M. Gatiuss-Perré for helpful discussions. Authors also thank J. Ashton-Chess for critical reading of the manuscript. Dr. C. Vinatier is an employee of GRAFTYS SA company. Dr. J. Guicheux owns shares and is a consultant to the GRAFTYS SA company.

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.* 55:1569–1593; 2003.
2. Awad, H. A.; Wickham, M. Q.; Leddy, H. A.; Gimble, J. M.; Guilak, F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 25:3211–3222; 2004.
3. Bai, X.; Sadat, S.; Gehmert, S.; Alt, E.; Song, Y. H. VEGF receptor Flk-1 plays an important role in c-kit expression in adipose tissue derived stem cells. *FEBS Lett.* 581:4681–4684; 2007.
4. Barry, F.; Boynton, R. E.; Liu, B.; Murphy, J. M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp. Cell Res.* 268:189–200; 2001.
5. Bennett, K. P.; Bergeron, C.; Acar, E.; Klees, R. F.; Vandenberg, S. L.; Yener, B.; Plopper, G. E. Proteomics reveals multiple routes to the osteogenic phenotype in mesenchymal stem cells. *BMC Genomics* 8:380–390; 2007.
6. Benoit, D. S.; Schwartz, M. P.; Durney, A. R.; Anseth, K. S. Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells. *Nat. Mater.* 7:816–823; 2008.
7. Bonaventure, J.; Kadhon, N.; Cohen-Solal, L.; Ng, K. H.; Bourguignon, J.; Lasselín, C.; Freisinger, P. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp. Cell Res.* 212:97–104; 1994.
8. Bourges, X.; Weiss, P.; Coudreuse, A.; Daculsi, G.; Legeay, G. General properties of silylated hydroxyethylcellulose for potential biomedical applications. *Biopolymers* 63:232–238; 2002.
9. 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.* 99:215–228; 2002.
10. Bouwmeester, S. J.; Beckers, J. M.; Kuijer, R.; van der Linden, A. J.; Bulstra, S. K. Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee. *Int. Orthop.* 21:313–317; 1997.
11. 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.* 331:889–895; 1994.
12. Bunnell, B. A.; Estes, B. T.; Guilak, F.; Gimble, J. M. Differentiation of adipose stem cells. *Methods Mol. Biol.* 456:155–171; 2008.
13. Cancedda, R.; Dozin, B.; Giannoni, P.; Quarto, R. Tissue

- engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol.* 22:81–91; 2003.
14. Chung, C.; Burdick, J. A. Engineering cartilage tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60:243–262; 2008.
 15. Dawson, E.; Mapili, G.; Erickson, K.; Taqvi, S.; Roy, K. Biomaterials for stem cell differentiation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60:215–228; 2008.
 16. Discher, D. E.; Mooney, D. J.; Zandstra, P. W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 324:1673–1677; 2009.
 17. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317; 2006.
 18. Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126:677–689; 2006.
 19. Erickson, G. R.; Gimble, J. M.; Franklin, D. M.; Rice, H. E.; Awad, H.; Guilak, F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290:763–769; 2002.
 20. Estes, B. T.; Diekman, B. O.; Gimble, J. M.; Guilak, F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat. Protoc.* 5:1294–1311; 2010.
 21. Fatimi, F.; Tassin, J. F.; Quillard, S.; Axelos, M. A.; Weiss, P. The rheological properties of silated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices. *Biomaterials* 29:533–543.
 22. Gilbert, J. E. Current treatment options for the restoration of articular cartilage. *Am. J. Knee Surg.* 11:42–46; 1998.
 23. Gimble, J. M.; Katz, A. J.; Bunnell, B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.* 100:1249–1260; 2007.
 24. Hardingham, T. E.; Fosang, A. J.; Dudhia, J. The structure, function and turnover of aggrecan, the large aggregating proteoglycan from cartilage. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 32:249–257; 1994.
 25. Hunziker, E. B. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10:432–463; 2002.
 26. Jin, X. B.; Sun, Y. S.; Zhang, K.; Wang, J.; Ju, X. D.; Lou, S. Q. Neocartilage formation from predifferentiated human adipose derived stem cells in vivo. *Acta Pharmacol. Sin.* 28:663–671; 2007.
 27. Jin, X. B.; Sun, Y. S.; Zhang, K.; Wang, J.; Shi, T. P.; Ju, X. D.; Lou, S. Q. Tissue engineered cartilage from hTGF beta2 transduced human adipose derived stem cells seeded in PLGA/alginate compound in vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. A* 86:1077–1087; 2008.
 28. Johnstone, B.; Hering, T. M.; Caplan, A. I.; Goldberg, V. M.; Yoo, J. U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 238:265–272; 1998.
 29. Jung, M.; Kaszap, B.; Redohl, A.; Steck, E.; Breusch, S.; Richter, W.; Gotterbarm, T. Enhanced early tissue regeneration after matrix-assisted autologous mesenchymal stem cell transplantation in full thickness chondral defects in a minipig model. *Cell Transplant.* 18:923–932; 2009.
 30. Koulalis, D.; Schultz, W.; Heyden, M.; Konig, F. Autologous osteochondral grafts in the treatment of cartilage defects of the knee joint. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 12:329–334; 2004.
 31. Lee, Y. A.; Kang, S. S.; Baek, S. H.; Jung, J. C.; Jin, E. J.; Tak, E. N.; Sonn, J. K. Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes on chitosan membranes and involvement of PKCalpha and P38 MAP kinase. *Mol. Cells* 24:9–15; 2007.
 32. Markway, B. D.; Tan, G. K.; Brooke, G.; Hudson, J. E.; Cooper-White, J. J.; Doran, M. R. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplant.* 19:29–42; 2010.
 33. Martin, I.; Shastri, V. P.; Padera, R. F.; Yang, J.; Mackay, A. J.; Langer, R.; Vunjak-Novakovic, G.; Freed, L. E. Selective differentiation of mammalian bone marrow stromal cells cultured on three-dimensional polymer foams. *J. Biomed. Mater. Res.* 55:229–235; 2001.
 34. Martin-Hernandez, C.; Cebamanos-Celma, J.; Molinaros, A.; Ballester-Jimenez, J. J.; Ballester-Soleda, J. Regenerated cartilage produced by autogenous periosteal grafts: A histologic and mechanical study in rabbits under the influence of continuous passive motion. *Arthroscopy* 26:76–83; 2010.
 35. Merceron, C.; Vinatier, C.; Clouet, J.; Collicec-Jouault, S.; Weiss, P.; Guicheux, J. Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering. *Joint Bone Spine* 75:672–674; 2008.
 36. Merceron, C.; Vinatier, C.; Portron, S.; Masson, M.; Amiaud, J.; Guigand, L.; Cherel, Y.; Weiss, P.; Guicheux, J. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298:355–364; 2010.
 37. Mueller, M. B.; Tuan, R. S. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* 58:1377–1388; 2008.
 38. O'Driscoll, S. W. The healing and regeneration of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* 80:1795–1812; 1998.
 39. Peltari, K.; Winter, A.; Steck, E.; Goetzke, K.; Hennig, T.; Ochs, B. G.; Aigner, T.; Richter, W. 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; 2006.
 40. Pochampally, R. Colony forming unit assays for MSCs. *Methods Mol. Biol.* 449:83–91; 2008.
 41. Prante, C.; Bieback, K.; Funke, C.; Schon, S.; Kern, S.; Kuhn, J.; Gastens, M.; Kleesiek, K.; Gotting, C. The formation of extracellular matrix during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells correlates with increased levels of xylosyltransferase I. *Stem Cells* 24:2252–2261; 2006.
 42. Scotti, C.; Tonnarelli, B.; Papadimitropoulos, A.; Scherberich, A.; Schaeren, S.; Schauerte, A.; Lopez-Rios, J.; Zeller, R.; Barbero, A.; Martin, I. Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:7251–7256; 2010.
 43. Sekiya, I.; Vuorio, J. T.; Larson, B. L.; Prockop, D. J. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:4397–4402; 2002.
 44. Steinert, A. F.; Ghivizzani, S. C.; Rethwilm, A.; Tuan, R. S.; Evans, C. H.; Noth, U. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res. Ther.* 9:213–228; 2007.

45. Terraciano, V.; Hwang, N.; Moroni, L.; Park, H. B.; Zhang, Z.; Mizrahi, J.; Seliktar, D.; Elisseeff, J. Differential response of adult and embryonic mesenchymal progenitor cells to mechanical compression in hydrogels. *Stem Cells* 25:2730–2738; 2007.
46. Tremolada, C.; Palmieri, G.; Ricordi, C. Adipocyte transplantation and stem cells: Plastic surgery meets regenerative medicine. *Cell Transplant.* 19:1217–1223; 2010.
47. Vinatier, C.; Gauthier, O.; Fatimi, A.; Merceron, C.; Masson, M.; Moreau, A.; Moreau, F.; Fellah, B.; Weiss, P.; Guicheux, J. An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnol. Bioeng.* 102:1259–1267; 2009.
48. Vinatier, C.; Gauthier, O.; Masson, M.; Malard, O.; Moreau, A.; Fellah, B. H.; Bilban, M.; Spaethe, R.; Daculsi, G.; Guicheux, J. Nasal chondrocytes and fibrin sealant for cartilage tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* 89:176–185; 2009.
49. Vinatier, C.; Magne, D.; Moreau, A.; Gauthier, O.; Malard, O.; Vignes-Colombeix, C.; Daculsi, G.; Weiss, P.; Guicheux, J. Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *J. Biomed. Mater. Res. A* 80:66–74; 2007.
50. Vinatier, C.; Magne, D.; Weiss, P.; Trojani, C.; Rochet, N.; Carle, G. F.; Vignes-Colombeix, C.; Chadjichristos, C.; Galera, P.; Daculsi, G.; Guicheux, J. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* 26:6643–6651; 2005.
51. Vinatier, C.; Mrugala, D.; Jorgensen, C.; Guicheux, J.; Noel, D. Cartilage engineering: A crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol.* 27: 307–314; 2009.
52. Wei, Y.; Hu, H.; Wang, H.; Wu, Y.; Deng, L.; Qi, J. Cartilage regeneration of adipose-derived stem cells in a hybrid scaffold from fibrin-modified PLGA. *Cell Transplant.* 18: 159–170; 2009.
53. Weiss, S.; Hennig, T.; Bock, R.; Steck, E.; Richter, W. Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 223:84–93; 2010.
54. Winter, A.; Breit, S.; Parsch, D.; Benz, K.; Steck, E.; Hauner, H.; Weber, R. M.; Ewerbeck, V.; Richter, W. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: A comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum.* 48:418–429; 2003.
55. Zuk, P. A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; De Ugarte, D. A.; Huang, J. I.; Mizuno, H.; Alfonso, Z. C.; Fraser, J. K.; Benhaim, P.; Hedrick, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13:4279–4295; 2002.
56. Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J. W.; Katz, A. J.; Benhaim, P.; Lorenz, H. P.; Hedrick, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7:211–228; 2001.

1.3 Discussion

Dans le but de simplifier le protocole de préparation des CSM précédant leur implantation, nous avons évalué l'impact de la culture *in vitro* en deux ou trois dimensions sur le potentiel chondrogénique des CSA *in vivo*. Notre stratégie fut d'implanter des CSA pré-conditionnées *in vitro* en monocouche ou trois dimensions « pellet » et en présence ou non du milieu d'induction, en association avec un hydrogel HPMC-Si auto-réticulant, injectable et breveté au laboratoire (WO2005/044326).

Nos premiers résultats ont confirmé que le tissu adipeux représente une source de cellules répondant aux principaux critères de CSM [241]. En effet, les cellules adhérentes de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux sont capables de proliférer en culture et de s'auto-renouveler. Ces cellules expriment également les principaux marqueurs de surface associés aux CSM (CD29, CD44, CD49d, CD90, CD105) et n'expriment pas des marqueurs CD34 et CD45 associés aux cellules hématopoïétiques. Il est cependant à noter que plusieurs études décrivent l'expression de CD34 au sein de la population de CSA [236,515,516]. L'expression du CD 34 demeure toutefois faible et sa détection semble être influencée par la classe d'anticorps choisie [517]. Par ailleurs, l'expression de ce marqueur diminue significativement lorsque les cellules prolifèrent [518]. Ainsi dans nos conditions, il est possible que l'expression de ce marqueur soit trop faible pour être détectée. Pour finir, la multipotence des CSA a également été démontrée par l'expression des principaux marqueurs du phénotype chondrogénique, ostéoblastique et adipogénique en présence d'un milieu adapté.

Avant d'étudier le potentiel chondrogénique des CSA associées à l'hydrogel HPMC-Si *in vivo*, nous nous sommes demandés dans quelle mesure cet hydrogel pourrait constituer une matrice apte à promouvoir la différenciation chondrogénique des CSA. Lorsqu'elles sont placées en condition chondrogénique, les CSA cultivées en trois dimensions dans l'hydrogel sont toujours capables de se différencier dans la voie chondrogénique. Les CSA expriment les principaux marqueurs du phénotype chondrogénique que sont le collagène de type II, l'agrécan, COMP et le facteur de transcription SOX9. De plus, les analyses histologiques ont mis en évidence la production de GAG et de collagène de type II. Ces données montrent que

l'hydrogel HPMC-Si apporte un environnement tridimensionnel adapté à la différenciation chondrogénique des CSA *in vitro*.

Cet effet bénéfique de la culture en trois dimensions au sein de l'hydrogel HPMC-Si est vraisemblablement dû au fait que les cellules acquièrent une morphologie sphérique qui est l'une des caractéristiques du phénotype chondrocytaire [444]. De plus, il est reconnu que la culture au sein d'un environnement tridimensionnel favorise les interactions cellule-cellule et cellule-matrice nécessaires à la différenciation chondrogénique [279,519]. Des études complémentaires pourraient être envisagées pour détecter la présence de la N-cadhérine, indispensable à l'adhésion cellulaire, ou du collagène de type IV, majoritairement présent dans la matrice périceellulaire, matrice qui confère aux cellules un microenvironnement (chondron) crucial pour le développement et le maintien du tissu cartilagineux [280].

En ce sens, la culture tridimensionnelle représente un environnement propice à la différenciation chondrogénique comme cela a déjà été démontré dans de précédents travaux utilisant des matrices à base de polymères naturels ou synthétiques fonctionnalisés ou non [152,284,520,521]. Le biomatériau idéal pour l'ingénierie tissulaire du cartilage doit non seulement permettre la différenciation chondrogénique des CSM, mais également rendre possible leur transplantation *in vivo* par chirurgie mini-invasive. Par conséquent, afin de déterminer si l'hydrogel HPMC-Si peut représenter cette matrice idéale, nous nous sommes ensuite intéressés à sa capacité à permettre le transfert de CSA et la formation de cartilage *in vivo*. Dans un premier temps, parmi les conditions de culture testées, nous nous sommes demandés laquelle rassemble à la fois des critères de faisabilité pour une application en ingénierie tissulaire tout en permettant l'obtention d'un tissu cartilagineux *in vivo*. Sur la base de nos résultats de PCR en temps réel et d'analyses histologiques, les CSA cultivées en présence de milieu chondrogénique en trois dimensions semblent plus engagées que celles cultivées en l'absence de milieu chondrogénique quelle que soit la dimension de culture. Ces résultats sont en accord avec les nombreuses études utilisant la culture en pellets pour étudier la différenciation chondrogénique des CSM [522,Scotti, 2010 #82].

Ainsi, après 5 semaines d'implantation, les CSA ayant été cultivées en présence de milieu contrôle et en deux ou trois dimensions *in vitro*, ne produisent pas de GAG et de collagène de type II *in vivo*. Une matrice tridimensionnelle comme l'hydrogel HPMC-Si ne semble donc

pas suffisante pour initier la différenciation chondrogénique des CSA. En revanche, les CSA cultivées en présence de milieu chondrogénique, en deux ou trois dimensions, sont responsables de la formation d'une MEC contenant des GAG et du collagène de type II et présentent des scores histologiques comparables. Ainsi, bien que les CSA cultivées en deux dimensions en présence de milieu chondrogénique ne présentent pas une différenciation chondrogénique optimale elles permettent *in vivo*, en association avec l'hydrogel HPMC-Si, la formation d'un tissu cartilagineux comparable à celui obtenu avec les cellules induites en trois dimensions. Ces différences observées entre les résultats *in vitro* et *in vivo* peuvent découler du fait qu'*in vivo*, les stades plus ou moins avancés d'engagement dans la différenciation *in vitro* sont compensés par un environnement favorable *in vivo*. Ainsi, le pré-conditionnement des CSA en deux dimensions et en présence de milieu chondrogénique semble être suffisant pour former un tissu cartilagineux *in vivo*. Il apparaît raisonnable de supposer qu'un simple engagement des CSA en présence de milieu chondrogénique serait suffisant pour permettre l'orientation des CSA vers un phénotype chondrogénique, une fois placées dans des conditions favorables *in vivo*. Cependant, il convient de se demander si l'engagement des CSA dans ces conditions est suffisant pour prévenir la formation d'une matrice fibreuse, relative à l'hétérogénéité des potentiels chondrogéniques au sein de la population de CSA. Par ailleurs, le site sous-cutané reste éloigné d'un environnement articulaire lésé, en raison de l'absence notamment des contraintes mécaniques connues pour stimuler la différenciation des CSA vers la voie chondrogénique.

Le système de culture tridimensionnelle en pellet est largement répandu afin de participer à l'induction de la différenciation chondrogénique *in vitro* [523] bien qu'un certain nombre d'inconvénients soient inhérents à ce modèle et reste à surmonter dans le cadre d'applications cliniques. En effet, premièrement, il a été décrit que ce modèle de culture reproduit le processus d'ossification endochondrale caractérisé par l'induction d'un large panel de molécules du cartilage hyalin caractéristique des stades de différenciation hypertrophique précoce (collagène de type X ou phosphatase alcaline), de différenciation terminale (MMP13) [473]. Ce phénomène peut, à terme, conduire à la calcification de la matrice, à son invasion par les vaisseaux sanguins et finalement à l'instabilité du transplant [12]. Le second inconvénient est lié à la nécessité d'individualiser les cellules en déstructurant les pellets afin

de les associer au biomatériau. Cette étape s'avère limitante en termes de faisabilité, dans le cadre d'une procédure chirurgicale.

Pour conclure, cette étude suggère fortement que l'engagement des CSA *in vitro* en deux dimensions serait suffisant pour obtenir la formation d'un tissu cartilagineux. La culture en deux dimensions pourrait permettre de simplifier considérablement l'étape de culture cellulaire précédant l'implantation.

Notre étude a également confirmé que les CSA sont capables de se différencier vers la lignée chondrogénique *in vitro* lorsqu'elles sont cultivées dans un environnement tridimensionnel en pellets ou dans un hydrogel. Ces données, qui mettent également en évidence la formation d'un tissu cartilagineux *in vivo* après implantation des CSA associées à l'hydrogel HPMC-Si, soulignent le potentiel de cet hydrogel pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Il permet non seulement de favoriser et de maintenir le phénotype chondrocytaire *in vitro* et *in vivo* des CSA, mais également de transférer les cellules sur le site d'implantation par un protocole chirurgical mini-invasif.

2 Tension en oxygène

2.1 Problématique

Afin d'accélérer et améliorer la formation d'un tissu de réparation de type hyalin, l'utilisation de CSM prédifférenciées *in vitro* dans le lignage chondrogénique a été considérée récemment avec intérêt [167,168] et ce notamment grâce à l'amélioration de nos connaissances relatives à la différenciation chondrogénique des CSM. Cependant, malgré les descriptions récentes de protocoles permettant un engagement chondrogénique robuste des CSM, leur acquisition d'un phénotype chondrogénique stable reste difficile à contrôler. Dans ce contexte, de nombreuses équipes de recherche concentrent leurs efforts vers le développement de méthodes de cultures cellulaires efficaces pour améliorer et optimiser cette différenciation chondrogénique des CSM. Alors que les facteurs de croissances pro-chondrogéniques (TGF-béta, IGF, BMP) sont utilisés depuis plus d'une dizaine d'années, l'utilisation de facteurs environnementaux, telle que la tension en oxygène est de considération plus récente.

Ainsi, plusieurs études indiquent qu'une faible tension en oxygène améliore la différenciation chondrogénique des MO-CSM en présence de milieu inducteur [414,425]. Dans l'article I (page 47), nous avons montré qu'une tension en oxygène de 5% stimule la chondrogenèse des CSA tout en inhibant leur différenciation ostéogénique [524]. Ces données suggèrent que la tension en oxygène pourrait être un outil permettant de contrôler la différenciation chondrogénique au moins *in vitro*. Ainsi, toujours soucieux de transposer les données à notre disposition dans un contexte translationnel et appliqué nous avons souhaité déterminer si la stimulation de la différenciation chondrogénique par la tension en oxygène *in vitro* pourrait également favoriser la formation d'un tissu cartilagineux *in vivo* (article III).

Par ailleurs, le contrôle de la différenciation chondrogénique apparaît indispensable afin de favoriser l'engagement des CSA tout en prévenant l'apparition d'un phénotype hypertrophique responsable de la formation d'une matrice minéralisée. Compte tenu des difficultés à contrôler cette différenciation, nous avons émis l'hypothèse qu'une faible tension en oxygène pourrait prévenir l'apparition du stade hypertrophique de la différenciation chondrogénique. Nous avons également voulu déchiffrer les mécanismes moléculaires qui régissent les effets de la tension en oxygène au cours des processus de différenciation chondrogénique (article IV).

Article III : “Effects of an *in vitro* low oxygen tension preconditioning of adipose stromal cells on their *in vivo* chondrogenic potential: application in cartilage tissue repair”

-PLoS One-

2.2 Résumé

Les stratégies d'ingénierie tissulaire associant biomatériau et CSM, apparaissent prometteuses pour traiter les lésions cartilagineuses. Le cartilage étant un tissu non vascularisé, les cellules y sont soumises à une faible tension en oxygène. De manière intéressante, une faible tension en oxygène favorise la différenciation chondrogénique des CSM *in vitro* [524]. Dans ce contexte, notre objectif fut d'étudier la formation d'un tissu cartilagineux *in vivo* après implantation de CSM conditionnées *in vitro* en présence d'une faible tension en oxygène.

Les CSM isolées du tissu adipeux de lapin ou humain ont été cultivées en deux ou en trois dimensions au sein d'un hydrogel d'hydroxypropyl méthylcellulose silanisé (HPMC-Si) et mises en présence de milieu contrôle ou chondrogénique (ITS et TGF-béta) et sous une tension en oxygène de 21% (normoxie) ou de 5% (hypoxie). Avant implantation, la différenciation chondrogénique des CSA a été évaluée par RT-PCR en temps réel pour les niveaux d'expression des transcrits des gènes codant pour le collagène de type II ou l'agrécan. Les CSA pré-conditionnées ont été implantées en association avec l'hydrogel HPMC-Si en site articulaire chez le lapin ou en site ectopique chez la souris nude. La formation du tissu néoformé a été évaluée qualitativement et quantitativement par marquages et scoring histologiques.

Nos résultats montrent que l'hypoxie augmente l'expression des marqueurs chondrogéniques des CSA induites dans la voie chondrogénique *in vitro*. *In vivo*, le tissu formé est de type cartilagineux et ce quelle que soit la tension en oxygène perçue par les CSA *in vitro*. Néanmoins, la culture en trois dimensions au sein de l'hydrogel HPMC-Si des CSA potentialise les effets pro-chondrogéniques du milieu inducteur et de l'hypoxie *in vitro*. Ces données suggèrent que bien qu'une tension en oxygène de 5% favorise le potentiel chondrogénique des CSA *in vitro*, elle ne l'améliore pas *in vivo*. Ces résultats mettent en évidence que les CSA engagées dans la voie chondrogénique sont capables de former un tissu cartilagineux *in vivo*. L'utilisation combinée de l'hydrogel HPMC-Si aux CSA autologues pourrait ainsi représenter un outil potentiellement intéressant en médecine régénératrice du cartilage.

ARTICLE III

Effects of an *in vitro* low oxygen tension preconditioning of adipose stromal cells on their *in vivo* chondrogenic potential: application in cartilage tissue repair

Sophie PORTRON*, Christophe MERCERON*, Olivier GAUTHIER, Julie LESOEUR, Sophie SOURICE, Martial MASSON, Borhane Hakim FELLAH, Olivier GEFFROY, Elodie LALLEMAND, Pierre WEISS, Jérôme GUICHEUX*, Claire VINATIER*

*Equally contributing authors

-PLOS ONE- 2013

Effects of In Vitro Low Oxygen Tension Preconditioning of Adipose Stromal Cells on Their In Vivo Chondrogenic Potential: Application in Cartilage Tissue Repair

Sophie Portron^{1,2,3}, Christophe Merceron^{1,2,3}, Olivier Gauthier^{1,2,3}, Julie Lesoeur^{1,2}, Sophie Sourice^{1,2}, Martial Masson^{1,2}, Borhane Hakim Fellah³, Olivier Geffroy^{1,2,4}, Elodie Lallemand⁴, Pierre Weiss^{1,2}, Jérôme Guicheux^{1,2,3}, Claire Vinatier^{1,2,3}

1 INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), Unit 791, Center for Osteoarticular and Dental Tissue Engineering, Group STEP "Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology", Nantes, France, **2** University of Nantes, UFR Odontology, Nantes, France, **3** Center for Preclinical Research and Investigation of the ONIRIS Nantes-Atlantic College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering (CRIP), Nantes, France, **4** College of Veterinary Medicine of Nantes (ONIRIS), Department of Equine Surgery, Nantes, France

Abstract

Purpose: Multipotent stromal cell (MSC)-based regenerative strategy has shown promise for the repair of cartilage, an avascular tissue in which cells experience hypoxia. Hypoxia is known to promote the early chondrogenic differentiation of MSC. The aim of our study was therefore to determine whether low oxygen tension could be used to enhance the regenerative potential of MSC for cartilage repair.

Methods: MSC from rabbit or human adipose stromal cells (ASC) were preconditioned *in vitro* in control or chondrogenic (ITS and TGF- β) medium and in 21 or 5% O₂. Chondrogenic commitment was monitored by measuring COL2A1 and ACAN expression (real-time PCR). Preconditioned rabbit and human ASC were then incorporated into an Si-HPMC hydrogel and injected (i) into rabbit articular cartilage defects for 18 weeks or (ii) subcutaneously into nude mice for five weeks. The newly formed tissue was qualitatively and quantitatively evaluated by cartilage-specific immunohistological staining and scoring. The phenotype of ASC cultured in a monolayer or within Si-HPMC in control or chondrogenic medium and in 21 or 5% O₂ was finally evaluated using real-time PCR.

Results/Conclusions: 5% O₂ increased the *in vitro* expression of chondrogenic markers in ASC cultured in induction medium. Cells implanted within Si-HPMC hydrogel and preconditioned in chondrogenic medium formed a cartilaginous tissue, regardless of the level of oxygen. In addition, the 3D *in vitro* culture of ASC within Si-HPMC hydrogel was found to reinforce the pro-chondrogenic effects of the induction medium and 5% O₂. These data together indicate that although 5% O₂ enhances the *in vitro* chondrogenic differentiation of ASC, it does not enhance their *in vivo* chondrogenesis. These results also highlight the *in vivo* chondrogenic potential of ASC and their potential value in cartilage repair.

Citation: Portron S, Merceron C, Gauthier O, Lesoeur J, Sourice S, et al. (2013) Effects of In Vitro Low Oxygen Tension Preconditioning of Adipose Stromal Cells on Their In Vivo Chondrogenic Potential: Application in Cartilage Tissue Repair. PLoS ONE 8(4): e62368. doi:10.1371/journal.pone.0062368

Editor: Abhay Pandit, National University of Ireland, Galway, Ireland

Received: October 22, 2012; **Accepted:** March 20, 2013; **Published:** April 30, 2013

Copyright: © 2013 Portron et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was financed by grants from the "Courtin Arthritis Foundation", the "Société Française de Rhumatologie", ANR, the young researchers "Scartifold" project, the ANR Tecsan "Chondrograft" project, the "Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée" FRM "Veilleissement Osteoartculaire" (ET7-451 and ET9-491), les Haras Nationaux, Graftys S.A. and the INSERM U791. CM and SP received a fellowship from the "Région des Pays de la Loire, Bioregos I and II program. Those funding had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Jérôme Guicheux is a PLOS ONE Editorial Board member and the authors received funding from Graftys S.A.. However, this does not alter the authors' adherence to all PLOS ONE policies on the sharing of data and materials.

* E-mail: jerome.guicheux@univ-nantes.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Articular cartilage is an avascular and poorly cellularized tissue that has a limited capacity for self-repair after injury. Indeed, only full-thickness defects, which affect both the subchondral bone and cartilage exhibit a repair process that leads to the formation of fibrocartilage. This fibrocartilage does not however display the mechanical properties of native articular cartilage [1] and unfortunately degrades rapidly. This degradation may progress into a premature wear of cartilage and often leads to degenerative joint disease. Different surgical strategies are currently considered

such as microfracture [2] or mosaicplasty [3]. For the treatment of cartilage defects, none of these techniques results in a complete regeneration of cartilage tissue [4]. To address this clinical issue, autologous chondrocyte transplantation (ACT) initially developed by Brittberg *et al.* has been introduced into clinical use to treat focal lesions of the knee joint [5,6,7]. Given the limitations of autologous chondrocytes (lack of availability and dedifferentiation during amplification), the use of multipotent stromal cells (MSC) for cartilage tissue engineering has recently attracted growing interest [8,9,10]. Among the various tissues from which MSC can

be isolated, bone marrow has been the most widely used in cartilage repair strategies [11,12,13]. However, adherent cells isolated from stromal vascular fraction of adipose tissue also exhibit the major characteristics of stemness (proliferation, long-term self-renewal, and multilineage differentiation) [14] and were named adipose stromal cells (ASC) accordingly [15].

Interestingly, adipose tissue stromal vascular fraction contains 10- to 100-fold more clonogenic cells than bone marrow [16,17,18] and is easily accessible through non-invasive liposuction. These practical advantages make ASC an attractive cell population for use in cartilage repair.

Cartilage repair strategies combining MSC and biomaterials have been thoroughly explored recently [10,19,20,21,22]. In addition to providing a vehicle for the delivery of cells, biomaterials supply a three-dimensional environment suitable for the chondrogenesis of MSC [23,24].

The use of *in vitro* differentiated MSC for biomaterial-assisted cartilage repair, as opposed to undifferentiated MSC, results in faster and improved tissue repair [25,26]. However, despite recent progress in understanding MSC biology, the chondrogenic differentiation of MSC remains difficult to control. For this reason, research teams have focused on developing effective culture methods to optimize the chondrogenesis of MSC. While the use of growth factors (such as TGF, BMPs and IGF) for the chondrogenic differentiation of MSC has been widely explored [27,28], the use of environmental factors, such as oxygen tension, has only recently been contemplated [29].

As mentioned above, cartilage is an avascular tissue in which chondrocytes experience low oxygen tension [30,31,32], ranging from 2 to 7% O₂. Several studies report converging data indicating that low oxygen tension could enhance the chondrogenic differentiation of bone marrow-derived MSC in the presence of induction medium [33,34]. Of particular interest is Merceron *et al.*'s finding that 5% O₂ promotes the chondrogenesis of ASC [35]. These data together suggest that low oxygen tension contributes to controlling the chondrogenic commitment and differentiation of various types of progenitor cells including ASC. However, despite a large body of evidence on the *in vitro* prochondrogenic effects of low oxygen tension, it remains unknown whether chondrogenic commitment under low oxygen tension may affect the formation of cartilaginous tissue *in vivo*.

Therefore, the aim of the present study was to determine whether low oxygen tension could be used to enhance the regenerative potential of MSC for cartilage repair. For this purpose, we first assessed the impact of *in vitro* preconditioning with low oxygen tension of ASC on their *in vivo* chondrogenic potential. Next, we investigated two complementary models: (i) the repair of rabbit cartilage defects by the transplantation of autologous ASC in a cellulose-based hydrogel (Si-HPMC hydrogel) and (ii) the formation of cartilaginous tissue by subcutaneous transplantation of human ASC in Si-HPMC hydrogel in nude mice.

Materials and Methods

Materials

Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) E4M was purchased from Colorcon-Dow chemical (Bougival, France). Glycidoxypolytrimethoxysilane (3-GPTMS) was obtained from Acros (Geel, Belgium). Cell culture plastic wares were purchased from Corning BV (Schiphol-Rijk, The Netherlands). Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium–High Glucose (4.5 g/L) (DMEM), Phosphate-Buffered Saline (PBS), penicillin/streptomycin, trypsin-EDTA (0.05%/0.53 mM), Tri-

zol®, L-glutamine and Superscript® III kit were obtained from Invitrogen (Paisley, UK). 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), type IA crude collagenase, red blood cell lysis buffer, sodium L-ascorbate, Insulin Transferrin Sodium Selenite (ITS) media supplement, dexamethasone, alcian blue, hyaluronidase and type II collagenase (290 units/mg) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). TGF-β1 was obtained from PeproTech Inc. (London, UK). NucleoSpin® RNA II was obtained from Macherey-Nagel (Hoerd, France). Brilliant® SYBR® Green Master Mix was obtained from Stratagene (La Jolla, CA). The PCR primers were synthesized by MWG Biotech (Ebersberg, Germany). Fetal calf serum (FCS) was purchased from Dominique Dutscher (Brumath, France). Technovit 9100 New® was obtained from Heraeus Kulzer (Wehrheim/Ts, Germany). The mouse monoclonal antibody directed against human and rabbit type II collagen was purchased from MP Biomedicals (Solon, OH). The biotinylated goat anti-mouse IgG antibody, the Universal Dako LSAB® (labelled streptavidin biotin reagents) and peroxidase kit were purchased from Dako (Trappes, France). All other chemicals were obtained from standard laboratory suppliers and were of the highest grade of purity available.

Preparation of Si-HPMC hydrogel

As previously described, Si-HPMC (silanized hydroxypropyl methylcellulose) was synthesized by grafting 14.24% 3-GPTMS onto E4M1 in heterogeneous medium [36]. 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 (at 121°C for 20 min). Finally, to allow the formation of a reticulated hydrogel, the solution was mixed with 0.5 volume of 0.26 M HEPES buffer. The final product was a viscous liquid at pH 7.4, which allowed cell incorporation. The cell/Si-HPMC hydrogel mixture was then reticulated for approximately 30 min, as previously described [36].

Rabbit and mice surgery

Rabbit and mouse handling, as well as surgical procedures, were conducted according to European Community guidelines for the care, accommodation and use of laboratory animals (DE 86/609/CEE; modified DE 2003/65/CE). Experiments were performed according to good laboratory practices at the Center for Preclinical Research and Investigation of the ONIRIS Nantes-Atlantic College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering. All rabbit experimental studies were performed on adult female New Zealand White rabbits weighing 3 to 3.5 kg (Charles River, L'Arbresle, France). All mouse experimental studies were performed on 1-month-old female Swiss nude mice (Charles River, L'Arbresle, France). General anesthesia of rabbits was induced by intramuscular injection of ketamine (0.5 mL/kg, Imalgene 1000®, Merial SAS, France) and xylazine (0.3 mL/kg, Rompun®, Bayer, France) cocktail.

Intravenous injections were carried out to extend intramuscular administration until effects at one tenth of the initial intramuscular dosage and repeated on demand, once or twice during the whole surgical period.

Pre-operative analgesia was provided through subcutaneous injection of morphine chlorhydrate (2 mg/kg). Immediate post-operative analgesia was provided through subcutaneous injection of meloxicam (0.1 mg/kg, Metacam®, Boehringer Ingelheim, France), and prolonged for 5 days orally. Rabbits were euthanized by intra-cardiac injection of 5 mL of pentobarbital (Dolethal®, Vetoquinol S.A., France) after inducing general anesthesia as described above.

Mice were pre-medicated with morphine chlorhydrate (2 mg/kg) diluted into sterile saline solution and injected subcutaneously.

General anesthesia was obtained in an induction chamber with isoflurane (2%) delivered in O₂ and prolonged through an individual mask. Mice were euthanized by an overdose of isoflurane within an induction chamber.

Isolation, expansion and chondrogenic differentiation of rabbit and human adipose stromal cells

ASC were obtained from human patients (hASC) undergoing liposuction and who had given written consent (ethics committees: Agence de BioMedecine, n°PFS08-018, the legislation code L.1211-3 to L.1211-9: residues obtained during a surgical procedure, performed in the interest of the person operated, can be used for scientific research), or from autologous rabbit adipose tissue (rASC) harvested from the inguinal region. Briefly, and as previously described [35], human lipoaspirate and rabbit adipose tissue were shredded into small pieces and washed extensively with HBSS. The washed adipose tissue was treated with collagenase (0.025%) in HBSS for 1 h at 37°C under gentle agitation. The collagenase was inactivated by adding an equal volume of DMEM containing 1% penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine and 10% FCS (control medium). The digested product was then centrifuged at 250 g for 5 min to separate adipose fraction from stromal fraction. The supernatant was removed and the stromal cells were re-suspended in the control medium and filtered through a 70 µm nylon mesh filter. The filtrate was centrifuged and the cells were re-suspended in red blood cell lysis buffer. The lysis reaction was stopped by adding control medium. The suspension was centrifuged and the cells were finally re-suspended in control medium and plated at a density of 5×10^4 cells/cm².

hASC isolated using the protocol described above have been extensively characterized in our laboratory (for details see [35,37]).

The medium was replaced 24 h after seeding to remove non-adherent cells. To prevent spontaneous differentiation, primary cultures (P0) of ASC were grown to approximately 80% of confluence and then detached from the cell culture flask using trypsin-EDTA. For all subsequent experiments, ASC at passage 2 were used.

All culture incubations were performed at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and the medium was changed every 2 to 3 days.

For *in vitro* chondrogenic differentiation, ASC were divided into three experimental groups. The cells were cultured for 21 days in monolayers (1×10^4 cells/cm²) under normoxic conditions (21% O₂) in control medium (NCT) or in chondrogenic medium (NCH); otherwise, they were cultured under hypoxic conditions (5% O₂) in chondrogenic medium (HCH). The chondrogenic medium was composed of serum-free DMEM supplemented with 1% penicillin/streptomycin, 6.25 µg/mL insulin, 6.25 µg/mL transferrin, 6.25 ng/mL sodium selenite (ITS), 50 nM sodium L-ascorbate, 1×10^{-8} M dexamethasone and 10 ng/mL TGF-β1 as described previously [35,38]. For *in vitro* culture under hypoxic conditions, ASC were incubated at 37°C, in a tri-gas incubator (Binder, Tuttlingen, Germany) delivering 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ in a humidified atmosphere.

3D culture of human adipose stromal cells in Si-HPMC hydrogel

As described previously, hASC were collected and gently mixed with Si-HPMC hydrogel at a density of 2×10^6 cells/mL of hydrogel [39]. The hASC/Si-HPMC mixture was distributed in 12-well plates (1 mL/well) and incubated at 37°C and 5% CO₂. After a 2 h-incubation, control medium was added. After 24 h, hASC/Si-HPMC hydrogel constructs were separated into three

experimental groups and cultured in NCT, NCH and HCH conditions for 21 days. The media were changed every 2 to 3 days.

Real-time PCR analysis of the chondrogenic differentiation of rabbit and human adipose stromal cells

Total RNA was extracted from monolayer cultures using a Nucleospin® ARN II kit in accordance with the manufacturer's instructions. For hASC cultured in the 3D Si-HPMC hydrogel, total RNA was extracted with Trizol®. One microgram of total RNA was reverse-transcribed using the Superscript® III kit in a total volume of 20 µL. Complementary DNA (cDNA) was amplified in a total volume of 25 µL of PCR reaction mix containing 12.5 µL of Brilliant® SYBR® Green Master Mix (1X), 30 nM SYBR green reference dye and each primer at a concentration of 10 µM. The sequences of the rabbit and human primers are provided in Tables 1 and 2, respectively. The COL2A1 gene encodes the alpha-1 chain of type II collagen, a fibrillar collagen found specifically in cartilage. The ACAN gene encodes aggrecan core protein. Aggrecan is the major member of the proteoglycan family found in the extracellular matrix of cartilaginous tissue. Real-time PCR was performed in a MX3000P® real-time PCR system (Stratagene) under the following conditions: 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 1 min at 60°C and 30 s at 72°C. The efficiency and specificity of each primer set was confirmed using standard curves of cycle threshold values vs. serial dilutions of total RNA and by evaluating the melting profile. Cycle thresholds were normalized to those of β-actin, used as the reference gene, to control for differences in cDNA quantification. The results were reported as relative expression levels.

Implantation of rabbit adipose stromal cells within Si-HPMC hydrogel in rabbit articular defects

After a medial parapatellar incision, the patella was luxated laterally. Two osteochondral defects with a diameter of 3 mm and a depth of 4 mm were created in the patellar groove of the femur, using a surgical round bur on a slow-speed rotary dental handpiece, as described previously [10]. The surgical procedure was performed on both sides. For the implantation of autologous rASC/Si-HPMC hydrogel into articular cartilage defects, cells were individualized by trypsin/EDTA treatment, centrifuged at 250 g for 5 min. Two million individualized rASC were gently mixed with 200 µL of the Si-HPMC hydrogel before its reticulation. Defect sites were filled with the Si-HPMC hydrogel containing autologous rASC preconditioned in NCT, NCH, or HCH conditions. As reported previously [10], autologous rabbit nasal chondrocytes (RNCs), used as the positive control, were implanted at a density of 0.5×10^6 RNC/200 µL of Si-HPMC hydrogel. Autologous RNCs were isolated from the nasal septum, harvested and cultured, as described previously [10]. The four different conditions (rASC cultured in NCT, NCH, HCH and RNC) were tested in triplicates and three animals received implants (four implants per rabbit; two per patellar groove). After surgery, the animals were allowed to move freely in their cages. After eighteen weeks, rabbits were sacrificed and the samples were histologically processed as described below.

Implantation of human adipose stromal cells within Si-HPMC hydrogel in nude mice subcutis

hASC were cultured in NCT, NCH and HCH for three weeks and 0.5×10^6 cells were individualized and gently mixed with 250 µL of Si-HPMC hydrogel prior to subcutaneous implantation into nude mice, as described previously [37]. As a control, primary

Table 1. Sequences of rabbit primer pairs, gene bank accession numbers used for real-time PCR analysis and size of the PCR products.

Gene	Gene Bank Accession Number	Sequence	Base Pairs (bp)
<i>Atcb</i> (b-actin)	NM_001101683	Fwd 5'-CCCCTCTACGAGGGCTACGC-3' Rev 5'-TCCTTGATGTCCCGCACGATC-3'	152
<i>Col2a1</i> (type II collagen)	NM_001195671	Fwd 5'-ACAGCAGGTTCACCTATACCG-3' Rev 5'-CCCACTTACCGGTGTGTTTC-3'	60
<i>Acan</i> (aggrecan)	XM_002723376	Fwd 5'-GAGGATGGCTCCACCACT-3' Rev 5'-TGGGGTACCTGACAGTCTGA-3'	61

doi:10.1371/journal.pone.0062368.t001

horse nasal chondrocytes (HoNCs) incorporated into Si-HPMC hydrogel (0.5×10^6 HoNC/250 μ L) were injected subcutaneously.

The four different conditions (ASC cultured in NCT, NCH, HCH and HoNCs) were tested in triplicates and six animals received implants (two implants per animal). The animals were sacrificed five weeks after implantation and the samples were processed histologically as described below.

Histological analysis of explants

A group of rabbit explants was embedded in resin Technovit 9100 New[®] as described by Yang *et al.* [40] and stained using Movat's pentachrome [41].

The second group of rabbit explants, mice explants and hASC cultured in the Si-HPMC hydrogel were embedded in paraffin and stained or immunostained, as described previously [37,42]. Briefly, the explants embedded in resin and paraffin were cut in 5 μ m-thick sections passing through the middle of the defects in the coronal plane. The production of a cartilaginous matrix containing sulfated glycosaminoglycans (GAG) and type II collagen was evaluated using alcian blue staining and type II collagen immunostaining, respectively. For type II collagen immunostaining, human nasal cartilage sections were used as a positive control. As a negative control, the sections were processed using an identical protocol, but omitting the primary antibody. The sections were then visualized using a light microscope (Zeiss Axioplan2, Göttingen, Germany), with immuno-positive areas exhibiting brown staining.

The histological sections were evaluated by double-blind, randomized scoring performed by five trained, independent examiners for each section ($n = 3$ per replicate). To evaluate the quality of the repaired tissue in rabbits after surgery, the sections were scored according to O'Driscoll's method [43]. O'Driscoll

scoring assesses the nature of the predominant tissue (cellular morphology 0–4; matrix staining 0–3), the structural characteristics (surface regularity 0–3; surface integrity 0–2; thickness 0–2; bonding to the adjacent cartilage 0–2), cellular degenerative changes (hypocellularity 0–3; chondrocyte clustering 0–2) and changes in adjacent cartilage (0–3). The score for a normal cartilage is 24.

Statistical analysis

Each *in vitro* experiment was repeated at least three times with similar results. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of triplicate determinations. Means were compared using a one-way ANOVA followed by a post-hoc test (Tukey's honestly significant difference). Histological grading scores were analyzed using the Wilcoxon Mann-Whitney test. A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Chondrogenic potential of differentially preconditioned rabbit adipose stromal cells

Prior to investigating the *in vivo* effects of hypoxic preconditioning of autologous rASC, we characterized the *in vitro* phenotype of differentially preconditioned rASC. The rASC were cultured in a monolayer under NCT, NCH, or HCH conditions (Fig. 1A). Our real-time PCR data indicate that, in the NCT condition, the expression of type II collagen (*col2a1*) mRNA could not be detected (ND) and aggrecan (*acan*) mRNA was barely detectable. The expression of *col2a1* and *acan* became detectable in the NCH condition and substantially increased in rASC cultured in HCH conditions with significant 4.5- and 1.6-fold increases, respectively, compared with the NCH condition (Fig. 2A).

Table 2. Sequences of human primer pairs, gene bank accession numbers used for real-time PCR analysis and size of the PCR products.

Gene	Gene Bank Accession Number	Sequence	Base Pairs (bp)
<i>ACTB</i> (β -actin)	NM_001101	Fwd 5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3' Rev 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'	97
<i>COL2A1</i> (type II collagen)	NM_001844	Fwd 5'-TGTCAGGGCCAGGATGTC-3' Rev 5'-ATCATTATACCTCTGCCCATCC-3'	63
<i>ACAN</i> (aggrecan)	NM_001135	Fwd 5'-CCTCCCCTTCACGTGTAAAA-3' Rev 5'-GCTCCGCTCTGTAGTCTGC-3'	64

doi:10.1371/journal.pone.0062368.t002

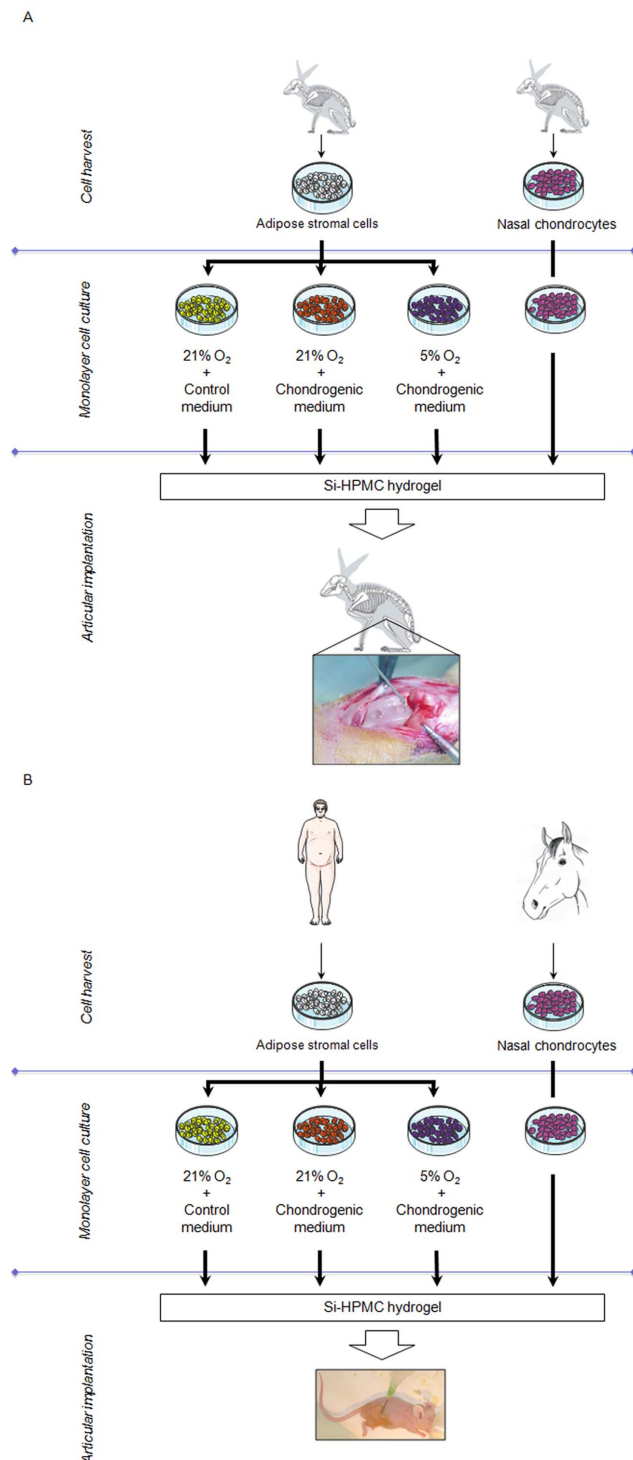


Figure 1. Schematic overview of *in vivo* experimental design. A) Schematic overview of the chondrogenic potential of differentially preconditioned rabbit adipose stromal cells (rASC). rASC were isolated and cultured under normoxic conditions (21% O₂) in control medium or chondrogenic medium or under hypoxic conditions (5% O₂) in chondrogenic medium. As a positive control, rabbit nasal chondrocytes (RNC) were used. Preconditioned rASC and RNC were finally associated with Si-HPMC hydrogel and implanted in rabbit articular cartilage defects for 18 weeks. B) Schematic overview of the chondrogenic potential of differentially preconditioned human adipose stromal cells (hASC). hASC were isolated and cultured under normoxic conditions (21% O₂) in control medium or chondrogenic medium or under hypoxic

conditions (5% O₂) in chondrogenic medium. As a positive control, horse nasal chondrocytes (HoNC) were used. Preconditioned hASC and HoNC were finally associated with Si-HPMC hydrogel and implanted in nude mice subcutis for 5 weeks.
doi:10.1371/journal.pone.0062368.g001

We next aimed to determine the effects of *in vitro* hypoxic preconditioning of rASC on their *in vivo* chondrogenic potential. rASC were cultured in the three conditions mentioned above and implanted within a Si-HPMC hydrogel in rabbit articular cartilage defects.

The newly formed tissue after implantation of the differentially preconditioned rASC/Si-HPMC hydrogel was first histologically characterized. Movat's pentachrome staining (Fig. 2B b, f, j) revealed yellow collagen fibers, especially in the superficial zone, in the NCT and NCH conditions. Round/oval cells and green/blue stained GAG seemed to be more predominant in the middle and deep zones. Alcian blue staining (Fig. 2B c, g, k) and immunostaining for type II collagen (Fig. 2B d, h, l) revealed the presence of sulfated GAG and type II collagen in the three conditions. In the NCT condition, GAG was weakly stained and immunostaining for type II collagen remained slight. When rASC were preconditioned in the NCH condition, alcian blue staining remained weak and type II collagen was mainly noted in the deep zone of the newly formed tissue. For rASC preconditioned in the HCH condition, GAG and type II collagen were homogeneously detected.

As expected, the implantation of the autologous RNC/Si-HPMC hydrogel induced the formation of a well-organized tissue (Fig. 2B n) rich in GAG (Fig. 2B o) and type II collagen (Fig. 2B p).

To further analyze the newly formed tissue, a semi-quantitative assessment was performed (Fig. 2C) using O'Driscoll's score. No difference between NCT- and NCH-preconditioned rASC and RNC was noted (16.5 ± 0.1 ; 17.9 ± 0.1 ; and 18.6 ± 0.065 , respectively). The score for HCH-preconditioned rASC/Si-HPMC (21.5 ± 0.01) was slightly, but not significantly, higher when compared with the other conditions.

The histological analyses revealed that the implantation of differentially preconditioned rASC/Si-HPMC hydrogel constructs led to the formation of a repair tissue containing GAG and type II collagen to a similar extent, regardless of the type of preconditioning used. Thus, although low oxygen tension exerts an *in vitro* pro-chondrogenic effect, the *in vivo* articular environment could overcome this effect.

Chondrogenic potential of differentially preconditioned human adipose stromal cells

To counteract this potential effect of the articular environment and with the long-term goal of developing a human therapy, we next tested the subcutaneous implantation of human ASC in nude mice (Fig. 1B).

Before investigating the impact of hypoxic preconditioning of hASC on their *in vivo* chondrogenic potential, the phenotypes of differentially preconditioned hASC were first characterized. Our real-time PCR data revealed that the expression levels of *COL2A1* and *ACAN* mRNA could be detected only for cells cultured in NCH and HCH (Fig. 3A). The mRNA for these genes was significantly upregulated 2- and 1.3-fold in chondrogenic medium under hypoxic conditions compared with normoxic conditions, respectively. Similar to the rASC findings, these results confirm that an induction medium is required for the induction of type II collagen and aggrecan expression and that 5% O₂ increases their expression.

To address the effects of hypoxic preconditioning on the chondrogenic potential of hASC *in vivo*, differentially precondi-

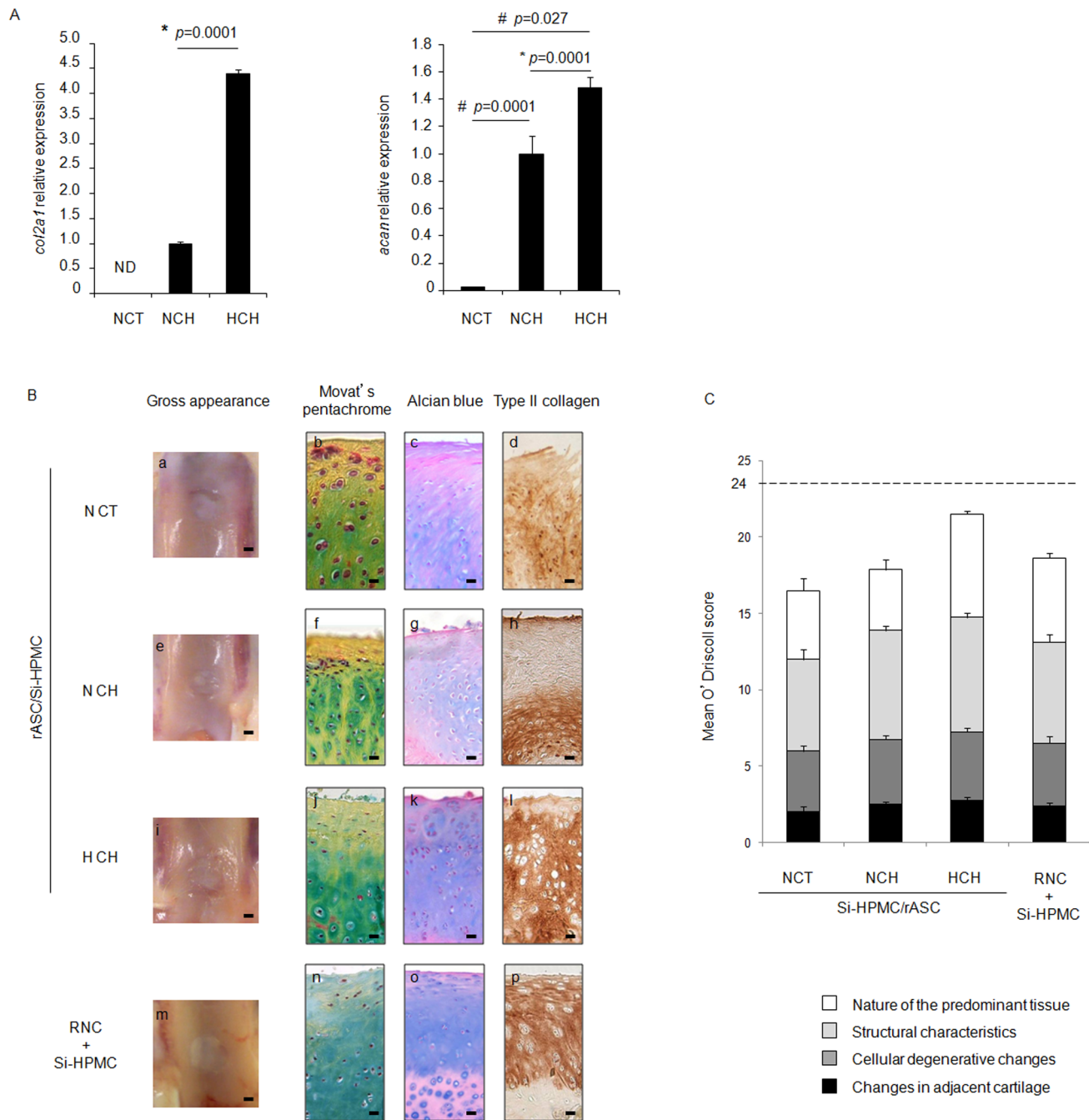


Figure 2. Chondrogenic potential of differentially preconditioned rabbit ASC (rASC). **A** rASC were cultured under normoxic conditions (21% O₂) in control medium (NCT) and chondrogenic medium (NCH) or under hypoxic conditions (5% O₂) in chondrogenic medium (HCH). The expression of transcripts encoding type II collagen (*col2a1*) and aggrecan (*acan*) was measured by real-time PCR. The results are expressed as relative expression levels. ND: not detected. # $p<0.05$ compared with NCT; * $p<0.05$ compared with NCH. **B** rASC were cultured in NCT (a, b, c, d), NCH (e, f, g, h), or HCH (i, j, k, l) and implanted with the Si-HPMC hydrogel in rabbit osteochondral defects. Rabbit nasal chondrocytes (RNCs) incorporated into the Si-HPMC hydrogel were used as a control (m, n, o, p). After 18 weeks of implantation, the defects were macroscopically observed [gross appearance (a, e, i, m)], histologically stained using Movat's pentachrome (b, f, j, n) and alcian blue (c, g, k, o) and immunostained for type II collagen (d, h, l, p). a, e, i, m: bar indicates 1 mm. b–d; f–h, j–l, n–p: bar indicates 100 μ m. **C** A semi-quantitative analysis of the regenerated tissue was performed using O'Driscoll's repair score as described in the "Materials and Methods" section. The results are expressed as a mean O'Driscoll score. doi:10.1371/journal.pone.0062368.g002

tioned hASC were incorporated into Si-HPMC hydrogel and injected into subcutaneous pockets of nude mice. The histological examination of the newly formed tissue using NCT-preconditioned hASC revealed the absence of cell aggregate formation (Fig. 3B a, b). In contrast, hASC implants that had been

preconditioned in NCH or HCH revealed the formation of cell aggregates (Fig. 3B c, d, e, f) that were positively stained by alcian blue and immunoreactive for type II collagen, thus suggesting the production of a cartilaginous matrix. As expected, primary HoNCs used as the positive control revealed the formation of

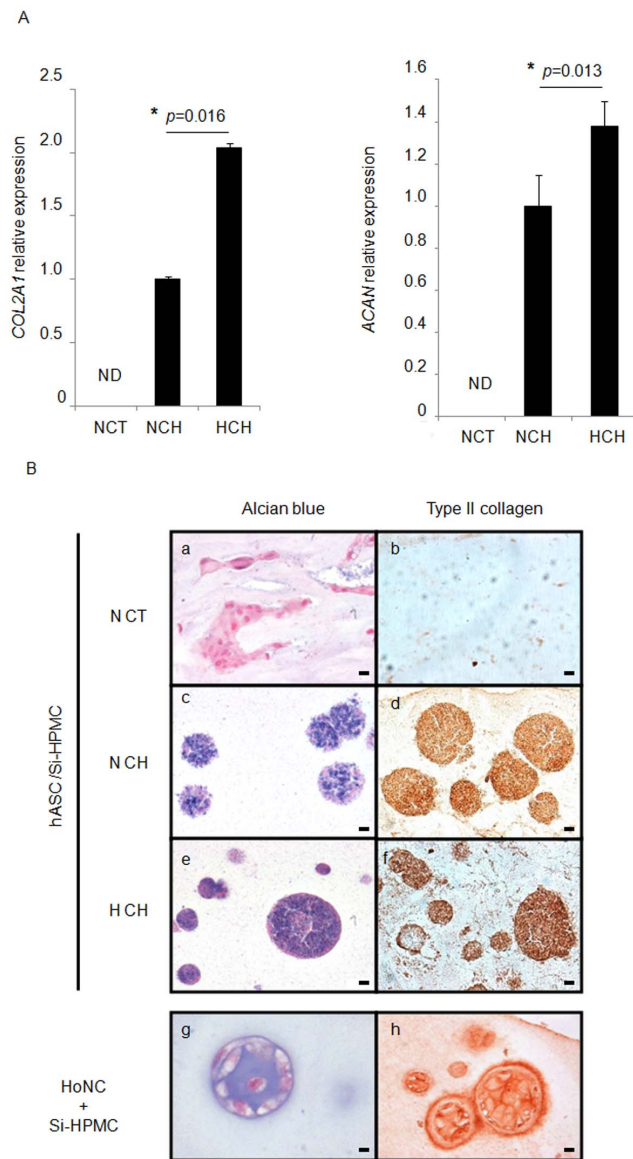


Figure 3. Chondrogenic potential of differentially preconditioned human ASC (hASC). **A**) hASC were cultured under normoxic conditions (21% O₂) in control medium (NCT) and chondrogenic medium (NCH) or under hypoxic conditions (5% O₂) in chondrogenic medium (HCH). The expression of transcripts encoding type II collagen (COL2A1) and aggrecan (ACAN) was measured using real-time PCR. The results are expressed as relative expression levels. ND: not detected * $p < 0.05$ compared with NCH. **B**) hASC were cultured in NCT (a, b), NCH (c, d) or HCH (e, f) and implanted with the Si-HPMC hydrogel into subcutaneous pockets of nude mice. Horse nasal chondrocytes (HoNCs) incorporated into the Si-HPMC hydrogel were used as a control (g, h). After five weeks, the samples were harvested, histologically stained using alcian blue (a, c, e, g) and immunostained for type II collagen (b, d, f, h). Bar indicates 20 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0062368.g003

cartilage-like aggregates containing GAG and type II collagen (Fig. 3B g, h).

Although low oxygen tension exerts an *in vitro* prochondrogenic effect, our data reveal that hASC cultured in chondrogenic medium, regardless of oxygen tension, are able to form cartilaginous cell aggregates to a similar extent.

These findings suggest that Si-HPMC may be a suitable scaffolding hydrogel that allows cells to adequately sense their environment.

In vitro chondrogenic differentiation of 3D-cultured human adipose stromal cells

To address whether ASC cultured within the Si-HPMC hydrogel respond to a prochondrogenic environment (i.e., 3D culture, chondrogenic medium and low oxygen tension), hASC were cultured within Si-HPMC hydrogel in NCT, NCH and HCH conditions. The *in vitro* production of a cartilaginous matrix was evaluated by alcian blue staining and type II collagen immunostaining. hASC cultured in NCT/Si-HPMC hydrogel exhibited weak alcian blue staining and type II collagen immunostaining (Fig. 4A a, b). In contrast, hASC cultured in chondrogenic medium within the Si-HPMC hydrogel were positive for GAG and type II collagen, especially when cultured under 5% O₂ (Fig. 4A c–f).

To further evaluate the scaffolding properties of the Si-HPMC hydrogel, we compared the expression of COL2A1 and ACAN mRNA in hASC cultured in monolayer or within the Si-HPMC hydrogel under the NCT, NCH and HCH conditions. According to the results obtained by real-time PCR, hASC cultured in a monolayer in NCT or in the NCT/Si-HPMC hydrogel barely expressed the two transcripts. In the monolayer condition, the chondrogenic medium induced a 2-fold increase in the expression of these transcripts, when compared with the NCT condition. In the Si-HPMC hydrogel condition, the chondrogenic medium induced 8- and 125-fold increases in the expression of COL2A1 and ACAN mRNA, respectively, when compared with the NCT condition (Fig. 4B).

In addition, a 3- and 6-fold increase in COL2A1 and ACAN transcripts, respectively, was observed in hASC cultured in the HCH monolayer, when compared with the NCH/monolayer. In Si-HPMC hydrogel, the expression of COL2A1 and ACAN was increased by 60- and 1.5-fold, respectively, for hASC cultured in HCH compared to those cultured in NCH.

These results suggest that hASC cultured within Si-HPMC hydrogel are responsive to a prochondrogenic medium and a 5% O₂ tension. In addition, our data strongly suggest that a 3D culture within Si-HPMC hydrogel may support the capacity of the prochondrogenic condition to enhance the chondrogenic differentiation of hASC.

Discussion

In the last decade, MSC-based regenerative strategies have been thoroughly investigated for the formation of long-term functional tissue in cartilage repair. However, controlling the chondrogenic commitment and differentiation of MSC remains challenging [44]. Among the various chondrogenic factors that could be used to exploit the potential of MSC for cartilage regeneration, hypoxia is probably among the most tunable, safe and easy-to-use. In this context, we evaluated whether *in vitro* low oxygen tension could impact the cartilage regenerative potential of ASC after *in vivo* implantation.

Consistent with our previously published data [35], our *in vitro* results confirmed that low oxygen tension increased the expression of the two major chondrogenic markers in monolayer-cultured ASC of rabbit and human origin. This first set of experiments also allowed us to determine whether ASC exhibited different levels of chondrogenic commitment after *in vitro* preconditioning under various conditions (NCT, NCH and HCH), especially at the mRNA level.

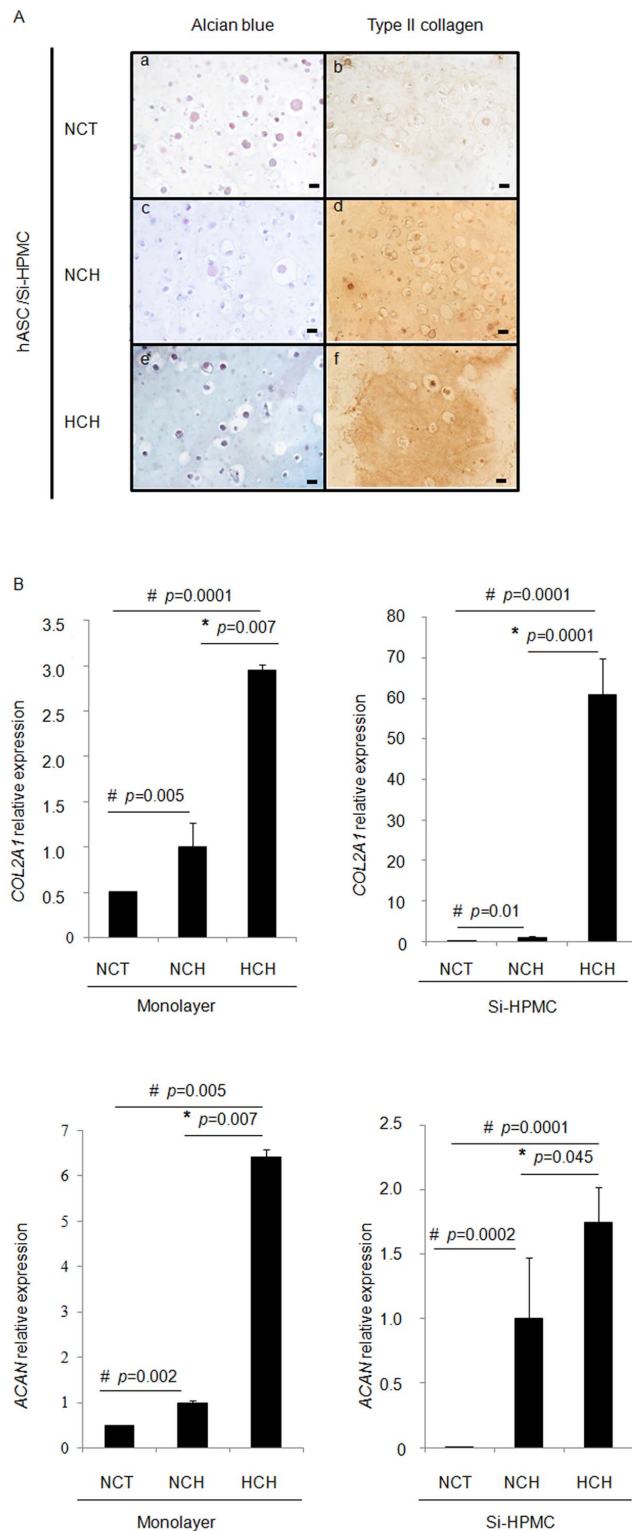


Figure 4. Chondrogenic differentiation of 3D cultured human ASC (hASC). **A)** hASC were 3D cultured within the Si-HPMC hydrogel under normoxic conditions (21% O₂) in control medium (NCT) (a, b) and chondrogenic medium (NCH) (c, d) or under hypoxic conditions (5% O₂) in chondrogenic medium (HCH) (e, f). The presence of sulfated glycosaminoglycans and type II collagen was investigated using alcian blue staining (a, c and e) and type II collagen immunostaining (b, d and f), respectively. Bar indicates 20 μ m. **B)** hASC were cultured in a monolayer or within the Si-HPMC hydrogel under normoxic conditions

(21% O₂) in control medium (NCT) and chondrogenic medium (NCH) or under hypoxic conditions (5% O₂) in chondrogenic medium (HCH). The expression of transcripts encoding type II collagen (COL2A1) and aggrecan (ACAN) was measured by real-time PCR. The results are expressed as relative expression levels. # $p < 0.05$ compared with NCT. * $p < 0.05$ compared with NCH. doi:10.1371/journal.pone.0062368.g004

Next, we evaluated the *in vivo* chondrogenic potential of these differentially preconditioned ASC. To enable the *in vivo* implantation of ASC, we used an injectable and self-setting cellulose-based hydrogel (Si-HPMC) that was developed for skeletal tissue engineering [42]. We then performed *in vivo* experiments in two complementary animal models that are widely used in cartilage tissue engineering: the repair of osteochondral defects in the rabbit knee joint [41] and the formation of subcutaneous cartilaginous cell aggregates in nude mice [37].

Based on our histological data and regardless of the preconditioning conditions, rabbit ASC were found to generate repair tissue in cartilage defects. It is well known, however, that the functional load-bearing capacity of cartilaginous repair tissue is dependent on the ultrastructural components and the organization of the newly formed tissue [45,46]. On the one hand, vertical collagen fibers in the deep zone of the cartilage counteract swelling and protect the extracellular matrix from strain at the subchondral junction. On the other hand, horizontal fibers in the superficial zone play a critical role in tangential resistance to shear stress at the articular surface. Given the biomechanical relevance of this specific histological organization of hyaline cartilage, it was particularly notable in the present study that preconditioned ASC, especially in chondrogenic medium and hypoxic conditions, induced the formation of repair tissue that exhibited a hyaline-like organization. These data confirm the potential of ASC for cartilage engineering.

Surprisingly, although 5% oxygen tension dramatically stimulated the *in vitro* chondrogenic differentiation of rASC, it failed to significantly enhance the *in vivo* formation of cartilage-like tissue in the rabbit articular site.

However, a crucial point when interpreting the results from the *in vivo* cartilage repair experiments is determining how much the cells actually influenced the outcome, as spontaneous repair is known to occur in osteochondral defects [47].

Therefore, the repair of an osteochondral defect in rabbits would probably not constitute the most relevant model to accurately evaluate the regenerative potential of cells. Thus, to counteract the endogenous regenerative effects of the articular environment, we implanted human ASC in nude mice subcutis in one of the most widely established models used to decipher the regenerative potential of cell biomaterial constructs.

In this model, and in contrast to the effect observed for NCT-preconditioned cells, chondrogenically induced human ASC incorporated into Si-HPMC hydrogel formed cartilage-like cell aggregates enriched in type II collagen and GAG. However, as previously reported for rabbit knee joints, 5% low oxygen tension did not stimulate the formation of cartilage-like aggregates. In contrast to the data obtained using rabbit ASC in the cartilage defect model, the findings in the subcutaneous nude mouse model highlight the beneficial effect of the induction medium on the *in vivo* chondrogenesis of hASC. This discrepancy, regardless of differences between species, could arise from the cartilaginous articular environment, which may provide implanted cells with prochondrogenic stimuli, such as growth factors, low oxygen tension, and mechanical constraints [48]. These prochondrogenic stimuli are also known to favor MSC chondrogenesis and cartilage tissue maturation [49,50]. In addition, the presence of progenitor

cells in articular cartilage has been detected in the superficial zone of articular cartilage. Cell population CD105+/CD166+ exhibiting a high colony-forming efficiency, a chemotactic activity and limited multipotency has been described recently [51,52,53,54]. These endogenous progenitors may influence the behavior of implanted cells and erase the differences observed after the preconditioning culture. However, the role and function of these endogenous progenitors have yet to be clearly deciphered, especially in the context of cartilage repair.

Altogether, the data obtained from the present rabbit and nude mice experiments demonstrate that although hypoxia strongly promotes the *in vitro* chondrogenic differentiation of ASC in a monolayer or entrapped within a Si-HPMC hydrogel, it fails to potentiate the formation of cartilaginous tissue *in vivo*. Viewing the discrepancy between the *in vitro* and *in vivo* data, it seems reasonable to speculate that cells implanted within Si-HPMC hydrogel experience some quite similar environmental factors, including low oxygen tension, that could greatly influence their ability to produce a cartilaginous tissue [30,31]. The effects of this low oxygen tension are mainly to be mediated by the activation of the HIF transcription factor family [55]. As suggested by our *in vitro* data, such a low oxygen tension has indeed been reported to stimulate the chondrogenic differentiation through a specific stabilization of HIF1- α . It is well acknowledged that HIF-1 α /HIF-1 β dimers upregulate the transcriptional activity of SOX9 promoter through binding on specific hypoxia-responsive element sequences [33,56], which in turn increases the expression of type II collagen and aggrecan. In addition, it has been shown that low oxygen tension also contributes to the hydroxylation-mediated maturation of the collagen fibers through the increase in the expression of prolyl-4-hydroxylase [57,58].

Regardless of the animal model used, one of the limitations in the present manuscript and in a large number of similar studies reported in the literature is the time point at which the formation of a repair tissue is investigated (18 weeks in rabbits and 5 weeks in nude mice). The maturation of the newly formed cartilage is indeed a complex, spatially- and temporally-regulated process that involved a large number of biological partners.

The Si-HPMC hydrogel that has long been considered a suitable vehicle for the delivery of cells in a cartilaginous defect via a minimally invasive surgical protocol should also be viewed as a permeable structure that allows cells to sense environmental prochondrogenic stimuli, such as growth factors, low oxygen tension and mechanical constraints.

Consequently, we hypothesized that the Si-HPMC hydrogel may provide a 3D scaffolding environment suitable for chondrogenesis. To address this issue, we cultured hASC in monolayers or within the Si-HPMC hydrogel under NCT, NCH and HCH

conditions. Our results suggest that the *in vitro* 3D culture within the Si-HPMC hydrogel seems to enhance the prochondrogenic effects of the induction medium and hypoxia. Both these properties of our hydrogel are likely to make Si-HPMC a promising scaffolding biomaterial for MSC-based cartilage tissue engineering [10].

The successful regeneration of cartilage, however, requires that the cells be driven towards a stable articular phenotype, as opposed to a growth plate phenotype, which leads to hypertrophy and ultimately to cartilage calcification [59]. Five per cent oxygen has been shown to not only promote the chondrogenic differentiation of MSC, but also to prevent their hypertrophic differentiation [60,61]. Thus, considering this effect of hypoxia on the terminal conversion of MSC towards a hypertrophic phenotype, testing whether hypoxic preconditioning of ASC could be used to prevent the formation of calcified tissue *in vivo* after long-term implantation remains of particular interest. This point will be addressed in future experiments.

Conclusions

Our study shows that concomitant treatment with low oxygen tension and a chondrogenic medium promotes the *in vitro* chondrogenic differentiation of ASC of rabbit and human origin. In addition, our data indicate that the *in vitro* chondrogenic differentiation of ASC, regardless of oxygen preconditioning, is required for optimal cartilage regeneration *in vivo*. Although hypoxic preconditioning of ASC did not improve *in vivo* regeneration in our models, whether such preconditioning may help prevent the formation of calcified cartilage *in vivo* remains to be determined. These data together provide new insights into the biology of MSC and could help take advantage of their regenerative potential for the development of a clinically relevant cartilage tissue repair procedure.

Acknowledgments

The authors also gratefully acknowledge Dr F. Lejeune (Clinique Bretéché Nantes) for harvesting human lipoaspirates. The authors would also like to thank the staff at "Koonec: Scientific and Medical Translation". Finally, the authors express thanks to Servier Medical Art for the designed cell biology element.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SP CM O. Gauthier JG CV. Performed the experiments: SP CM JL SS MM BHF O. Gauthier EL O. Geffroy CV. Analyzed the data: SP CM O. Gauthier JL SS MM JG CV. Contributed reagents/materials/analysis tools: PW. Wrote the paper: SP CM JG CV.

References

- Buckwalter JA, Mankin HJ (1998) Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum* 41: 1331–1342.
- Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ (2001) Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res*: S362–S369.
- Tyyni A, Karlsson J (2000) Biological treatment of joint cartilage damage. *Scand J Med Sci Sports* 10: 249–265.
- Hunziker EB (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 432–463.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, et al. (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889–895.
- Moseley JB Jr, Anderson AF, Browne JE, Mandelbaum BR, Micheli LJ, et al. (2010) Long-term durability of autologous chondrocyte implantation: a multicenter, observational study in US patients. *Am J Sports Med* 38: 238–246.
- Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A (2010) Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med* 38: 1117–1124.
- Szpalski C, Barbaro M, Sagebin F, Warren SM (2012) Bone tissue engineering: current strategies and techniques—part II: Cell types. *Tissue Eng Part B Rev* 18: 258–269.
- Chen J, Chen H, Li P, Diao H, Zhu S, et al. (2012) Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone *in vivo* using MSCs induced by a spatially controlled gene delivery system in bilayered integrated scaffolds. *Biomaterials* 32: 4793–4805.
- Vinater C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noel D (2009) Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol* 27: 307–314.
- Maumus M, Guerit D, Toupet K, Jorgensen C, Noel D (2011) Mesenchymal stem cell-based therapies in regenerative medicine: applications in rheumatology. *Stem Cell Res Ther* 2: 14.
- Cao L, Yang F, Liu G, Yu D, Li H, et al. (2011) The promotion of cartilage defect repair using adenovirus mediated Sox9 gene transfer of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 32: 3910–3920.

13. Vinardell T, Sheehy EJ, Buckley CT, Kelly DJ (2012) A comparison of the functionality and in vivo phenotypic stability of cartilaginous tissues engineered from different stem cell sources. *Tissue Eng Part A* 18: 1161–1170.
14. Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, et al. (2006) Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 206: 229–237.
15. Daher SR, Johnstone BH, Phinney DG, March KL (2008) Adipose stromal/stem cells: basic and translational advances: the IFATS collection. *Stem Cells* 26: 2664–2665.
16. 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.
17. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, et al. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279–4295.
18. Strioga M, Viswanathan S, Darinkas A, Slaby O, Michalek J (2012) Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev* 21: 2724–2752.
19. Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA (2012) Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science* 338: 917–921.
20. Dickman BO, Guilak F (2013) Stem cell-based therapies for osteoarthritis: challenges and opportunities. *Curr Opin Rheumatol* 25: 119–126.
21. Nelson L, Fairclough J, Archer CW (2010) Use of stem cells in the biological repair of articular cartilage. *Expert Opin Biol Ther* 10: 43–55.
22. Nooaid P, Salih V, Beier JP, Boccaccini AR (2012) Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications. *J Cell Mol Med* 16: 2247–2270.
23. Bian L, Zhai DY, Zhang EC, Mauck RL, Burdick JA (2013) Dynamic compressive loading enhances cartilage matrix synthesis and distribution and suppresses hypertrophy in hMSC-laden hyaluronic acid hydrogels. *Tissue Eng Part A* 18: 715–724.
24. Dawson E, Mapili G, Erickson K, Taqvi S, Roy K (2008) Biomaterials for stem cell differentiation. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 215–228.
25. Marquass B, Schulz R, Hepp P, Zscharnack M, Aigner T, et al. (2011) Matrix-associated implantation of predifferentiated mesenchymal stem cells versus articular chondrocytes: in vivo results of cartilage repair after 1 year. *Am J Sports Med* 39: 1401–1412.
26. Zscharnack M, Hepp P, Richter R, Aigner T, Schulz R, et al. (2011) Repair of chronic osteochondral defects using predifferentiated mesenchymal stem cells in an ovine model. *Am J Sports Med* 38: 1857–1869.
27. Estes BT, Dickman BO, Gimble JM, Guilak F (2010) Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc* 5: 1294–1311.
28. Weiss S, Hennig T, Bock R, Steck E, Richter W (2010) Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 223: 84–93.
29. Sheehy EJ, Buckley CT, Kelly DJ (2011) Oxygen tension regulates the osteogenic, chondrogenic and endochondral phenotype of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*.
30. Silver IA (1975) Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 271: 261–272.
31. Zhou S, Cui Z, Urban JP (2004) Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modeling study. *Arthritis Rheum* 50: 3915–3924.
32. Haselgrove JC, Shapiro IM, Silverton SF (1993) Computer modeling of the oxygen supply and demand of cells of the avian growth cartilage. *Am J Physiol* 265: C497–506.
33. Amarilio R, Viukov SV, Sharir A, Eshkar-Oren I, Johnson RS, et al. (2007) HIF1 α regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development* 134: 3917–3928.
34. Markway BD, Tan GK, Brooke G, Hudson JE, Cooper-White JJ, et al. (2010) Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplant* 19: 29–42.
35. Merceron C, Vinatier C, Portron S, Masson M, Amiaud J, et al. (2010) Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C355–364.
36. Vinatier C, Magne D, Weiss P, Trojani C, Rochet N, et al. (2005) A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* 26: 6643–6651.
37. Merceron C, Portron S, Masson M, Lesoeur J, Fellah BH, et al. (2011) The effect of two- and three-dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel. *Cell Transplant* 20: 1575–1588.
38. Merceron C, Portron S, Vignes-Colombeix C, Rederstorff E, Masson M, et al. (2012) Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically over-sulphated polysaccharide of marine origin: potential application to cartilage regenerative medicine. *Stem Cells*.
39. Vinatier C, Magne D, Moreau A, Gauthier O, Malard O, et al. (2007) Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *J Biomed Mater Res A* 80: 66–74.
40. Yang R, Davies CM, Archer CW, Richards RG (2003) Immunohistochemistry of matrix markers in Technovit 9100 New-embedded undecalcified bone sections. *Eur Cell Mater* 6: 57–71; discussion 71.
41. Vinatier C, Gauthier O, Fatimi A, Merceron C, Masson M, et al. (2009) An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnol Bioeng* 102: 1259–1267.
42. Clouet J, Vinatier C, Merceron C, Pot-vaucel M, Maugars Y, et al. (2009) From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug Discov Today* 14: 913–925.
43. O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB (1988) Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. *J Bone Joint Surg Am* 70: 595–606.
44. Dickhut A, Peltari K, Janicki P, Wagner V, Eckstein V, et al. (2009) Calcification or dedifferentiation: requirement to lock mesenchymal stem cells in a desired differentiation stage. *J Cell Physiol* 219: 219–226.
45. Owen JR, Wayne JS (2006) Influence of a superficial tangential zone over repairing cartilage defects: implications for tissue engineering. *Biomech Model Mechanobiol* 5: 102–110.
46. Shirazi R, Shirazi-Adl A, Hurtig M (2008) Role of cartilage collagen fibrils networks in knee joint biomechanics under compression. *J Biomech* 41: 3340–3348.
47. 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: 532–553.
48. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126: 677–689.
49. Angele P, Yoo JU, Smith C, Mansour J, Jepsen KJ, et al. (2003) Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J Orthop Res* 21: 451–457.
50. Huang AH, Farrell MJ, Kim M, Mauck RL (2010) Long-term dynamic loading improves the mechanical properties of chondrogenic mesenchymal stem cell-laden hydrogel. *Eur Cell Mater* 19: 72–85.
51. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M (2004) Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 50: 1522–1532.
52. Douthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, et al. (2004) The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci* 117: 889–897.
53. Seol D, McCabe DJ, Choe H, Zheng H, Yu Y, et al. (2012) Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. *Arthritis Rheum* 64: 3626–3637.
54. Karlsson C, Thormemo M, Henriksson HB, Lindahl A (2009) Identification of a stem cell niche in the zone of Ranvier within the knee joint. *J Anat* 215: 355–363.
55. Semenza GL, Neufeldt MK, Chi SM, Antonarakis SE (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5680–5684.
56. Robins JC, Akeno N, Mukherjee A, Dalal RR, Aronow BJ, et al. (2005) Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal cells in association with transcriptional activation of Sox9. *Bone* 37: 313–322.
57. Aro E, Khatri R, Gerard-O'Riley R, Mangiavini L, Myllyharju J, et al. (2012) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) but not HIF-2 is essential for hypoxic induction of collagen prolyl 4-hydroxylases in primary newborn mouse epiphyseal growth plate chondrocytes. *J Biol Chem* 287: 37134–37144.
58. Pfander D, Cramer T, Schipani E, Johnson RS (2003) HIF-1 α controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes. *J Cell Sci* 116: 1819–1826.
59. Freyria AM, Mallein-Gerin F (2011) Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. *Injury* 43: 259–265.
60. Gawlitta D, van Rijen MH, Schrijver EJ, Alblas J, Dhert WJ (2012) Hypoxia impedes hypertrophic chondrogenesis of human multipotent stromal cells. *Tissue Eng Part A* 18: 1957–1966.
61. Hirao M, Tamai N, Tsumaki N, Yoshikawa H, Myoui A (2006) Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J Biol Chem* 281: 31079–31092.

Article IV : “Inverse regulation of early and late chondrogenic differentiation by oxygen tension defines cues for stem cell-based cartilage tissue engineering”

-En cours-

2.3 Résumé

Les cellules souches mésenchymateuses isolées du tissu adipeux (CSA) sont considérées comme une source prometteuse de cellules autologues pour l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire [72,174,175]. Cependant, le processus de différenciation chondrogénique des CSM s'apparente à celui observé dans la plaque de croissance [269]. Ainsi, ces cellules lors de leur implantation *in vivo* peuvent conduire à la formation d'un cartilage minéralisé non fonctionnel [12]. Il apparaît donc crucial de prévenir la formation de ce cartilage minéralisé, en contrôlant la différenciation chondrogénique terminale des CSM. Nous avons émis l'hypothèse que l'hypoxie pourrait, en plus de stimuler les phases précoces de la différenciation chondrogénique, prévenir la phase terminale hypertrophique de cette différenciation.

Pour répondre à cette question, nous avons étudié les effets de la tension en oxygène sur la différenciation chondrogénique et hypertrophique des CSA humaines et de la lignée cellulaire ATDC5. Les CSA et les ATDC5 ont été cultivées en présence de milieu contrôle ou milieu chondrogénique et soumises à une tension en oxygène de 21% (normoxie) ou 5% (hypoxie). Les effets de la tension en oxygène sur la différenciation chondrogénique et hypertrophique ont été évalués par (i) coloration au bleu alcian pour la production de GAG sulfatés, (ii) RT-PCR en temps réel pour l'expression des marqueurs chondrogéniques (Sox9, Acan, Col2a1) et hypertrophiques (Mmp13, Col10A1, Runx2, AlpL), (iii) mesure de l'activité de la phosphatase alcaline. Pour finir, l'activité de liaison à l'ADN de HIF-1alpha et HIF-2alpha a été étudiée par No shift assay.

Par l'étude de deux modèles cellulaires humain et murin, nous montrons que 5% d'oxygène stimule la différenciation chondrogénique tout en prévenant la production d'une matrice minéralisée, en diminuant l'expression des marqueurs hypertrophiques et l'activité de la phosphatase alcaline. De plus, 5% d'oxygène est suffisant pour induire la liaison à

l'ADN de HIF-1alpha et HIF-2alpha. Nos résultats montrent que l'hypoxie non seulement stimule les phases précoces de la différenciation chondrogénique sur deux modèles de cellules chondrogéniques, mais inhibe également les marqueurs hypertrophiques. Ces résultats font de l'hypoxie un outil pertinent pour prévenir la formation d'une matrice calcifiée en ingénierie tissulaire du cartilage à base de CSM.

ARTICLE IV

Inverse regulation of early and late chondrogenic differentiation by oxygen tension defines cues for stem cell-based cartilage tissue engineering

Sophie PORTRON, Vincent HIVERNAUD, Christophe MERCERON, Julie LESOEUR, Martial MASSON, Olivier GAUTHIER, Claire VINATIER, Laurent BECK, Jérôme GUICHEUX

-EN COURS-

**Inverse regulation of early and late chondrogenic differentiation
by oxygen tension defines cues for stem cell-based cartilage tissue
engineering**

S.Portron^{1,2}, V.Hivernaud^{1,2}, C.Merceron^{1,2}, J.Lesoeur^{1,2}, M.Masson^{1,2}, O.Gauthier^{1,2,3},
C.Vinatier^{1,2}, L.Beck^{1,2}, J.Guicheux^{1,2,4}

¹ INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), UMRS 791, center for
osteoarticular and dental tissue engineering, Group STEP “Skeletal Tissue Engineering and
Physiopathology”, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France.

² University of Nantes, UFR Odontology, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1,
France.

³ Center for Preclinical Research and Investigation of the ONIRIS Nantes-Atlantic College of
Veterinary Medicine, Food Science and Engineering (CRIP), Atlanpôle – La Chantrerie,
BP40706, 44307 Nantes Cedex 3, France.

⁴ CHU Nantes, Pole hospitalo-universitaire 4 OTONN, Nantes, France.

Abstract

Purpose

Multipotent stromal cells (MSC) have been considered promising for the regenerative medicine of articular cartilage. The MSC chondrogenic differentiation can ultimately lead to the formation of hypertrophic chondrocytes responsible for the calcification of cartilage. To prevent this MSC-dependent production of a calcified matrix in articular site, the MSC late hypertrophic differentiation has to be carefully controlled. Given that articular cartilage is avascular, we questioned whether in addition to its stimulatory role in the early differentiation of chondrogenic cells, hypoxia may prevent their late hypertrophic conversion.

Materials and Methods

Human adipose MSC and murine ATDC5 cells were used. Cells were cultured in normoxia (21% O₂) or hypoxia (5% O₂). The effects of hypoxia on the chondrogenic and hypertrophic differentiation was evaluated by (i) the production of GAGs and calcified matrix by Alcian blue and Alizarin red stainings respectively (ii) the expressions of chondrogenic and hypertrophic differentiation markers (Sox9, Acan, Col2a1, Mmp13, Col10A1, Runx2, AlpL) by RT-PCR (iii) the measurement of alkaline phosphatase. The transcriptional activity of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha was evaluated by No shift DNA binding assay.

Results

A 5%O₂ has been found to stimulate the early chondrogenic commitment while decreasing the production of a calcified matrix, down-regulating the expression of hypertrophic markers and reducing alkaline phosphatase. Our data also indicate that a 5%O₂ promoted the transcriptional activity of HIF-1alpha and HIF-2alpha.

Conclusions

41 Our data demonstrate that a low oxygen tension not only stimulates the early chondrogenic
42 commitment of two complementary models of chondrogenic cells, but also inhibits their
43 hypertrophic differentiation. These results make hypoxia an instrumental tool to prevent the
44 formation of a calcified matrix in MSC-based cartilage tissue engineering.

45

Introduction

Hyaline articular cartilage damages through aging, trauma and inflammatory or degenerative diseases often result in extracellular matrix degradation and ultimately in the loss of joint function. To address this clinical issue, cell-based reparative strategies using autologous chondrocytes have been proposed and have revealed short and mid-term promising results in human [1]. However, this procedure is accompanied by a donor site morbidity and the limited amount of chondrocyte obtainable upon harvest requires the use of *in vitro* cell expansion that is associated with a risk of cell dedifferentiation. Consequently, the therapeutic strategies that consist in implanting autologous chondrocytes have rarely resulted in a complete and stable regeneration of hyaline cartilage. In this context, the repair of damaged cartilage remains a clinical challenge that has recently prompted the development of regenerative strategies based on the use of mesenchymal stromal cells as an alternative to the use of autologous chondrocytes as well as the development of bio-inspired smart biomaterials [2, 3].

Preclinical and clinical studies have thus demonstrated the potential of mesenchymal stem/stromal cells (MSC) to repair articular cartilage defects (for review see [4, 5]). These studies have also highlighted several key challenges that remain to be overcome, among them, the quality and durability of the newly formed tissue, its effective integration with the surrounding host tissue and the control of the chondrogenic differentiation towards a stable and non-hypertrophic phenotype [6]. Indeed, it is well acknowledged that MSC committed into the chondrogenic differentiation have the ability to recapitulate the endochondral ossification process from the early commitment to the late hypertrophic phase [7]. This late hypertrophic conversion of the chondrogenic cells initiates the formation of a mineralized cartilaginous matrix that will be ultimately converted into bone [8]. Several studies reported that *in vitro* chondrogenically-differentiated bone marrow (BM)-derived MSC express

hypertrophy-related genes, such as MMP-13 and type X collagen [9-15]. Consistently, this *in vitro* late hypertrophic differentiation has been reported to lead to an unwanted formation of a calcified matrix when human BM-MSC are subsequently implanted in nude mice subcutis [16, 17]. Therefore, one of the major challenges in MSC-based cartilage tissue engineering is the preservation of the early chondrogenic differentiation to promote the formation of a hyaline-like tissue repair while preventing their terminal hypertrophic differentiation.

As the physiological oxygen tension experienced by articular chondrocytes is ranging from 2 to 7 % [18, 19, 20], the use of such a low oxygen tension as an environmental factor able to finely tune the chondrogenic phenotype of BM-MSC *in vitro* [21, 22] has been paid attention. Previous studies have thus reported that hypoxic condition could enhance the chondrogenic differentiation of BM-MSC in the presence of inductive medium [23] while impeding their hypertrophic differentiation [24, 25].

However, bone marrow suffers certain limitations that are related to its painful harvest and to the limited amount of collectable MSC. In the light of these limitations, adipose tissue has also been contemplated with interest as an alternative source of MSC. Adipose tissue is indeed easily accessible through non-invasive liposuction and has the advantage of containing MSC in a larger number than bone marrow [26-28]. Despite a large body of evidence indicating the ability of adipose stem/stromal cells (ASC) to undergo an early chondrogenic differentiation *in vitro*, their hypertrophic conversion remains marginally documented [29-31]. In addition, while the impact of a low oxygen tension on their early chondrogenic commitment has been documented [22, 32], its effects on their *in vitro* hypertrophic differentiation remains not yet deciphered despite being of particular interest for cartilage regenerative medicine.

In this context, the major objective of this study was to determine whether a low oxygen tension may differentially influence the early chondrogenesis and late hypertrophic conversion of human ASC. To confirm the data obtain in human ASC and to further analyze the cellular mechanisms underlying the effects of a low oxygen tension, we were also interested in determining whether hypoxia may also influence early and late chondrogenic differentiation in a murine carcinoma-derived chondroprogenitor cell line (ATDC5). First, the extracellular matrix composition and the expression level of chondrogenic and hypertrophic markers of ASC and ATDC5 cells have been monitored over the time. Thereafter, the effects of a low oxygen tension have been investigated on their chondrogenic and hypertrophic phenotypes. Finally, to determine whether the effects of a low oxygen tension could be associated with transcriptional mechanisms, the DNA binding activity of hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha transcription factors was evaluated.

Materials and Methods

Materials

Cell culture plastic wares were purchased from Corning-Costar BV Life Sciences (Schipol-Rijk, The Netherlands). Hank's Balanced Sodium Salt (HBSS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose (4.5g/L), alpha minimum essential medium, F12 Nutrient Mixture (HAM), phosphate-buffered salt (PBS), penicillin/streptomycin, trypsin/EDTA (0.05%/0.53mM), superscript III kit were obtained from Invitrogen Corporation (Paisley, UK). Collagenase crude type I A, red blood cell lysis buffer, trypan blue, sodium L-ascorbate, insulin-transferrin-selenite media supplement, dexamethasone, Alcian blue, Red alizarin S and guanidine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Brilliant SYBR Green Master Mix was obtained from Stratagene Europe (Amsterdam Zuidoost, The Netherlands). PCR primers were synthesized by MWG Biotech (Ebersberg, Germany). Fetal calf serum (FCS) was purchased from Dominique Dutscher (Brumath, France). Protein content was determined using the Pierce Coomassie Plus assay (Pierce, Rockford, IL, USA). HIF-alpha No shift assay was obtained from Bertin pharma (Montigny, France). TGF- β 1 was from PeproTech Inc. (London, UK). NucleoSpin[®] RNA II was obtained from Macherey-Nagel (Hoerdt, France). Alkaline phosphatase assay kit was purchased from Abcam (Cambridge, UK). Axioplan 2 light microscope from Zeiss (Göttingen, Germany). Tri-gas incubator was purchased from Binder (Tuttlingen, Germany).

All other chemicals were obtained from standard laboratory suppliers and were of the highest purity available.

Methods

Isolation, expansion, chondrogenic differentiation and hypoxic culture of human ASC

Human ASC were obtained from patients undergoing liposuction after written consent. Briefly and as previously described [32], human lipoaspirates were washed extensively with HBSS and treated with collagenase type I A (0.025%) in HBSS for 1h at 37°C under gentle agitation. The collagenase was inactivated by adding an equal volume of DMEM containing 1% penicillin/streptomycin and 10% FCS (control medium). The digested product was then centrifuged at 250g for 5min to separate adipocytes from stromal cells. The supernatant was removed and the cells were resuspended in the control medium and filtered through a 70µm nylon mesh filter. The filtrate was centrifuged and the cells were resuspended in red blood cell lysis buffer. The lysis reaction was stopped by adding control medium. The suspension was centrifuged and the cells were finally counted by trypan blue and resuspended in control medium and plated at a density of 5×10^4 cells/cm². The medium was replaced 24h after seeding to remove non-adherent cells. To prevent spontaneous differentiation, primary cultures of ASC were grown to 80-90% confluence and then detached from the cell culture flask using trypsin-EDTA. All culture incubations were performed at 37°C and 5% CO₂ and medium was changed every two to three days.

Five hundred thousand ASC (passage 3) were placed into a 15mL polypropylene tube containing 1mL of control medium. They were then centrifuged for 5min at 250g. The tubes were fitted with vented caps to permit gas exchange, and the cell pellets were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air. After 24h, pellets of ASC were divided into three experimental groups.

To characterize the chondrogenic differentiation of ASC and to examine the effects of hypoxia on their phenotype, pellets of ASC were cultured under normoxia (21% O₂) either in

the presence of control medium (NCT) or chondrogenic medium (NCH) or under hypoxia (5% O₂) in the presence of chondrogenic medium (HCH) during 14, 21 and 28 days. The chondrogenic medium was composed of serum-free DMEM supplemented with 1% penicillin/streptomycin, 6.25µg/mL insulin, 6.25µg/mL transferrin, 6.25ng/mL sodium selenite, 50nM sodium L-ascorbate, 1×10^{-8} M dexamethasone and 10ng/mL TGF-β1 as previously described [32, 33]. Culture media were changed every 2–3 days. For HCH conditions, ASC were cultured as described above and placed at 37°C in a humidified atmosphere and inside a tri-gas incubator containing 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂.

Expansion, chondrogenic induction and hypoxic culture of ATDC5 cells

ATDC5 cells were routinely cultured in a control medium consisting of DMEM/F12 (1:1) containing 5% FCS, 1% penicillin/streptomycin. Cells were passaged once a week using trypsin/EDTA, and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Chondrogenic medium consisted of the growing medium supplemented with 10µg/mL insulin, 10µg/mL transferrin and 10ng/mL sodium selenite. ATDC5 cells were counted by trypan blue and were cultured at $1.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ in control or chondrogenic medium for 2 weeks in normoxia (21% O₂) and for an additional 7 days period of time in chondrogenic medium under normoxic or hypoxic (5% O₂) condition.

For HCH condition, cells were cultured inside a tri-gas incubator containing 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂. The medium was changed every 2-3 days.

Transcript analyses

RNA isolation

Total RNA was extracted from ASC and ATDC5 cells using a Nucleospin® ARN II kit in accordance with the manufacturer's instructions. After DNase digestion, RNA was quantified

using a UV-spectrophotometer (Nanodrop ND-1000, Labtech, Palaiseau, France) and quality was determined with the Agilent Bioanalyser 2100 system (Waldbronn, Germany).

Real-time PCR

One microgram of total RNA was reverse-transcribed using the Superscript[®] III kit. Complementary DNA (cDNA) was amplified in a total volume of 15µL of PCR reaction mix containing 12.5µL of Brilliant[®] SYBR[®] Green Master Mix (1X), 30nM SYBR green reference dye and each primer at a concentration of 10µM. The sequences of the human and mouse primers are provided in Tables 1 and 2 respectively. Real-time PCR were performed in a MX3000P[®] real-time PCR system (Stratagene) under the following conditions: 10min 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 using standard curves of cycle threshold values vs serial dilutions of total RNA and by evaluating the melting profile. Cycle thresholds were normalized to those of *act b* and *PPIA* for ATDC5 cells and ASC mRNAs respectively. The results were reported as relative expression levels.

Histological analyses

ASC pellets were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections (5µm thick) were deparaffinized using toluene, rehydrated through a graded series of ethanol, and rinsed in distilled water. Sections were stained with Trichrome's masson and Alcian blue as previously described [32]. Alcian blue revealed the presence of sulfated glycosaminoglycans (GAG) containing cartilaginous matrix. Trichrome's Masson stained the collagen fibers in green.

Biochemical analyses

The production of GAG by ATDC5 cells was investigated with Alcian blue staining as previously described [32]. Briefly, extracellular matrix was washed with ice-cold PBS and

fixed for 20min in 100% ethanol. Then extracellular matrix was stained at room temperature with 0.1% Alcian blue solution in 0.1M HCl. After overnight incubation, the solution was discarded and the extracellular matrix was rinsed with 0.1M HCl to eliminate nonspecific staining. Photographs were obtained with a light microscope. Alcian blue was quantified using a solution of guanidine/HCl 6M. After 8 hours, liquid was harvested and Alcian blue optical density was read on a spectrophotometer at a wavelength of 595nm.

Calcium deposition in ATDC5 cell culture was detected with Alizarin Red S staining as previously described [34]. Briefly, extracellular matrix was washed with cold PBS and stained with 2% Alizarin red S solution for 2 min. Stained cells were extensively washed with deionized water to remove any nonspecific staining. Photographs were obtained with a light microscope. Alizarin red staining was extracted using a solution of 20% methanol and 10% acetic acid in water. After 15minutes, liquid was harvested and the Alizarin red optical density was read on a spectrophotometer at a wavelength of 450nm.

The alkaline phosphatase activity of ATDC5 cells was evaluated using the Alkaline phosphatase assay in accordance with the manufacturer's instructions.

Nuclear protein extraction and No shift transcription factor assay

Nuclear protein extraction has been performed as described previously [35]. ATDC5 cells were rapidly frozen in liquid nitrogen before lysis at 4 °C. Cell layers were scraped in low salt buffer: 10 mM HEPES, pH 7.9, 0.1 % Nonidet P-40, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol [DTT], 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 10 µg/ml pepstatin A, 10 µg/ml aprotinin, and 10 µg/ml leupeptin. The cellular suspension was incubated on ice for 1 hour with gentle shaking every 15 min and sedimented by centrifugation (10,000g) for 10 min at 4°C. The resultant pellet was resuspended in a high

salt buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 1 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10 µg/ml pepstatin A, 10 µg/ml aprotinin, and 10 µg/ml leupeptin) and incubated for 1–3 hours with gentle shaking every 15 minutes. The nuclear suspension was centrifuged at 10,000g for 10 minutes at 4°C. Then, the supernatants were collected and stored at -80°C. The nuclear protein concentration of nuclear lysates was determined with a Pierce Coomassie Plus protein assay.

The DNA binding activity of the transcriptional factors HIF-1alpha (hypoxia inducible factor-1alpha) and HIF-2alpha was then investigated by an ELISA-based Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) using the HIF-alpha No shift transcription factor assay kit according to the manufacturer's recommendations.

Results

Characterization of the chondrogenic and hypertrophic phenotype of ASC

Before investigating the effects of hypoxia on the chondrogenesis of ASC, we sought to characterize the chondrogenic differentiation of ASC by using Alcian blue and Masson's trichrome staining. While Alcian blue staining of ASC pellets cultured in the control medium failed to reveal the presence of sulfated GAG within the matrix, in the presence of chondrogenic medium and as early as day 14, a blue ring was visible at the external zone of the pellet section, demonstrating the synthesis of sulfated GAG within the matrix (Figure 1A, a-f). In addition, after a 28-day period of culture in the chondrogenic medium, the pellet section was strongly positive for sulfated GAG (Figure 1A a-f). Interestingly, conversely to the pellets cultured in the presence of control medium, ASC pellets cultured in the presence of chondrogenic medium were positive for Masson's trichrome staining. Green-stained collagen fibers were mainly detected at the external zone of the pellet section as early as day 21, whereas collagen fibers were observed within the whole pellet section at day 28 (Figure 1A g-

l). To confirm the expression of chondrogenic markers at the mRNA level, *SOX9*, *ACAN* and *COL2A1* mRNAs were measured by real-time-PCR. Whereas the expression levels of *SOX9*, *ACAN* and *COL2A1* mRNA were not or barely increased whatever the time-period of culture in NCT conditions, the chondrogenic medium induced a significant time-dependent increase in the expression of *SOX9*, *ACAN* and *COL2A1* mRNAs (Figure 1B).

To specifically document the terminal chondrogenic differentiation of ASC, the expression levels of transcripts encoding for several hypertrophic markers including *RUNX2*, *COL10A1* and *MMP13* mRNA were then investigated. Interestingly, in the presence of chondrogenic medium, the expression levels of *RUNX2*, *COL10A1* and *MMP13* mRNA were temporally and significantly increased at day 14, 21 and 28 respectively as compared to day 0 and to control condition at the same day (Figure 1B). Taken together, these data indicate that human ASC are able to undergo an early and late hypertrophic chondrogenic differentiation in the presence of a specific inductive medium.

Effects of hypoxia on the chondrogenic and hypertrophic phenotype of ASC

After having confirmed that human ASC exhibit some of the major features of early chondrogenic and late hypertrophic phenotypes, we sought to determine whether hypoxia may impact on both these phenotypes. Alcian blue and Masson's trichrome stainings were positive and of comparable intensity in both normoxia and hypoxia suggesting the production of sulfated GAG and collagen fibers respectively, in a similar extent (Figure 2A). Our real-time PCR data indicate that ASC cultured in hypoxic condition exhibited a significant increase in *SOX9*, *ACAN* and *COL2A1* mRNA expression as compared to ASC cultured in normoxic condition with a 1.7-, 4.5- and 2.5-fold increase respectively. Of interest, a significant decrease of about 30%, 50% and 60% of steady state levels of *RUNX2*, *COL10A1* and

270 *MMP13* transcripts was observed in ASC cultured in hypoxia as compared to normoxia
271 (Figure 2B).

272 Taken together, these data suggest that, a low oxygen tension not only promoted the
273 expression level of early chondrogenic markers in human ASC but also down-regulated the
274 mRNA expression levels of hypertrophic markers.

275 Characterization of the chondrogenic and hypertrophic phenotype of ATDC5 cells

276 To strengthen the hypothesis that a low oxygen tension may exert its effects in a broad range
277 of chondrogenic cells, we then embarked in experiments using a murine chondroprogenitor
278 cell line, ATDC5 [36, 37]. Our data first confirmed that in the presence of chondrogenic
279 medium, ATDC5 cells formed nodular structures as early as day 7. At day 14 and 21, sulfated
280 GAG and calcium deposits increased within the matrix, as evidenced by Alcian blue and
281 Alizarin red staining respectively. These observations were correlated with the quantification
282 of the extracted stainings (Figure 3A and 3B). These data were then confirmed at the mRNA
283 level. Our RT-PCR data indeed showed that in NCH conditions and as compared to day 0 and
284 to the NCT conditions at the same time, the expression level of *sox9* mRNA markedly
285 increased as early as day 14 and those of *acan* and *col2a1* mRNA increased at days 14 and 21
286 (Figure 3C).

287 Prior to investigate the effects of a low oxygen tension on the hypertrophic phenotype of
288 ATDC5 cells, we first monitored the emergence of the hypertrophic differentiation over the
289 time. Our data have shown that ATDC5 cells cultured in NCH condition exhibited a time-
290 dependent and significant increase in the expression level of *runx2*, *col10a1*, *mmp13* and *alpl*
291 mRNA (Figure 3C). In addition, alkaline phosphatase activity was also found to be
292 significantly increased in NCH conditions as compared to NCT conditions at days 14 and 21
293 (Figure 3D).

The whole of our data indicate that in the presence of an inductive medium ATDC5 cells undergo a chondrogenic differentiation and express multiple hypertrophic markers in a time-dependant manner.

Effects of hypoxia on the chondrogenic and hypertrophic phenotype of ATDC5 cells

We finally sought to address whether hypoxia may influence the chondrogenic and hypertrophic phenotype of ATDC5 cells. Figure 4A indicates that ATDC5 cell cultures were positive for Alcian blue staining without any significant difference between normoxic and hypoxic conditions. Conversely, calcium deposition evidenced by alizarin red staining and quantification was significantly decreased by about three times when cells were cultured in hypoxia as compared to those cultured in normoxia (Figure 4B).

Interestingly, while *sox9*, *acan* and *col2a1* transcripts were significantly increased when cells were cultured in HCH conditions in comparison with NCH conditions (1.7-, 8- and 1.5-fold increase respectively), the expression levels of *runx2*, *col10a1*, *mmp13* and *alpl* mRNAs were significantly decreased by about 80%, 50%, 90% and 80% respectively (Figure 4C). These data at the mRNA level were ultimately confirmed by the decrease in ALP activity. Indeed when ATDC5 cells were cultured in hypoxia, we observed a significant decrease in enzyme activity by about two times when compared to cell cultured in normoxia. (Figure 4D).

Effects of hypoxia on the DNA-binding activity of HIF-1alpha and HIF-2alpha transcription factors

Finally, we were interested in determining whether the 5% oxygen tension used in the present study, may lead to the stabilization of the key transcriptional factors responsible for the cellular effects of hypoxia. We thus performed a No shift transcription factor assay for HIF-1alpha and a HIF-2alpha DNA binding activity on nuclear extracts obtained from both

hypoxia- and normoxia-treated ATDC5 cells. Our data indicated that 4h of culture in hypoxic condition significantly increased the binding of HIF-1alpha and HIF-2alpha on their DNA hypoxia response element (HRE) consensus binding sites. Subsequently, the DNA binding activity of HIF-1alpha and HIF-2alpha decreased at 8h and returned to its basal level at 12h (Figure 5). Hypoxia-induced HIF-1alpha and HIF-2alpha binding to HRE consensus sites were blunted in a competitive assay with a 50-fold molar excess of HRE oligomers (data not shown).

These results indicate that a 5% oxygen tension stimulates the *in vitro* binding of HIF-1alpha and HIF-2alpha to HRE consensus motifs in ATDC5 cells.

Discussion

The control of the chondrogenic differentiation of MSC, and notably the prevention of their hypertrophic conversion, remains an important challenge to direct the repair of cartilage towards a non calcified hyaline-like tissue. Indeed, the *in vitro* MSC chondrogenic differentiation that mimics the successive steps of the development of growth plate chondrocytes, includes the formation of hypertrophic chondrocytes that lead to the calcification of the ECM.

While it is well acknowledged that a low oxygen tension can stimulate the chondrogenic commitment while inhibiting the osteogenic differentiation of ASC [32, 38], the effects of such a low oxygen tension on their hypertrophic differentiation was not yet addressed. Thus considering our ambition to optimize the chondrogenic differentiation of ASC for cartilage repair, we were interested in determining whether a low oxygen tension, an easy-to-use, tunable and safe environmental factor, may modulate the emergence of the early and late chondrogenic differentiation of ASC derived chondrogenic cells.

340 In a first set of experiments, we have characterized the early chondrogenic and late
341 hypertrophic differentiation of human ASC. Our data demonstrated that ASC committed
342 towards the chondrogenic lineage concomitantly express hyaline (SOX9, Aggrecan and Type
343 II collagen) as well as hypertrophic (RUNX2, Type X collagen and MMP13) cartilaginous
344 markers. This concomitant expression of early and late chondrogenic markers could arise
345 from the heterogeneity of the ASC population in culture that is likely to lead to variability in
346 the chondrogenic potential of specific cell subclones. Having demonstrated the chondrogenic
347 and hypertrophic differentiation of ASC, we sought to investigate the effects of a low oxygen
348 tension on these phenotypes. Our results confirm that hypoxia can promote the chondrogenic
349 differentiation of ASC, as previously reported [32, 38]. Interestingly, the mRNA expression
350 level of hypertrophic markers was down-regulated in hypoxic condition in comparison to
351 normoxic condition.

352 To strengthen the scientific relevance of our data, we have also sought to determine whether a
353 low oxygen tension may alter the transcriptional profile of ASC. To address this issue, we
354 have used a TLDA low density real-time PCR arrays. The expression of 96 genes including
355 osteogenesis, adipogenesis, chondrogenesis and apoptosis markers were profiled. Our data
356 failed to demonstrate that hypoxia induced a dramatic alteration of the ASC transcriptional
357 profile (data not shown). However and consistently with our previously mentioned data,
358 TLDA indicate that hypoxia, in addition of being able to increase the early chondrogenic
359 differentiation of ASC, down-regulates the expression level of genes related to the
360 hypertrophic phenotypes (*MEF2C* and *SHOX*) as well as genes associated with the formation
361 of a mineralized matrix (*CST5*, *MGP* and *Bone-GLAP*). Collectively, these data strongly
362 suggest that a low oxygen tension can promotes the chondrogenic differentiation of ASC
363 whilst inhibiting their hypertrophic differentiation.

364 To further address the intracellular mechanisms of the hypoxic response, we thought to
365 proceed with a more accessible, reproducible and homogenous model of chondrogenic cells.
366 Among the relevant reported models of chondrogenic differentiation, ATDC5 remains the
367 only cell line that recapitulates, in a temporally-regulated manner, the full range of events
368 described during the differentiation of growth plate chondrocytes [36, 37]. Thus, ATDC5 cells
369 appear as an appropriate *in vitro* model to finely decipher the role of biological factors that
370 can influence chondrogenesis [39]. Prior to investigate the effects of a low oxygen tension on
371 the hypertrophic phenotype of ATDC5 cells, we first monitored the emergence of the
372 hypertrophic differentiation over the time. In the present study, ATDC5 cells mimics the
373 major stages of the endochondral differentiation process of chondrocyte from (i) the early
374 commitment, as evidenced by *sox9*, *acan* and *col2a1* expressions, sulfated GAG and collagen-
375 enriched nodules formation, until (ii) the terminal conversion towards a hypertrophic
376 phenotype, as evidenced by the increased expression of *runx2*, *col10a1*, *mmp13* and *alpl*
377 mRNA, alkaline phosphatase activity and the calcification of the extracellular matrix. Using
378 this ATDC5 cell model of chondrogenesis, the effects of a low oxygen tension on the
379 hypertrophic differentiation were investigated from day 14 to day 21. Of interest and as
380 reported for ASC, hypoxia promoted the chondrogenic differentiation of ATDC5 cells as
381 evidenced by the increased expression of *sox9*, *acan* and *col2a1* mRNA. The GAG
382 accumulation was not significantly modified by the oxygen tension but hypoxic conditions
383 decreased the production of a calcified matrix, down-regulated the expression of hypertrophic
384 markers (*runx2*, *col10a1*, *mmp13* and *alpl*) and reduced alkaline phosphatase activity. These
385 results demonstrate that hypoxia inhibits the emergence of a hypertrophic phenotype in
386 ATDC5 cells. Altogether, our data strongly suggest that hypoxia can promote and control the
387 chondrogenesis process of ATDC5 cells by acting differentially on both the early
388 chondrogenic and late hypertrophic phenotypes.

Collectively, our findings in ASC and ATDC5 cells demonstrate that the chondrogenic differentiation of human and murine chondrogenic cells is modulated by a low oxygen tension in a quite comparable manner. In light of these data, it seems reasonable to assume that the hypoxia effects may be mediated through a universal pathway involving very common biological effectors. Among these biological effectors, HIF-1alpha and HIF-2alpha are known to be potent intracellular transducers of the low oxygen effects [40]. In hypoxic condition, HIF-1alpha and HIF-2alpha are usually stabilized and appear able to translocate to the nucleus, heterodimerize with the HIF-1beta subunit, and initiate their transcriptional program [41]. HIF-1alpha and HIF-2alpha are thus reported to improve the chondrogenesis of cells by inducing the expression of collagen II and aggrecan through the interaction with the transcriptional factor SOX9 that is considered as the main promoter of chondrogenesis [23, 42, 43]. Consistently, in the present study, a 5% O₂ is found to be sufficient to induce the DNA binding activity of HIF-1alpha and HIF-2alpha. Additional analyses using broad range HIF chemical inhibitors (cadmium [44], 2-Methoxyestradiol [45]) are under intense investigation in our laboratory to precise the role of HIF-1alpha and HIF-2alpha in the hypoxia-mediated control of hypertrophic differentiation.

Recently, the specific roles of HIF-1alpha and HIF-2alpha have received considerable attention. In contrast with HIF-1alpha [46], the role of HIF-2alpha during the chondrogenesis process is indeed currently debated [47]. It has been shown that HIF-2alpha can induce the expression of hypertrophic markers such as type X collagen and MMP13 in hypertrophic and osteoarthritic chondrocytes [48, 49]. These studies particularly suggest that HIF-1alpha and HIF-2alpha have distinct functions in cartilage tissue. In the articular chondrocytes, HIF-1alpha promotes homeostatic pathways whereas HIF-2alpha promotes degradative pathways that foster osteoarthritis [50]. Whether HIF-1alpha and HIF-2alpha may also have distinct

413 roles in controlling the hypoxia-mediated early and late differentiation process of
414 chondrogenic cells remains however to be deciphered. To address this issue, RNA
415 interference experiments targeting specifically HIF-1alpha and HIF-2alpha have been recently
416 initiated.

417 Whereas the underlying mechanisms of the regulation of HIF pathway during osteoarthritis
418 remain poorly understood [48 , 49], improving our understanding of the hypoxia-mediated
419 control of chondrocyte terminal differentiation, could be of major relevance to help design
420 specific drugs targeting HIF pathway in osteoarthritis development.

421 To conclude, the present study demonstrates that a low oxygen tension differentially affects
422 the early and late chondrogenic differentiation of two complementary models of
423 chondrogenesis: human ASC and murine ATDC5 cells. Collectively, our finding therefore
424 makes oxygen tension an instrumental tool to drive an efficient and reliable MSC-based
425 chondrogenesis. These data also highlight the possibility to prevent the *in vivo* formation of a
426 calcified matrix by chondrogenically-committed MSC thanks to the hypoxia-mediated
427 prevention of their hypertrophic differentiation. Whether a sustained prevention of
428 hypertrophy and maintenance of a stable chondrogenic phenotype by hypoxia can be achieved
429 *in vivo* remains however to be determined in adapted preclinical animal models of cartilage
430 repair.

431

Figures Legends

Table 1: Sequences of human primer pairs, gene bank accession numbers used for real-time PCR analysis and size of the PCR products.

Table 2: Sequences of mouse primer pairs, gene bank accession numbers used for real-time PCR analysis and size of the PCR products.

Figure 1: Characterization of the chondrogenic and hypertrophic phenotype of ASC.

Human ASC were cultured in pellets for 14, 21 and 28 days in the presence of control (NCT) and chondrogenic medium (NCH).

(A) Histological sections of ASC pellets were stained with Alcian blue (a-f) or Masson's trichrome (g-l). Bar: 100 μ m.

(B) Expression of chondrogenic markers *SOX9*, *ACAN*, *COL2A1* and hypertrophic markers *RUNX2*, *COL10A1*, *MMP13* were investigated by real time PCR as described in the materials and methods section. Results for the expression of *SOX9*, *ACAN*, *COL2A1*, *COL10A1*, *MMP13* are expressed as relative expression level compared to the control medium at day 0. Results for the expression of *RUNX2* are expressed as relative expression level compared to the control medium at day 14. * $p < 0.05$ compared to the control medium at the same day. # $p < 0.05$ compared to the respective control medium at day 0. ND: not detected.

Figure 2: Effects of hypoxia on the chondrogenic and hypertrophic phenotype of ASC

Human ASC were cultured in pellets for 28 days in the presence of chondrogenic medium under normoxic (NCH) or hypoxic (HCH) conditions.

(A) Histological sections were stained with Alcian blue (a,b) or Masson's trichrome (c,d). Bar: 100 μ m.

(B) Expression of the chondrogenic markers *SOX9*, *ACAN*, *COL2A1* and hypertrophic markers *RUNX2*, *COL10A1*, *MMP13* were investigated by real time PCR as described in the materials and methods section. Results are expressed as relative expression levels. $*p < 0.05$ compared with NCH conditions.

Figure 3: Characterization of the chondrogenic and hypertrophic phenotype of ATDC5 cells

ATDC5 cells were cultured for 0, 7, 14 and 21 days in the presence of control (NCT) and chondrogenic medium (NCH).

(A) Sulfated GAG accumulation was revealed by Alcian blue staining. The staining was extracted and quantified as described in the materials and methods section. Results are expressed as the relative Alcian blue content compared to the control medium at day 0. $*p < 0.05$ compared to the control medium at the same day. $\#p < 0.05$ compared to the control medium at day 0.

(B) Calcium deposition was evaluated by Alizarin red staining. The staining was then extracted and quantified as described in the materials and methods section. Results are expressed as the relative Alizarin red content compared to the control medium at day 0. $*p < 0.05$ compared to the control medium at the same day. $\#p < 0.05$ compared to the control medium at day 0.

(C) Expression of the chondrogenic markers *sox9*, *acan*, *col2a1* and hypertrophic markers *runx2*, *col10a1*, *mmp13*, *alpl* were investigated by real time PCR as described in the materials and methods section. Results are expressed as relative expression level compared to the basal level at day 0. $*p < 0.05$ compared to the control medium at the same day. $\#p < 0.05$ compared to the control medium at day 0. ND: not detected.

(D) Alkaline phosphatase activity was measured in the total protein extract. $*p < 0.05$ compared to the control medium at the same day. $\#p < 0.05$ compared to the control medium at day 0.

Figure 4: Effects of hypoxia on the chondrogenic and hypertrophic phenotype of ATDC5 cells

(A-E) ATDC5 cells were cultured for 14 days in the presence of chondrogenic medium under normoxic conditions and then cultured for a 7 days-period of time either in normoxic (NCH) or hypoxic (HCH) conditions.

(A) Sulfated GAG accumulation was revealed by Alcian blue staining. The staining was extracted and quantified as described in the materials and methods section. Results are expressed as the relative Alcian blue content compared to the NCH condition at the same time.

(B) Calcium deposit was evaluated by Alizarin red staining. The staining was extracted and quantified as described in the materials and methods section. Results are expressed as the relative Alizarin red content compared to the NCH condition at the same time. $*p < 0.05$ compared to the NCH condition at the same time.

(C) Expression of the chondrogenic markers *sox9*, *acan*, *col2a1* and hypertrophic markers *runx2*, *col10a1*, *mmp13*, *alpl* were investigated by real time PCR as described in the materials and methods section. Results are expressed as relative expression levels compared to NCH. $*p < 0.05$ compared with NCH.

(D) Alkaline phosphatase activity was measured in the total protein extract. $*p < 0.05$ compared with NCH.

Figure 5: Effects of hypoxia on the DNA-binding activity of HIF-1alpha and HIF-2alpha transcription factors.

ATDC5 cells were cultured in the presence of chondrogenic medium for 14 days (white bars). ATDC5 cells were then cultured for an additional 4h-, 8h- or 12h-incubation time under hypoxic condition (black bars). Nuclear extracts were prepared as described in the materials and methods section and HIF-1alpha and HIF-2alpha DNA binding activity were evaluated with an ELISA-based EMSA using a No shift Transcription Factor Assay.

507

Acknowledgments

508 This study was financed by grants from the " Fondation Arthritis Courtin ", the "Société
509 Française de Rhumatologie", ANR young researchers "Scartifold" project, ANR Tecsan
510 "Chondrograft" project, the "Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée"
511 (ET7-451 and ET9-491), les Haras Nationaux, Graftys S.A. and INSERM U791. C. Merceron
512 and S. Portron received a fellowship from the "Région des Pays de la Loire, Bioregos I and II
513 program". The authors also gratefully acknowledge F. Lejeune (Clinique Bretéché, Nantes,
514 France) for harvesting human lipoaspirates. The authors would also like to thank P. Galéra
515 (EA 3214, Caen, France) for having shared with us the nuclear extract protocol and P. Naud
516 and L. Oliver (Inserm U 892, Nantes, France) for their assistance in TLDA experiments.

517

518 **Table 1:** Sequences of human primer pairs, gene bank accession numbers used for real-time
519 PCR analysis and size of the PCR products.

Gene	Gene Bank Accession Number	Sequence	Base Pairs (bp)
<i>PPIA</i>	NM_021130.3	Fwd 5'-ATGCTGGACCCAACACAAAT-3' Rev 5'-TCTTTCACCTTGCCAAACACC-3'	97
<i>SOX9</i>	NM_000346.2	Fwd 5'-GTACCCGCACTTGCACAAC-3' Rev 5'-TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC-3'	72
<i>ACAN</i>	NM_001135.1	Fwd 5'-CCTCCCCTTCACGTGTAAAA-3' Rev 5'-GCTCCGCTTCTGTAGTCTGC-3'	64
<i>COL2A1</i>	NM_001844	Fwd 5'-TGTCAGGGCCAGGATGTC-3' Rev 5'-ATCATTATACCTCTGCCCATCC-3'	63
<i>RUNX2</i>	NM_001024630	Fwd 5'-CACCATGTCAGCAAACTTCTT-3' Rev 5'-TCACGTCGCTCATTTTGC-3'	96
<i>COL10A1</i>	NM_000493.3	Fwd 5'-CACCTTCTGCACTGCTCATC-3' Rev 5'-GGCAGCATATTCTCAGATGGA-3'	104
<i>MMP13</i>	NM_002427.2	Fwd 5'-CCAGTCTCCGAGGAGAAACA-3' Rev 5'-AAAAACAGCTCCGCATCAAC-3'	85

520

521 **Table 2:** Sequences of mouse primer pairs, gene bank accession numbers used for real-time
522 PCR analysis and size of the PCR products.

Gene	Gene Bank Accession Number	Sequence	Base Pairs (bp)
<i>act b</i>	NM_007393	Fwd 5'-AAGGCCAACCGTGAAAAGAT-3' Rev 5'-GTGGTACGACCAGAGGCATAC-3'	110
<i>sox9</i>	NM_011448.3	Fwd 5'-CAGCAAGACTCTGGGCAAG-3' Rev 5'-ATCGGGGTGGTCTTTCTTGT-3'	109
<i>acan</i>	NM_007424.2	Fwd 5'-GCTGAAGTCCCTGGTCAGC-3' Rev 5'-GCCTCCTCAAATGTCAGAGAGTA-3'	92
<i>col2a1</i>	NM_031163.2	Fwd 5'-GCGAGCCTGGTGTCTCTG-3' Rev 5'-GCCTCTTTCCCCAGACTTTC-3'	110
<i>runx2</i>	NM_009820.2	Fwd 5'-CCACAAGGACAGAGTCAGATTACA-3' Rev 5'-TGGCTCAGATAGGAGGGGTA-3'	92
<i>col10a1</i>	NM_009925	Fwd 5'-GCATCTCCCAGCACCAGA-3' Rev 5'-CCATGAACCAGGGTCAAGAA-3'	85
<i>alpl</i>	NM_007431.2	Fwd 5'-GGCCAGCTACACCACAACA-3' Rev 5'-CTGAGCGTTGGTGTATATGTCTT-3'	96
<i>mmp13</i>	NM_008607.1	Fwd 5'-CAGTCTCCGAGGAGAACTATGAT-3' Rev 5'-GGACTTTGTCAAAAAGAGCTCAG-3'	94

523

- 525 1. Peterson, L., et al., *Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up*. Am J Sports
526 Med, 2010. **38**(6): p. 1117-24.
- 527 2. Vinatier, C., et al., *Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal
528 stem cell therapy*. Curr Stem Cell Res Ther, 2009. **4**(4): p. 318-29.
- 529 3. Vinatier, C., et al., *Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and
530 biofactors*. Trends Biotechnol, 2009. **27**(5): p. 307-14.
- 531 4. Filardo, G., et al., *Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from
532 preclinical findings to clinical application in orthopaedics*. Knee Surg Sports Traumatol
533 Arthrosc, 2013. Epub ahead of print.
- 534 5. Veronesi, F., et al., *Clinical use of bone marrow, bone marrow concentrate, and expanded
535 bone marrow mesenchymal stem cells in cartilage disease*. Stem Cells Dev, 2013. **22**(2): p.
536 181-92.
- 537 6. Roelofs, A.J., J.P. Rocke, and C. De Bari, *Cell-based approaches to joint surface repair: a
538 research perspective*. Osteoarthritis Cartilage, 2013. Epub ahead of print.
- 539 7. Gawlitta, D., et al., *Modulating endochondral ossification of multipotent stromal cells for
540 bone regeneration*. Tissue Eng Part B Rev, 2010. **16**(4): p. 385-95.
- 541 8. Kronenberg, H.M., *Developmental regulation of the growth plate*. Nature, 2003. **423**(6937):
542 p. 332-6.
- 543 9. Coleman, C.M., et al., *Growth Differentiation Factor-5 Enhances In Vitro Mesenchymal
544 Stromal Cell Chondrogenesis and Hypertrophy*. Stem Cells Dev, 2013.
- 545 10. Barry, F., et al., *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow:
546 differentiation-dependent gene expression of matrix components*. Exp Cell Res, 2001. **268**(2):
547 p. 189-200.
- 548 11. Ichinose, S., et al., *Morphological examination during in vitro cartilage formation by human
549 mesenchymal stem cells*. Cell Tissue Res, 2005. **322**(2): p. 217-26.
- 550 12. Lee, J.M. and G.I. Im, *PTHrP isoforms have differing effect on chondrogenic differentiation
551 and hypertrophy of mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **421**(4): p.
552 819-24.
- 553 13. Mueller, M.B. and R.S. Tuan, *Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of
554 human mesenchymal stem cells*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(5): p. 1377-88.
- 555 14. Mueller, M.B., et al., *Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF-
556 beta isoforms and chondrogenic conditioning*. Cells Tissues Organs, 2010. **192**(3): p. 158-66.
- 557 15. Steinert, A.F., et al., *Hypertrophy is induced during the in vitro chondrogenic differentiation of
558 human mesenchymal stem cells by bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic
559 protein-4 gene transfer*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(5): p. R148.
- 560 16. Pelttari, K., et al., *Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of
561 human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after
562 ectopic transplantation in SCID mice*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(10): p. 3254-66.
- 563 17. Dickhut, A., et al., *Calcification or dedifferentiation: requirement to lock mesenchymal stem
564 cells in a desired differentiation stage*. J Cell Physiol, 2009. **219**(1): p. 219-26.
- 565 18. Silver, I.A., *Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites*. Philos Trans R Soc
566 Lond B Biol Sci, 1975. **271**(912): p. 261-72.
- 567 19. Zhou, S., Z. Cui, and J.P. Urban, *Factors influencing the oxygen concentration gradient from
568 the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modeling study*.
569 Arthritis Rheum, 2004. **50**(12): p. 3915-24.
- 570 20. Haselgrove, J.C., I.M. Shapiro, and S.F. Silverton, *Computer modeling of the oxygen supply
571 and demand of cells of the avian growth cartilage*. Am J Physiol, 1993. **265**(2 Pt 1): p. C497-
572 506.

- 573 21. Meretoja, V.V., et al., *The effect of hypoxia on the chondrogenic differentiation of co-cultured*
574 *articular chondrocytes and mesenchymal stem cells in scaffolds*. Biomaterials, 2013. **34**(17):
575 p. 4266-73.
- 576 22. Sheehy, E.J., C.T. Buckley, and D.J. Kelly, *Oxygen tension regulates the osteogenic,*
577 *chondrogenic and endochondral phenotype of bone marrow derived mesenchymal stem cells*.
578 Biochem Biophys Res Commun, 2012. **417**(1): p. 305-10.
- 579 23. Amarilio, R., et al., *HIF1alpha regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of*
580 *hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis*. Development, 2007. **134**(21): p.
581 3917-28.
- 582 24. Gawlitta, D., et al., *Hypoxia impedes hypertrophic chondrogenesis of human multipotent*
583 *stromal cells*. Tissue Eng Part A, 2012. **18**(19-20): p. 1957-66.
- 584 25. Hirao, M., et al., *Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during*
585 *endochondral ossification*. J Biol Chem, 2006. **281**(41): p. 31079-92.
- 586 26. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*.
587 Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
- 588 27. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell,
589 2002. **13**(12): p. 4279-95.
- 590 28. Strioga, M., et al., *Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone*
591 *marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(14): p. 2724-
592 52.
- 593 29. Kim, H.J. and G.I. Im, *The effects of ERK1/2 inhibitor on the chondrogenesis of bone marrow-*
594 *and adipose tissue-derived multipotent mesenchymal stromal cells*. Tissue Eng Part A, 2009.
595 **16**(3): p. 851-60.
- 596 30. Mehlhorn, A.T., et al., *Differential effects of BMP-2 and TGF-beta1 on chondrogenic*
597 *differentiation of adipose derived stem cells*. Cell Prolif, 2007. **40**(6): p. 809-23.
- 598 31. Hennig, T., et al., *Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells*
599 *correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6*. J Cell
600 Physiol, 2007. **211**(3): p. 682-91.
- 601 32. Merceron, C., et al., *Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human*
602 *adipose-derived stem cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **298**(2): p. C355-64.
- 603 33. Merceron, C., et al., *Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell*
604 *chondrogenesis by a chemically oversulfated polysaccharide of marine origin: potential*
605 *application to cartilage regenerative medicine*. Stem Cells, 2012. **30**(3): p. 471-80.
- 606 34. Magne, D., et al., *Development of an odontoblast in vitro model to study dentin*
607 *mineralization*. Connect Tissue Res, 2004. **45**(2): p. 101-8.
- 608 35. Andriamanalijaona, R., et al., *Mediation of interleukin-1beta-induced transforming growth*
609 *factor beta1 expression by activator protein 4 transcription factor in primary cultures of*
610 *bovine articular chondrocytes: possible cooperation with activator protein 1*. Arthritis Rheum,
611 2003. **48**(6): p. 1569-81.
- 612 36. Atsumi, T., et al., *A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805*
613 *teratocarcinoma cells*. Cell Differ Dev, 1990. **30**(2): p. 109-16.
- 614 37. Shukunami, C., et al., *Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived*
615 *chondrogenic cell line ATDC5 in vitro*. J Bone Miner Res, 1997. **12**(8): p. 1174-88.
- 616 38. Markway, B.D., et al., *Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived*
617 *mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures*. Cell Transplant,
618 2010. **19**(1): p. 29-42.
- 619 39. Magne, D., et al., *Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and*
620 *apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of*
621 *endochondral ossification*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(8): p. 1430-42.

622 40. Semenza, G.L., *Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Physiology
623 (Bethesda), 2009. **24**: p. 97-106.

624 41. Semenza, G.L., et al., *Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located*
625 *3' to the human erythropoietin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5680-4.

626 42. Robins, J.C., et al., *Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal*
627 *cells in association with transcriptional activation of Sox9*. Bone, 2005. **37**(3): p. 313-22.

628 43. Lafont, J.E., et al., *Hypoxia promotes the differentiated human articular chondrocyte*
629 *phenotype through SOX9-dependent and -independent pathways*. J Biol Chem, 2008. **283**(8):
630 p. 4778-86.

631 44. Chun, Y.S., et al., *Cadmium blocks hypoxia-inducible factor (HIF)-1-mediated response to*
632 *hypoxia by stimulating the proteasome-dependent degradation of HIF-1alpha*. Eur J Biochem,
633 2000. **267**(13): p. 4198-204.

634 45. Mabeesh, N.J., et al., *2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting*
635 *microtubules and dysregulating HIF*. Cancer Cell, 2003. **3**(4): p. 363-75.

636 46. Duval, E., et al., *Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application*
637 *in in vivo cartilage tissue engineering*. Biomaterials, 2012. **33**(26): p. 6042-51.

638 47. Murphy, C.L., *HIF-2alpha--a mediator of osteoarthritis?* Cell Res, 2010. **20**(9): p. 977-9.

639 48. Saito, T., et al., *Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during*
640 *skeletal growth and osteoarthritis development*. Nat Med, 2010. **16**(6): p. 678-86.

641 49. Yang, S., et al., *Hypoxia-inducible factor-2alpha is a catabolic regulator of osteoarthritic*
642 *cartilage destruction*. Nat Med, 2011. **16**(6): p. 687-93.

643 50. Husa, M., R. Liu-Bryan, and R. Terkeltaub, *Shifting HIFs in osteoarthritis*. Nat Med, 2011.
644 **16**(6): p. 641-4.

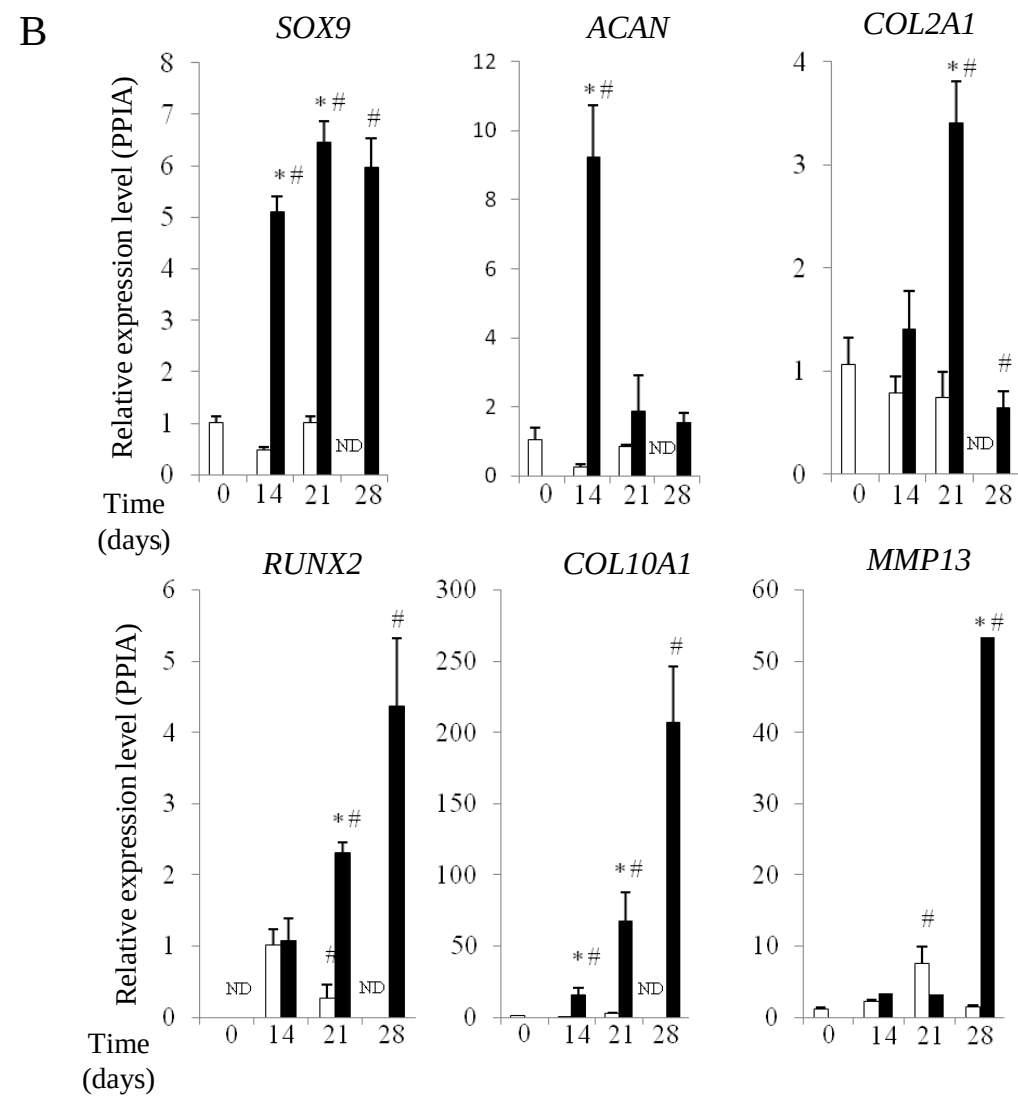
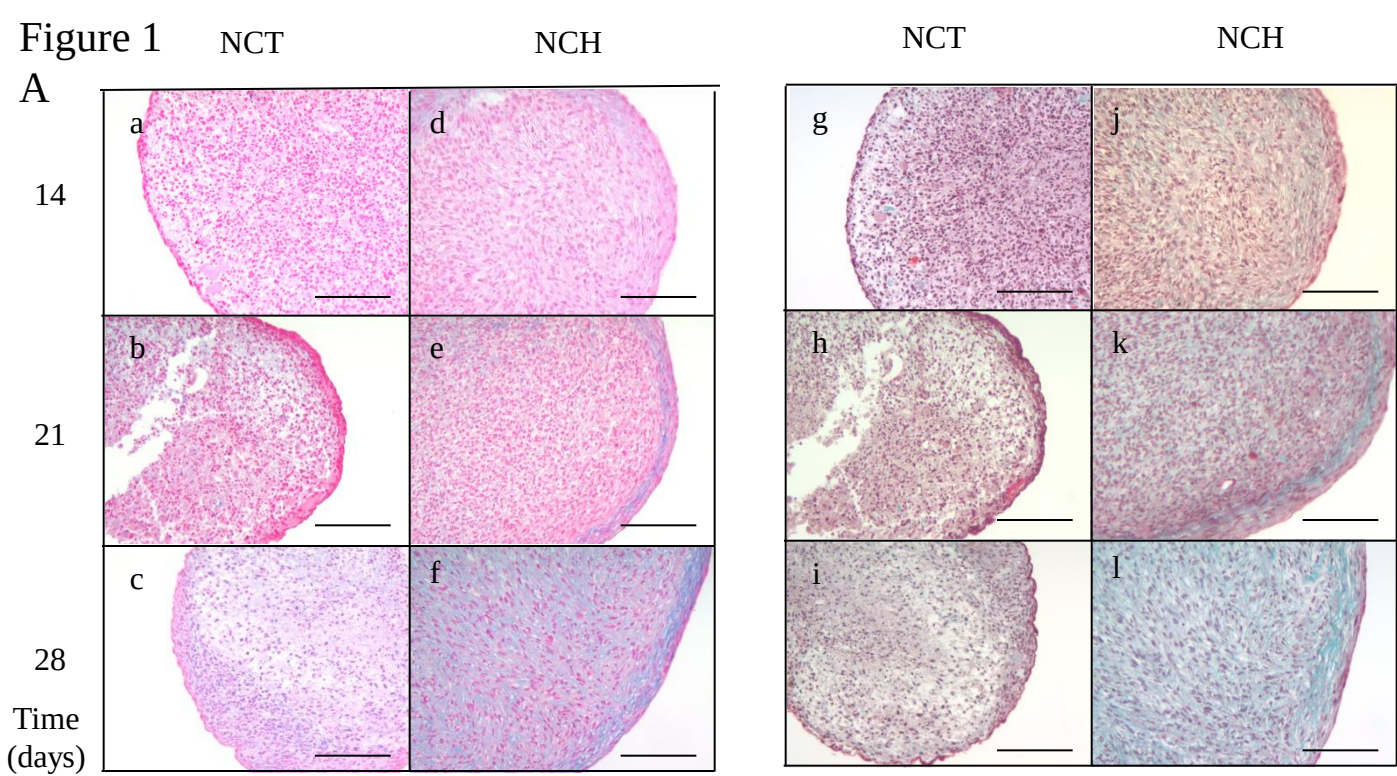
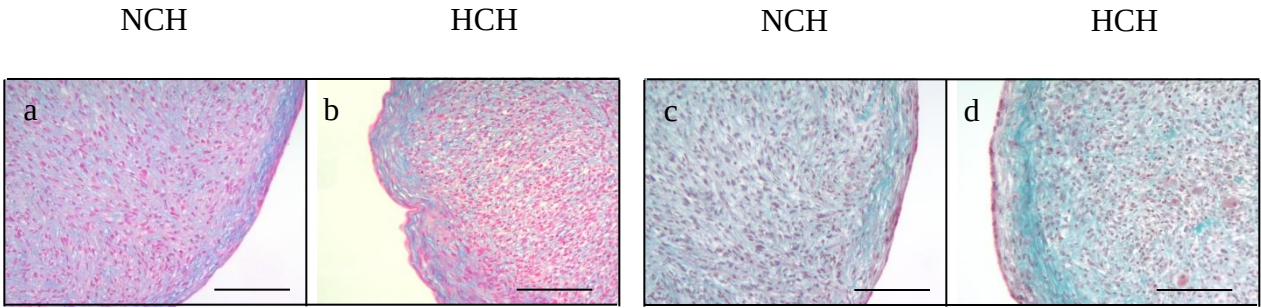


Figure 2
A



B

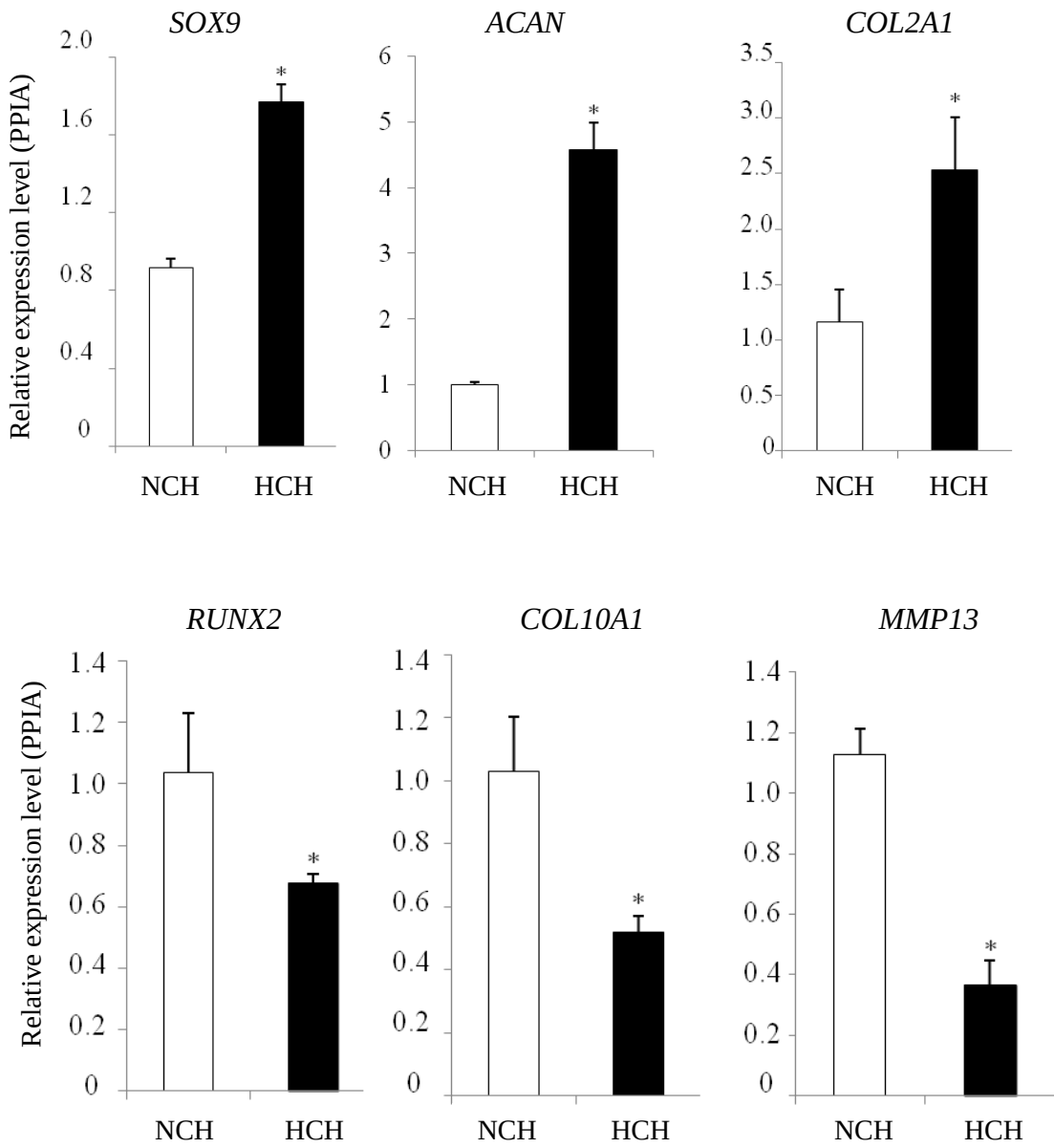
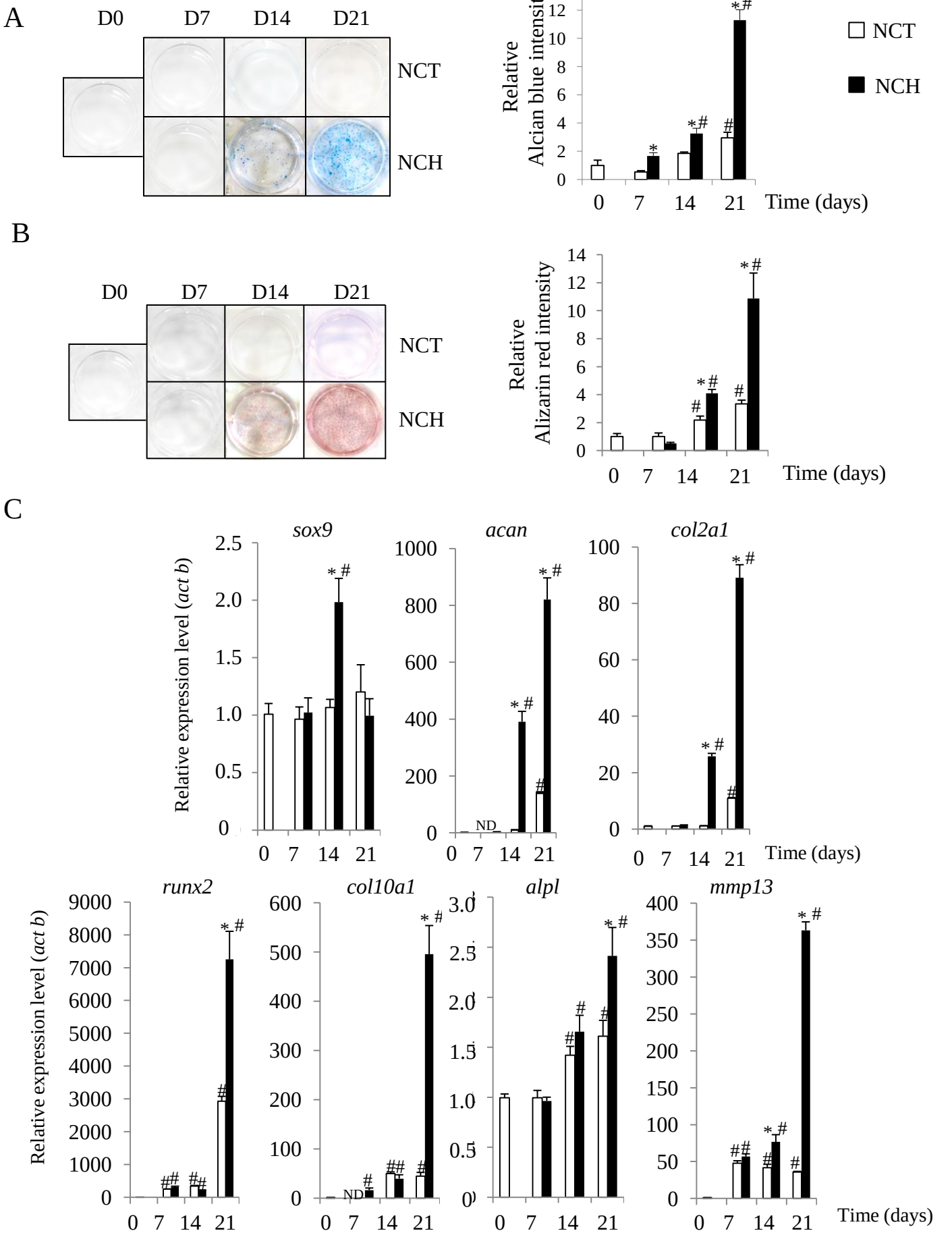


Figure 3



D

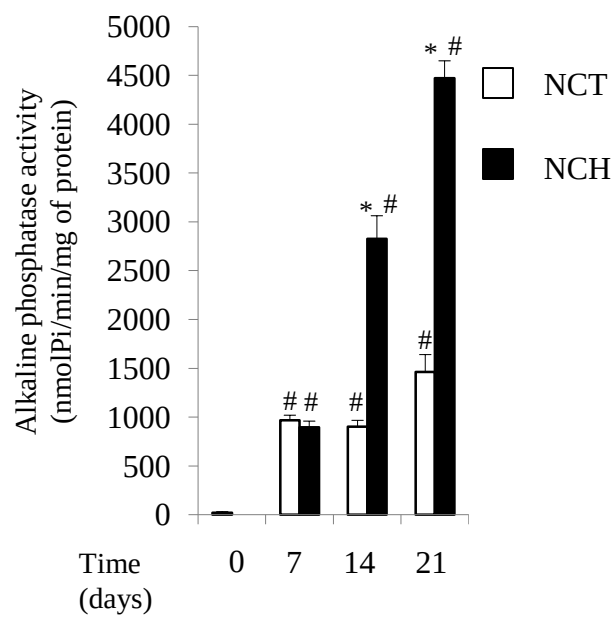
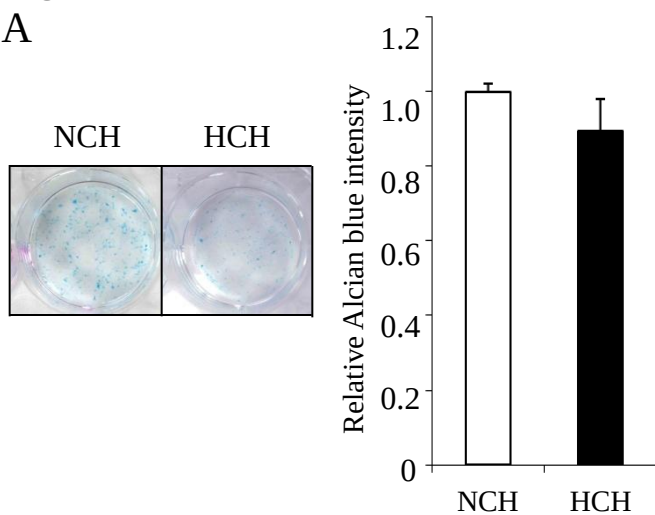
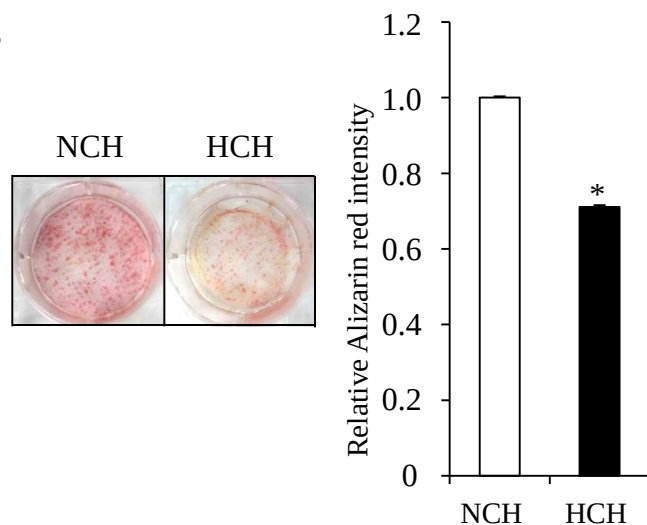


Figure 4

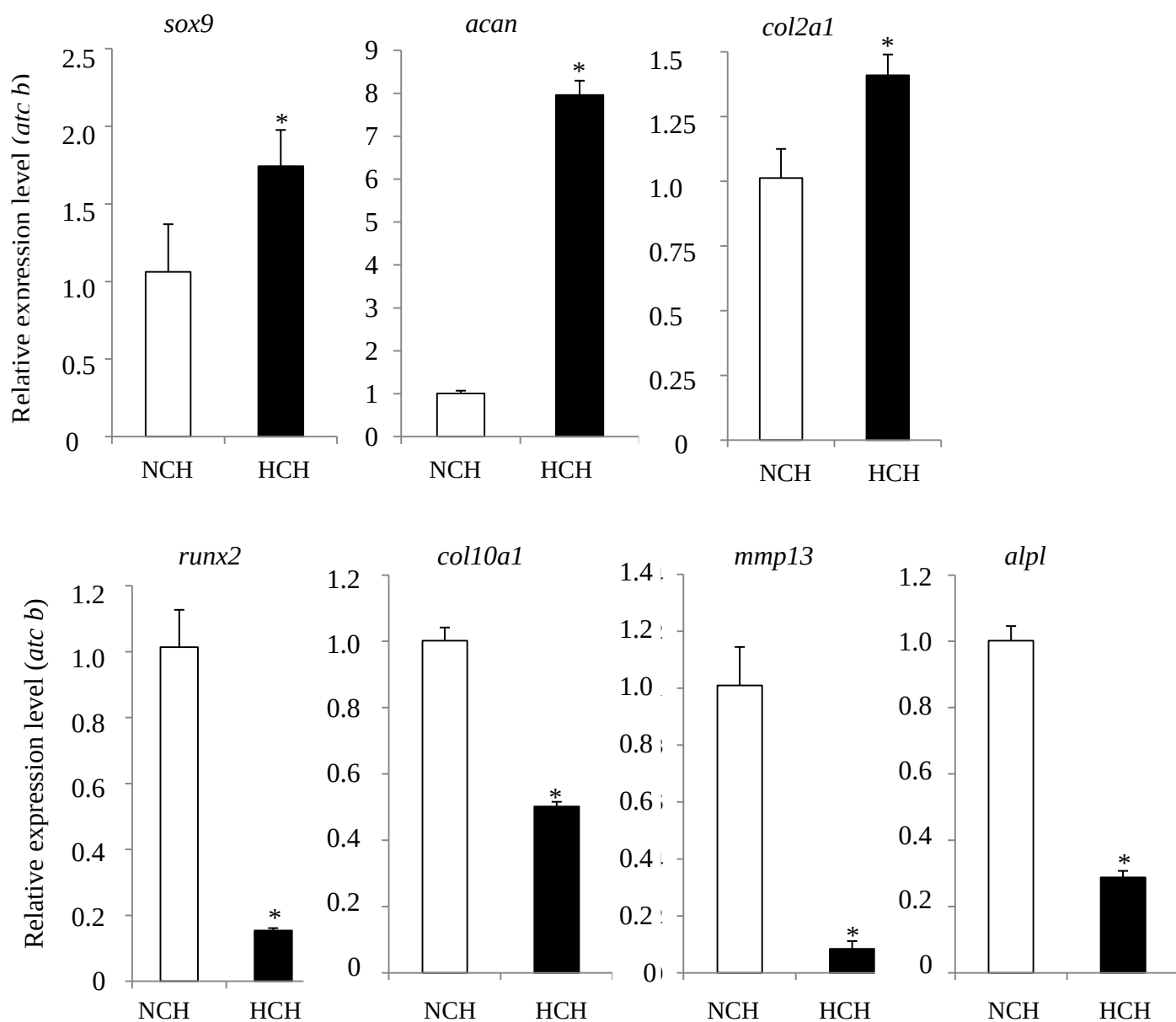
A



B



C



D

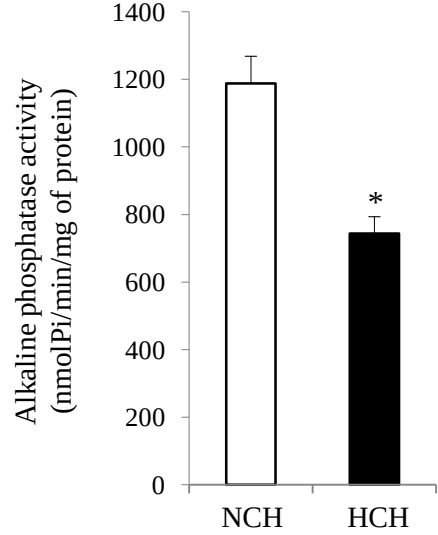
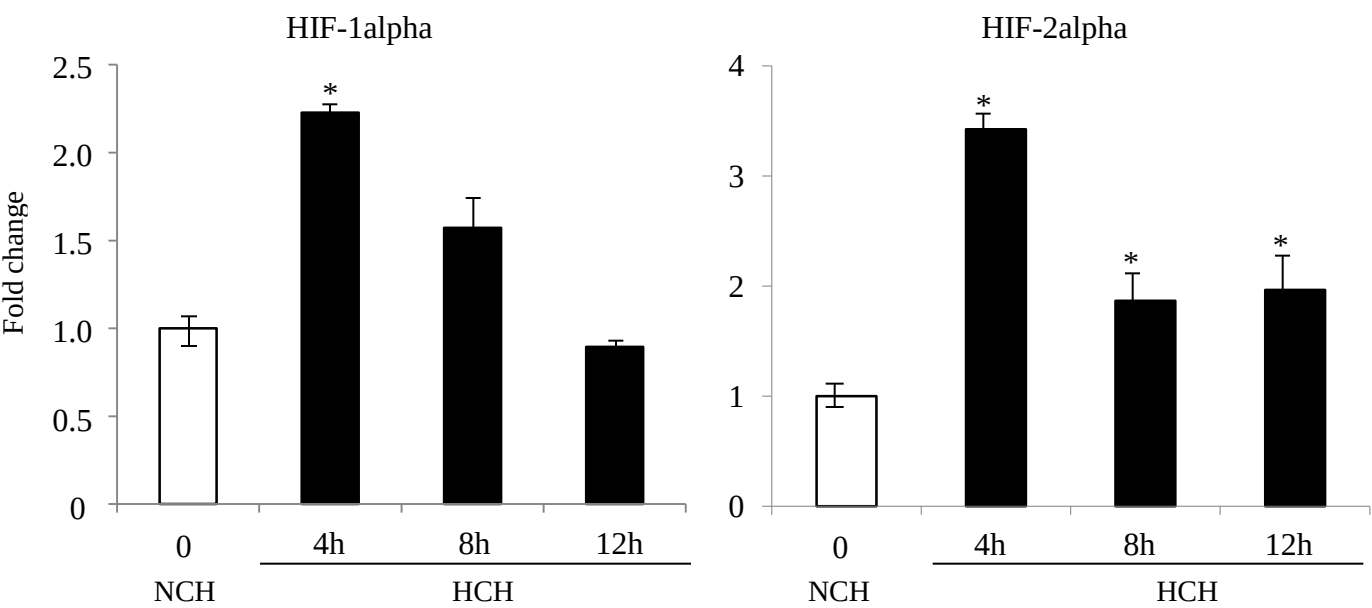


Figure 5



2.4 Discussion

Le cartilage articulaire n'étant pas vascularisé, la tension en oxygène physiologique perçue par les chondrocytes est faible. Ainsi et en accord avec la littérature [17,18,19,525,526], nous avons montré qu'une tension en oxygène de 5% stimule la différenciation chondrogénique et inhibe la différenciation ostéogénique de CSA humaine (Article I, page 47). Ces travaux mettent en évidence le rôle différentiel de la tension en oxygène sur le phénotype ostéochondrogénique de CSA *in vitro* [524]. Fort de ces résultats, la seconde partie expérimentale de notre travail, regroupant l'article III et IV, s'est focalisée sur des aspects plus translationnels et s'est consacrée aux effets de la tension en oxygène sur le potentiel chondrogénique des CSA *in vitro* et surtout *in vivo*.

Dans l'article III page 67, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux effets d'un pré-conditionnement hypoxique des CSA *in vitro* sur leur potentiel à former un tissu cartilagineux *in vivo*.

Compte tenu de nos résultats précédents (article II, page 60) montrant que le pré-conditionnement des CSA *in vitro* en deux dimensions et en présence de milieu chondrogénique était suffisant pour former un tissu cartilagineux *in vivo*, les CSA utilisées dans l'article III ont été cultivées *in vitro* en deux dimensions uniquement [527]. Afin d'évaluer l'effet d'un pré-conditionnement *in vitro* des CSA sur la formation d'un tissu cartilagineux *in vivo*, les CSA ont été cultivées en présence de milieu contrôle ou chondrogénique, et d'une tension en oxygène de 21% (normoxie) ou 5% (hypoxie). En accord avec nos résultats précédents (article II), nos données *in vitro* confirment qu'une faible tension en oxygène augmente l'expression des deux principaux marqueurs chondrogéniques dans des CSA de lapin et humaines cultivées en monocouche. Ces premières expériences nous ont permis de déterminer si les CSA présentent différents niveaux d'engagement en fonction des conditions d'induction. L'analyse phénotypique des CSA avant implantation confirme que la tension en oxygène potentialise la différenciation chondrogénique des CSA en présence d'un milieu d'induction [414,423], mis en évidence par analyse des transcrits codants pour le collagène de type II et de l'agrécan. Ainsi, les cellules implantées présentent des phénotypes chondrogéniques différents en fonction de leur condition de pré-conditionnement. Sur la base

de nos données de PCR en temps réel essentiellement, il semble que les cellules pré-conditionnées en milieu inducteur et en hypoxie soient les cellules les plus « engagées » en comparaison de celles ayant été traitées par un milieu inducteur mais en normoxie.

Par la suite, nous avons évalué les effets de la tension en oxygène perçue par les CSA *in vitro* sur leur potentiel chondrogénique *in vivo*. Pour cela, les CSA pré-conditionnées ont été implantées en association avec l'hydrogel HPMC-Si en site articulaire chez le lapin ou en site ectopique chez la souris nude, deux modèles complémentaires et largement utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage [296,527]. Les analyses histologiques et scoring du tissu néoformé en site articulaire chez le lapin, montrent que indépendamment des conditions de culture *in vitro*, les CSA sont capables de former un tissu cartilagineux *in vivo*. Il est largement décrit que les propriétés mécaniques du tissu cartilagineux nouvellement formé sont dépendantes de sa composition et de son organisation histologique [528,529]. D'une part, l'orientation perpendiculaire à la surface des fibres de collagène, dans les couches profondes du cartilage, lui confère ses propriétés de résistance aux forces de compressions. D'autre part, les fibres disposées parallèlement à la surface, dans la zone superficielle, apportent au tissu sa résistance aux forces de cisaillements [56]. Compte tenu de l'importance de cette organisation histologique, il est intéressant de souligner que les CSA pré-conditionnées, plus particulièrement en présence de milieu chondrogénique et en condition hypoxique, induisent la formation d'un tissu de réparation présentant une organisation histologique proche de celle d'un tissu de type hyalin.

Etonnamment, bien que la tension en oxygène de 5% stimule fortement la différenciation chondrogénique *in vitro*, elle n'améliore pas la formation de tissu cartilagineux *in vivo* en site articulaire chez le lapin. L'interprétation de ces données expérimentales doit prendre en compte l'influence des conditions environnementales du site d'implantation. En effet, l'environnement pro-chondrogénique du site d'implantation articulaire ostéochondral, peut fortement influencer le devenir des cellules implantées [2]. Par conséquent, afin de s'affranchir de l'effet de cet environnement pro-chondrogénique articulaire, des CSA humaines ont été par la suite implantées en association avec l'hydrogel HPMC-Si en site ectopique sous-cutané chez la souris nude.

Dans ce modèle, les CSA induites en condition chondrogénique et associées à l'HPMC-Si forment des agrégats cellulaires riches en GAG et collagène de type II. Comme précédemment observé dans le modèle lapin, le pré-conditionnement des CSA en présence de 5% d'O₂ ne stimule pas la formation d'agrégats cartilagineux. Cependant, et contrairement au modèle d'implantation en site articulaire, le modèle d'implantation en site sous-cutané souligne l'importance de l'engagement des CSA *in vitro* par le milieu d'induction chondrogénique, sur la formation des agrégats cartilagineux *in vivo*. En effet, seule des CSA ayant été pré-conditionnées en milieu chondrogénique, en normoxie ou en hypoxie, sont capables de former des agrégats cartilagineux en sous-cutané chez la souris nude.

Indépendamment de l'espèce, cette différence de résultats *in vivo* peut provenir de l'environnement articulaire, celui-ci peut fournir de nombreux stimulateurs de la différenciation chondrogénique tels que les facteurs de croissance, la présence de chondroprogéniteurs, la tension en oxygène ainsi que les contraintes mécaniques [58,60,61,282,530,531]. Ces stimuli pro-chondrogéniques sont d'ailleurs connus pour favoriser la chondrogenèse des CSM ainsi que la maturation du tissu cartilagineux. De plus, des cellules progénitrices ont été détectées dans la zone superficielle du cartilage articulaire. Cette population cellulaire présentant les marqueurs CD105 et CD166, a une forte capacité d'autorenouvellement, une activité chimiotactique et une multipotence limitée [58,59,61]. Ces progéniteurs endogènes pourraient influencer le devenir des cellules implantées et annuler les différences observées après le pré-conditionnement. Cependant, le rôle et la fonction de ces progéniteurs endogènes doivent encore être clarifiés particulièrement dans le contexte de la réparation cartilagineuse.

L'ensemble des données *in vivo*, différentes des données *in vitro*, nous a aussi conduit à supposer que les cellules implantées au sein de l'hydrogel sont soumises aux mêmes facteurs environnementaux, incluant l'hypoxie, ce qui pourrait grandement influencer leur capacité à former un tissu cartilagineux *in vivo*. Parallèlement, il convient de souligner que la maturation du tissu cartilagineux néo formé, en site articulaire ou sous cutané, est complexe, régulée dans le temps et implique de nombreux partenaires biologiques. Ainsi le temps d'implantation (18 semaines chez le lapin et 5 semaines chez la souris nude) pourrait également expliquer les différences observées.

L'hydrogel HPMC-Si, longtemps considéré comme un simple véhicule, pourrait aussi être perçu comme une structure perméable permettant aux cellules de « sentir » les facteurs pro-chondrogéniques environnants tels que les facteurs de croissance, la tension en oxygène et les contraintes mécaniques. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'hydrogel HPMC-Si pourrait fournir un environnement tridimensionnel propice à la chondrogenèse. Pour vérifier cette hypothèse, les CSA ont été cultivées en trois dimensions au sein de l'hydrogel HPMC-Si ou en monocouche et ce en présence de milieu contrôle ou chondrogénique, et d'une tension en oxygène de 21% (normoxie) ou 5% (hypoxie). Nos données confirment que les CSA cultivées en trois dimensions au sein de l'hydrogel s'engagent dans la voie chondrogénique en présence du milieu d'induction. Cependant, leur différenciation chondrogénique est stimulée en condition hypoxique et ce même au sein de l'hydrogel. Ceci renforce notre hypothèse concernant le rôle pro-chondrogénique que pourrait jouer l'hydrogel HPMC-Si notamment grâce à sa perméabilité aux facteurs environnementaux. Ceci confirme également que l'hydrogel HPMC-Si est un vecteur adapté pour l'ingénierie tissulaire du cartilage à base de CSM comme cela avait déjà été suggéré précédemment au laboratoire [296,527].

L'ensemble de ces données a donc révélé qu'une tension en oxygène de 5% stimule la différenciation chondrogénique *in vitro*, mais ne potentialise pas la formation d'un tissu cartilagineux *in vivo*.

La formation d'un tissu cartilagineux de type hyalin est fortement dépendante du phénotype chondrogénique des CSA implantées [167,168]. En effet, les CSM peuvent non seulement exprimer les marqueurs du phénotype chondrogénique mais également ceux du phénotype hypertrophique [265-268,532-534]. Ainsi, le contrôle de la différenciation chondrogénique des CSM, et plus particulièrement de leur conversion hypertrophique, reste un challenge important pour aboutir à la formation d'un tissu cartilagineux de type hyalin et non calcifié. En effet, la différenciation chondrogénique des CSM *in vitro* mime les étapes successives du développement des chondrocytes de plaque de croissance, incluant la formation de chondrocytes hypertrophiques conduisant à la calcification de la matrice.

Alors qu'il est bien connu qu'une faible tension en oxygène stimule l'engagement dans la différenciation chondrogénique des CSA tout en inhibant leur différenciation ostéogénique, les effets de cette faible tension en oxygène sur leur différenciation hypertrophique n'ont pas

encore été résolu. Ainsi, considérant notre ambition d'optimiser la différenciation chondrogénique des CSA pour la réparation du cartilage, nous nous sommes intéressés (article IV) à déterminer si une faible tension en oxygène pouvait moduler différemment les phases précoces et tardives de la différenciation chondrogénique des CSA. La première étape de notre travail fut de caractériser la différenciation chondrogénique et hypertrophique des CSA. Nous avons observé l'expression concomitante des marqueurs du phénotype chondrogénique (sox9, collagène de type II et agrécane) et hypertrophique (runx2, collagène de type X et mmp13). L'expression concomitante de ces marqueurs pourrait s'expliquer par le fait que les CSA sont une population hétérogène de cellules n'ayant pas le même potentiel chondrogénique [185,241]. Suite à la caractérisation de la différenciation chondrogénique et hypertrophique des CSA, nous nous sommes intéressées aux effets de la tension en oxygène sur ces deux phénotypes. Nos données confirment que l'hypoxie stimule leur différenciation chondrogénique, en présence d'un milieu inducteur [425,524]. Nos travaux révèlent cependant qu'en présence de 5% d'oxygène, l'expression des marqueurs hypertrophiques est inhibée.

Afin de conforter ces résultats, nous nous sommes demandés ensuite si une faible tension en oxygène pouvait influencer le profil transcriptionnel des CSA. Nous avons donc réalisé une analyse transcriptionnelle sur plaque microfluidique à faible débit (Taqman Low Density Array). L'analyse de l'expression de 96 gènes, comprenant des marqueurs de l'ostéogenèse, de l'adipogenèse, de la chondrogenèse ainsi que de l'apoptose, ne montre pas une forte modification du profil d'expression (données non montrées) en hypoxie. Cependant, et en accord avec nos données précédentes, l'expression des gènes du phénotype hypertrophique (*MEF2C* et *SHOX*) ainsi que des gènes impliqués dans la formation d'une MEC minéralisée (*CST5*, *MGP* et *Bone-GLAP*) est diminuée en condition hypoxique. Ces résultats suggèrent fortement que l'hypoxie oriente les CSA vers un phénotype chondrogénique tout en inhibant leur conversion terminale hypertrophique.

Afin d'approfondir les mécanismes intracellulaires mis en place par la cellule en réponse à une faible tension en oxygène, nous avons utilisé un modèle plus accessible, reproductible et homogène de cellules chondrogéniques, la lignée cellulaire ATDC5 [535,536]. Cette lignée

cellulaire possède la particularité de reproduire *in vitro* les étapes de la différenciation endochondrale des chondrocytes de la plaque de croissance [535,536].

Notre premier objectif fut de déterminer le décours temporel d'apparition des phénotypes chondrogénique et hypertrophique dans ce modèle. Nous avons ainsi mis en évidence qu'après 14 jours de culture, les ATDC5 présentent un phénotype chondrocytaire : accumulation de GAG dans la MEC, expression de *sox9*, du collagène de type II et de l'agrécan. Après 21 jours, les ATDC5 présentent un phénotype hypertrophique : minéralisation de la MEC, expression de *runx2*, du collagène de type X, de la MMP13 et de la phosphatase alcaline, corrélée par son activité enzymatique. Suite à ces résultats, nous avons étudié les effets d'une tension en oxygène de 5% sur la mise en place du phénotype hypertrophique entre 14 et 21 jours de culture. Comme déjà observé avec les CSA, nous avons montré que l'hypoxie stimule la différenciation chondrogénique des ATDC5. En effet, nous observons une augmentation de l'expression des transcrits de *sox9*, *acan* et *col2a1*. L'accumulation des GAG n'est pas significativement modifiée par la tension en oxygène, en revanche l'hypoxie diminue la production de matrice minéralisée ainsi que les expressions des marqueurs hypertrophiques (*runx2*, *col10a1*, *mmp13* et *alpl*) et l'activité de la phosphatase alcaline. Ces résultats indiquent que l'hypoxie inhibe l'apparition du phénotype hypertrophique dans les ATDC5. Ainsi, ces données suggèrent fortement que l'hypoxie peut stimuler et contrôler le processus de différenciation chondrogénique des ATDC5 en agissant différemment sur le phénotype chondrogénique et hypertrophique.

Par l'étude de deux modèles cellulaires CSA et ATDC5, nous montrons que l'hypoxie module la différenciation chondrogénique de cellules humaines et murines de façon comparable. Ceci suggère que l'hypoxie médie ces effets par une voie de signalisation vraisemblablement commune. Parmi les effecteurs biologiques de la tension en oxygène, les facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2 sont connus pour être les principaux médiateurs des effets d'une faible tension en oxygène. Les HIF participent directement à l'induction de la différenciation chondrogénique, en se fixant sur le promoteur de SOX9 [414,415], facteur de transcription indispensable à la chondrogenèse [78,79], et ainsi stimulent l'expression du collagène de type II et de l'agrécan [21]. De plus, HIF-1 et HIF-2 participent à la maturation de la matrice extracellulaire en stimulant l'expression des prolyl-4-hydroxylases impliquées dans la

maturation des fibres de collagène [420]. Ainsi, nous avons observé, dans nos conditions de culture à 5% d'oxygène, que HIF-1alpha et HIF-2alpha se lient à leur séquence consensus HRE dans nos expériences de No shift. Afin de savoir si HIF-1alpha et HIF-2alpha sont réellement impliqués dans la mise en place des effets de l'hypoxie sur la différenciation hypertrophique, des analyses complémentaires utilisant des inhibiteurs chimiques (cadmium [537], 2-Methoxyestradiol [538]) de l'activation des HIF sont actuellement en cours.

Récemment, l'étude des rôles respectifs de HIF-1alpha et HIF-2alpha a reçu beaucoup d'attention. Contrairement à HIF-1alpha [432], le rôle de HIF-2alpha dans la mise en place du phénotype chondrogénique et hypertrophique est débattu. En effet, au sein de chondrocytes hypertrophiques ou arthrosiques, HIF-2alpha induit l'expression du collagène de type X, MMP-13 et VEGF en se fixant directement à leur promoteur [134, 437]. Ces études suggèrent le rôle distinct de HIF-1alpha et de HIF-2alpha dans l'homéostasie du cartilage articulaire [539]. Cependant, le rôle respectif de HIF-1alpha et de HIF-2alpha dans les effets de la tension en oxygène sur les phénotypes chondrogéniques et hypertrophiques, n'est pas connu. Pour répondre à cette question, des expérimentations d'ARN interférence ciblant spécifiquement HIF-1alpha et HIF-2alpha sont en cours de réalisation. La compréhension de ces mécanismes intracellulaires qui régissent les effets de l'hypoxie médiés par HIF-1alpha et HIF-2alpha sur le phénotype chondrogénique et hypertrophique, pourrait ouvrir des perspectives thérapeutiques notamment dans le traitement de l'arthrose [540] où l'apparition de chondrocyte articulaire hypertrophique est suspecté de jouer un rôle dans la pathogénie de cette maladie.

Pour conclure, cette étude montre qu'une faible tension en oxygène module la différenciation chondrogénique de CSA humaines et de cellules ATDC5 murines, d'une part en stimulant leur différenciation chondrogénique et d'autre part en inhibant leur différenciation hypertrophique. L'ensemble de nos données indique donc que la tension en oxygène représente un outil pour diriger efficacement et de façon reproductible la chondrogenèse des CSM. Nos résultats soulignent également la possibilité de prévenir la formation d'une matrice calcifiée *in vivo* par les CSM induites, *via* la prévention de leur différenciation hypertrophique. Des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si la

stabilisation du phénotype chondrogénique des CSA *in vitro* permettrait de prévenir la formation d'une matrice calcifiée *in vivo* à long terme.

3 Glycosaminoglycanes mimétiques

3.1 Problématique

Pour finir, nous nous sommes intéressés aux potentielles activités biologiques que pouvaient exercer des polysaccharides GAG mimétiques d'origine marine (GY785 DR et DRS), dans le processus de différenciation chondrogénique des CSA (article V). Il est en effet décrit que les GAG de la MEC participent à de nombreux processus tels que l'adhésion, la migration, la prolifération ou la différenciation cellulaire notamment par leurs interactions avec les facteurs de croissance. Ainsi, les CSA ont été cultivées en présence de ces polysaccharides GAG-mimétiques et en présence ou non de milieu chondrogénique. Nous avons également recherché les possibles interactions entre ces polysaccharides et certains composants du milieu (TGF-béta et ITS) ainsi que les voies de signalisation stimulées en réponse aux polysaccharides.

Article V : “Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically over-sulphated polysaccharide of marine origin: potential application to cartilage regenerative medicine”

-Stem Cells-

3.2 Résumé

Les CSM, du fait de leur grande biodisponibilité et de leur capacité de prolifération *in vitro* sont considérées comme une source de cellules attractive pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. La différenciation chondrogénique de CSM est cruciale pour la formation d'un tissu de réparation cartilagineux. Cette différenciation peut être induite par différents agents biologiques tels que les polysaccharides ou GAG qui participent, *via* leurs interactions avec des facteurs de croissance, à de nombreux processus biologiques. Les GAG interagissent avec les facteurs de croissance et ainsi peuvent augmenter leur concentration locale, les protéger de la dégradation par des protéases et potentialiser leur liaison au récepteur [50].

Nous avons ainsi émis l'hypothèse que la différenciation chondrogénique des CSA, régis par le TGF-béta1, pourrait être potentialisée par un polysaccharide marin chimiquement sur-sulfaté. Afin de confirmer ou non cette hypothèse, des CSA ont été cultivées en trois dimensions (pellets), en présence de milieu chondrogénique contenant du TGF-béta1 et additionné soit du polysaccharide GY785 DR soit de sa version sur-sulfatée le GY785 DRS. La différenciation chondrogénique a été évaluée par mesure du volume des pellets, de la quantité d'ADN, de collagène et de GAG et par analyses immunohistologiques.

Nos données montrent une augmentation de la taille des pellets, de la production de GAG et de collagènes totaux lorsque les CSA sont cultivées en présence de milieu chondrogénique (ITS, TGF-béta1) supplémenté en GY785 DRS. Cette potentialisation de la différenciation chondrogénique est également confirmée par une augmentation des niveaux d'expression de *COL2A1*, *ACAN*, *COMP* et *SOX9* analysés par RT-PCR en temps réel. De plus, l'analyse par résonance plasmonique de surface a révélé que le TGF-béta1 se lie au GY785 DRS avec une plus forte affinité qu'avec le GY785 DR. Finalement, nous démontrons que le polysaccharide marin GY785 DRS augmente la phosphorylation de ERK 1/2 dépendant du TGF-béta1, indiquant ainsi que le polysaccharide marin sur-sulfaté renforce l'activité de signalisation intracellulaire médiée par le TGF-béta1.

Ces résultats montrent que la différenciation chondrogénique des CSA en présence de TGF-béta1 est potentialisée par le polysaccharide marin hautement sulfaté. Ce polysaccharide d'origine marine facilement produit peut donc être considéré comme un additif prometteur pour orienter efficacement la différenciation chondrogénique des CSA. Des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer comment ces données peuvent nous permettre d'exploiter le potentiel chondrogénique des CSM en médecine régénératrice du cartilage.

ARTICLE V

Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically over-sulphated polysaccharide of marine origin: potential application to cartilage regenerative medicine

Christophe MERCERON, Sophie PORTRON, Caroline VIGNES-COLOMBEIX, Emilie REDERSTORFF, Martial MASSON, Julie LESOEUR, Sophie SOURICE, Corinne SINQUIN, Sylvia COLLIEC-JOUAULT, Pierre WEISS, Claire VINATIER, Jérôme GUICHEUX

-STEM CELLS- 2012

Pharmacological Modulation of Human Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis by a Chemically Oversulfated Polysaccharide of Marine Origin: Potential Application to Cartilage Regenerative Medicine

CHRISTOPHE MERCERON,^{a,b} SOPHIE PORTRON,^{a,b} CAROLINE VIGNES-COLOMBEIX,^{a,b} EMILIE REDERSTORFF,^{a,b,c} MARTIAL MASSON,^{a,b} JULIE LESOEUR,^{a,b} SOPHIE SOURICE,^{a,b} CORINNE SINQUIN,^c SYLVIA COLLIEC-JOUAULT,^c PIERRE WEISS,^{a,b} CLAIRE VINATIER,^{a,b,d} JÉRÔME GUICHEUX^{a,b}

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMRS 791 Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire, Group STEP "Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology," Université de Nantes, Nantes, France; ^bPRES-UNAM, UFR Odontologie, Université de Nantes, Nantes, France; ^cIFREMER, Laboratoire de biotechnologie et molécules marines (BRM/BMM), Nantes, France; ^dGRAFTYS SA, Pôle d'Activités d'Aix en Provence, Aix en Provence, France

Key Words. Cartilage • Adipose-derived mesenchymal stem cells • Polysaccharides • Transforming growth factor- β

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are considered as an attractive source of cells for cartilage engineering due to their availability and capacity for expansion and multipotency. Differentiation of MSC into chondrocytes is crucial to successful cartilage regeneration and can be induced by various biological agents, including polysaccharides that participate in many biological processes through interactions with growth factors. Here, we hypothesize that growth factor-induced differentiation of MSC can be increased by chemically oversulfated marine polysaccharides. To test our hypothesis, human adipose tissue-derived MSCs (hATSCs) were cultured in pellets with transforming growth factor (TGF)- β 1-supplemented chondrogenic medium containing either the polysaccharide GY785 DR or its oversulfated isoform GY785 DRS. Chondrogenesis was monitored by the measurement of pellet volume, quantification of DNA, collagens, glycosaminoglycans (GAGs), and immunohistological staining. Our data revealed an increase in pellet volume,

total collagens, and GAG production with GY785 DRS and chondrogenic medium. The enhanced chondrogenic differentiation of hATSC was further demonstrated by the increased expression of several chondrogenic markers by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. In addition, surface plasmon resonance analyses revealed that TGF- β 1 bound GY785 DRS with higher affinity compared to GY785 DR. In association with TGF- β 1, GY785 DRS was found to upregulate the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2, indicating that oversulfated polysaccharide affects the mitogen activated protein kinase signaling activity. These results demonstrate the up-regulation of TGF- β 1-dependent stem cell chondrogenesis by a chemically oversulfated marine polysaccharide. This polysaccharide of marine origin is easily producible and therefore could be considered a promising additive to drive efficient and reliable MSC chondrogenesis for cartilage tissue engineering. *STEM CELLS* 2012;30:471–480

Disclosure of potential conflicts of interest is found at the end of this article.

INTRODUCTION

Articular cartilage is a specialized tissue that surrounds the ends of long bones. It reduces friction and acts as shock-absorbing tissue during joint mobilization. Cartilage is com-

posed of a single cell type, the chondrocyte, that is responsible for the synthesis of an abundant extracellular matrix (ECM) essentially composed of type II, IX, and XI collagens and proteoglycans [1, 2]. Chondrocytes play a major role in maintaining the integrity of cartilage through the control of anabolic and catabolic processes. However, cartilage is susceptible to

Author contributions: C.M.: conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing; S.P.: collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation; C.V.-C., M.M., J.L., and S.S.: collection and/or assembly of data; E.R.: conception and design, collection and/or assembly of data, manuscript writing; C.S.: provision of study material or patients; S.C.-J.: financial support, provision of study material or patients, final approval of the manuscript; P.W.: financial support, final approval of the manuscript; C.V.: data analysis and interpretation, final approval of the manuscript; and J.G.: conception and design, financial support, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of the manuscript.

Correspondence: Jérôme Guicheux, Ph.D., D.Sc., INSERM U 791, Laboratoire d'ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire (LIOAD), Group STEP "Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology," Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France. Telephone: +33 240412919; Fax: +33 240083712; e-mail: jerome.guicheux@inserm.fr Received May 3, 2011; Revised October 31, 2011; accepted for publication November 15, 2011; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* November 30, 2011. © AlphaMed Press 1066-5099/2011/\$30.00/0 doi: 10.1002/stem.1686

damage through aging, trauma, and inflammatory or degenerative diseases. These impairments often result in ECM degradation and ultimately in the loss of joint function.

Many surgical approaches have been developed to improve the poor intrinsic self-repair capacity of cartilage. Unfortunately, these techniques have not shown satisfactory efficacy. In this context, the regeneration of functional cartilage through the transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs) with bioactive synthetic matrices has recently been contemplated [3, 4]. MSCs were initially identified in bone marrow [5] and since have been detected in various other tissues such as adipose tissue, tendon, synovial membrane, muscle, and periosteum [6]. MSCs exhibit a number of attractive features, particularly for regenerative medicine, including their self-renewal, their ability to proliferate in culture, and their multipotency [7]. Biological sulfated polysaccharides such as glycosaminoglycans (GAGs) have been shown to modulate the biological activities of growth factors including transforming growth factor (TGF)- β [8, 9]. The binding of growth factors to GAG can increase their local concentration up to levels appropriate for signaling, protect them from degradation by extracellular proteases, and act as coreceptors, facilitating their interaction with their receptors [10]. The actions of biologically active polysaccharides are largely dependent on their molecular structure, in particular their molecular size and varying size of repeating unit features, osidic residues, linkage, and sulfation degree.

Natural polysaccharides derived from marine prokaryotes offer a significant structural chimiodiversity with novel, striking biological properties [11, 12]. In addition, natural GAG-mimetics can be chemically customized and produced in large amounts with relatively simple and reproducible processes, making them potentially suitable as bioactive agents for medical applications. Among the large number of prokaryotic species capable of producing GAG [11], *Alteromonas infernus* has been shown to produce a branched high-molecular weight polysaccharide: GY785 ($\sim 10^6$ g/mol). This polysaccharide is unique with no known analog [13]. Low-molecular weight (GY785 DR) and low-molecular weight oversulfated (GY785 DRS) derivatives of GY785 have been produced by chemical modification and described as "heparin-like" compounds, exhibiting some anticoagulant and proangiogenic properties [13, 14].

With respect to the potential effects of GAG-like polysaccharides on the regulation of growth factor bioavailability, we postulated that low-molecular weight marine polysaccharides such as oversulfated or standard GY785 may influence the growth factor-mediated chondrogenic differentiation of MSC.

To address this issue, we sought to determine whether the presence of oversulfated or standard GY785 could influence the chondrogenic differentiation of human adipose tissue-derived MSC (hATSC) driven by a TGF- β 1 and insulin-supplemented culture medium. We first assessed the effects of GY785 DR and GY785 DRS on hATSC viability and proliferation. Thereafter, we investigated the effect of these two polysaccharides on the chondrogenic differentiation of hATSC pellets by determining the volume and the DNA, total collagens, and GAG contents before immunohistological characterization of the pellets. At a transcriptional level, mRNA encoding the *COL2A1*, *ACAN*, *COMP*, *SOX9*, *COL1A1*, and *COL10A1* were analyzed by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Physical interactions between chondrogenic (CH) medium constituents (TGF- β 1 and insulin) and polysaccharides were investigated using the surface plasmon resonance approach. To obtain further insight into the regulation of cell signaling, we additionally studied the effect of GY785 DRS on the major signaling pathways activated by TGF- β 1 in hATSC.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Cell culture plastic wares were purchased from Corning-Costar BV Life Sciences (Schiphol-Rijk, The Netherlands, www.coming.com/lifesciences/emea/en/index.aspx). Hank's Balanced Sodium Salt (HBSS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose (4.5 g/L), alpha minimum essential medium, phosphate-buffered salt (PBS), penicillin/streptomycin, trypsin/EDTA (0.05%/0.53 mM), L-glutamine, superscript III kit, NuPAGE 4%–12% Bis-Tris gel, bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), and polyvinylidene difluoride (PVDF) Invitrolon membranes were obtained from Invitrogen Corporation (Paisley, UK, www.invitrogen.com). Vascular endothelial growth factor (VEGF) was purchased from Amrad Corporation (Richmond, Australia, www.amrad.com.au). Low-molecular weight heparin (4,500 g/mol) was obtained from Sanofi-Aventis (Paris, France, www.sanofi.com/). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) reagents were from Promega (Charbonnières, France, www.promega.com/products). Collagenase crude type I A; red blood cell lysis buffer; trypan blue; sodium L-ascorbate; insulin, transferrin, selenite media supplement; dexamethasone; Alcian Blue; papain; pepsin; anisomycin; and DNA quantification kit were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, www.sigmaaldrich.com/france.html). Total collagens (Sircol) and GAG (Blyscan) quantification kits were from Biocolor (Carrickfergus, UK, www.biocolor.co.uk). Brilliant SYBR Green Master Mix was obtained from Stratagene Europe (Amsterdam Zuidooit, The Netherlands, www.stratagene.com). PCR primers were synthesized by MWG Biotech (Ebersberg, Germany, www.mwg-biotech.com). Fetal calf serum (FCS) was purchased from Dominique Dutscher (Brumath, France, www.dutscher.com). TGF- β 1 and Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) were obtained from Peprotech Inc. (London, UK, www.peprotech.com). The RNeasy micro kit was purchased from Qiagen (www.qiagen.com) and turbo DNase from Ambion Inc. (www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/ambion.html), both distributed by Applied Biosystems (Courtaboeuf, France, www.appliedbiosystems.com). Protein content was determined using the Pierce Coomassie Plus assay (Pierce, Rockford, IL, www.piercenet.com). The rabbit anti-phospho-SMAD 2 (3101), phospho-extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 (9101), phospho-c-Jun N-terminal kinase (JNK)1/2 (9251), phospho-p38 (9211), SMAD 2 (3102), ERK1/2 (9102), and goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-linked (7074) antibodies were purchased from Cell Signaling Inc. (Beverly, MA, www.cellsignal.com/index.jsp). The Western blot detection system was obtained from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK, www3.gehealthcare.com). Anti-human type I (631701) and type II (08631711) collagens monoclonal mouse antibodies were purchased from MP Biomedicals Europe (Illkirch, France, www.mpbio.com). Monoclonal antibody directed against human type X collagen (2031501018) was purchased from Quartett (Berlin, Germany, www.quartett.com/products.htm). All other chemicals were obtained from standard laboratory suppliers and were of the highest purity available.

Production, Purification, and Characterization of GY785 DR and GY785 DRS Polysaccharides

The two low-molecular weight polysaccharides GY785 DR and GY785 DRS were derived from GY785, a high-molecular weight exopolysaccharide ($\sim 10^6$ g/mol) produced by a bacterium, *A. infernus*. The isolation procedure and characterization of the strain *A. infernus* have previously been described by Raguenes et al. [15]. The native polysaccharide can undergo a radical depolymerization to obtain GY785 DR. Then, the GY785 DR can be chemically oversulfated to obtain the GY785 DRS as described elsewhere [16]. GY785 DR and GY785 DRS are homogenous fractions with average molecular masses of 15×10^3 g/mol and

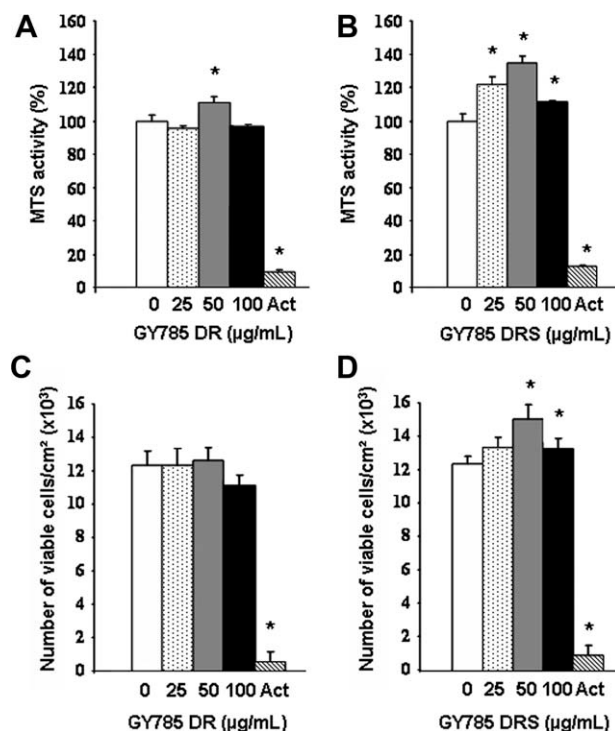


Figure 1. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (ATSC) viability and proliferation. Human ATSCs were cultured in the presence of either GY785 DR (A and C) and GY785 DRS (B and D) at the indicated concentrations or Act (5 μg/ml) for 72 hours. Viability (A and B) was evaluated by MTS activity measurement and expressed as the relative MTS activity compared to the untreated control. Proliferation (C and D) was estimated by viable cell counting after trypan blue exclusion dye. * $p < .05$ compared to the control condition (0 μg/ml of polysaccharide). Abbreviations: Act, actinomycin D; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt.

20×10^3 g/mol and 10% and 40% sulfate groups, respectively, as determined by analytical high performance size-exclusion chromatography (Supporting Information Fig. 1) [13].

Cell Culture

hATSCs were isolated by collagenase digestion of lipoaspirates obtained from three different patients undergoing liposuction and who had given their informed consent. All protocols were approved by the French national ethical committee. Briefly and as previously described [17, 18], lipoaspirates were washed extensively with HBSS to remove debris and then treated with collagenase (0.025%) in HBSS for 1 hour at 37°C under gentle agitation. The collagenase treatment was inactivated by adding an equal volume of DMEM high glucose containing 1% penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine, and 10% FCS (control [CT] medium). The digested product was then centrifuged at 250g for 5 minutes to separate adipocytes from stromal cells. The supernatant was removed and cells were resuspended in the control medium and filtered through a 70-μm nylon mesh filter. The filtrate was centrifuged and cells were resuspended in red blood cell lysis buffer. The lysis reaction was stopped by adding control medium. The suspension was centrifuged and cells were finally resuspended in control medium and plated at 5×10^4 cells per cm² in culture flasks. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere and the control medium was replaced 24 hours after seeding to remove nonadherent cells. Thereafter, the control medium was renewed every 2–3 days. hATSC primary cultures were grown to 90% confluence and then detached from the culture flask using trypsin/EDTA, then replated at 1×10^4 cells per cm². For all

subsequent experiments, hATSCs were used at passage 2. hATSCs isolated using the above-described protocol have been extensively characterized in our laboratory (for details [18, 19]).

Viability and Proliferation

Cell viability was evaluated using an MTS assay as previously described [20]. hATSCs were plated at a density of 1×10^4 cells per cm² and cultured in control medium in the absence or presence of 25, 50, and 100 μg/ml of GY785 DR or GY785 DRS for 72 hours. As a negative control, cells were cultured in the presence of actinomycin D (5 μg/ml) a well-known cell death inducer [20]. Results were expressed as relative MTS activity compared to the control condition (cells cultured in the absence of polysaccharide).

To correlate MTS activity with cell proliferation, we also estimated the number of viable cells. As previously described, cells were treated with trypsin/EDTA after 72 hours of culture and counted using trypan blue exclusion dye [18, 20]. Results were expressed as the total number of viable cells per square centimeter compared with the control condition (cells cultured in the absence of polysaccharide).

Chondrogenic Differentiation

For the in vitro chondrogenic differentiation of hATSC, 5×10^5 cells were placed into polypropylene tubes containing 1 ml of control medium, as previously reported [18]. They were then centrifuged for 5 minutes at 250g. The tubes were fitted with vented caps to permit gas exchange, and the cell pellets were maintained at 37°C in a humidified atmosphere. Pellets of hATSCs were divided into seven experimental groups and cultured for the indicated times either in the presence of CT or CH medium alone or supplemented with 50 μg/ml or the indicated concentrations of GY785 DR, GY785 DRS, or heparin. The chondrogenic medium was composed of serum-free control medium supplemented with 6.25 μg/ml insulin, 6.25 μg/ml transferrin, 6.25 ng/ml sodium selenite; 50 nM sodium L-ascorbate; 10^{-8} M dexamethasone; and 10 ng/ml TGF-β1 [18, 19]. Culture media were changed every 2–3 days.

Human ATSC Pellet Characterization

For the measurement of pellet volume, pellets were considered as scalene ellipsoid entities. Their volumes were estimated using the following formula:

$$\text{Scalene ellipsoid volume} = 4/3 \pi abc$$

In which a , b , and c represent the radius of long axis in each spatial plane.

For pellet gross appearance, the production of sulfated GAG was investigated on whole 28-day-old pellets by Alcian Blue staining. Pellets were washed with ice-cold PBS and fixed for 20 minutes in 100% ethanol. Pellets were then stained with 0.1% Alcian Blue solution in 0.1 M HCl. After overnight incubation, the solution was discarded and the pellets were rinsed with 0.1 M HCl to eliminate nonspecific staining. Photographs were obtained with a stereomicroscope (MZ6, Leica, Wetzlar, Germany, www.leica-microsystems.com).

For DNA and GAG quantification, pellets were digested by papain solution (2 mg/ml) for 3 hours at 60°C. DNA content was determined using the DNA binding fluorochrome bisbenzimidazole following manufacturer's instructions. DNA amount was evaluated using a standard curve of calf thymus DNA. GAG production was determined using a Blyscan Kit according to the manufacturer's indications. For total collagens quantification, pellets were minced and digested overnight by pepsin solution (0.1 mg/ml) at 4°C. Isolation and quantification of collagen were performed using Sircol Kit according to the manufacturer's instructions.

For histological and immunohistological analysis, hATSC pellets were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections (5- μ m thick) were deparaffinized using toluene, rehydrated through a graded series of ethanol, and rinsed in distilled water. Tissue sections were stained with hematoxylin-eosin-safran (HES) and Alcian Blue and immunostained for type I, II, and X collagens as previously described [18]. As negative control, sections were processed using identical protocols, but omitting the primary antibody. Sections were then visualized using a light microscope (Axioplan 2, Zeiss, Göttingen, Germany, www.zeiss.com). Alcian Blue reveals the presence of a GAG-containing cartilaginous matrix, HES stains the nucleus in purple, the cytoplasm in pink, and collagen fibers in yellow and immunopositive areas exhibit brown staining.

Transcript Analysis

Total RNA from hATSC pellets was extracted using the RNeasy micro kit in accordance with the manufacturer's instructions. After DNase digestion, RNA was quantified using a UV-spectrophotometer (Nanodrop ND-1000, Labtech, Palaiseau, France, www.nanodrop.com) and quality was determined with the Agilent Bioanalyzer 2100 system (Waldbronn, Germany, www.genomics.agilent.com). Five hundred nanograms of RNA per sample were reverse transcribed using the superscript III kit in a total volume of 30 μ L. Complementary DNA (cDNA) was amplified in a total volume of 25 μ L PCR reaction mix containing 12.5 μ L of Brilliant SYBR Green Master Mix (1 $\times$) and 30 nM SYBR green reference dye. The sequences of each primer set are provided in Supporting Information Table 1. The real-time polymerase chain reaction was carried out in a MX3000P real-time PCR system (Stratagene) under the following conditions: 10 minutes at 95°C followed by 40 cycles of 30 seconds at 95°C, 1 minute at 60°C and 30 seconds at 72°C. The efficiency and specificity of each primer set were confirmed with standard curves of cycle threshold (Ct) values versus serial dilution of total RNA and melting profile evaluation. Cycle thresholds were normalized to β -actin to control for cDNA quantification differences. Results were reported as relative expression levels.

Surface Plasmon Resonance

Experiments were carried out on a Biacore 3000 instrument (Biacore, Uppsala, Sweden, www.biacore.com/lifesciences/index.html). TGF- β 1, insulin, BMP-2, VEGF, and IGF-1 were covalently immobilized to the dextran matrix of a CM5 sensor chip (Biacore) as recommended by the manufacturer at a flow rate of 5 μ L/minute. Binding assays of GY785 DR, GY785 DRS, and heparin were performed in 10 mM HEPES buffer, pH 7.4, containing 0.15 M NaCl and 0.005% P₂O surfactant [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)-buffered saline-NaCl: 0.15 M NaCl, 0.01 M HEPES, pH 7.4 with 0.005% vol/vol surfactant P20 (Biacore)] and dissociation was monitored for 15 minutes. Regeneration was achieved with NaOH (4.5 mM) after each cycle. The resulting sensorgrams were fitted using BiaEval 4.1 software (Biacore). For K_d calculations, the following molecular weights were used: GY785 DR: 15×10^3 g/mol and GY785 DRS: 20×10^3 g/mol.

Western Blotting

Confluent hATSCs were cultured in the presence of TGF- β 1 (10 ng/ml) alone or in combination with GY785 DR or GY785 DRS (50 μ g/ml) in control medium containing low serum levels (0.5%) for 1-, 4-, 8-, and 24-hour periods. For each time point, cells were rapidly frozen in liquid nitrogen and conserved at -80°C until use. For Western blotting, cells were thawed on ice and lysed by the addition of RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM potassium chloride, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 20 mM β -glycerophosphate, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mM NaF). The protein concentration of cell lysates was determined with a Pierce Coomassie-Plus-protein assay. Thirty micrograms of total protein were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, and

proteins were transferred to a PVDF membrane following the manufacturer's protocol. Membranes were blocked and probed in 5% nonfat dry milk in PBS/Tween 20. Primary antibodies were diluted 1/1,000 and were detected using goat anti-rabbit (HRP)-conjugated secondary antibodies diluted 1/2,000 in 5% nonfat dry milk in PBS/Tween 20. The blots were visualized by enhanced chemiluminescence development using a Western blotting detection system.

As a positive control for SMAD and mitogen activated protein (MAP) kinase activation, confluent osteoblastic MC3T3-E1 cells were serum starved overnight and treated for 15 minutes with anisomycin (5 μ g/ml), TGF- β 1 (10 ng/ml), or inorganic phosphate (Pi; 10 mM) as previously described [21].

Statistical Analysis

Each experiment was repeated at least three times with similar results. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of triplicate determinations. Comparative studies of means were performed by using one-way analysis of variance followed by a post hoc test (Fisher's projected least significant difference) with a statistical significance at $p < .05$.

RESULTS

Viability and Proliferation of hATSC Cultured in the Presence of Polysaccharides

To examine the viability and the proliferation of hATSC cultured in the presence of 0, 25, 50, and 100 μ g/ml of GY785 DR or GY785 DRS, MTS activity was measured and cells were enumerated using trypan blue exclusion dye after 72 hours. When treated with actinomycin D, the MTS activity and the proliferation of hATSC were reduced by nearly 90%. At the concentration of 50 μ g/ml, GY785 DR induced a slight but significant increase in MTS activity (Fig. 1A). GY785 DRS was found to trigger a dose-dependent increase in MTS activity, with a maximum at 50 μ g/ml (Fig. 1B). Regarding hATSC proliferation, GY785 DR did not elicit any beneficial effect (Fig. 1C), whereas the sulfated form of the molecule (GY785 DRS) at 50 μ g/ml significantly increased hATSC proliferation in comparison to the control condition (Fig. 1D).

Chondrogenic Differentiation of hATSC Cultured in the Presence of Polysaccharides

Since GY785 DR and GY785 DRS are considered as GAG-like polysaccharides [13, 14], we paid attention to their putative properties in driving MSC chondrogenic differentiation. To this end, hATSCs were cultured in three-dimensional pellets in the presence of CT or CH medium supplemented with of GY785 DR, GY785 DRS, or heparin for the indicated times. Chondrogenic differentiation was evaluated by the measurement of pellet volume and by the production of a GAG-containing cartilaginous matrix using Alcian Blue staining (Fig. 2A).

Surprisingly, volume estimation revealed that pellets exposed to GY785 DRS in combination with the chondrogenic medium underwent a massive increase by nearly eight-fold (Fig. 2A). In addition, to highlight differences in terms of GAG production between the different conditions, the gross appearance of pellets was observed after Alcian Blue staining. Alcian Blue staining revealed that in the presence of chondrogenic medium, and regardless of polysaccharide supplementation, GAG production was upregulated as shown by the intense dark blue color (Fig. 2A). Heparin failed to exert dramatic effect on pellet volume (Supporting Information Fig. 2).

To decipher whether the size increase observed for hATSC pellets cultured in the presence of chondrogenic

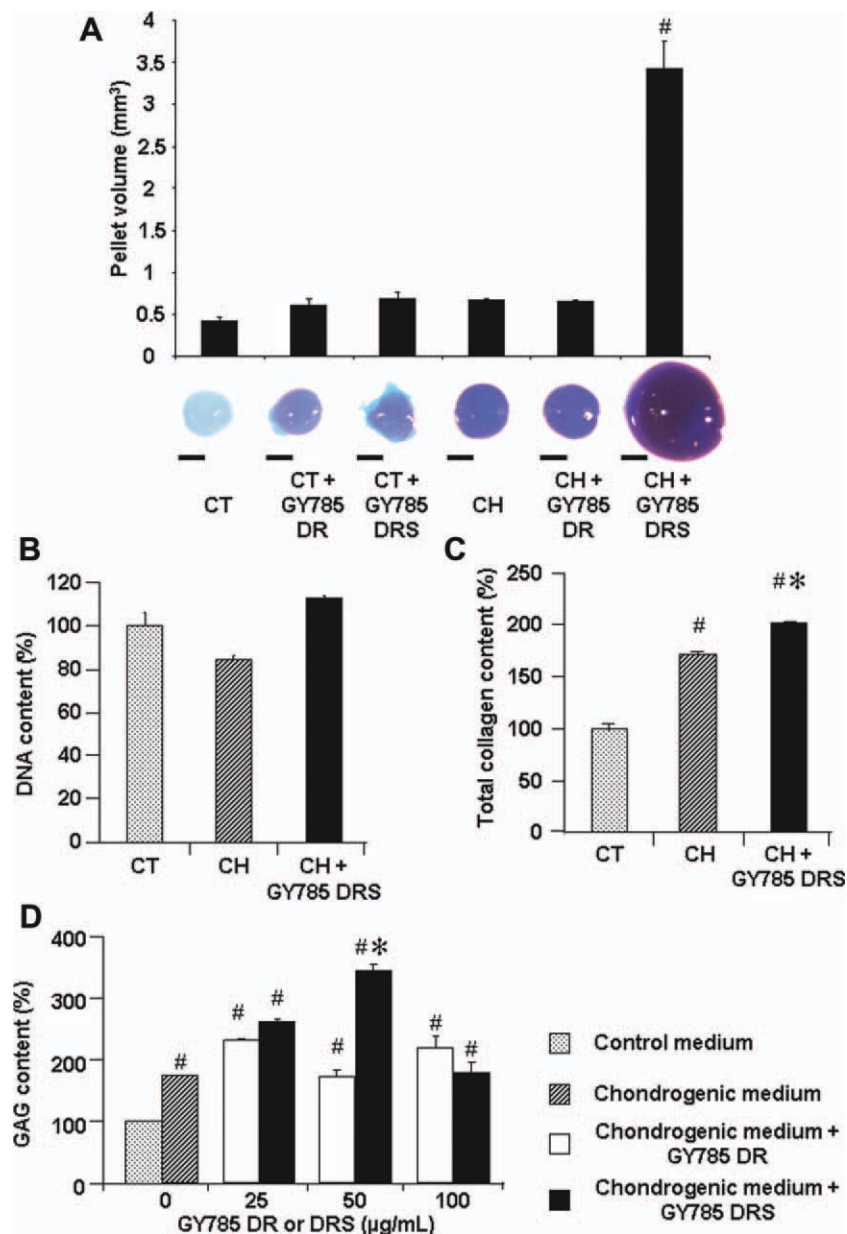


Figure 2. Biochemical characterization of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (hATSC) pellets. hATSCs were cultured in pellets in the presence of CT or CH medium supplemented or not with 50 µg/ml or the indicated concentrations of GY785 DR or GY785 DRS for 28 days. **(A):** The pellet volumes were calculated by equating these entities to ellipsoids. [#]*p* < .05 compared to the control condition. GAG production was evaluated at a gross level after Alcian Blue staining of the whole pellets. Bar: 500 µm. **(B):** Total DNA contents were evaluated using a DNA quantification kit. Results are expressed as the relative content compared to the control condition. ^{*}*p* < .05 compared to the control condition. ^{*}*p* < .05 compared to the chondrogenic condition. **(C):** Total collagens contents were quantified using a Sircol Kit. Results are expressed as the relative content compared to the control condition. [#]*p* < .05 compared to the control condition. ^{*}*p* < .05 compared to the chondrogenic condition. **(D):** GAG contents were quantified using a Blyscan Kit. Results are expressed as the relative content compared to the control condition. [#]*p* < .05 compared to the control condition. ^{*}*p* < .05 compared to the chondrogenic medium supplemented with GY785 DR at the same concentration. Abbreviations: CH, chondrogenic; CT, control; GAG, glycosaminoglycan.

medium supplemented with GY785 DRS was due to an enhanced cell proliferation or an increased ECM production, DNA (Fig. 2B), total collagens (Fig. 2C), and GAG (Fig. 2D) have been quantified. DNA content was not significantly affected, whereas these data point to a slight but significant increase in the production of total collagens and a twofold increase in the production of GAG. In addition, the dose-response experiment evidenced that the dose of 50 µg/ml of GY785 DRS was the optimal concentration for the increased production of GAG.

In the presence of CT medium, HES staining distinguished cell nuclei (purple) and cytoplasm (pink) but did not reveal any particular organization of the cells (Fig. 3A a, c, and e). On the contrary, in the presence of CH medium, supplemented or not with polysaccharides, HES staining revealed a particular structural organization of the cells within the pellet (Fig. 3A g, i, and k). In the external zone, the cells were tangentially oriented to the surface of the pellet and in the innermost part, the cells seemed to be arranged radially. Moreover, in the presence of chondrogenic medium, a

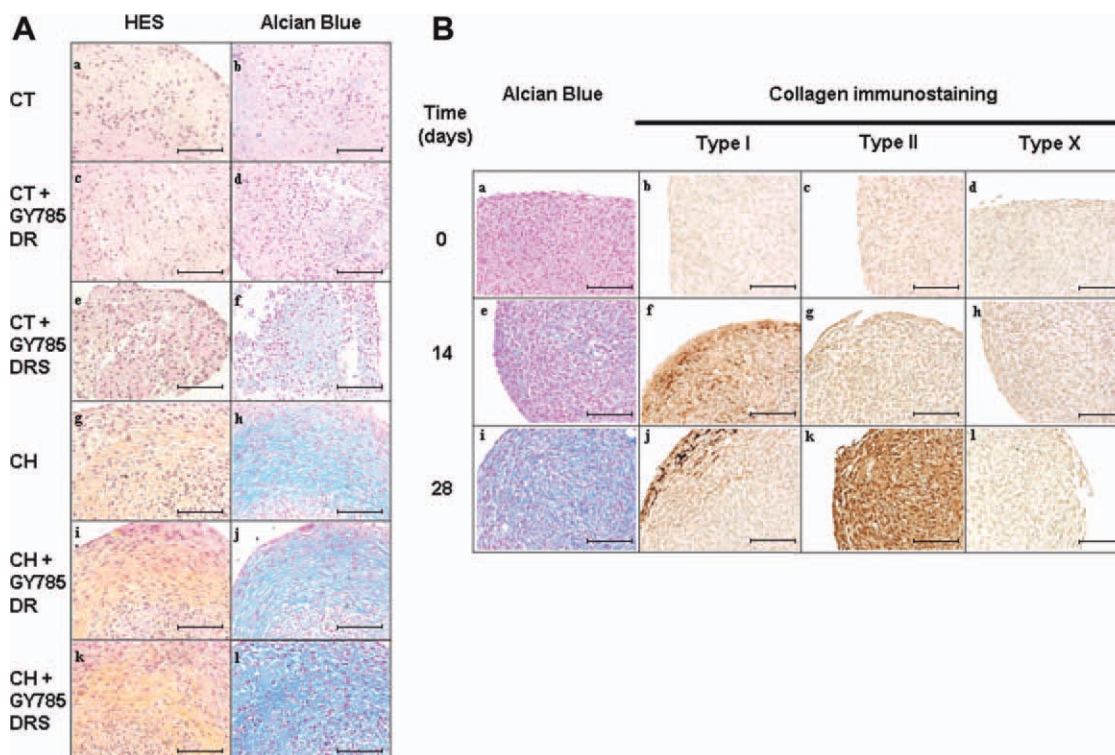


Figure 3. Histological characterization of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (hATSC) pellets. (A): Human ATSCs were cultured in pellets for 28 days in the presence of CT or CH medium supplemented or not with GY785 DR or GY785 DRS (50 $\mu\text{g/ml}$). Histological sections of hATSC pellets were stained with HES (a, c, e, g, i, and k) and Alcian Blue (b, d, f, h, j, and l) as indicated in Materials and Methods. Bar: 100 μm . (B): Human ATSCs were cultured in pellets for 0, 14, and 28 days in the presence of chondrogenic medium supplemented with GY785 DRS (50 $\mu\text{g/ml}$). Histological sections of hATSC pellets were stained with Alcian Blue (a, e, and i) and immunostained for type I (b, f, and j), II (c, g and k), and X (d, h, and l) collagens as indicated in Materials and Methods. Bar: 100 μm . Abbreviations: CH, chondrogenic; CT, control; HES, hematoxylin-eosin-safran.

yellow-orange ring is visible, demonstrating the synthesis of collagen fibers within the matrix (Fig. 3A g, i, and k). Alcian Blue staining failed to reveal the presence of sulfated GAG within the matrix of pellets cultured in control medium (Fig. 3A b, d, and f). Interestingly, in the presence of chondrogenic medium, pellet sections were strongly positive for sulfated GAG (Fig. 3A h, j, and l), especially in the presence of chondrogenic medium supplemented with GY785 DRS polysaccharide. For accurate analysis of the nature and kinetics of matrix components synthesis, we performed a time course experiment. A gradual accumulation of GAG within the matrix was demonstrated by Alcian Blue staining (Fig. 3B a, e, and i), suggesting that GY785 DRS affects the chondrogenesis of hATSC in a time-dependent manner. Type I collagen was detected in the outer part of pellet sections from day 14 (Fig. 3B b, f, and j). The production of type II collagen was barely detectable at day 14. By contrast, pellet sections at day 28 exhibited strong positive areas (Fig. 3B c, g, and k). The synthesis of type X collagen could not be detected (Fig. 3B d, h, and l), and this for all the culture conditions tested.

To confirm the cartilage-like appearance of hATSC pellets shown by our histological observations, we sought to determine the relative expression of *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*, and *COMP* transcripts, by real-time RT-PCR. Our data indicate that in the presence of CT medium supplemented or not with polysaccharide, transcripts coding for the various chondrocyte markers could not be detected (ND) or remained at barely detectable levels. For each transcript analyzed, the expression level was significantly increased in the presence of chondrogenic medium compared to the control medium. Of interest, GY785 DRS used in combination with chondrogenic medium induced a marked increase in the expression levels of the four

chondrogenic markers when compared to GY785 DR (Fig. 4A). Interestingly, in a time course experiment (Fig. 4B), our data confirmed that the effects of GY785 DRS were time-dependent. In addition to promote the expression of the above-mentioned chondrogenic markers, the association of GY785 DRS with the chondrogenic medium significantly reduces the expression levels of type I and X collagens in comparison with the chondrogenic medium alone (Fig. 4B). On the opposite, heparin failed to affect the expression level of tested chondrogenic markers (Supporting Information Fig. 3).

Interactions Between GY785 DR or GY785 DRS Polysaccharides and Growth Factors

To further address whether GY785 DRS may stimulate hATSC chondrogenesis, we then embarked on a set of surface plasmon resonance experiments. Chondrogenic medium contains two major constituents: TGF- β 1 [22, 23] and insulin [24, 25], which are known to drive the chondrogenic differentiation of MSC. To investigate whether these factors can specifically interact with GY785 DR or GY785 DRS, quantitative measurements of their potential physical interaction were performed by Biacore analysis. Both GY785 DR and GY785 DRS polysaccharides were able to bind immobilized TGF- β 1 (Fig. 5). By contrast, heparin was not able to bind these growth factors with a sufficient affinity to determine a K_d constant. The binding affinity of GY785 DR for TGF- β 1 was approximately 100-fold lower than that of GY785 DRS polysaccharide, with a respective K_d of 3.45×10^{-8} and 5.5×10^{-10} M. No modification was observed in the kinetic parameters of the interaction between GY785 DR or GY785 DRS

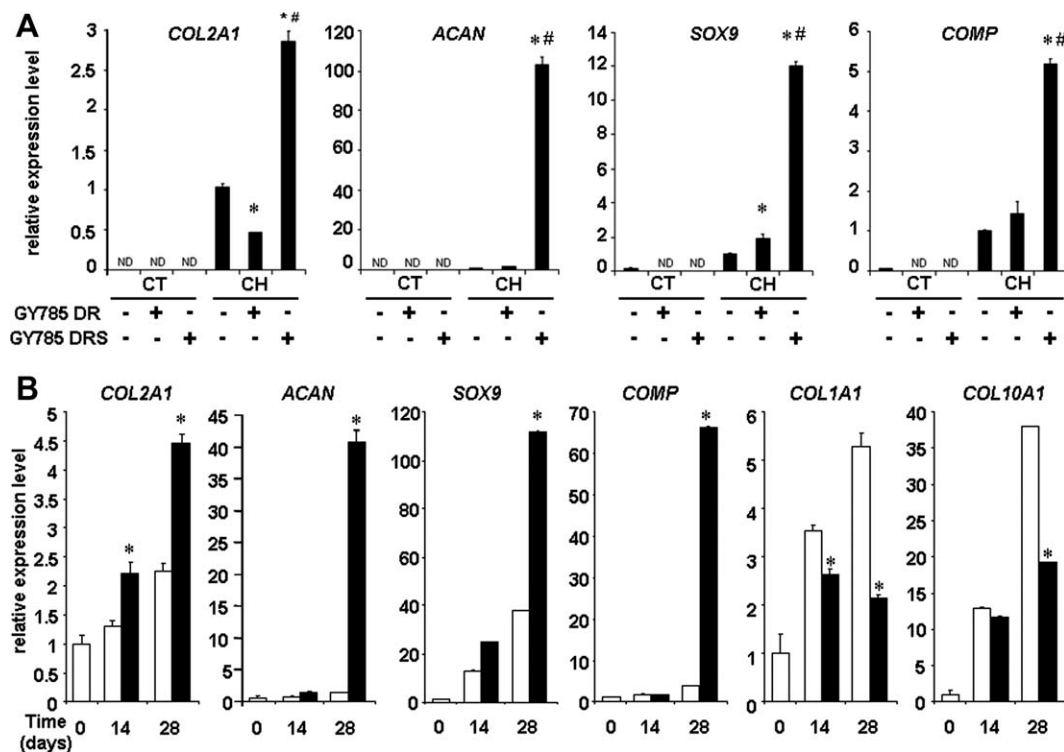


Figure 4. Analysis of the expression levels of chondrogenic markers. (A): Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (ATSC) pellets were cultured in the presence of CT or CH medium supplemented or not with 50 $\mu\text{g/ml}$ of GY785 DR or GY785 DRS for 28 days. Expression of the chondrogenic markers *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*, and *COMP* was investigated by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results are expressed as relative expression level compared to the chondrogenic medium in the absence of polysaccharide. $*p < .05$ compared to chondrogenic medium. $\#p < .05$ compared to chondrogenic medium supplemented with GY785 DR. (B) Human ATSC pellets were cultured in the presence of chondrogenic medium (white bars) or chondrogenic medium supplemented with 50 $\mu\text{g/ml}$ of GY785 DRS (black bars) for 0, 14, and 28 days. Expression of *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*, *COMP*, *COL1A1*, and *COL10A1* was investigated by real-time RT-PCR. Results are expressed as relative expression level compared to the basal level at day 0 in the absence of polysaccharide. $*p < .05$ compared to the chondrogenic condition at the same day. Abbreviations: CH, chondrogenic; CT, control.

and immobilized insulin (data exhibiting a flat sensorgram are not shown). These results indicate that GY785 DRS can bind TGF- β 1 with higher affinity than GY785 DR and neither of them interacts with insulin. Additional Biacore experiments were performed using BMP-2, VEGF, and IGF-1 as growth factors potentially secreted by MSC during their chondrogenic differentiation. Interestingly, we found that GY785 DRS interacts with BMP-2 and VEGF with respective K_d of 1.67×10^{-9} and 5.93×10^{-10} M, but not with IGF-1 (all K_d values are reported in Supporting Information Table 2).

Effects of GY785 DRS on the TGF- β 1 Signaling Pathway

To address whether the GY785 DRS/ TGF- β 1 interaction demonstrated by surface plasmon resonance may lead to specific activation of cellular events in hATSC, we were interested in determining the potential upregulation of TGF- β -dependent activation of SMAD 2 in hATSC (Fig. 6) [26]. Immunoblots of cell lysates indicated that TGF- β 1 alone or in association with GY785 DRS polysaccharide induced the phosphorylation of SMAD 2 as early as 1 hour and up to 24 hours. The presence of the sulfated polysaccharide alone was not sufficient to promote SMAD 2 activation and no additive or synergistic effect of GY785 DRS and TGF- β 1 could be detected on the phosphorylation of SMAD 2. Since MAP kinase signaling pathways, including ERK, JNK, and p38, have been largely involved in TGF- β -dependent chondrogenesis

[27, 28], we sought to decipher whether MAPK could be activated in response to treatment with TGF- β 1 and GY785 DRS.

Of particular interest, whereas ERK1/2 phosphorylation was barely stimulated by TGF- β 1 or GY785 DRS alone, the concomitant treatment of cells with TGF- β 1 and GY785 DRS induced a marked upregulation of the phosphorylation of ERK1/2 as early as 4 hours. This stimulation was maintained up to 24 hours. Analysis of the phosphorylation of the other MAPK showed no detectable phosphorylation of either JNK or p38 in response to TGF- β 1 and GY785 DRS treatment alone or combined. GY785 DR alone failed to affect any tested signaling pathway (data not shown).

To ensure the reliability of our detection method for the phosphorylation of SMAD 2, ERK1/2, JNK, and p38, MC3T3-E1 cells were treated with anisomycin, Pi, and TGF- β 1 and used as a positive control. As expected, in these conditions, phosphorylation of p38 and JNK1/2 was observed after anisomycin treatment [21], phosphorylation of ERK1/2 was observed after Pi stimulation [21], and phosphorylation of SMAD 2 was observed in the presence of TGF- β 1 [29] (Fig. 6 right panel).

DISCUSSION

Injuries to articular cartilage are one of the most challenging issues of musculoskeletal medicine due to the poor intrinsic ability of this tissue for repair. Despite progress in surgery, the lack of efficient modalities of treatment for large chondral

defects has prompted research into tissue engineering combining chondrogenic cells, scaffolding materials, and morphogenic factors. MSCs, initially isolated from bone marrow and exten-

sively studied since, are an attractive source of cells for cartilage engineering. Over the past decade, MSCs from adipose tissue have been considered with a growing interest, due to their easy collection, their high capacity for in vitro expansion, and their chondrogenic potential [30]. However, MSC chondrogenic potential cannot be exploited without a considerable breakthrough in the use of adapted differentiation conditions, combining tridimensional culture and appropriate morphogens.

In this context, with a view to optimizing the chondrogenic differentiation of MSC for cartilage tissue regeneration, we were interested in identifying an easy-to-use, reliable, and safe chondrogenic agent.

A large body of evidence indicates that GAG-like polysaccharides can be involved in the regulation of various biological processes including cell adhesion, migration, proliferation, and differentiation [31], likely via the presence of sulfate groups on their carbohydrate structure. In light of the particular biological properties and chemical structure of oversulfated GAG-like polysaccharides of marine origin, we logically questioned whether GY785 DR and its oversulfated analog may affect MSC behavior.

It has been long described that sulfated GAGs, such as dermatan, chondroitin, and heparan sulfate, are able to stimulate the proliferation of fibroblasts [32], but the effects of marine sulfated polysaccharides on the proliferation of MSCs have not yet been characterized. Accordingly, in a first set of experiments, we were interested in demonstrating that the oversulfated GY785 DRS, and to a lesser extent its non-oversulfated isoform GY785 DR, have a slight but significant effect on viability and proliferation of hATSC. In addition to their effects on cell proliferation, we were then particularly captivated to observe that concomitant treatment of hATSC pellets with GY785 DRS (and not GY785 DR) and a growth factor-rich chondrogenic medium induced a dramatic increase in volume and GAG contents of chondrogenic pellets. Since the effects of GY785 DRS on DNA content were not

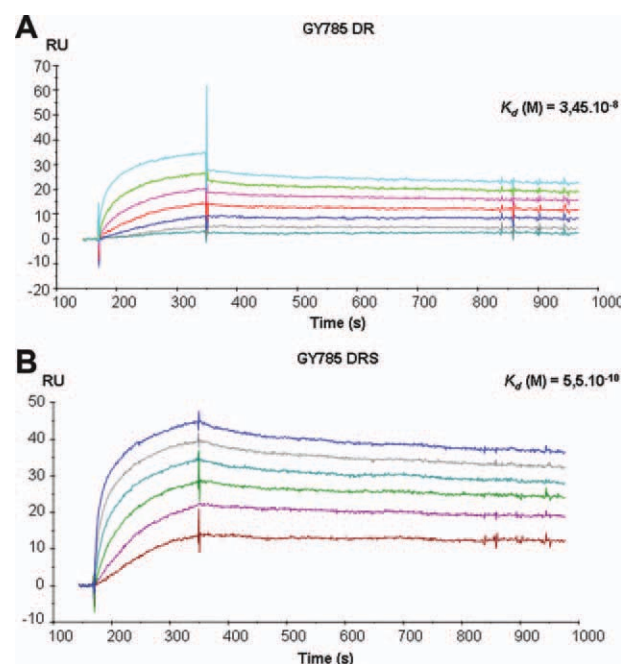


Figure 5. Determination of GY785 DR and GY785 DRS binding to transforming growth factor (TGF)- β 1. The binding of GY785 DR (A) and GY785 DRS (B) to TGF- β immobilized on a research-grade CM5 chip was visualized as the change in surface plasmon resonance in the form of sensorgrams. The resulting sensorgrams were fitted using BiaEval 4.1 software. The regions used in determining equilibrium dissociation constants [K_d (M)] are shown. Abbreviation: RU, resonance unit.

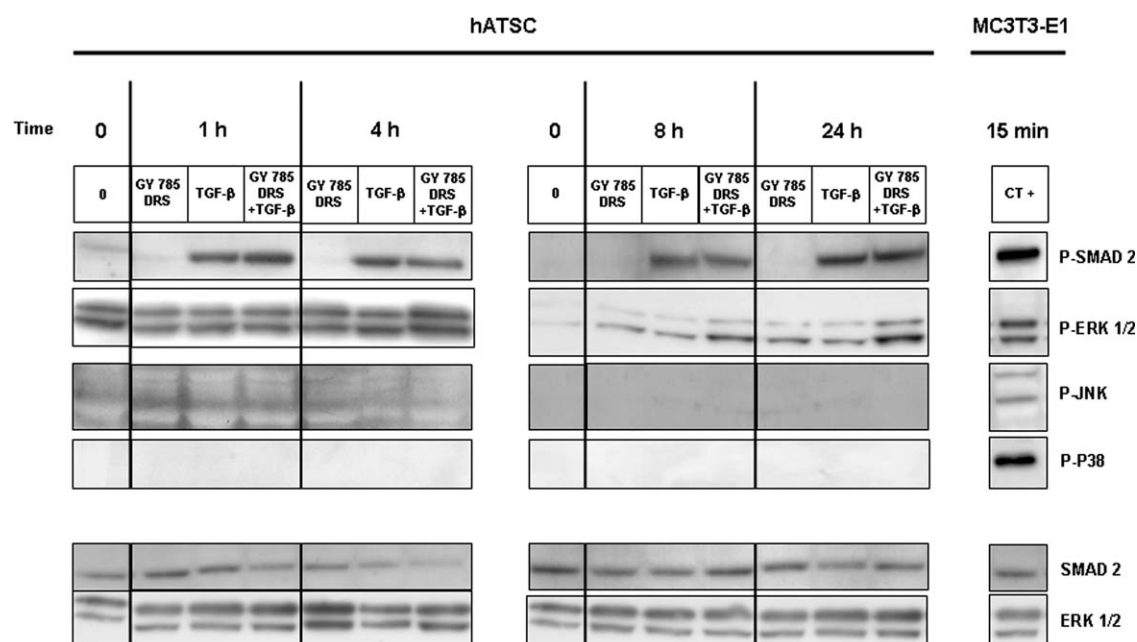


Figure 6. Effect of GY785 DRS on TGF- β 1-dependent activation of SMAD 2 and mitogen activated protein kinase pathways. Human ATSCs were treated with 10 ng/ml of TGF- β 1 in the presence or absence of 50 μ g/ml of GY785 DRS for the indicated times. MC3T3-E1s were used as positive controls. Cells were rapidly frozen in liquid nitrogen before lysis on ice. The resulting samples were analyzed by Western blot using specific antibodies against P-SMAD 2, P-ERK1/2, P-JNK1/2, and P-p38, and/or antibodies against SMAD 2 and ERK1/2 as indicated. Data are representative of experiments with similar results. Abbreviations: CT, control; ERK, extracellular signal-regulated kinase; hATSC, human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell; P-ERK, phosphorylated ERK; P-JNK, phosphorylated c-Jun N-terminal kinase; TGF, transforming growth factor.

significant, it is unlikely that the increase in pellet volume might be due to an increase in cell proliferation. Conversely, the increase in collagens and GAG contents and our immunostaining data allows us to speculate that the GY785 DRS was able to stimulate the production and accumulation of a chondrogenic matrix that could thus explain the increase in pellet volume. As GY785 DR and GY785 DRS are counterparts in structure and are only distinguishable by their degree of sulfation, our data clearly shed light on the role of the sulfate groups of polysaccharides in controlling their biological properties. Previous studies have reported that heparan sulfate and structurally related GAGs (dermatan sulfate and dextran sulfate) are involved in the regulation of chondrogenesis, specifically in nodule growth. Such studies have also found the non-sulfated forms to be quite less effective in stimulating chondrogenesis [33, 34].

To strengthen the scientific relevance of our histological findings, we then analyzed at the transcriptional level, whether GY785 DRS, together with our chondrogenic medium, was able to stimulate the expression levels of several chondrogenic genes. We focused our efforts on three extracellular articular cartilaginous matrix proteins type II collagen, aggrecan, and COMP, as well as on a transcription factor well known to drive the early step of MSC commitment toward the chondrogenic lineage, SOX9. Our real-time RT-PCR highlighted the upregulation of these four chondrogenic markers, thereby confirming our histological observations. Moreover, the presence of GY785 DRS in the chondrogenic medium was found to reduce the expression levels of unwanted transcripts coding for type I and X collagens and their corresponding proteins that are specific markers of osteogenesis and hypertrophy, respectively.

Sulfated GAGs were able to bind and regulate a number of proteins such as cytokines, chemokines, growth factors, morphogens, enzymes, and adhesion molecules. Some growth factors such as VEGF and FGF have been extensively described as being stored, stabilized, and protected from degradation in the matrix through interactions with GAG [35]. Under the action of a stimulus, these growth factors can then be released and exert their biological functions [36, 37]. These observations suggest that not only the binding affinity of a ligand to its receptor but also the stability of the ligand-receptor complex on the cell surface is one of the key factors that control the biological activity of the ligand in the targeted cells. To decipher whether TGF- β 1 or insulin, the two major chondrogenic stimulatory factors of our culture medium, can physically interact with both GY785 DR and DRS, surface plasmon resonance experiments were performed. Interestingly, our Biacore data demonstrate the existence of a high affinity between GY785 DRS and TGF- β 1, but not with insulin. On the contrary, the non-oversulfated isoform GY785 DR failed to exhibit such a high affinity for TGF- β 1. Taken together, these findings shed further light on the possibility that the GY785 DRS may act synergistically with TGF- β 1 through a physical interaction, as shown by the formation of affinity complexes in Biacore experiments.

Among its various biological effects, TGF- β 1 is known to be a potent inducer of the osteochondrogenic differentiation of MSC by upregulating the SMAD and MAP kinase signaling pathways [27, 28]. We next investigated whether the *in silico* physical interaction seen by Biacore led to the activation of specific cellular responses *in vitro*. For this, we deciphered the SMAD and MAP kinase pathway activation in response to concomitant treatment of hATSC with GY785

DRS and TGF- β 1. While the SMAD 2 pathway was not upregulated by this cotreatment, our experiments showed that GY785 DRS and TGF- β 1 act concomitantly to induce a sustained activation of the ERK1/2 pathway. Collectively, our findings therefore strongly suggest that a physical interaction between TGF- β 1 and GY785 DRS may be at the origin of the sustained ERK1/2 activation. Having demonstrated the existence of physical interactions between the GY785 DRS and particular growth factors, two putative mechanisms may explain the enhanced signaling observed within hATSC stimulated by the combined use of TGF- β 1 and GY785 DRS. The first hypothesis is that GY785 DRS can protect growth factor to which it binds from proteolysis; thus, prolonging their lifespan and their biological activity.

The second hypothesis is that GY785 DRS can act as a coreceptor of growth factor and is participating in the stabilization of the interaction between the growth factor and its receptor, strengthening the intracellular signal arising from receptor activation.

CONCLUSION

To conclude, we have demonstrated that GY785 DRS stimulates hATSC chondrogenic differentiation, probably through interaction with TGF- β 1. This GAG-like polysaccharide of marine origin is easily producible and could therefore be considered a promising additive to drive efficient and reliable MSC chondrogenesis.

Whereas the underlying mechanisms of the interaction between GY785 DRS and TGF- β 1 remain poorly understood, it could be of major relevance to further dissect these molecular mechanisms and their biological consequences, especially to help us monitor and exploit the potential of stem cells in cartilage repair.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed by grants from the “foundation Arthritis Courtin,” the “Société Française de Rhumatologie,” ANR, young researchers project “scartifold,” ANR Tecsan project “Chondrograft,” the “fondation de l’avenir pour la recherche médicale appliquée” (ET7-451 and ET9-491), Graftys S.A., IFREMER, and the INSERM U791.

C. Merceron and S. Portron received a fellowship from “Région des Pays de la Loire, program Bioregos I and II.” We also gratefully acknowledge Dr. F. Lejeune (Clinique Brétèche Nantes) for harvesting human lipoaspirates; M. Maillason and Y. Jacques (Plateforme IMPACT biogénouest, CRCNA-INSERM U892) for their assistance in surface plasmon resonance experiments; J. Ratiskol (IFREMER) for the GY785 DR and GY785 DRS polysaccharide production and analysis; and M. Gatiou-Perré for helpful discussions. We also thank Britt House English language editing.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

- 1 Archer CW, Francis-West P. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:401–404.
- 2 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.
- 3 Hunziker EB. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:432–463.
- 4 Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C et al. Cartilage engineering: A crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol* 2009;27:307–314.
- 5 Friedenstein AJ, Piatetzky S II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16:381–390.
- 6 Vinatier C, Bouffi C, Merceron C et al. Cartilage tissue engineering: Towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009;4(4):318–329.
- 7 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–317.
- 8 Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991;64:867–869.
- 9 Gandhi NS, Mancera RL. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des* 2008;72:455–482.
- 10 Ramirez F, Rifkin DB. Cell signaling events: A view from the matrix. *Matrix Biol* 2003;22:101–107.
- 11 Rougeaux H, Pichon R, Kervarec N et al. Novel bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydr Polym* 1996;31:237–242.
- 12 Guezennec J. Deep-sea hydrothermal vents: A new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest? *J Ind Microbiol Biotechnol* 2002;29:204–208.
- 13 Collic-Jouault S, Chevotot L, Helley D et al. Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochim Biophys Acta* 2001;1528:141–151.
- 14 Matou S, Collic-Jouault S, Galy-Fauroux I et al. Effect of an oversulfated exopolysaccharide on angiogenesis induced by fibroblast growth factor-2 or vascular endothelial growth factor in vitro. *Biochem Pharmacol* 2005;69:751–759.
- 15 Raguene GH, Peres A, Ruimy R et al. *Alteromonas infernus* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *J Appl Microbiol* 1997;82:422–430.
- 16 Guezennec J, Pignet P, Lijour Y et al. Sulfation and depolymerization of a bacterial exopolysaccharide of hydrothermal origin. *Carbohydr Polym* 1998;37:19–24.
- 17 Estes BT, Diekmann BO, Gimble JM et al. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc* 2010;5:1294–1311.
- 18 Merceron C, Vinatier C, Portron S et al. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;298:355–364.
- 19 Merceron C, Masson M, Portron S et al. Chondrogenic potential of differentially cultured human adipose-derived stem cells after transplantation with a cellulose hydrogel. *Cell Transplant* 2011 (in press).
- 20 Vinatier C, Magne D, Weiss P et al. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* 2005;26:6643–6651.
- 21 Julien M, Khoshniat S, Lacreusette A et al. Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: Role of ERK1/2 and Fra-1. *J Bone Miner Res* 2009;24:1856–1868.
- 22 Awad HA, Halvorsen YD, Gimble JM et al. Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng* 2003;9:1301–1312.
- 23 Puetzer JL, Petite JN, Lobo EG. Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:435–444.
- 24 Malafaya PB, Oliveira JT, Reis RL. The effect of insulin-loaded chitosan particle-aggregated scaffolds in chondrogenic differentiation. *Tissue Eng Part A* 2010;16:735–747.
- 25 Wang CY, Chen LL, Kuo PY et al. Apoptosis in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells: Effect of serum and medium supplements. *Apoptosis* 2010;15:439–449.
- 26 Massague J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 2000;14:627–644.
- 27 Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003;425:577–584.
- 28 Arita NA, Pelaez D, Cheung HS. Activation of the Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) is needed for the TGFbeta-induced chondrogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;405(4):564–569.
- 29 Lai CF, Feng X, Nishimura R et al. Transforming growth factor-beta up-regulates the beta 5 integrin subunit expression via Sp1 and Smad signaling. *J Biol Chem* 2000;275:36400–36406.
- 30 Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279–4295.
- 31 Rapraeger AC. Syndecan-regulated receptor signaling. *J Cell Biol* 2000;149:995–998.
- 32 Penc SF, Pomahac B, Winkler T et al. Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J Biol Chem* 1998;273:28116–28121.
- 33 Park JS, Woo DG, Yang HN et al. Heparin-bound transforming growth factor-beta3 enhances neocartilage formation by rabbit mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2008;85:589–596.
- 34 San Antonio JD, Winston BM, Tuan RS. Regulation of chondrogenesis by heparan sulfate and structurally related glycosaminoglycans. *Dev Biol* 1987;123:17–24.
- 35 Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J* 2011;278:28–45.
- 36 Vlodavsky I, Abboud-Jarrous G, Elkin M et al. The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006;35:116–127.
- 37 Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. Glycosaminoglycans: Molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev* 1991;71:481–539.



See www.StemCells.com for supporting information available online.

3.3 Discussion

Durant la dernière décennie, les CSA ont été considérées avec un intérêt croissant non seulement de par leur propriété de CSM mais également grâce à leur prélèvement facile et leur nombre élevé au sein du tissu adipeux [174]. Cependant, le défi que représente l'utilisation des CSA pour l'ingénierie tissulaire du cartilage reste entier. Il est en effet nécessaire de pouvoir contrôler de manière précise leur différenciation chondrogénique. L'identification de réactifs chondrogéniques faciles à utiliser et reproductibles est donc un objectif pertinent dans le but d'optimiser la différenciation des CSA et améliorer leur utilisation en médecine régénératrice du cartilage.

Les GAG sont impliqués dans la régulation de multiples processus biologiques incluant l'adhésion, la migration, la prolifération ou la différenciation cellulaire *via* la présence de groupements sulfates [312]. Les effets des GAG physiologiquement présents au sein de la MEC du cartilage sur le comportement des chondrocytes et CSM ont largement été décrits. Dans ce contexte, et en collaboration avec le laboratoire de Biotechnologie et Molécules Marines de l'Ifremer, nous avons considéré avec intérêt un polysaccharide marin de structure particulièrement proche des GAG, le GY785 DR et son homologue sur-sulfaté, le GY785 DRS pour une utilisation en ingénierie tissulaire du cartilage. En conséquence, nous nous sommes intéressés à leur rôle potentiel dans la différenciation chondrogénique des CSA.

Il est décrit depuis longtemps, que les GAG sulfatés tels que le dermatane, le chondroïtine et l'héparane sulfate sont capables de stimuler la prolifération de fibroblastes [541] mais leurs effets sur la prolifération de CSM n'ont pas encore été caractérisés. Ainsi, après nous être assurés que le GY785 DR et GY785 DRS n'induisent pas la mort des CSA, nous avons observé que le GR785 DRS, et dans une moindre mesure le GY785DR, exercent une légère augmentation du nombre de cellules. De façon intéressante, le GY785 DRS ajouté au milieu de chondrogénique induit une augmentation significative du volume des pellets de CSA. D'après les effets modestes du GY785 DRS sur la prolifération et la quantité d'ADN, cette augmentation n'est probablement pas due à une prolifération cellulaire. Nous nous sommes donc intéressés à la composition de la matrice extracellulaire. L'augmentation des contenus en GAG sulfatés et collagènes, notamment le collagène de type II, ainsi que la diminution en

collagène de type X et de type I, nous permettent de supposer que le GY785 DRS stimule la production et l'accumulation d'une matrice chondrogénique, non hypertrophique et non fibroblastique, expliquant ainsi l'augmentation du volume des pellets. Le GY785 DR et le GY785 DRS étant des polysaccharides ramifiés homologues de structure, ne se distinguant que par le degré de sulfatation, nos données mettent en relief l'importance des groupements sulfates dans le contrôle des propriétés biologiques des GAG. Ceci en accord avec les données de la littérature rapportant que l'héparane sulfate et analogues (dermatane sulfate et dextrane sulfate) sont impliqués dans la régulation de la chondrogenèse [542 ,543].

Afin de confirmer nos observations histologiques, nous avons analysé l'effet du GY785 DRS additionné au milieu chondrogénique sur l'expression des marqueurs chondrogéniques. Nos analyses par PCR en temps réel ont mis en évidence que l'addition du GY785 DRS au milieu chondrogénique induit une augmentation au cours du temps de l'expression de trois protéines de la MEC cartilagineuse, le collagène de type II, l'agrécan, COMP ainsi que l'expression du facteur de transcription connu pour diriger la différenciation chondrogénique : SOX9. De façon intéressante, les niveaux d'expression des marqueurs du phénotype fibroblastique et hypertrophique (collagène de type I et de type X, respectivement) sont diminués, en présence du milieu d'induction supplémenté en GY785 DRS.

Pour comprendre comment le GY785 DRS additionné au milieu chondrogénique peut stimuler la différenciation des CSA, nous nous sommes intéressés à sa capacité à interagir avec les composants du milieu de culture. Les GAG sulfatés ont été décrits comme capables de lier et de réguler la biodisponibilité de nombreuses protéines [544], de les protéger vis-à-vis de la dégradation par des enzymes protéolytiques et de stabiliser les interactions ligand-récepteur. Afin de déterminer comment les GY785 DR et DRS pouvaient physiquement interagir avec l'insuline ou le TGF-béta1, les deux composants majeurs de notre milieu de différenciation chondrogénique, des expériences de résonance plasmonique de surface ont été réalisées. De manière intéressante, nos données démontrent l'existence d'interactions de haute affinité entre le GY785 DRS et le TGF-béta1 mais inexistantes avec l'insuline. Ces résultats mettent en évidence la possibilité que le GY785 DRS puisse agir de manière synergique *via* des interactions physiques avec le TGF-béta1 en formant un complexe stable. Le TGF-béta étant connu pour être un puissant inducteur de la différenciation chondrogénique

par la stimulation des voies de signalisation SMAD et MAP kinase, nous nous sommes alors intéressés à l'activation de ces voies lorsque les CSA sont cultivées en présence de GY785 DRS. Alors que la voie de signalisation SMAD2 n'est pas stimulée par le co-traitement TGF-béta/GY785 DRS, nous mettons en évidence l'induction prolongée de la voie de signalisation ERK 1/2 par l'action complémentaire du GY785 DRS et du TGF-béta1. Ensemble, ces résultats suggèrent fortement qu'une interaction physique entre le TGF-béta et le GY785 DRS serait à l'origine de l'activation soutenue de ERK 1/2. Deux hypothèses peuvent être émises : le GY785 DRS peut soit protéger les facteurs de croissance, auxquels il est lié, de la protéolyse et ainsi prolonger leur survie et leur activité biologique ; soit agir comme corécepteur des facteurs de croissance et participer ainsi à la stabilisation des interactions entre les facteurs de croissance et leurs récepteurs, renforçant les signaux intracellulaires qui en découlent.

Bien que l'activation de la voie ERK 1/2, médiée par le milieu de différenciation contenant du TGF- béta1 associé au GY785 DRS, semble conduire à une stimulation de la chondrogenèse, des expériences complémentaires utilisant des inhibiteurs chimiques spécifiques ou une approche d'ARN interférence ciblant ERK 1/2 devront être réalisées.

En conclusion, ces travaux ont démontré que le GY785 DRS stimule la différenciation chondrogénique des CSA probablement en interagissant avec le TGF-béta1. Ce polysaccharide GAG-mimétique d'origine marine est aisément productible et représente un actif biologique prometteur pour induire efficacement la différenciation chondrogénique des CSA. Cependant, les mécanismes sous-jacents des interactions entre le GY785 DRS et le TGF-béta1 restent encore méconnus. Il serait donc intéressant de mieux cerner ces mécanismes moléculaires et leurs conséquences biologiques afin d'exploiter de manière optimale le potentiel des CSM dans la réparation du cartilage.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les stratégies d'ingénierie tissulaire du cartilage ont pour objectif de réparer les lésions du cartilage articulaire à l'aide de cellules chondrogéniques telles que les cellules souches mésenchymateuses (CSM) adultes. Ces CSM transplantées sont généralement maintenues sur le site lésionnel *via* une matrice tridimensionnelle ou un biomatériau. Cependant, l'instabilité, notamment à long terme, du tissu de réparation conduit actuellement les recherches vers l'optimisation des conditions d'utilisation des CSM dans le but de permettre la néoformation d'un tissu cartilagineux de type hyalin biomécaniquement compétent et pérenne dans le temps.

C'est dans ce contexte que notre travail de thèse s'est inscrit et son objectif principal a consisté à développer des conditions environnementales optimales pour contrôler la cinétique et la qualité de la différenciation chondrogénique de CSM isolées du tissu adipeux. Ainsi, nous avons porté notre attention sur trois facteurs environnementaux : la dimensionnalité, la tension en oxygène et un polysaccharide marin GAG mimétique.

Pour répondre à notre objectif, nous avons débuté notre travail par l'étude des effets de la culture en deux ou trois dimensions sur le potentiel chondrogénique de CSA *in vitro* et *in vivo*. Nous avons montré que la culture en trois dimensions « pellets » ou au sein d'un hydrogel HPMC-Si potentialise la différenciation chondrogénique des CSA *in vitro*. Par la suite, nous avons démontré qu'il est possible de simplifier la culture de CSA avant implantation. En effet, la différenciation chondrogénique *in vitro* en deux dimensions s'est avérée suffisante dans nos expériences pour permettre la formation d'agrégats cellulaires de type cartilagineux en sous-cutanée chez la souris nude.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux effets de la tension en oxygène sur le potentiel chondrogénique des CSA *in vitro* et *in vivo*. Notre première étude montre que bien qu'une tension en oxygène de 5% favorise le potentiel chondrogénique des CSA *in vitro*, elle ne potentialise pas la formation d'un tissu cartilagineux *in vivo* en site articulaire lésionnel. Cependant, ces travaux confirment que les CSA engagées dans la voie chondrogénique sont capables de former un tissu cartilagineux de réparation en site articulaire et attestent de l'intérêt des CSA en ingénierie tissulaire du cartilage.

L'utilisation des CSM pour la réparation du cartilage articulaire nécessite certes d'orienter les CSM vers un phénotype chondrogénique, mais également d'assurer la stabilité de ce phénotype comme nous l'évoquions ci dessus.

Ainsi, notre seconde étude a révélé que l'hypoxie favorise la différenciation chondrogénique et pourrait également permettre de maintenir ce phénotype en prévenant l'apparition de l'hypertrophie. Les mécanismes par lesquels l'hypoxie maintient le phénotype chondrogénique font l'objet d'études expérimentales actuellement en cours au laboratoire. Les voies de signalisation impliquant les facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2 sont notamment étudiées par deux approches complémentaires utilisant d'un côté des inhibiteurs chimiques et de l'autre des ARN interférants. Par ailleurs, et quels que soient les résultats obtenus concernant le rôle des HIF dans ces processus, il conviendra de réaliser des études complémentaires afin de déterminer si la stabilisation du phénotype chondrogénique des CSA *in vitro* permet réellement de prévenir la formation d'une matrice calcifiée *in vivo* à long terme.

Finalement le troisième et dernier facteur environnemental auquel nous nous sommes intéressés, nous a conduit à considérer avec intérêt l'utilisation de polysaccharides marins (GY785 DR et DRS) en tant qu'actifs favorisant la différenciation chondrogénique des CSA. A la faveur de notre collaboration avec le laboratoire de Biotechnologie et Molécules Marines de l'Ifremer, nous avons ainsi mis en évidence, *in vitro*, la capacité du GY785 DRS à promouvoir l'orientation des CSA vers un phénotype chondrocytaire. Nos données ont également suggéré que le GY785 DRS pourrait prévenir la différenciation hypertrophique des CSA. Ceci probablement *via* un mécanisme de potentialisation des effets du facteur de croissance TGF-béta1 permettant l'activation prolongée de la voie de signalisation ERK 1/2. Des études complémentaires sont donc nécessaires tout d'abord pour mieux comprendre le mode d'action de ce GAG mimétique, mais également pour déterminer si ses effets anti-hypertrophique *in vitro* peuvent être exploités dans une approche *in vivo*.

Ces travaux nous permettent de proposer une stratégie d'ingénierie tissulaire basée sur une utilisation optimale de CSA associées à l'hydrogel HPMC-Si. Cette stratégie a fait l'objet d'une revue publiée dans le journal Ingénierie et Recherche BioMédicale (Article VI).

Bien que de nombreuses études précliniques, dont la nôtre, démontrent la capacité des CSA différenciées dans la voie chondrogénique à former un tissu cartilagineux *in vivo*, il demeure aujourd'hui difficile de conclure objectivement que le tissu formé par les CSA est de meilleure qualité que celui formé par des chondrocytes, actuellement en clinique. De plus, les normes et contrôles sanitaires qui s'appliquent à l'utilisation de CSM, nécessaires pour garantir la sécurité du patient, font appel à des techniques coûteuses et logistiquement lourdes.

A l'heure actuelle, notre stratégie associant un biomatériau et des CSA apparaît difficilement transférable en clinique humaine compte tenu notamment de son surcoût financier mais aussi de tous les impératifs sanitaires. Aujourd'hui, il est d'ailleurs à noter qu'aucun essai clinique utilisant des CSM différenciées n'est réalisé en ingénierie tissulaire du cartilage.

De nombreux essais cliniques sont cependant en cours, portant soit sur l'amélioration de la technique ACI, avec de nouvelles matrices ou des chondrocytes nasaux, soit sur l'utilisation de CSM issues de la moelle osseuse. Cependant, en dépit des efforts consacrés aux développements de nouvelles stratégies thérapeutiques, le traitement des défauts focaux reste un défi majeur en clinique.

Dans le but de discerner les implications respectives des différents facteurs pouvant moduler la différenciation chondrogénique des CSA (dimensionnalité, composition du milieu de culture, tension en oxygène, durée de la différenciation) des études transcriptomiques par puce à ADN sont en cours de réalisation. Ces études permettront de déterminer le rôle et le potentiel de ces facteurs environnementaux et d'identifier les mécanismes de régulation de la différenciation chondrogénique des CSA afin d'exploiter de manière optimale leur potentiel en ingénierie du cartilage.

Le potentiel chondrogénique des CSA nécessite certes d'être optimisé et contrôlé, mais également d'être comparé aux autres CSM issues de différents tissus. Nous notons, en effet, la disparité des potentiels chondrogéniques entre des CSM issues de différentes sources tissulaires. Plusieurs études comparatives montrent la supériorité des CSM issues de l'environnement articulaire (liquide synovial, membrane synoviale ou coussin graisseux de l'articulation) au regard des CSM issues de la moelle osseuse ou du tissu adipeux [58,184,240,545-550]. Si ces aspects n'ont pas été abordés au cours de cette thèse, un

programme de recherche a été initié au laboratoire récemment, (thèse d'université de Nicolas Maillard), et consiste à comparer les caractéristiques biologiques (propriétés immunomodulatrice, anti-inflammatoire et chondrogénique) de CSM issues de la moelle osseuse, du coussin graisseux de l'articulation et du liquide synovial d'un même patient arthrosique.

Notre stratégie d'ingénierie tissulaire associant des CSA différenciées à un biomatériau, même si elle demeure aujourd'hui difficilement transférable en clinique humaine, reste pertinente scientifiquement pour le traitement des lésions focales. Or, il est aujourd'hui bien admis que les lésions cartilagineuses focales non traitées progressent rapidement vers l'arthrose de l'articulation concernée [551,552]. Par conséquent, notre stratégie d'ingénierie tissulaire pourrait permettre de prévenir le développement d'une telle pathologie. Signalons cependant que l'évolution de défauts focaux vers l'arthrose dépend de la taille de la lésion, de sa localisation et des caractéristiques morpho-posturales des patients [553,554]. Il est ainsi difficile de prédire pour quelles lésions focales les techniques d'ingénierie tissulaire seront bénéfiques. Par ailleurs, comme le cartilage articulaire est aneural, la perte de substance cartilagineuse n'est pas douloureuse initialement, ce qui rend difficile sa détection précoce. Ainsi, dans la majorité des cas, les lésions à traiter sont détectées tardivement, étendues en surface et en profondeur, pouvant toucher l'ensemble de la cavité articulaire et présentent une composante inflammatoire [555,556]. L'inflammation stimule les voies cataboliques, l'apparition du phénotype hypertrophique des chondrocytes résidants ainsi que des cellules implantées, aboutissant à l'entretien de la dégradation de la matrice extracellulaire [10]. Dans ce contexte arthrosique, l'implantation de CSM différenciées au sein d'un biomatériau ne semble pas de prime abord rationnelle. En effet, un nombre important de cellules serait nécessaire pour traiter un défaut large. De plus, l'environnement arthrosique, les facteurs biomécaniques ou inflammatoires, peuvent influencer la différenciation chondrogénique des cellules implantées ou causer la dégradation de l'implant [557,558]. Actuellement, aucune solution thérapeutique ne permet de traiter ou d'inverser le processus arthrosique de façon cliniquement significative et prolongée.

Cependant et fort de l'amélioration des connaissances en ingénierie tissulaire, de nouvelles stratégies pour régénérer un tissu arthrosique ont récemment été développées. En ce sens,

l'injection intra-articulaire de CSM en site arthrosique a permis d'améliorer significativement les symptômes cliniques, bien que peu de CSM implantées soient retrouvées au sein du tissu régénéré [559,560]. Ces études mettent ainsi en évidence que les effets dus à l'implantation de CSM vont bien au-delà de leur potentiel chondrogénique et de leur capacité à remplacer les cellules hôtes. Les CSM ont la capacité de migrer sur un site lésé, de sécréter, en fonction de leur environnement, un grand nombre de facteurs trophiques. Ces facteurs, tels que les facteurs de croissances, chémo-attractants et anti-inflammatoires, sont capables de stimuler et favoriser la réparation tissulaire naturelle [218-220]. Par conséquent, les CSM implantées peuvent limiter l'inflammation du tissu arthrosique, stimuler l'anabolisme des chondrocytes et activer les chondroprogéniteurs [224,561]. Ainsi, l'utilisation de CSM apparaît prometteuse pour traiter les pathologies articulaires *via* une stratégie de médecine régénératrice basée sur la stimulation des processus de réparation naturelle [562,563]. Aujourd'hui, plusieurs essais cliniques sont en cours pour tester le traitement de lésion arthrosique par l'injection intra-articulaire de CSM issues de la moelle osseuse et un essai clinique utilise des CSM issues du tissu adipeux.

Notre étude sur la différenciation hypertrophique des CSA ouvre également des perspectives intéressantes pour l'ingénierie tissulaire osseuse. En effet, les nouvelles stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse, dites « développementale », consistent à implanter des CSM induites dans la voie chondrogénique pour reproduire les étapes de l'ossification endochondrale [271,272,562]. En plus de mimer la réparation osseuse naturelle de type endochondrale, l'intérêt de cette approche réside dans le potentiel des cellules implantées à (i) produire des facteurs pro-angiogéniques (ii) des BMP, et (iii) à survivre dans un environnement hypoxique [269]. Par ailleurs, afin d'apporter les nutriments et l'oxygène nécessaires à la survie cellulaire au sein du greffon, l'un des défis en ingénierie tissulaire osseuse est de stimuler la vascularisation de l'implant [563]. Pour cela la présence de progéniteurs endothéliaux est nécessaire [564]. La fraction stromale vasculaire (FSV) du tissu adipeux est également reconnue pour être une source de progéniteurs endothéliaux [565,566]. Ceci permet de considérer la FSV du tissu adipeux comme une source unique de cellules souches et de progéniteurs endothéliaux [241]. Pour ces raisons, l'utilisation de la FSV du tissu adipeux apparaît prometteuse [567,568].

L'ensemble de ces travaux ainsi que leurs perspectives s'appuient sur différentes données issues de la recherche fondamentale. Ainsi, l'identification et la caractérisation de niches cellulaires au sein desquelles les chondroprogéniteurs se développent, ainsi que la compréhension des voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie, le remodelage et la réparation du tissu cartilagineux sont clés pour continuer à développer et améliorer les stratégies régénératives du cartilage. A titre d'exemple, les travaux de Jonhson *et al* montrent qu'une protéine, la kartogenin, sécrétée par les chondrocytes, module la réponse des cellules endogènes en prévenant les effets catabolique des cytokines inflammatoires [447]. L'identification de cette protéine ouvre de nouvelles voies thérapeutiques notamment en médecine régénératrice ostéoarticulaire.

La poursuite de notre travail pourrait fournir d'importantes données sur les mécanismes moléculaires fondamentaux qui contrôlent la différenciation chondrogénique hypertrophique de cellules souches sous différents facteurs environnementaux. Notre travail pourrait être utile à la médecine régénérative du cartilage ainsi qu'à la compréhension de la physiopathogénie des maladies cartilagineuses dégénératives.

ARTICLE VI

Cellules souches et biomatériaux injectables pour la médecine régénératrice du cartilage : le consortium « chondrograft »

Sophie PORTRON, Christophe MERCERON, Nicolas MAILLARD, Pierre WEISS, Gael GRIMANDI, Claire VINATIER, Jérôme GUICHEUX, Olivier GAUTHIER

- INGÉNIERIE ET RECHERCHE BIOMÉDICALE - 2012



ELSEVIER
MASSON

Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

IRBM

IRBM 33 (2012) 92–97

Article original

Cellules souches et biomatériaux injectables pour la médecine régénératrice du cartilage : le consortium « chondrograft »

*Stem cells and injectable biomaterials for the regenerative medicine of cartilage:
The “chondrograft” consortium*

S. Portron^{a,b}, C. Merceron^{a,b}, N. Maillard^{a,b,c}, P. Weiss^{a,b}, G. Grimandi^{a,b,c}, C. Vinatier^{a,b},
J. Guicheux^{a,*}, O. Gauthier^{a,b,d}

^a Inserm (Institut national de la santé et de la recherche médicale), UMRS 791-LLOAD, laboratoire d'ingénierie ostéoarticulaire et dentaire, Group STEP « Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology », faculté de chirurgie dentaire, université de Nantes, 1, place Alexis-Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France

^b UFR odontologie, université de Nantes, 44042 Nantes, France

^c Pharmacie centrale, CHU de Nantes, 44093 Nantes, France

^d Unité de chirurgie-anesthésie ONIRIS, service de chirurgie expérimentale-CRIP, école nationale vétérinaire de Nantes Atlanpole-La Chantrerie (ONIRIS), BP 40706, 44307 Nantes cedex 3, France

Reçu le 14 décembre 2011 ; reçu sous la forme révisée le 9 janvier 2012 ; accepté le 12 janvier 2012

Disponible sur Internet le 23 février 2012

Résumé

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif non innervé, non vascularisé et faiblement cellularisé. Il peut être le siège de nombreuses altérations d'origine traumatologique ou liée au vieillissement. Ce tissu possède de faibles capacités de cicatrisation spontanée et l'établissement de ces altérations se manifeste aux stades terminaux par la perte du rôle fonctionnel des articulations. La dernière décennie a permis le développement de nouvelles technologies permettant de stimuler les capacités intrinsèques de réparation du cartilage. Malheureusement, l'ensemble de ces technologies n'a pas démontré de succès clinique satisfaisant. Dans ce contexte, la régénération du cartilage par ingénierie tissulaire est aujourd'hui considérée avec un intérêt croissant. En particulier, le transfert de cellules réparatrices autologues à l'aide de biomatériaux synthétiques apparaît prometteur. Nous avons ainsi développé et breveté un hydrogel biocompatible de cellulose silanisée autoréticulant pouvant être utilisé comme un vecteur injectable pour la médecine régénératrice. Ainsi, nos études portent sur l'association de cet hydrogel avec une source de cellules réparatrices, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) adultes dérivées du tissu adipeux. Dans un premier temps, nous avons déterminé les conditions de culture optimales nécessaires à l'orientation chondrogénique des cellules souches (morphogènes, hypoxie, trois dimensions...). L'intérêt préclinique de nos associations hybrides cellules et matériaux a ensuite été testé avec succès dans différents modèles animaux (souris, lapin). La médecine régénératrice et l'ingénierie tissulaire basées sur l'utilisation de cellules souches et d'hydrogel pourraient permettre d'ouvrir de nouvelles fenêtres thérapeutiques dans le traitement de ces atteintes dont le vieillissement de la population ne fait qu'accroître l'impact socioéconomique.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Articular cartilage is a non innervated, nonvascularized and poorly cellularized connective tissue that is frequently damaged as a result of trauma or age-linked degenerative diseases. It hardly heals spontaneously and its alterations often lead to further extracellular matrix degradation and ultimately, to the loss of joint function. Past decades, many therapeutic approaches have been developed to improve the poor intrinsic self-repair properties of cartilage. Unfortunately, these techniques have not proved really satisfying. In this context, the regeneration of a functional cartilage through tissue engineering and regenerative medicine has recently been contemplated. In particular, the transplantation of autologous reparative cells using a synthetic biomaterial appears promising. We have thus developed and patented a biocompatible self-setting cellulose hydrogel that can be used as an injectable scaffold for cell-based regenerative medicine. Our studies associate this hydrogel with adult mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, as a source of reparative cells for cartilage tissue engineering. In a first set of experiments, we have determined the

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : sophie.portron@univ-nantes.fr (S. Portron), christophe.merceron@univ-nantes.fr (C. Merceron), nicoluste@gmail.com (N. Maillard), pweiss@sante.univ-nantes.fr (P. Weiss), ggrimandi@chu-nantes.fr (G. Grimandi), claire.vinatier@univ-nantes.fr (C. Vinatier), jerome.guicheux@inserm.fr (J. Guicheux), olivier.gauthier@oniris-nantes.fr (O. Gauthier).

optimal culture conditions required to induce the controlled chondrogenic commitment of stem cells (morphogens, hypoxia, three-dimensional environments...). The preclinical potential of hybrid constructs associating cells and hydrogel has then been assessed with success in animals (mouse, rabbit). Today, trauma and degenerative pathologies of joint tissues remain a major challenge for clinicians and cartilage engineers. Establishing the proof of concept of hydrogel-associated stem cells-based regenerative medicine could help us open new therapeutic windows in the treatment of joint disorders.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

1.1. Contexte

L'ingénierie tissulaire est basée sur l'association des principes de l'ingénierie et de la biomédecine afin de produire un substitut tissulaire capable de restaurer, maintenir ou améliorer la fonction des tissus. Une des approches les plus prometteuses consiste à introduire directement des cellules au sein d'une structure tridimensionnelle synthétique pour proposer leur transfert sur le site de la lésion permettant ainsi une régénération du tissu endommagé.

De par sa constitution et ses caractéristiques, le cartilage articulaire est un des tissus où l'ingénierie tissulaire fait l'objet d'un développement extrêmement rapide et spectaculaire. En effet, le cartilage articulaire, tissu conjonctif de soutien non vascularisé et non innervé, peut être le siège de nombreuses altérations d'origine traumatique ou liées au vieillissement. L'établissement de ces atteintes cartilagineuses conduit à une dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), une perte du phénotype des chondrocytes et une diminution de la cellularité tissulaire. Ces affections peuvent finalement entraîner à plus ou moins long terme une atteinte fonctionnelle des articulations. Par ailleurs, l'absence de vascularisation du cartilage et de capacité de prolifération des chondrocytes articulaires confèrent à ce tissu de faibles capacités de réparation spontanée (pour revue voir [1]).

Dans ce contexte, l'obtention d'un cartilage fonctionnel par ingénierie tissulaire apparaît comme un enjeu majeur de la médecine régénératrice notamment pour la restauration de la fonctionnalité des articulations lésées. Notre programme de recherche s'attache à développer ce concept d'ingénierie tissulaire du cartilage basé sur l'utilisation de cellules autologues et de biomatériaux.

1.2. État de l'art

La première thérapie cellulaire de défauts cartilagineux articulaires a été proposée par Brittberg et al. en 1994 et reposait sur la transplantation de chondrocytes autologues [2]. Celle-ci se déroule en trois temps, tout d'abord un fragment de cartilage est prélevé dans une zone non portante de l'articulation 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. Les résultats ont cependant montré une réparation du défaut cartilagineux par un tissu de type essentiellement fibrocartilagineux et ne présentant pas les propriétés biomécaniques du tissu sain [3].

Suite aux travaux de Brittberg, les recherches se sont orientées vers deux stratégies. La première stratégie s'est tournée vers

le développement de biomatériaux qui permettraient la culture en trois dimensions de chondrocytes puis leur réimplantation. En effet, les chondrocytes se différencient très rapidement dans des conditions de culture monocouche alors qu'ils maintiennent leur phénotype chondrocytaire lors d'une culture tridimensionnelle. Ainsi, plusieurs matrices tridimensionnelles d'origine végétale ou animale ont été développées comme les éponges de collagène, la fibrine, l'acide hyaluronique ou l'alginate [4]. Le risque de transmission virale associé à l'utilisation de ces matériaux biologiques et les réactions inflammatoires observées lors des expérimentations précliniques ont dirigé les recherches actuelles vers le développement de biomatériaux totalement synthétiques. Des polymères tels que l'acide polylactique, l'acide polyglycolique, 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 de cellules mésenchymateuses. Parmi ces polymères synthétiques, certains ont entraîné des réactions immunitaires ou une inflammation après leur implantation en site cartilagineux. Dans ce contexte, notre laboratoire s'est intéressé à l'utilisation des dérivés celluloseux, dont les propriétés de biocompatibilité sont connues depuis de nombreuses années. Lapkowski et al. ont ainsi mis au point un hydrogel réticulable constitué d'une solution aqueuse d'hydroxypropyl méthyl cellulose (HPMC) sur laquelle sont greffés des groupements silanes qui permettent la formation de liaisons covalentes entre les chaînes d'HPMC. Les premiers essais de synthèse de ce polymère ont permis l'obtention d'un hydrogel (Si-HPMC) dont les paramètres physico-chimiques (injectabilité, résistance mécanique) ont été caractérisés [5]. Des études de cytotoxicité de l'hydrogel et de viabilité cellulaire ont ensuite été menées. Les résultats obtenus indiquent que cet hydrogel ne présente pas de cytotoxicité et permet le développement et le maintien du phénotype de chondrocytes [6]. Dans ce cadre, un brevet a été déposé par l'Inserm [7] pour protéger l'utilisation de ce polymère en tant que vecteur de chondrocytes pour la réparation du cartilage.

Parallèlement au développement de nouveaux biomatériaux, nous nous sommes également intéressés aux sources possibles de cellules pour la médecine régénératrice du cartilage, comme les chondrocytes nasaux. En effet, les travaux de Brittberg utilisaient des chondrocytes autologues prélevés sur une zone non portante du cartilage articulaire. Ce type de prélèvement présente de nombreux désavantages. Tout d'abord, il nécessite de réaliser sur le futur receveur une intervention chirurgicale supplémentaire. De plus, le prélèvement de cellules au niveau du cartilage articulaire (genou en particulier) est associé à une morbidité du site donneur et la cellularité du tissu prélevé ne permet pas l'isolement de quantité importante de cellules. Les chondrocytes issus de cartilage nasal humain possèdent des propriétés de

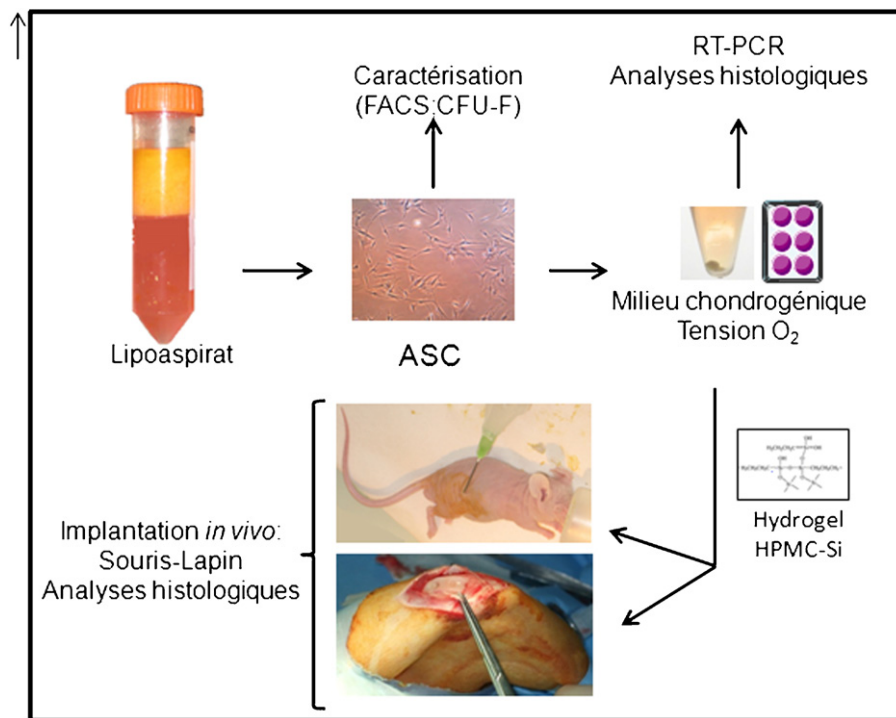


Fig. 1. Cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux (ASC) : isolement, caractérisation, différenciation et potentiel régénératif en association avec l'hydrogel Si-HPMC.

prolifération supérieures à celles des chondrocytes issus de cartilage articulaire. De plus et contrairement au cartilage articulaire, le cartilage nasal permet l'obtention de nombreuses cellules. Dans ce contexte, nous avons réalisé des implantations de composites associant l'hydrogel Si-HPMC à des chondrocytes nasaux humains en site sous-cutané chez la souris *nude*. Nos résultats ont clairement démontré la formation d'un tissu cartilagineux [8]. Au vue de ces résultats, nous avons développé chez le modèle du lapin de transplantation de chondrocytes nasaux autologues associés à l'hydrogel Si-HPMC pour la réparation de défaut cartilagineux articulaire. Les résultats ont montré le comblement des lésions articulaires par un tissu cartilagineux de nature hyaline.

2. Objectifs

Aujourd'hui, face aux limites du prélèvement de chondrocytes autologues humains (faible quantité disponible, morbidité du site donneur, stabilité du phénotype...) qu'ils soient d'origine articulaire ou nasale et dans l'objectif d'une transposition de notre concept à la clinique humaine, nous avons souhaité poursuivre nos études en recherchant des sources alternatives de cellules chondrogéniques. La découverte des nombreuses potentialités des cellules souches mésenchymateuses (CSM) adultes a permis d'ouvrir de nouvelles voies de recherche en médecine régénératrice, et c'est donc vers l'utilisation de ces cellules et d'hydrogels que le consortium « chondrograft » a orienté ses recherches (Fig. 1). Les objectifs de nos travaux se sont principalement articulés autour de deux grands axes :

- isolement, caractérisation et contrôle de la différenciation chondrogénique des CSM du tissu adipeux (ASC) ;
- association ASC et hydrogels : évaluation du potentiel régénératif in vivo.

3. Résultats

3.1. Isolement, caractérisation et contrôle de la différenciation chondrogénique des tissus adipeux (ASC)

De nombreux travaux concernant les CSM adultes humaines ont montré leur capacité à se différencier in vitro en adipocytes, ostéoblastes, myoblastes et de façon intéressante, en chondrocytes. Initialement isolées de la moelle osseuse, les CSM sont aujourd'hui décrites dans la plupart des tissus adultes. Parmi les tissus contenant des CSM facilement isolables, nous avons montré que les cellules isolées de la fraction stromale du tissu adipeux possédaient la capacité à se différencier en chondrocytes [9]. Le tissu adipeux adulte pourrait donc représenter une source alternative de cellules chondrogéniques dont les potentialités pourraient s'avérer pertinentes pour le développement du concept d'ingénierie tissulaire du cartilage [10]. Ainsi, nous avons développé dans un premier temps un protocole d'isolement, de culture et de différenciation des ASC vers un phénotype chondrocytaire en utilisant des techniques de culture cellulaire en 3D et un milieu spécifique d'induction contenant notamment du TGF- β 1 et de l'insuline. Parallèlement, le cartilage articulaire n'étant pas vascularisé il y règne une tension en oxygène qui varie entre 2 et 7 %. Nous avons donc

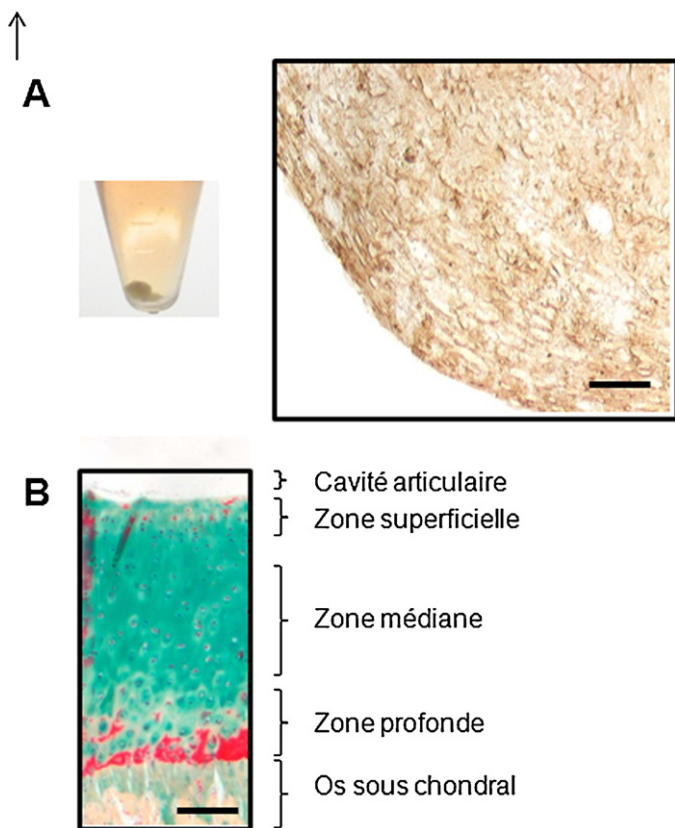


Fig. 2. a : différenciation chondrogénique des tissus adipeux (ASC). Immunomarcage pour le collagène de type II (ASC humaine, 28 jours, 3D, milieu chondrogénique, 5 % O₂) Bar: 100 µm ; b : tissu cartilagineux de réparation formé après implantation d'ASC par l'hydrogel Si-HPMC dans un défaut articulaire de lapin. Coloration au pentachrome de Movat. (ASC de lapin, 28 jours, 3D, milieu chondrogénique, 21 %O₂) Bar :50 µm.

formulé l'hypothèse que la tension en oxygène pourrait être un régulateur clé de l'engagement des ASC dans la différenciation chondrogénique. De façon intéressante, nos données ont étayé cette hypothèse (Fig. 2a). La différenciation chondrogénique des ASC est en effet potentialisée en présence de faible tension en oxygène alors que la différenciation ostéogénique de ces mêmes cellules est inhibée [11]. Cependant, l'un des défis majeurs de l'ingénierie tissulaire du cartilage utilisant des CSM est certes de stimuler l'engagement des CSM dans la voie de différenciation chondrogénique, mais également de prévenir leur différenciation terminale hypertrophique. Cette différenciation terminale pourrait en effet conduire à une minéralisation de la MEC comme observée dans les processus arthrosiques ou de calcification du cartilage des plaques de croissance. Afin de contrôler de manière précise cette différenciation, nous avons poursuivi nos études sur les effets de l'hypoxie en proposant notamment qu'en plus d'être un facteur d'engagement, l'hypoxie pourrait être un facteur inhibiteur de la différenciation terminale hypertrophique des chondrocytes. Nos résultats récents ont ainsi confirmé cette seconde hypothèse, faisant de la tension en oxygène un facteur permettant non seulement l'engagement des ASC dans la différenciation chondrogénique mais aussi inhibant la différenciation terminale chondrogénique de ces cellules [9]. Parallèlement aux effets de

la tension en oxygène et toujours dans le but d'optimiser la différenciation chondrogénique des ASC, nous avons recherché des actifs innovants qui pouvaient stimuler cette différenciation. Partant du constat que les glycosaminoglycanes (GAG) de la MEC du cartilage peuvent interagir avec de nombreux facteurs de croissance pour potentialiser leurs effets biologiques, nous avons souhaité tester les effets chondrogéniques de GAG mimétiques d'origine marine. Nos données ont clairement démontré que le GAG mimétique GY785 DRS pouvait interagir physiquement avec le TGF-β1 et ainsi stimuler de façon majeure la différenciation chondrogénique des ASC in vitro [12]. Ces données font du GY785 DRS un additif chondrogénique prometteur pour des applications en médecine régénératrice du cartilage et ainsi a fait l'objet d'un dépôt de brevet [13]. Afin de déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels la dimension (2D et 3D), la tension en oxygène et le milieu de culture peuvent exercer leurs effets sur la différenciation chondrogénique in vitro des ASC, nous réalisons actuellement des études transcriptomiques (par puces à ADN) et moléculaires (identification des facteurs de transcription).

L'ensemble de nos données indique donc que les CSM du tissu adipeux humain sont des candidates prometteuses pour la médecine régénératrice du cartilage articulaire.

3.2. Capacité régénératrice de l'association tissu adipeux (ASC) et biomatériaux

Après avoir largement documenté la possibilité d'utiliser l'hydrogel Si-HPMC pour transplanter des chondrocytes autologues, nous avons souhaité utiliser cet hydrogel pour transplanter des ASC in vivo dans différents modèles de régénération cartilagineuse.

3.2.1. Souris

Dans un premier temps et afin de conforter nos données in vitro sur l'engagement chondrogénique des ASC en réponse à la tension en oxygène, nous avons analysé la capacité de systèmes hybrides associant des ASC et notre hydrogel Si-HPMC à former un tissu cartilagineux in vivo. Les différentes conditions de culture comme décrites ci-dessus (milieux inductif, tension en oxygène variable...), ont donc été testées dans un modèle in vivo d'ingénierie tissulaire du cartilage : le modèle de la poche sous-cutanée chez la souris *nude* [8]. Nos résultats ont montré que les ASC humaines, cultivées in vitro en présence de milieu chondrogénique en 2D ou 3D sont capables de former un tissu cartilagineux in vivo en site sous-cutané après cinq semaines d'implantation au sein de l'hydrogel Si-HPMC [14]. Les effets du préconditionnement in vitro des ASC par une faible tension en oxygène (5 %O₂) sur leur potentiel chondrogénique in vivo sont en cours d'évaluation. L'évaluation des propriétés mécaniques de ce tissu par des analyses rhéologiques a révélé que la production d'une MEC par les cellules chondrogéniques modifiait les résistances mécaniques des constructions hybrides.

3.2.2. Lapin

L'efficacité de nos associations ASC autologues et hydrogel Si-HPMC à réparer des lésions cartilagineuses articulaires

chez le lapin a ensuite été testée. Nos données préliminaires et à court terme (six semaines) montrent que les ASC peuvent être utilisées pour ces approches thérapeutiques en association avec l'hydrogel Si-HPMC. Une analyse à plus long terme (18 semaines) visant à comparer les effets d'un préconditionnement hypoxique sont en cours d'analyse (Fig. 2b). Afin de réaliser un suivi longitudinal et obtenir une mesure quantitative de la formation cartilagineuse *in vivo*, nous avons validé la possibilité d'utiliser la scintigraphie à l'aide d'un radiotracer spécifique des GAG de la MEC [15]. Parallèlement, des études visant à déterminer le devenir *in vivo* de l'hydrogel d'Si-HPMC ont été réalisées en utilisant un Si-HPMC marqué au ruthénium. L'analyse des données par rayonnement synchrotron à l'ESRF a révélé que Si-HPMC était dégradable *in vivo* [16].

4. Conclusions

Les traumatismes et la dégénérescence des tissus cartilagineux articulaires mais aussi des disques intervertébraux affectent une part croissante de la population. Ces pathologies induisent à l'échelle individuelle de fortes incapacités physiques et génèrent des coûts de prise en charge considérables pour l'économie de la santé. Le cartilage, de par ses caractéristiques physiologiques intrinsèques ne possède pas, contrairement au tissu osseux, de capacité spontanée de cicatrisation. Les lésions de ce tissu sont donc irréversibles et tendent à s'aggraver avec le temps. Dans ce contexte, nous avons conçu et breveté une approche thérapeutique originale consistant à réparer le cartilage par chirurgie mini-invasive en injectant des cellules souches autologues sur le siège des lésions à l'aide d'un matériau autoréticulant.

Notre concept hybride associant un polymère de cellulose à des cellules autologues est, à notre connaissance, le premier système à combiner les avantages suivants :

- utilisation d'une source alternative de cellules réparatrices (cellules souches dérivées du tissu adipeux) évitant ainsi une morbidité du site donneur et permettant l'obtention de grandes quantités de cellules ;
- utilisation d'un polymère synthétique limitant les risques de contamination ou de rejet ;
- utilisation d'un hydrogel injectable et autoréticulant (sans adjonction de composés chimiques) permettant un recours aux techniques de chirurgie mini-invasive sous arthroscopie.

Nous espérons que ce type de matériaux hybrides permettra de réels progrès dans la prise en charge et le traitement des atteintes ostéoarticulaires. Nous pouvons raisonnablement espérer que l'ensemble de nos données précliniques nous permettra de développer des essais cliniques chez l'homme. Nous pensons également que, indépendamment des résultats cliniques, notre programme fournira d'importantes données sur les mécanismes fondamentaux qui régissent la différenciation chondrocytaire. Ces données seront utiles à l'ingénierie du cartilage mais aussi à la compréhension des maladies cartilagineuses dégénératives comme l'arthrose ou la dégénérescence discale.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Les auteurs remercient leurs sources de financement : l'ANR TecSan « chondrograft », l'ANR Jeunes chercheurs « Scartifold », la fondation Arthritis Courtin, la Société française de rhumatologie, la Fondation de l'avenir pour la recherche médicale appliquée, l'Agence de la biomédecine, la région des pays de la Loire-Bioretos I et II, l'Inserm, l'université de Nantes et Graftys SA.

Les membres du consortium « chondrograft » ainsi que l'ensemble des personnes ayant contribué de près ou de loin à ces travaux sont également remerciés.

Références

- [1] Clouet J, Vinatier C, Merceron C, Pot-vauzel M, Maugars Y, Weiss P, et al. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug Discov Today* 2009;14:913–25.
- [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;331:889–95.
- [3] Merceron C, Vinatier C, Clouet J, Collic-Jouault S, Weiss P, Guicheux J. Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering. *Joint Bone Spine* 2008;75:672–4.
- [4] Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noel D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol* 2009;27:307–14.
- [5] 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;99:215–28.
- [6] 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;26:6643–51.
- [7] Guicheux J, Vinatier C, Grimandi G, Daculsi G, Weiss P. Utilisation d'un hydrogel pour la culture de chondrocytes. Patent: WO2005044326, 2005.
- [8] 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;80:66–74.
- [9] Merceron C, Portron S, Masson M, Fellah BH, Gauthier O, Lesoeur J, et al. Cartilage tissue engineering: from hydrogel to mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng* 2010;20:159–66.
- [10] Magne D, Vinatier C, Julien M, Weiss P, Guicheux J. Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. *Trends Mol Med* 2005;11:519–26.
- [11] Merceron C, Vinatier C, Portron S, Masson M, Amiaud J, Guigand L, et al. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;298:C355–64.
- [12] Merceron C, Portron S, Vignes-Colombeix C, Rederstorff E, Masson M, Lesoeur J, Sourice S, et al. Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically over-sulphated polysaccharide of marine origin: potential application to cartilage regenerative medicine. *Stem Cells* 2011; doi: 10.1002/stem.1686, Epub ahead of print.
- [13] Merceron C, Rederstorff E, Collic-Jouault S, Weiss P, Guicheux J. Chondrogenic differentiation media and methods for inducing chondrogenic differentiation of cells. Patent: EP 11305306.0, 2011.

- [14] Merceron C, Portron S, Masson M, Lesoeur J, Grybek V, Fellah B, et al. Chondrogenic potential of differentially cultured human adiposed-derived stem cells after in vivo transplantation with a cellulose hydrogel. Cell transplantation 2011; Epub ahead of print.
- [15] Miot-Noirault E, Guicheux J, Vidal A, Gauthier O, Auzeloux P, Lesoeur J, et al. In vivo experimental imaging of osteochondral defect and healing using 99Tc-NTP 15-5 radiotracer. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2011; In press.
- [16] Laib S, Fellah BH, Fatimi A, Quillard S, Vinatier C, Gauthier O, et al. The in vivo degradation of a ruthenium labelled polysaccharide-based hydrogel for bone tissue engineering. Biomaterials 2009;30: 1568–77.

ANNEXE

ARTICLE VII

Cartilage tissue engineering: From hydrogel to mesenchymal stem cells

Christophe MERCERON, Sophie PORTRON, Martial MASSON, Borhane Hakim FELLAH, Olivier GAUTHIER, Julie LESOEUR, Yan CHEREL, Pierre WEISS, Jérôme GUICHEUX and Claire VINATIER

- BIO-MEDICAL MATERIALS AND ENGINEERING - 2010

Cartilage tissue engineering: From hydrogel to mesenchymal stem cells

C. Merceron^a, S. Portron^a, M. Masson^a, B.H. Fellah^{a,b,c}, O. Gauthier^{a,b}, J. Lesoeur^a, Y. Chérel^d, P. Weiss^a, J. Guicheux^{a,*} and C. Vinatier^{a,c}

^aINSERM U791, LIOAD, Group “STEP”, Nantes University, Nantes, France

^bNational Veterinary School, CRIP – Experimental Surgery Department, Nantes, France

^cGraftys SA, Aix en Provence, France

^dINRA UMR703, National Veterinary School, Nantes, France

Abstract. Articular cartilage does not repair itself spontaneously. To promote its repair, the transfer of stem cells from adipose tissue (ATSC) using an injectable self-setting cellulosic-hydrogel (Si-HPMC) appears promising. In this context, the objective of this work was to investigate the influence of *in vitro* chondrogenic differentiation of ATSC on the *in vivo* cartilage formation when combined with Si-HPMC. In a first set of experiments, we characterized ATSC for their ability to proliferate, self renew and express typical mesenchymal stem cell surface markers. Then, the potential of ATSC to differentiate towards the chondrogenic lineage and the optimal culture conditions to drive this differentiation were evaluated. Real-time RT-PCR and histological analysis for sulphated glycosaminoglycans and type II collagen revealed that 3-dimensional culture and hypoxic condition favored ATSC chondrogenesis regarding mRNA expression level and the corresponding proteins production. In order to assess the phenotypic stability of chondrogenically-differentiated ATSC, real-time RT-PCR for specific terminal chondrogenic markers and alkaline phosphatase activity assay were performed. In addition to promote chondrogenesis, our culture conditions seem to prevent the terminal differentiation of ATSC. Histological examination of ATSC/Si-HPMC implants suggested that the *in vitro* chondrogenic pre-commitment of ATSC in monolayer is sufficient to obtain cartilaginous tissue *in vivo*.

Keywords: Articular cartilage, tissue engineering, human mesenchymal stem cells, hydrogel, hypoxia

1. Introduction

Articular cartilage (AC) is frequently damaged as a result of ageing, trauma and degenerative diseases. AC hardly heals and its alteration often leads to further extracellular matrix degradation and ultimately, to the loss of joint function. These osteoarticular damages affect a large number of the world's population and are therefore a public health concern, which also worsen with the ageing of the population particularly in developed countries.

Over the past decade, many therapeutic approaches have been developed to improve the poor intrinsic self-repair capacity of cartilage. Unfortunately, these techniques have not proved satisfactory effectiveness. In this context, the regeneration of a functional cartilaginous tissue through cell therapy and tissue engineering has recently been contemplated [1,2]. In particular, the transfer of autologous reparative cells using a synthetic biomaterial appears promising. Our laboratory has thus developed a self-setting

*Address for correspondence: Jérôme Guicheux, INSERM U791, Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire (LIOAD), Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France. Tel.: +33 240412919; Fax: +33 240083712; E-mail: jerome.guicheux@inserm.fr.

cellulose-based hydrogel (Si-HPMC) that can be used as an injectable scaffold for cell therapy of cartilage [3,4]. To overcome the limits related to the harvest of articular chondrocytes in adult (morbidity, low amount) we sought to determine whether adult mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (ATSC) could represent an alternative source of autologous reparative cells [5]. Our global objective is therefore to propose a novel clinically relevant concept of biomaterial-assisted cell therapy for damaged cartilaginous tissues.

One of the major challenges in using ATSC for cartilage tissue engineering is to maintain the chondrogenic cells in a prehypertrophic state thereby preventing them from undergoing terminal differentiation as seen in endochondral ossification. AC is an avascularized tissue, in which cells experience hypoxia. In AC, oxygen tension indeed ranges from 2.5% to 7.5%. Interestingly, oxygen tension has been recently suggested as a negative regulatory factor of the chondrocyte terminal differentiation [6]. In this context, it seems reasonable to speculate that oxygen tension may be a relevant factor not only able to promote the early chondrogenic differentiation of ATSC but also to concomitantly prevent their terminal hypertrophic differentiation.

Our study was organized in an *in vitro* set of experiments followed by *in vivo* experiments. *In vitro*, we first aimed at characterizing ATSC obtained from human lipoaspirates for their ability to proliferate and self-renew in culture and for their expression of typical surface markers [7]. After having developed culture conditions allowing the differentiation of human ATSC using a three dimensional culture system in the presence of chondrogenic medium under hypoxia (5% O₂), we focused our attention on the effects of oxygen tension not only on the commitment of ATSC towards the chondrogenic lineage, but also on the terminal differentiation of ATSC characterized by the expression of type X collagen, MMP 13, ALP, CST5, MEF2C, OPN, . . . , [8]. To decipher the effects of hypoxia on this terminal differentiation of ATSC, phenotypic analysis of differentiated cells has been performed by real-time PCR using Taqman Low Density Array (TLDA) and at the level of alkaline phosphatase (ALP) activity. *In vivo*, we were finally interested in deciphering whether tissue formed by ATSC transplanted with our hydrogel exhibits a cartilaginous matrix in subcutaneous pockets in nude mice.

2. Materials and methods

2.1. Flow cytometry

hATSC were characterized by flow cytometry using anti-human CD 29 and CD 105 FITC-conjugated antibodies and anti-human CD 44, CD 90, CD 34 and CD 45 PE-conjugated antibodies (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA). The adherent hATSC were detached using trypsin/EDTA, centrifuged for 1 min at 1200g, and resuspended in PBS/BSA (1%)/sodium azide (5%). Aliquots containing 2×10^5 hATSC were incubated with primary antibodies for 15 min at 4°C. The suspended hATSC were washed and then analyzed using a FACSCalibur fluorescence-activated cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA). Results were expressed as the percentage of positive cells by comparison with the isotype-matched negative control antibodies on histogram plots.

2.2. Chondrogenic differentiation

For *in vitro* chondrogenic differentiation, hATSC at passage 2 were placed into polypropylene tube containing 1 ml of control medium and were then centrifuged. The tubes were fitted with vented caps to permit gas exchange, and the cell pellets were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing

5% CO₂ and 95% air. After 24 h, pellets of hATSC were divided into 2 experimental groups and cultured either in the presence of control (CT) or chondrogenic (CH) medium. The chondrogenic medium was composed of serum-free DMEM supplemented with 6.25 µg/ml insulin, 6.25 µg/ml transferrin, 6.25 ng/ml sodium selenite (ITS), 50 nM sodium L-ascorbate, 10⁻⁸ M dexamethasone and 10 ng/ml TGF-β1. Culture media were changed every 2–3 days for 28 days [9].

2.3. Real-time polymerisation chain reaction

For real-time PCR analysis, total RNA was extracted using the RNeasy micro-kit in accordance with the manufacturer's instructions. After DNase digestion, RNA was quantified using a UV-spectrophotometer (Nanodrop ND-1000, Labtech, Palaiseau, France) and quality was determined with the Agilent Bioanalyser 2100 system. RNA were reverse transcribed using the superscript III kit. Complementary DNA (cDNA) were amplified with the Brilliant® SYBR® Green Master Mix. The real-time polymerase chain reaction was carried out in a MX3000P® real-time PCR system (Stratagene). Cycle thresholds were normalized to β-actin to control for cDNA quantification differences. Results were reported as relative expression levels.

2.4. Glycosaminoglycan production

The production of sulphated glycosaminoglycans (GAGs) was investigated on pellets by alcian blue staining. Pellets were washed with ice-cold PBS and fixed for 20 min in 100% ethanol. Pellets were then stained at room temperature with 0.1% alcian blue solution in 0.1 M HCl. After overnight incubation, the solution was discarded and the pellets rinsed with 0.1 M HCl to eliminate non-specific staining. Photographs were obtained using a stereo microscope.

2.5. Immunohistochemistry

Pellets were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections (5 µm thick) were mounted on pre-treated slides, deparaffinized, rehydrated and rinsed in distilled water. Sections were incubated for 10 min with newly diluted 3% H₂O₂ solution to inactivate internal peroxidases, followed by trypsin digestion for 10 min. After digestion, slides were incubated for 20 min with 2% diluted goat serum for blocking. Slides were then immunoblotted with the primary monoclonal mouse antibody against human type II collagen for 1 h at room temperature. Incubation with biotin-labeled anti-mouse antibody for 30 min was followed by 30 min of incubation with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin. Antibody binding was visualized using diaminobenzidine (DAB).

2.6. Implantation

To investigate whether constructs associating Si-HPMC and hATSC enable the formation of a cartilaginous tissue *in vivo*, we performed implantation of constructs in subcutaneous pockets of 1-month-old nude mice (swiss nude mice, Charles River, L'Arbresle, France). Firstly, hATSC were cultured in monolayer or in pellets and in the presence of control or chondrogenic medium during 3 weeks. Then 5 × 10⁵ hATSC were gently mixed with 250 µl of Si-HPMC hydrogel and implanted subcutaneously in nude mice. Secondly, freshly isolated horse nasal chondrocytes (5 × 10⁵) were associated to 250 µl of Si-HPMC and injected subcutaneously to serve as positive control. Si-HPMC alone was also implanted and

used as 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.

3. Results

3.1. *In vitro* chondrogenic differentiation of ATSC

3.1.1. ATSC characterization

One of the most typical features of stem cells is their ability to proliferate in culture and to ensure their self-renewal. In addition, a set of surface markers has been described as characteristic of MSC (CD 29, 44, 90, 105 positive and CD 34 and 45 negative) [10]. Our first objective was to isolate and characterize MSC from human adipose tissue. ATSC have been isolated from lipoaspirates by enzymatic treatment and selected after adhesion prior characterization for their ability to proliferate, self-renew and to express typical stem cells surface markers by flow cytometry at different culture passages. Our data have demonstrated that ATSC in an undifferentiated state are able to proliferate (from P0 to P3) and to self-renew in a proportion of $1.13\% \pm 0.13\%$ in accordance with data from the literature [11]. ATSC also expressed typical MSC surface markers CD 29, 44, 90, 105 and are negative for CD 34 and 45 (Fig. 1). These observations clearly indicate that we are able to isolate a cell population exhibiting adult stem cell characteristics from human lipoaspirates.

3.1.2. ATSC chondrogenic differentiation

Given that cartilage is not vascularized, oxygen tension has been suggested as a regulatory factor for chondrogenic differentiation. Our work therefore aimed at determining whether hypoxia could affect the chondrogenic potential of ATSC. ATSC were cultured in chondrogenic medium or control medium for 30 days respectively in 3D (pellets) or monolayer, and under low (5%) or normal (21%) oxygen tension. Cell differentiation was monitored at the level of mRNA by real-time PCR (type II collagen and

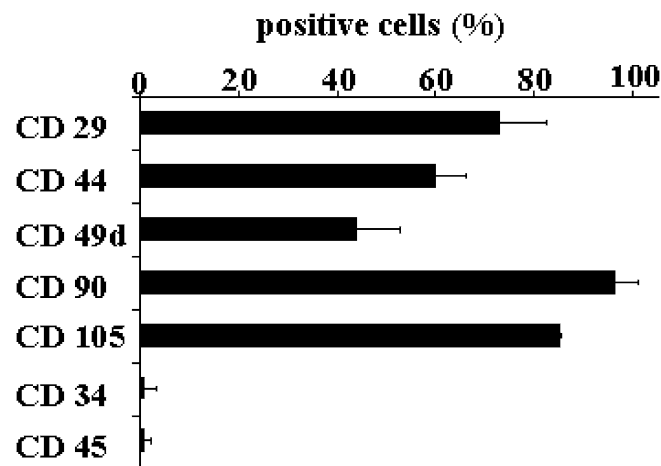


Fig. 1. Cytometric characterization of ATSC (passage 2). ATSC (5000 cells/cm^2) were cultured in monolayer, in control medium and under normoxic condition until confluence. Cells were trypsinized and cytometric analysis was performed using specific antibodies directed against CD 29, 44, 90, 105, 34 and 45. 10,000 events were scored. Results are expressed as the percentage of positive cells in the whole population. A representative experiment is shown.

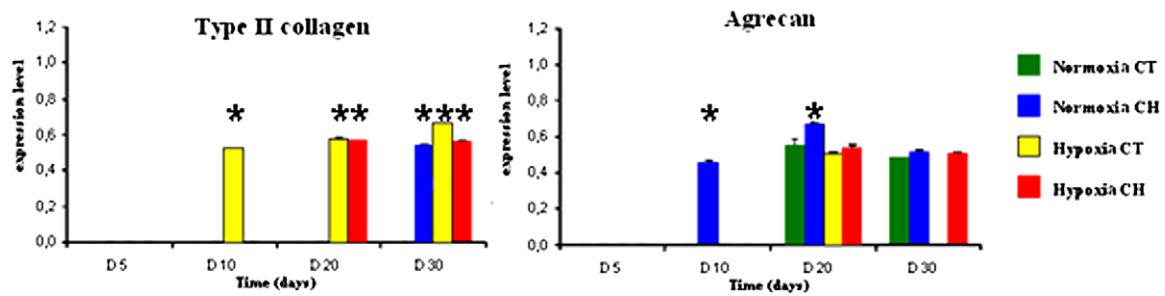


Fig. 2. Effects of culture medium and oxygen tension on the expression levels of type II collagen and aggrecan in ATSC cultured in pellets for 5, 10, 20 and 30 days in the presence of chondrogenic medium (CH) or control medium (CT) and in normoxia (20% O₂) or hypoxia (5% O₂). RNAs were analysed by real-time PCR. Results are expressed as relative expression level. * $p < 0.05$ compared to the respective control. (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-2010-0627>.)

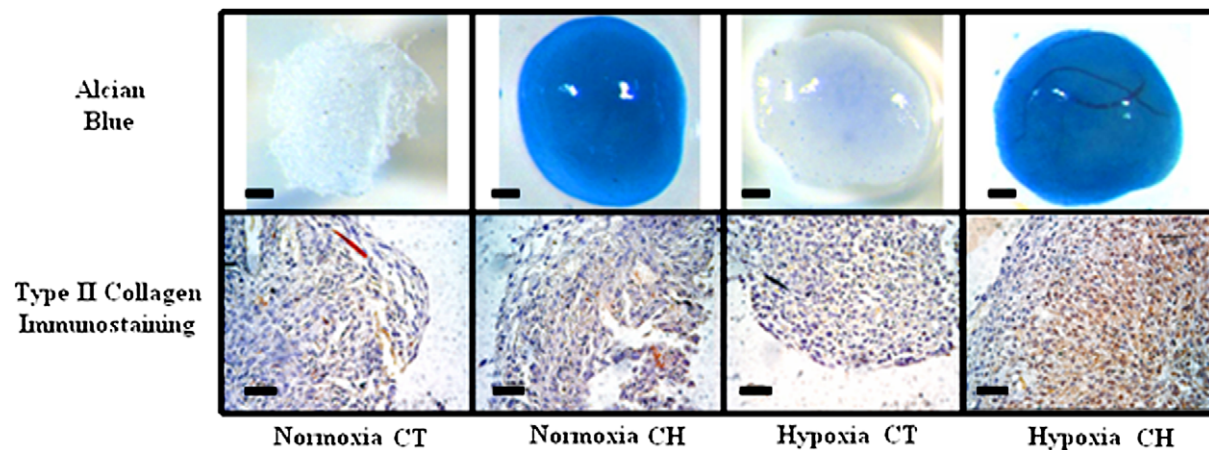


Fig. 3. Gross appearance (upper panel) and histological sections (lower panel) of ATSC pellets after 30 days in culture in the presence of variable oxygen tensions and of control (CT) or chondrogenic medium (CH). Glycosaminoglycans were revealed by Alcian Blue staining and type II collagen by immunohistological detection using a specific antibody. Upper panel, bar: 200 µm; lower panel, bar: 40 µm. (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-2010-0627>.)

aggrecan). The chondrogenic differentiation was further evaluated by alcian blue and immunohistological staining for the detection of sulphated glycosaminoglycans (GAG) and type II collagen respectively. Real-time PCR analysis indicated that type II collagen expression was markedly induced by hypoxia in both media, whereas aggrecan expression was induced by the presence of chondrogenic medium whatever the oxygen tension (Fig. 2). The presence of both GAG and type II collagen (Fig. 3) in the matrix was detected only when ATSC were exposed to chondrogenic medium and hypoxic condition. Our results highlight the major role of hypoxia and 3D environment in accelerating the chondrogenic differentiation of ATSC and the state of maturation of the extracellular matrix [7].

3.1.3. ATSC terminal differentiation

A critical point in biomaterial-assisted MSC therapy of cartilage is to maintain differentiated MSC in a prehypertrophic and stable state of differentiation. The major drawbacks during *in vitro* chondrogenesis is that MSC naturally tend to undergo a terminal differentiation process similar to that observed in endochondral ossification mechanism. Once implanted in damaged cartilage, these cells will lead to

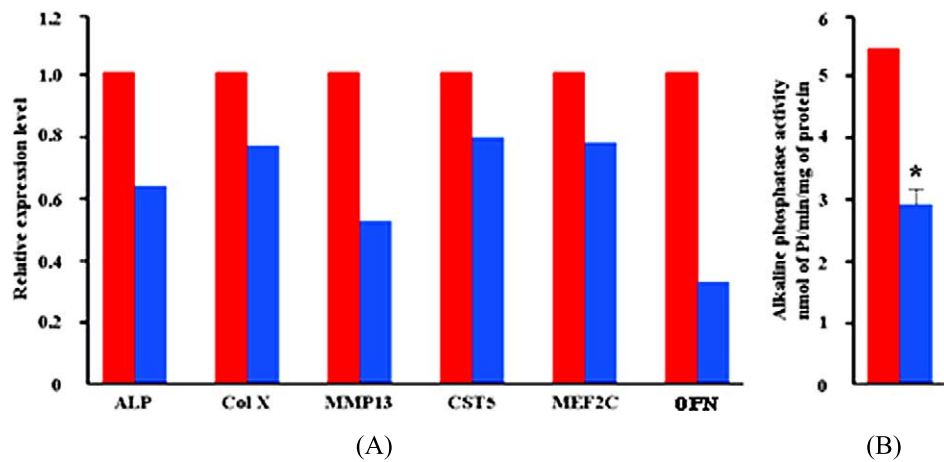


Fig. 4. Effects of oxygen tension on ATSC terminal differentiation. ATSC have been cultured in pellets for 28 days in normoxic or hypoxic condition in the presence of chondrogenic medium. (A) Expression levels of hypertrophic markers were evaluated by TLDA. (B) ALP activity was measured and corrected by the total amount of protein. (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-2010-0627>.)

the formation of a vascularized and calcified tissue [8] which is not compatible with the functional and mechanical properties of healthy cartilage. To overcome this hurdle, hypoxia has been recently suggested as a powerful inhibitor of terminal differentiation [6]. Differentiated ATSC under normoxic or hypoxic conditions have been analysed for their hypertrophic phenotype by real-time PCR (TLDA). Results evidenced that hypoxia reduces the expression level of the major hypertrophic markers (Fig. 4A) and significantly decreases the ALP activity of differentiated ATSC (Fig. 4B).

3.1.4. Nude mice implantation

To address whether human ATSC may be able to give rise to cartilage *in vivo*, ATSC/Si-HPMC associations were injected in subcutaneous pockets in nude mice as described [12]. Human ATSC have been isolated, amplified and differentiated in 2D or 3D, under normal (21% O₂) or hypoxic (5% O₂) condition, in control or chondrogenic medium during 21 days. Horse nasal chondrocytes (HNC) have been used as positive control. Cartilage neoformation has been assessed after a 5 weeks implantation period by histological scoring of the samples after alcian blue staining and type II collagen immunostaining (Fig. 5A). Histological analysis of the subcutaneous samples revealed that chondrogenically-differentiated ATSC grown in 2D and under hypoxia have the most prominent ability to form a cartilaginous tissue (Fig. 5B). To validate our concept, a preclinical study will be performed in critical size articular defects in rabbits.

4. Conclusion

We have demonstrated that human lipoaspirates contain a cell population exhibiting MSC features as evidenced by their ability to proliferate and self-renew in culture, by their expression of typical MSC surface markers (CD 29, 44, 90, 105, 34 and 45) and by their multipotency (data not shown, see [7]). We have also defined optimal culture conditions allowing the chondrogenic differentiation of ATSC using a pellet culture system in the presence of chondrogenic culture medium and under hypoxia (5% O₂). Such culture conditions favored type II collagen and aggrecan mRNA expression as well as the synthesis of the corresponding proteins within the extracellular matrix of pellets. We have also evidenced the

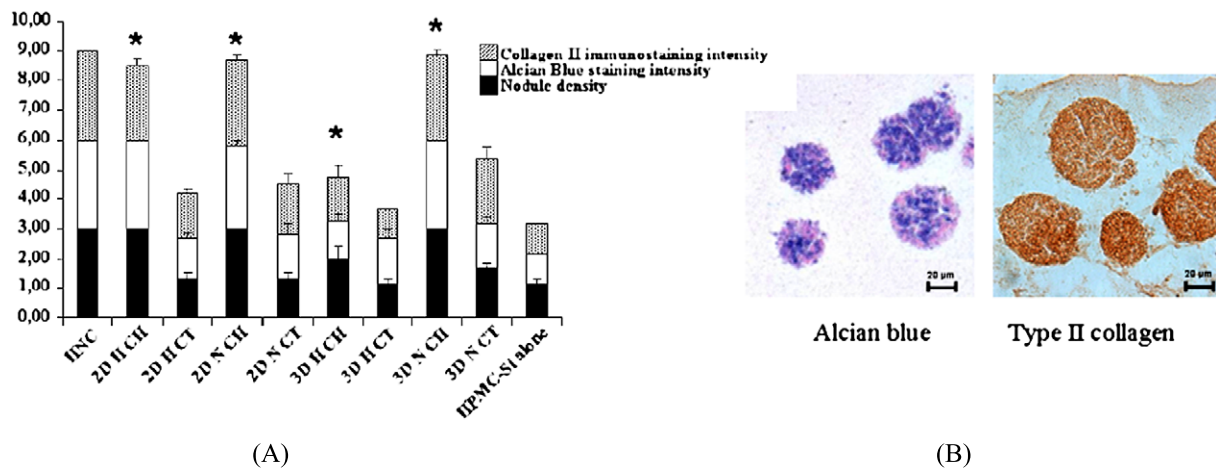


Fig. 5. Histological analysis of the samples after alcian blue and type II collagen immunostaining staining. (A) Histogram representative of staining intensity and nodule density. Score ranging from 1 to 3 were attributed blindly for each parameter. (B) Cartilaginous nodules formed by ATSC implanted subcutaneously with Si-HPMC hydrogel for 5 weeks in nude mice. Bar: 20 µm. * $p < 0.05$ compared to the control medium with similar oxygen and dimension conditions. (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-2010-0627>.)

inhibitory effect of hypoxia on the terminal differentiation by decreasing the expression of major hypertrophic markers and ALP activity. Finally, *in vivo* experiments in nude mice have clearly addressed the capability of ATSC to give rise to cartilage when implanted with Si-HPMC hydrogel. Histological examination indicated that the *in vitro* chondrogenic pre-commitment of ATSC in monolayer and under hypoxia is sufficient to obtain a cartilaginous tissue *in vivo*. This hydrogel may likely provide a 3D environment propitious to the development of chondrogenesis. Finally, to evaluate the preclinical potential of ATSC, cells will be harvested, isolated, expanded and pre-committed before implantation in critical size articular defects in rabbits.

Acknowledgements

Karl Rouger, Séverine Remy, Michèle Heslan and Ignacio Anegón for FACS analysis. Florence Lejeune (clinique Brétéché) for harvesting human lipoaspirates. Lydie Guigand and Jerome Amiaud for histology. Maïthé Gatus for helpful discussion. Lisa Oliver, Sophie Demolombe and Patrice Naud for their assistance in TLDA experiments. The “Fondation Arthritis Courtin”, the “Société Française de Rhumatologie”, ANR Tecsan “Chondrograft”, the “Fondation de l’Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée”, the “Région Pays de la Loire” and Graftys SA for their financial support.

References

- [1] E.B. Hunziker, Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects, *Osteoarthr. Cartil.* **10**(6) (2002), 432–463.
- [2] C. Vinatier et al., Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors, *Trends Biotechnol.* **27**(5) (2009), 307–314.
- [3] C. Vinatier et al., An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects, *Biotechnol. Bioeng.* **102**(4) (2009), 1259–1267.

- [4] C. Vinatier et al., A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes, *Biomaterials* **26**(33) (2005), 6643–6651.
- [5] D. Magne et al., Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage, *Trends Mol. Med.* **11**(11) (2005), 519–526.
- [6] M. Hirao et al., Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification, *J. Biol. Chem.* **281**(41) (2006), 31079–31092.
- [7] C. Merceron et al., Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **298**(2) (2010), 355–364.
- [8] K. Pelttari et al., 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**(10) (2006), 3254–3266.
- [9] B.A. Bunnell et al., Differentiation of adipose stem cells, *Methods Mol. Biol.* **456** (2008), 155–171.
- [10] P.A. Zuk et al., Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, *Mol. Biol. Cell* **13**(12) (2002), 4279–4295.
- [11] W.J. Jurgens et al., Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Cell Tissue Res.* **332**(3) (2008), 415–426.
- [12] C. Vinatier et al., Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel, *J. Biomed. Mater. Res. A* **80**(1) (2007), 66–74.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hunziker EB (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 432-463.
2. 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: 532-553.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
4. Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, Gimple JM (2006) Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 206: 229-237.
5. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, Ritt MJ, van Milligen FJ (2006) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 8: 166-177.
6. Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, Ritt MJ, van Milligen FJ (2008) Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res* 332: 415-426.
7. Filardo G, Madry H, Jelic M, Roffi A, Cucchiaroni M, Kon E (2013) Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*.
8. Veronesi F, Giavaresi G, Tschon M, Borsari V, Nicoli Aldini N, Fini M (2013) Clinical use of bone marrow, bone marrow concentrate, and expanded bone marrow mesenchymal stem cells in cartilage disease. *Stem Cells Dev* 22: 181-192.
9. Roelofs AJ, Rocke JP, De Bari C (2013) Cell-based approaches to joint surface repair: a research perspective. *Osteoarthritis Cartilage*.
10. van der Kraan PM, van den Berg WB (2012) Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis Cartilage*.
11. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97: 33-44.
12. Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, Aigner T, Richter W (2006) Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum* 54: 3254-3266.
13. Aigner T, 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.
14. Archer CW, Francis-West P (2003) The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 401-404.
15. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 221-233.
16. Sommarin Y, Larsson T, Heinegard D (1989) Chondrocyte-matrix interactions. Attachment to proteins isolated from cartilage. *Exp Cell Res* 184: 181-192.
17. Silver IA (1975) Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 271: 261-272.
18. Zhou S, Cui Z, Urban JP (2004) Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modeling study. *Arthritis Rheum* 50: 3915-3924.

19. Haselgrove JC, Shapiro IM, Silverton SF (1993) Computer modeling of the oxygen supply and demand of cells of the avian growth cartilage. *Am J Physiol* 265: C497-506.
20. Gelse K, Muhle C, Knaup K, Swoboda B, Wiesener M, Hennig F, Olk A, Schneider H (2008) Chondrogenic differentiation of growth factor-stimulated precursor cells in cartilage repair tissue is associated with increased HIF-1 α activity. *Osteoarthritis Cartilage* 16: 1457-1465.
21. Lafont JE, Talma S, Hopfgarten C, Murphy CL (2008) Hypoxia promotes the differentiated human articular chondrocyte phenotype through SOX9-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 283: 4778-4786.
22. Shapiro IM, Srinivas V (2007) Metabolic consideration of epiphyseal growth: survival responses in a taxing environment. *Bone* 40: 561-567.
23. del Valle AE, Aledo JC (2006) What process is glycolytic stoichiometry optimal for? *J Mol Evol* 62: 488-495.
24. Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K, Johnson RS (2001) Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21: 3436-3444.
25. Mobasheri A, Richardson S, Mobasheri R, Shakibaei M, Hoyland JA (2005) Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes. *Histol Histopathol* 20: 1327-1338.
26. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB (2008) The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7: 11-20.
27. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3: 177-185.
28. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC (2006) HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 3: 187-197.
29. Chen FH, Rousche KT, Tuan RS (2006) Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2: 373-382.
30. Eyre D (2002) Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 4: 30-35.
31. Eyre DR, Wu JJ, Fernandes RJ, Pietka TA, Weis MA (2002) Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network. *Biochem Soc Trans* 30: 893-899.
32. Naumann A, Dennis JE, Awadallah A, Carrino DA, Mansour JM, Kastenbauer E, Caplan AI (2002) Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem* 50: 1049-1058.
33. Ng LJ, Tam PP, Cheah KS (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.
34. Lui VC, Ng LJ, Nicholls J, Tam PP, Cheah KS (1995) Tissue-specific and differential expression of alternatively spliced $\alpha 1(\text{II})$ collagen mRNAs in early human embryos. *Dev Dyn* 203: 198-211.
35. Sandell LJ, Nalin AM, Reife RA (1994) Alternative splice form of type II procollagen mRNA (IIA) is predominant in skeletal precursors and non-cartilaginous tissues during early mouse development. *Dev Dyn* 199: 129-140.
36. Sandell LJ, Morris N, Robbins JR, Goldring MB (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.

37. Girkontaite I, Frischholz S, Lammi P, Wagner K, Swoboda B, Aigner T, 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.
38. Grant WT, Wang GJ, Balian G (1987) Type X collagen synthesis during endochondral ossification in fracture repair. *J Biol Chem* 262: 9844-9849.
39. Lyons TJ, Stoddart RW, McClure SF, McClure J (2005) The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint. *J Mol Histol* 36: 207-215.
40. Rucklidge GJ, Milne G, Robins SP (1996) Collagen type X: a component of the surface of normal human, pig, and rat articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 297-302.
41. Rogers BA, Murphy CL, Cannon SR, Briggs TW (2006) Topographical variation in glycosaminoglycan content in human articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 88: 1670-1674.
42. Settembre C, Arteaga-Solis E, McKee MD, de Pablo R, Al Awqati Q, Ballabio A, Karsenty G (2008) Proteoglycan desulfation determines the efficiency of chondrocyte autophagy and the extent of FGF signaling during endochondral ossification. *Genes Dev* 22: 2645-2650.
43. Hardingham TE, Fosang AJ (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 6: 861-870.
44. Moreland LW (2003) Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther* 5: 54-67.
45. Knudson CB, Knudson W (2001) Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 12: 69-78.
46. Heinegard D (2009) Proteoglycans and more--from molecules to biology. *Int J Exp Pathol* 90: 575-586.
47. Eames BF, Yan YL, Swartz ME, Levic DS, Knapik EW, Postlethwait JH, Kimmel CB (2011) Mutations in *fam20b* and *xyll1* Reveal That Cartilage Matrix Controls Timing of Endochondral Ossification by Inhibiting Chondrocyte Maturation. *PLoS Genet* 7: e1002246.
48. Raman R, Sasisekharan V, Sasisekharan R (2005) Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions. *Chem Biol* 12: 267-277.
49. Sasisekharan R, Raman R, Prabhakar V (2006) Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. *Annu Rev Biomed Eng* 8: 181-231.
50. Ramirez F, Rifkin DB (2003) Cell signaling events: a view from the matrix. *Matrix Biol* 22: 101-107.
51. Loeser RF (2000) Chondrocyte integrin expression and function. *Biorheology* 37: 109-116.
52. Gendelman R, Burton-Wurster NI, MacLeod JN, Lust G (2003) The cartilage-specific fibronectin isoform has a high affinity binding site for the small proteoglycan decorin. *J Biol Chem* 278: 11175-11181.
53. Haut Donahue TL, Genetos DC, Jacobs CR, Donahue HJ, Yellowley CE (2004) Annexin V disruption impairs mechanically induced calcium signaling in osteoblastic cells. *Bone* 35: 656-663.
54. Jones AR, Chen S, Chai DH, Stevens AL, Glegghorn JP, Bonassar LJ, Grodzinsky AJ, Flannery CR (2009) Modulation of lubricin biosynthesis and tissue surface properties following cartilage mechanical injury. *Arthritis Rheum* 60: 133-142.
55. Di Cesare PE, Chen FS, Moergelin M, Carlson CS, Leslie MP, Perris R, Fang C (2002) Matrix-matrix interaction of cartilage oligomeric matrix protein and fibronectin. *Matrix Biol* 21: 461-470.
56. Clouet J, Vinatier C, Merceron C, Pot-vaucel M, Maugars Y, Weiss P, Grimandi G, Guicheux J (2009) From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug Discov Today* 14: 913-925.
57. Kumar P, Oka M, Toguchida J, Kobayashi M, Uchida E, Nakamura T, Tanaka K (2001) Role of uppermost superficial surface layer of articular cartilage in the lubrication mechanism of joints. *J Anat* 199: 241-250.

58. Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, Haughton L, Bayram Z, Boyer S, Thomson B, Wolfe MS, Archer CW (2004) The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci* 117: 889-897.
59. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M (2004) Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 50: 1522-1532.
60. Karlsson C, Thormemo M, Henriksson HB, Lindahl A (2009) Identification of a stem cell niche in the zone of Ranvier within the knee joint. *J Anat* 215: 355-363.
61. Seol D, McCabe DJ, Choe H, Zheng H, Yu Y, Jang K, Walter MW, Lehman AD, Ding L, Buckwalter JA, Martin JA (2012) Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. *Arthritis Rheum* 64: 3626-3637.
62. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T (2007) Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee* 14: 177-182.
63. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noel D (2010) Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 1: 2.
64. Niemeyer P, Pestka JM, Erggelet C, Steinwachs M, Salzmänn GM, Sudkamp NP (2011) Comparison of arthroscopic and open assessment of size and grade of cartilage defects of the knee. *Arthroscopy* 27: 46-51.
65. Buckwalter JA, Mankin HJ (1998) Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum* 41: 1331-1342.
66. Mankin HJ (1982) The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 64: 460-466.
67. Beris AE, Lykissas MG, Papageorgiou CD, Georgoulis AD (2005) Advances in articular cartilage repair. *Injury* 36 Suppl 4: S14-23.
68. Olsen BR, Reginato AM, Wang W (2000) Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 191-220.
69. Leijten JC, Emons J, Sticht C, van Gool S, Decker E, Uitterlinden A, Rappold G, Hofman A, Rivadeneira F, Scherjon S, Wit JM, van Meurs J, van Blitterswijk CA, Karperien M (2012) Gremlin 1, frizzled-related protein, and Dkk-1 are key regulators of human articular cartilage homeostasis. *Arthritis Rheum* 64: 3302-3312.
70. Lefebvre V, Smits P (2005) Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75: 200-212.
71. Shimizu H, Yokoyama S, Asahara H (2007) Growth and differentiation of the developing limb bud from the perspective of chondrogenesis. *Dev Growth Differ* 49: 449-454.
72. Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noel D (2009) Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol* 27: 307-314.
73. Hall BK, Miyake T (2000) All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* 22: 138-147.
74. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS (2000) Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 8: 309-334.
75. Leonard CM, Fuld HM, Frenz DA, Downie SA, Massague J, Newman SA (1991) Role of transforming growth factor-beta in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF-beta and evidence for endogenous TGF-beta-like activity. *Dev Biol* 145: 99-109.
76. Tickle C (2002) Molecular basis of vertebrate limb patterning. *Am J Med Genet* 112: 250-255.

77. Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell DM, Tam PP, Cheah KS, Koopman P (1997) SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* 183: 108-121.
78. Akiyama H (2008) Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod Rheumatol* 18: 213-219.
79. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, 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.
80. Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B (1997) SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro $\alpha 1(\text{II})$ collagen gene. *Mol Cell Biol* 17: 2336-2346.
81. Han Y, Lefebvre V (2008) L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol Cell Biol* 28: 4999-5013.
82. Yoon BS, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM (2005) *Bmpr1a* and *Bmpr1b* have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5062-5067.
83. Randall RM, Shao YY, Wang L, Ballock RT (2012) Activation of Wnt planar cell polarity (PCP) signaling promotes growth plate column formation in vitro. *J Orthop Res*.
84. Romereim SM, Dudley AT (2011) Cell polarity: The missing link in skeletal morphogenesis? *Organogenesis* 7: 217-228.
85. Smits P, Dy P, Mitra S, 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.
86. Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A (2002) Interaction of FGF, *Ihh*/*Pthlh*, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell* 3: 439-449.
87. Ornitz DM (2005) FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 205-213.
88. Sahni M, Ambrosetti DC, Mansukhani A, Gertner R, Levy D, Basilico C (1999) FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev* 13: 1361-1366.
89. Legeai-Mallet L, Benoist-Lasselin C, Munnich A, Bonaventure J (2004) Overexpression of *FGFR3*, *Stat1*, *Stat5* and *p21Cip1* correlates with phenotypic severity and defective chondrocyte differentiation in *FGFR3*-related chondrodysplasias. *Bone* 34: 26-36.
90. Su N, Xu X, Li C, He Q, Zhao L, Chen S, Luo F, Yi L, Du X, Huang H, Deng C, Chen L (2010) Generation of *Fgfr3* conditional knockout mice. *Int J Biol Sci* 6: 327-332.
91. Horton WA, Hall JG, Hecht JT (2007) Achondroplasia. *Lancet* 370: 162-172.
92. Dy P, Smits P, Silvester A, Penzo-Mendez A, Dumitriu B, Han Y, de la Motte CA, Kingsley DM, Lefebvre V (2010) Synovial joint morphogenesis requires the chondrogenic action of Sox5 and Sox6 in growth plate and articular cartilage. *Dev Biol* 341: 346-359.
93. Dy P, Wang W, Bhattaram P, Wang Q, Wang L, Ballock RT, Lefebvre V (2012) Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Dev Cell* 22: 597-609.
94. Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrea PD, de Crombrughe B (2004) Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* 18: 1072-1087.
95. Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M, Yamagiwa H, Kimura T, Yasui N, Ochi T, Endo N, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T (1999) Maturation disturbance of chondrocytes in *Cbfa1*-deficient mice. *Dev Dyn* 214: 279-290.

96. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP (1999) Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13: 2072-2086.
97. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ (1996) Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273: 613-622.
98. Shukunami C, Hiraki Y (2001) Role of cartilage-derived anti-angiogenic factor, chondromodulin-I, during endochondral bone formation. *Osteoarthritis Cartilage* 9 Suppl A: S91-101.
99. Buckwalter JA, Mower D, Ungar R, Schaeffer J, Ginsberg B (1986) Morphometric analysis of chondrocyte hypertrophy. *J Bone Joint Surg Am* 68: 243-255.
100. Bush PG, Parisinos CA, Hall AC (2008) The osmotic sensitivity of rat growth plate chondrocytes in situ; clarifying the mechanisms of hypertrophy. *J Cell Physiol* 214: 621-629.
101. Bush PG, Pritchard M, Loqman MY, Damron TA, Hall AC (2010) A key role for membrane transporter NKCC1 in mediating chondrocyte volume increase in the mammalian growth plate. *J Bone Miner Res* 25: 1594-1603.
102. Bluteau G, Julien M, Magne D, Mallein-Gerin F, Weiss P, Daculsi G, Guicheux J (2007) VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes. *Bone* 40: 568-576.
103. Kronenberg HM (2003) Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423: 332-336.
104. Provot S, Schipani E (2005) Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 658-665.
105. Srinivas V, Bohensky J, Zahm AM, Shapiro IM (2009) Autophagy in mineralizing tissues: microenvironmental perspectives. *Cell Cycle* 8: 391-393.
106. Bohensky J, Shapiro IM, Leshinsky S, Terkhorn SP, Adams CS, Srinivas V (2007) HIF-1 regulation of chondrocyte apoptosis: induction of the autophagic pathway. *Autophagy* 3: 207-214.
107. Bradley EW, McGee-Lawrence ME, Westendorf JJ (2011) Hdac-mediated control of endochondral and intramembranous ossification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 21: 101-113.
108. Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, McAnally J, Pomajzl C, Shelton JM, Richardson JA, Karsenty G, Olson EN (2004) Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 119: 555-566.
109. Arnold MA, Kim Y, Czubryt MP, Phan D, McAnally J, Qi X, Shelton JM, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2007) MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. *Dev Cell* 12: 377-389.
110. Hecht J, Seitz V, Urban M, Wagner F, Robinson PN, Stiege A, Dieterich C, Kornak U, Wilkening U, Brieske N, Zwingman C, Kidess A, Stricker S, Mundlos S (2007) Detection of novel skeletogenesis target genes by comprehensive analysis of a Runx2(-/-) mouse model. *Gene Expr Patterns* 7: 102-112.
111. Zheng Q, Zhou G, Morello R, Chen Y, Garcia-Rojas X, 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.
112. Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T (2004) Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* 18: 952-963.
113. Li TF, Dong Y, Ionescu AM, Rosier RN, Zuscik MJ, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Drissi H (2004) Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) inhibits Runx2 expression through the PKA signaling pathway. *Exp Cell Res* 299: 128-136.
114. Zhang M, Xie R, Hou W, Wang B, Shen R, Wang X, Wang Q, Zhu T, Jonason JH, Chen D (2009) PTHrP prevents chondrocyte premature hypertrophy by inducing cyclin-D1-dependent Runx2 and Runx3 phosphorylation, ubiquitylation and proteasomal degradation. *J Cell Sci* 122: 1382-1389.

115. Wang W, Xu J, Du B, Kirsch T (2005) Role of the progressive ankylosis gene (ank) in cartilage mineralization. *Mol Cell Biol* 25: 312-323.
116. Kim HJ, Delaney JD, Kirsch T (2010) The role of pyrophosphate/phosphate homeostasis in terminal differentiation and apoptosis of growth plate chondrocytes. *Bone* 47: 657-665.
117. Ortega N, Behonick DJ, Werb Z (2004) Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol* 14: 86-93.
118. Alvarez J, Costales L, Serra R, Balbin M, Lopez JM (2005) Expression patterns of matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor during epiphyseal ossification. *J Bone Miner Res* 20: 1011-1021.
119. Ortega N, Wang K, Ferrara N, Werb Z, Vu TH (2010) Complementary interplay between matrix metalloproteinase-9, vascular endothelial growth factor and osteoclast function drives endochondral bone formation. *Dis Model Mech* 3: 224-235.
120. Lee ER, Lamplugh L, Kluczyk B, Leblond CP, Mort JS (2009) Neoepitopes reveal the features of type II collagen cleavage and the identity of a collagenase involved in the transformation of the epiphyses anlagen in development. *Dev Dyn* 238: 1547-1563.
121. Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, Fosang AJ, Schorpp-Kistner M, Angel P, Werb Z (2004) Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* 131: 5883-5895.
122. Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, Thomas D, Fukai N, Soker S, Olsen BR (2001) Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech Dev* 106: 97-106.
123. Kwon TG, Zhao X, Yang Q, Li Y, Ge C, Zhao G, Franceschi RT (2011) Physical and functional interactions between Runx2 and HIF-1alpha induce vascular endothelial growth factor gene expression. *J Cell Biochem* 112: 3582-3593.
124. Lee SH, Che X, Jeong JH, Choi JY, Lee YJ, Lee YH, Bae SC, Lee YM (2012) Runx2 protein stabilizes hypoxia-inducible factor-1alpha through competition with von Hippel-Lindau protein (pVHL) and stimulates angiogenesis in growth plate hypertrophic chondrocytes. *J Biol Chem* 287: 14760-14771.
125. Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E, Olsen BR (2004) VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 131: 2161-2171.
126. Allerstorfer D, Longato S, Schwarzer C, Fischer-Colbrie R, Hayman AR, Blumer MJ (2010) VEGF and its role in the early development of the long bone epiphysis. *J Anat* 216: 611-624.
127. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-676.
128. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5: 623-628.
129. Shapiro IM, Adams CS, Freeman T, Srinivas V (2005) Fate of the hypertrophic chondrocyte: microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75: 330-339.
130. Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS (2001) Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* 15: 2865-2876.
131. Pfander D, Cramer T, Schipani E, Johnson RS (2003) HIF-1alpha controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes. *J Cell Sci* 116: 1819-1826.
132. Provot S, Schipani E (2007) Fetal growth plate: a developmental model of cellular adaptation to hypoxia. *Ann N Y Acad Sci* 1117: 26-39.

133. Provot S, Zinyk D, Gunes Y, Kathri R, Le Q, Kronenberg HM, Johnson RS, Longaker MT, Giaccia AJ, Schipani E (2007) Hif-1alpha regulates differentiation of limb bud mesenchyme and joint development. *J Cell Biol* 177: 451-464.
134. Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, Nishida N, Akune T, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI, Kawaguchi H (2010) Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med* 16: 678-686.
135. Araldi E, Khatri R, Giaccia AJ, Simon MC, Schipani E (2011) Lack of HIF-2alpha in limb bud mesenchyme causes a modest and transient delay of endochondral bone development. *Nat Med* 17: 25-26; author reply 27-29.
136. Pfander D, Kobayashi T, Knight MC, Zelzer E, Chan DA, Olsen BR, Giaccia AJ, Johnson RS, Haase VH, Schipani E (2004) Deletion of Vhlh in chondrocytes reduces cell proliferation and increases matrix deposition during growth plate development. *Development* 131: 2497-2508.
137. Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS (2003) Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* 23: 359-369.
138. Roskoski R, Jr. (2008) VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 375: 287-291.
139. Maes C, Stockmans I, Moermans K, Van Looveren R, Smets N, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G (2004) Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival. *J Clin Invest* 113: 188-199.
140. Maes C, Araldi E, Haigh K, Khatri R, Van Looveren R, Giaccia AJ, Haigh JJ, Carmeliet G, Schipani E (2012) VEGF-independent cell-autonomous functions of HIF-1alpha regulating oxygen consumption in fetal cartilage are critical for chondrocyte survival. *J Bone Miner Res* 27: 596-609.
141. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 741-752.
142. Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6: 463-477.
143. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL (2008) Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 283: 10892-10903.
144. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, Mazure NM (2009) Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 29: 2570-2581.
145. Barnes K, Ingram JC, Porras OH, Barros LF, Hudson ER, Fryer LG, Foufelle F, Carling D, Hardie DG, Baldwin SA (2002) Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Cell Sci* 115: 2433-2442.
146. Bohensky J, Leshinsky S, Srinivas V, Shapiro IM (2010) Chondrocyte autophagy is stimulated by HIF-1 dependent AMPK activation and mTOR suppression. *Pediatr Nephrol* 25: 633-642.
147. Emerling BM, Weinberg F, Snyder C, Burgess Z, Mutlu GM, Viollet B, Budinger GR, Chandel NS (2009) Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. *Free Radic Biol Med* 46: 1386-1391.
148. Bohensky J, Terkhorn SP, Freeman TA, Adams CS, Garcia JA, Shapiro IM, Srinivas V (2009) Regulation of autophagy in human and murine cartilage: hypoxia-inducible factor 2 suppresses chondrocyte autophagy. *Arthritis Rheum* 60: 1406-1415.
149. Elisseeff J (2004) Injectable cartilage tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* 4: 1849-1859.
150. Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science* 260: 920-926.

151. Ateshian GA (2007) Artificial cartilage: weaving in three dimensions. *Nat Mater* 6: 89-90.
152. Chung C, Burdick JA (2008) Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 243-262.
153. Isogai N, Kusuha H, Ikada Y, Ohtani H, Jacquet R, Hillyer J, Lowder E, Landis WJ (2006) Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng* 12: 691-703.
154. Kafienah W, Jakob M, Demarteau O, Frazer A, Barker MD, Martin I, Hollander AP (2002) Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Eng* 8: 817-826.
155. Darling EM, Athanasiou KA (2005) Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res* 23: 425-432.
156. Dehne T, Karlsson C, Ringe J, Sittering M, Lindahl A (2009) Chondrogenic differentiation potential of osteoarthritic chondrocytes and their possible use in matrix-associated autologous chondrocyte transplantation. *Arthritis Res Ther* 11: R133.
157. Sandell LJ, Aigner T (2001) Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 3: 107-113.
158. Barbero A, Grogan S, Schafer D, Heberer M, Mainil-Varlet P, Martin I (2004) Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 476-484.
159. Aigner T, Zhu Y, Chansky HH, Matsen FA, 3rd, Maloney WJ, Sandell LJ (1999) Reexpression of type IIA procollagen by adult articular chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 42: 1443-1450.
160. Tallheden T, Bengtsson C, Brantsing C, Sjogren-Jansson E, Carlsson L, Peterson L, Brittberg M, Lindahl A (2005) Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis Res Ther* 7: R560-568.
161. Strobel S, Loparic M, Wendt D, Schenk AD, Candrian C, Lindberg RL, Moldovan F, Barbero A, Martin I (2010) Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Res Ther* 12: R34.
162. 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: 889-895.
163. Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A (2010) Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med* 38: 1117-1124.
164. Haddo O, Mahroof S, Higgs D, David L, Pringle J, Bayliss M, Cannon SR, Briggs TW (2004) The use of chondrogide membrane in autologous chondrocyte implantation. *Knee* 11: 51-55.
165. Niemeyer P, Pestka JM, Kreuz PC, Erggelet C, Schmal H, Suedkamp NP, Steinwachs M (2008) Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint. *Am J Sports Med* 36: 2091-2099.
166. Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M (2009) Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 17: 561-577.
167. Marquass B, Schulz R, Hepp P, Zscharnack M, Aigner T, Schmidt S, Stein F, Richter R, Osterhoff G, Aust G, Josten C, Bader A (2011) Matrix-associated implantation of predifferentiated mesenchymal stem cells versus articular chondrocytes: in vivo results of cartilage repair after 1 year. *Am J Sports Med* 39: 1401-1412.
168. Zscharnack M, Hepp P, Richter R, Aigner T, Schulz R, Somerson J, Josten C, Bader A, Marquass B (2011) Repair of chronic osteochondral defects using predifferentiated mesenchymal stem cells in an ovine model. *Am J Sports Med* 38: 1857-1869.

169. Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D (2008) Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician* 11: 343-353.
170. Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D (2008) Regeneration of meniscus cartilage in a knee treated with percutaneously implanted autologous mesenchymal stem cells. *Med Hypotheses* 71: 900-908.
171. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M (2002) Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 199-206.
172. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13625-13630.
173. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44: 1928-1942.
174. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JJ, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295.
175. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-228.
176. Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG (1999) Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg* 65: 22-26.
177. Nadri S, Soleimani M (2007) Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from murine bone marrow and amniotic fluid. *Cytotherapy* 9: 729-737.
178. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH (2004) Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 22: 1338-1345.
179. Erices A, Conget P, Minguell JJ (2000) Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109: 235-242.
180. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7: 393-395.
181. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317.
182. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119: 2204-2213.
183. O'Sullivan J, D'Arcy S, Barry FP, Murphy JM, Coleman CM (2011) Mesenchymal chondroprogenitor cell origin and therapeutic potential. *Stem Cell Res Ther* 2: 8.
184. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T (2005) Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 52: 2521-2529.
185. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113 (Pt 7): 1161-1166.
186. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-49.

187. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringden O (2008) Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371: 1579-1586.
188. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838-3843.
189. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC (2003) Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75: 389-397.
190. De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, Arnalich-Montiel F (2012) Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med* 12: 574-591.
191. Caux C (1998) Pathways of development of human dendritic cells. *Eur J Dermatol* 8: 375-384.
192. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE (2006) Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 177: 2080-2087.
193. Aggarwal S, Pittenger MF (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105: 1815-1822.
194. Chen L, Zhang W, Yue H, Han Q, Chen B, Shi M, Li J, Li B, You S, Shi Y, Zhao RC (2007) Effects of human mesenchymal stem cells on the differentiation of dendritic cells from CD34+ cells. *Stem Cells Dev* 16: 719-731.
195. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N (2005) Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105: 4120-4126.
196. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noel D (2007) Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* 25: 2025-2032.
197. Whiteside TL, Herberman RB (1994) Role of human natural killer cells in health and disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1: 125-133.
198. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxeavanis CN, Papamichail M (2006) Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 24: 74-85.
199. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L (2006) Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 107: 1484-1490.
200. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L (2008) Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111: 1327-1333.
201. Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu CP, Kuroda Y, Kandeel F, Mullen Y (2009) Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp Hematol* 37: 604-615.
202. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G (2005) Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 35: 1482-1490.
203. Comoli P, Ginevri F, Maccario R, Avanzini MA, Marconi M, Groff A, Cometa A, Cioni M, Porretti L, Barberi W, Frassoni F, Locatelli F (2008) Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. *Nephrol Dial Transplant* 23: 1196-1202.

204. Rafei M, Hsieh J, Fortier S, Li M, Yuan S, Birman E, Forner K, Boivin MN, Doody K, Tremblay M, Annabi B, Galipeau J (2008) Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood* 112: 4991-4998.
205. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107: 367-372.
206. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F (2005) Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105: 2821-2827.
207. Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, Gualandi F, Frassoni F, Pistoia V, Mancardi G, Uccelli A (2007) Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells* 25: 1753-1760.
208. Jorgensen C, Djouad F, Fritz V, Apparailly F, Plence P, Noel D (2003) Mesenchymal stem cells and rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 70: 483-485.
209. Jorgensen C, Djouad F, Bouffi C, Mrugala D, Noel D (2008) Multipotent mesenchymal stromal cells in articular diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22: 269-284.
210. Djouad F, Bouffi C, Ghannam S, Noel D, Jorgensen C (2009) Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 5: 392-399.
211. Bouffi C, Djouad F, Mathieu M, Noel D, Jorgensen C (2009) Multipotent mesenchymal stromal cells and rheumatoid arthritis: risk or benefit? *Rheumatology (Oxford)* 48: 1185-1189.
212. Kastrinaki MC, Papadaki HA (2009) Mesenchymal stromal cells in rheumatoid arthritis: biological properties and clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther* 4: 61-69.
213. Noth U, Rackwitz L, Steinert AF, Tuan RS (2010) Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 62: 765-783.
214. Maumus M, Guerit D, Toupet K, Jorgensen C, Noel D (2011) Mesenchymal stem cell-based therapies in regenerative medicine: applications in rheumatology. *Stem Cell Res Ther* 2: 14.
215. DeLany JP, Floyd ZE, Zvonic S, Smith A, Gravois A, Reinert E, Wu X, Kilroy G, Lefevre M, Gimble JM (2005) Proteomic analysis of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation by Adipogenesis. *Mol Cell Proteomics* 4: 731-740.
216. De la Fuente A, Mateos J, Lesende-Rodriguez I, Calamia V, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, Arufe MC, Blanco FJ (2012) Proteome analysis during chondrocyte differentiation in a new chondrogenesis model using human umbilical cord stroma mesenchymal stem cells. *Mol Cell Proteomics* 11: M111 010496.
217. Calamia V, Lourido L, Fernandez-Puente P, Mateos J, Rocha B, Montell E, Verges J, Ruiz-Romero C, Blanco FJ (2012) Secretome analysis of chondroitin sulfate-treated chondrocytes reveals its anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-catabolic properties. *Arthritis Res Ther* 14: R202.
218. Caplan AI (2009) Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 217: 318-324.
219. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y (2008) Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 3: e1886.
220. Valle-Prieto A, Conget PA (2010) Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cells Dev* 19: 1885-1893.
221. Noth U, Steinert AF, Tuan RS (2008) Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4: 371-380.
222. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noel D (2010) IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One* 5: e14247.
223. Aung A, Gupta G, Majid G, Varghese S (2011) Osteoarthritic chondrocyte-secreted morphogens induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 63: 148-158.

224. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP (2003) Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48: 3464-3474.
225. Grigolo B, Lisignoli G, Desando G, Cavallo C, Marconi E, Tschon M, Giavaresi G, Fini M, Giardino R, Facchini A (2009) Osteoarthritis treated with mesenchymal stem cells on hyaluronan-based scaffold in rabbit. *Tissue Eng Part C Methods* 15: 647-658.
226. Li L, Zhang S, Zhang Y, Yu B, Xu Y, Guan Z (2009) Paracrine action mediate the antifibrotic effect of transplanted mesenchymal stem cells in a rat model of global heart failure. *Mol Biol Rep* 36: 725-731.
227. Mias C, Lairez O, Trouche E, Roncalli J, Calise D, Seguelas MH, Ordener C, Piercecchi-Marti MD, Auge N, Salvayre AN, Bourin P, Parini A, Cussac D (2009) Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. *Stem Cells* 27: 2734-2743.
228. Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM (2010) Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 5: 103-110.
229. Granero-Molto F, Weis JA, Longobardi L, Spagnoli A (2008) Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther* 8: 255-268.
230. Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S (2010) The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev*.
231. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3: 393-403.
232. Becker AJ, Mc CE, Till JE (1963) Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197: 452-454.
233. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, Ruadkow IA (1974) Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2: 83-92.
234. Daher SR, Johnstone BH, Phinney DG, March KL (2008) Adipose stromal/stem cells: basic and translational advances: the IFATS collection. *Stem Cells* 26: 2664-2665.
235. Haeck PC, Swanson JA, Gutowski KA, Basu CB, Wandel AG, Damitz LA, Reisman NR, Baker SB (2009) Evidence-based patient safety advisory: liposuction. *Plast Reconstr Surg* 124: 28S-44S.
236. Suga H, Shigeura T, Matsumoto D, Inoue K, Kato H, Aoi N, Murase S, Sato K, Gonda K, Koshima I, Yoshimura K (2007) Rapid expansion of human adipose-derived stromal cells preserving multipotency. *Cytotherapy* 9: 738-745.
237. Coleman SR (1995) Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg* 19: 421-425.
238. Schaffler A, Scholmerich J, Buchler C (2005) Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in intestinal and mesenteric diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2: 103-111.
239. Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, van Ham SM, van Milligen FJ (2007) Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev* 16: 91-104.
240. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I, Gonda K (2006) Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* 208: 64-76.
241. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM (2013) Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for

- Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Cytotherapy.
242. Harvath L (2000) Food and Drug Administration's proposed approach to regulation of hematopoietic stem/progenitor cell products for therapeutic use. *Transfus Med Rev* 14: 104-111.
 243. Sensebe L, Bourin P, Tarte K (2011) Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum Gene Ther* 22: 19-26.
 244. Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, Tai BC, Lee EH (2010) Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med* 38: 1110-1116.
 245. Koh YG, Choi YJ (2012) Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. *Knee* 19: 902-907.
 246. Pak J (2011) Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. *J Med Case Rep* 5: 296.
 247. van Harmelen V, Skurk T, Rohrig K, Lee YM, Halbleib M, Aprath-Husmann I, Hauner H (2003) Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 889-895.
 248. Bellantuono I, Aldahmash A, Kassem M (2009) Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their contribution to age-related bone loss. *Biochim Biophys Acta* 1792: 364-370.
 249. Stenderup K, Justesen J, Eriksen EF, Rattan SI, Kassem M (2001) Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 16: 1120-1129.
 250. Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A (2008) Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 129: 163-173.
 251. Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I (2004) Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 22: 675-682.
 252. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M (2003) Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33: 919-926.
 253. Lapasset L, Milhavet O, Prieur A, Besnard E, Babled A, Ait-Hamou N, Leschik J, Pellestor F, Ramirez JM, De Vos J, Lehmann S, Lemaitre JM (2011) Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev* 25: 2248-2253.
 254. Van Harmelen V, Rohrig K, Hauner H (2004) Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism* 53: 632-637.
 255. Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwicz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lonning PE, Bjerkvig R, Schichor C (2009) Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res* 69: 5331-5339.
 256. Wang Y, Huso DL, Harrington J, Kellner J, Jeong DK, Turney J, McNiece IK (2005) Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 7: 509-519.
 257. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG, Zuffardi O, Locatelli F (2007) Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 67: 9142-9149.

258. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, Tchirkov A, Rouard H, Henry C, Splingard M, Dulong J, Monnier D, Gourmelon P, Gorin NC, Sensebe L (2010) Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* 115: 1549-1553.
259. Wakitani S, Okabe T, Horibe S, Mitsuoka T, Saito M, Koyama T, Nawata M, Tensho K, Kato H, Uematsu K, Kuroda R, Kurosaka M, Yoshiya S, Hattori K, Ohgushi H (2011) Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J Tissue Eng Regen Med* 5: 146-150.
260. Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA (1997) Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood* 89: 776-779.
261. Gimble JM, Bunnell BA, Chiu ES, Guilak F (2011) Concise review: Adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: let's not get lost in translation. *Stem Cells* 29: 749-754.
262. Bieback K, Hecker A, Kocaomer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, Kluter H (2009) Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 27: 2331-2341.
263. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, Drexler C, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D (2007) Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion* 47: 1436-1446.
264. Rothenberg AR, Ouyang L, Elisseeff JH (2011) Mesenchymal stem cell stimulation of tissue growth depends on differentiation state. *Stem Cells Dev* 20: 405-414.
265. 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.
266. Lee JM, Im GI (2012) PTHrP isoforms have differing effect on chondrogenic differentiation and hypertrophy of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 421: 819-824.
267. Mueller MB, Fischer M, Zellner J, Berner A, Dienstknecht T, Prantl L, Kujat R, Nerlich M, Tuan RS, Angele P (2010) Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF-beta isoforms and chondrogenic conditioning. *Cells Tissues Organs* 192: 158-166.
268. Mueller MB, Tuan RS (2008) Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 58: 1377-1388.
269. Gawlitta D, Farrell E, Malda J, Creemers LB, Alblas J, Dhert WJ (2010) Modulating endochondral ossification of multipotent stromal cells for bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 16: 385-395.
270. Gawlitta D, van Rijen MH, Schrijver EJ, Alblas J, Dhert WJ (2012) Hypoxia impedes hypertrophic chondrogenesis of human multipotent stromal cells. *Tissue Eng Part A* 18: 1957-1966.
271. Scotti C, Tonnarelli B, Papadimitropoulos A, Scherberich A, Schaeren S, Schauerte A, Lopez-Rios J, Zeller R, Barbero A, Martin I (2010) Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7251-7256.
272. Jakob M, Saxer F, Scotti C, Schreiner S, Studer P, Scherberich A, Heberer M, Martin I (2012) Perspective on the evolution of cell-based bone tissue engineering strategies. *Eur Surg Res* 49: 1-7.
273. Nesic D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P (2006) Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 300-322.
274. Martin Y, Vermette P (2005) Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances. *Biomaterials* 26: 7481-7503.

275. Schulz RM, Bader A (2007) Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur Biophys J* 36: 539-568.
276. Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Freed LE (2002) Bioreactor studies of native and tissue engineered cartilage. *Biorheology* 39: 259-268.
277. Caron MM, Emans PJ, Coolen MM, Voss L, Surtel DA, Cremers A, van Rhijn LW, Welting TJ (2012) Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis Cartilage* 20: 1170-1178.
278. Vinatier C, Magne D, Weiss P, Trojani C, Rochet N, Carle GF, Vignes-Colombeix C, Chadjichristos C, Galera P, Daculsi G, Guicheux J (2005) A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* 26: 6643-6651.
279. Hsieh-Bonassera ND, Wu I, Lin JK, Schumacher BL, Chen AC, Masuda K, Bugbee WD, Sah RL (2009) Expansion and redifferentiation of chondrocytes from osteoarthritic cartilage: cells for human cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 15: 3513-3523.
280. Guilak F, Alexopoulos LG, Upton ML, Youn I, Choi JB, Cao L, Setton LA, Haider MA (2006) The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Ann N Y Acad Sci* 1068: 498-512.
281. Erickson IE, Huang AH, Sengupta S, Kestle S, Burdick JA, Mauck RL (2009) Macromer density influences mesenchymal stem cell chondrogenesis and maturation in photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Osteoarthritis Cartilage* 17: 1639-1648.
282. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126: 677-689.
283. Erickson IE, Huang AH, Chung C, Li RT, Burdick JA, Mauck RL (2009) Differential maturation and structure-function relationships in mesenchymal stem cell- and chondrocyte-seeded hydrogels. *Tissue Eng Part A* 15: 1041-1052.
284. Vinatier C, Bouffi C, Merceron C, Gordeladze J, Brondello JM, Jorgensen C, Weiss P, Guicheux J, Noel D (2009) Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 4: 318-329.
285. Freed LE, Grande DA, Lingbin Z, Emmanuel J, Marquis JC, Langer R (1994) Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 28: 891-899.
286. Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Zichner L, Langer R, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G (2004) Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 88: 379-391.
287. Taguchi T, Xu L, Kobayashi H, Taniguchi A, Kataoka K, 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.
288. van Susante JLC, Pieper J, Buma P, van Kuppevelt TH, van Beuningen H, van Der Kraan PM, Veerkamp JH, van den Berg WB, Veth RPH (2001) Linkage of chondroitin-sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes in vitro. *Biomaterials* 22: 2359-2369.
289. Barbucci R, Lamponi S, Borzacchiello A, Ambrosio L, Fini M, Torricelli P, Giardino R (2002) Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials* 23: 4503-4513.
290. Liao E, Yaszemski M, Krebsbach P, 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.
291. Satija NK, Gurudutta GU, Sharma S, Afrin F, Gupta P, Verma YK, Singh VK, Tripathi RP (2007) Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. *Stem Cells Dev* 16: 7-23.

292. Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Rowley JA, Mooney DJ (2002) Engineering growing tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12025-12030.
293. Atala A, Cima LG, Kim W, Paige KT, Vacanti JP, Retik AB, Vacanti CA (1993) Injectable alginate seeded with chondrocytes as a potential treatment for vesicoureteral reflux. *J Urol* 150: 745-747.
294. Elisseeff JH, Lee A, Kleinman HK, Yamada Y (2002) Biological response of chondrocytes to hydrogels. *Ann N Y Acad Sci* 961: 118-122.
295. Suh JK, Matthew HW (2000) Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 21: 2589-2598.
296. Vinatier C, Gauthier O, Fatimi A, Merceron C, Masson M, Moreau A, Moreau F, Fellah B, Weiss P, Guicheux J (2009) An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnol Bioeng* 102: 1259-1267.
297. Vinatier C, Magne D, Moreau A, Gauthier O, Malard O, Vignes-Colombeix C, Daculsi G, Weiss P, Guicheux J (2007) Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *J Biomed Mater Res A* 80: 66-74.
298. Mercier NR, Costantino HR, Tracy MA, Bonassar LJ (2004) A novel injectable approach for cartilage formation in vivo using PLG microspheres. *Ann Biomed Eng* 32: 418-429.
299. Mercier NR, Costantino HR, Tracy MA, Bonassar LJ (2005) Poly(lactide-co-glycolide) microspheres as a moldable scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 26: 1945-1952.
300. Elisseeff J, Anseth K, Sims D, McIntosh W, Randolph M, Yaremchuk M, Langer R (1999) Transdermal photopolymerization of poly(ethylene oxide)-based injectable hydrogels for tissue-engineered cartilage. *Plast Reconstr Surg* 104: 1014-1022.
301. Elisseeff J, McIntosh W, Anseth K, Riley S, Ragan P, Langer R (2000) Photoencapsulation of chondrocytes in poly(ethylene oxide)-based semi-interpenetrating networks. *J Biomed Mater Res* 51: 164-171.
302. Kim TK, Sharma B, Williams CG, Ruffner MA, Malik A, McFarland EG, Elisseeff JH (2003) Experimental model for cartilage tissue engineering to regenerate the zonal organization of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 653-664.
303. Burdick JA, Anseth KS (2002) Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials* 23: 4315-4323.
304. Prestwich GD, Erickson IE, Zarembinski TI, West M, Tew WP (2012) The translational imperative: making cell therapy simple and effective. *Acta Biomater* 8: 4200-4207.
305. Chung C, Burdick JA (2009) Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Tissue Eng Part A* 15: 243-254.
306. Maleski MP, Knudson CB (1996) Hyaluronan-mediated aggregation of limb bud mesenchyme and mesenchymal condensation during chondrogenesis. *Exp Cell Res* 225: 55-66.
307. Knudson W, Aguiar DJ, Hua Q, Knudson CB (1996) CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: an ultrastructural and biochemical analysis. *Exp Cell Res* 228: 216-228.
308. Chow G, Knudson CB, Homandberg G, Knudson W (1995) Increased expression of CD44 in bovine articular chondrocytes by catabolic cellular mediators. *J Biol Chem* 270: 27734-27741.
309. Knudson W, Loeser RF (2002) CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 59: 36-44.
310. Wu SC, Chen CH, Chang JK, Fu YC, Wang CK, Eswaramoorthy R, Lin YS, Wang YH, Lin SY, Wang GJ, Ho ML (2013) Hyaluronan initiates chondrogenesis mainly via CD44 in human adipose derived stem cells. *J Appl Physiol*.

311. Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF (2005) FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 203: 398-409.
312. Gandhi NS, Mancera RL (2008) The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des* 72: 455-482.
313. Nguyen LH, Kudva AK, Guckert NL, Linse KD, Roy K (2011) Unique biomaterial compositions direct bone marrow stem cells into specific chondrocytic phenotypes corresponding to the various zones of articular cartilage. *Biomaterials* 32: 1327-1338.
314. Varghese S, Hwang NS, Canver AC, Theprungsirikul P, Lin DW, Elisseeff J (2008) Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biol* 27: 12-21.
315. Mo X, An Y, Yun CS, Yu SM (2006) Nanoparticle-assisted visualization of binding interactions between collagen mimetic peptide and collagen fibers. *Angew Chem Int Ed Engl* 45: 2267-2270.
316. Wang AY, Mo X, Chen CS, Yu SM (2005) Facile modification of collagen directed by collagen mimetic peptides. *J Am Chem Soc* 127: 4130-4131.
317. Lee HJ, Lee JS, Chansakul T, Yu C, Elisseeff JH, Yu SM (2006) Collagen mimetic peptide-conjugated photopolymerizable PEG hydrogel. *Biomaterials* 27: 5268-5276.
318. Kwon HJ, Yasuda K, Ohmiya Y, Honma K, Chen YM, Gong JP (2010) In vitro differentiation of chondrogenic ATDC5 cells is enhanced by culturing on synthetic hydrogels with various charge densities. *Acta Biomater* 6: 494-501.
319. Handschel JG, Depprich RA, Kubler NR, Wiesmann HP, Ommernborn M, Meyer U (2007) Prospects of micromass culture technology in tissue engineering. *Head Face Med* 3: 4.
320. Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI (1991) In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res* 195: 492-503.
321. Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Ishiguro T, Okumura M, Iwanaga T, Kadosawa T, Fujinaga T (2004) Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Exp Hematol* 32: 502-509.
322. Zhang Z, McCaffery JM, Spencer RG, Francomano CA (2004) Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *J Anat* 205: 229-237.
323. Martinez I, Elvenes J, Olsen R, Bertheussen K, Johansen O (2008) Redifferentiation of in vitro expanded adult articular chondrocytes by combining the hanging-drop cultivation method with hypoxic environment. *Cell Transplant* 17: 987-996.
324. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM (1987) Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236: 799-806.
325. Edelman GM, Murray BA, Mege RM, Cunningham BA, Gallin WJ (1987) Cellular expression of liver and neural cell adhesion molecules after transfection with their cDNAs results in specific cell-cell binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 8502-8506.
326. Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C (2011) Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* 15: 1239-1253.
327. Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A (2010) Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7: 150-161.
328. Maes C, Carmeliet G, Schipani E (2012) Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease. *Nat Rev Rheumatol* 8: 358-366.

329. Bunn HF, Poyton RO (1996) Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* 76: 839-885.
330. Schmidt JV, Bradfield CA (1996) Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 55-89.
331. Hirose K, Morita M, Ema M, Mimura J, Hamada H, Fujii H, Saijo Y, Gotoh O, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (1996) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol Cell Biol* 16: 1706-1713.
332. Sekine H, Mimura J, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y (2006) Unique and overlapping transcriptional roles of arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) and Arnt2 in xenobiotic and hypoxic responses. *J Biol Chem* 281: 37507-37516.
333. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5510-5514.
334. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y (1997) A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4273-4278.
335. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL (1997) Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 272: 19253-19260.
336. Tian H, McKnight SL, Russell DW (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11: 72-82.
337. Crews ST (1998) Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev* 12: 607-620.
338. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7987-7992.
339. Maemura K, Hsieh CM, Jain MK, Fukumoto S, Layne MD, Liu Y, Kourembanas S, Yet SF, Perrella MA, Lee ME (1999) Generation of a dominant-negative mutant of endothelial PAS domain protein 1 by deletion of a potent C-terminal transactivation domain. *J Biol Chem* 274: 31565-31570.
340. Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *Embo J* 17: 6573-6586.
341. Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC (2007) The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. *Mol Biol Cell* 18: 4528-4542.
342. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC (2003) Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 23: 9361-9374.
343. Gaber T, Dziurla R, Tripmacher R, Burmester GR, Buttgerit F (2005) Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O₂! See what HIF can do! *Ann Rheum Dis* 64: 971-980.
344. Semenza GL, Neifelt MK, Chi SM, Antonarakis SE (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5680-5684.
345. Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y (1999) Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *Embo J* 18: 1905-1914.
346. Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM (1996) An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12969-12973.

347. Yoon H, Lim JH, Cho CH, Huang LE, Park JW (2011) CITED2 controls the hypoxic signaling by snatching p300 from the two distinct activation domains of HIF-1alpha. *Biochim Biophys Acta* 1813: 2008-2016.
348. Agrawal A, Gajghate S, Smith H, Anderson DG, Albert TJ, Shapiro IM, Risbud MV (2008) Cited2 modulates hypoxia-inducible factor-dependent expression of vascular endothelial growth factor in nucleus pulposus cells of the rat intervertebral disc. *Arthritis Rheum* 58: 3798-3808.
349. Bhattacharya S, Michels CL, Leung MK, Arany ZP, Kung AL, Livingston DM (1999) Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev* 13: 64-75.
350. Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L (2000) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* 20: 402-415.
351. Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL (2007) RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell* 25: 207-217.
352. Chun YS, Choi E, Kim TY, Kim MS, Park JW (2002) A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible factor-1alpha gene. *Biochem J* 362: 71-79.
353. Gothie E, Richard DE, Berra E, Pages G, Pouyssegur J (2000) Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 275: 6922-6927.
354. Karuppagounder SS, Ratan RR (2012) Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition: robust new target or another big bust for stroke therapeutics? *J Cereb Blood Flow Metab* 32: 1347-1361.
355. Sperandio S, Fortin J, Sasik R, Robitaille L, Corbeil J, de Belle I (2009) The transcription factor Egr1 regulates the HIF-1alpha gene during hypoxia. *Mol Carcinog* 48: 38-44.
356. Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, Gorlach A (2007) Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 18: 4691-4697.
357. Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF, Abdellatif M (2009) Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res* 104: 879-886.
358. Taguchi A, Yanagisawa K, Tanaka M, Cao K, Matsuyama Y, Goto H, Takahashi T (2008) Identification of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster. *Cancer Res* 68: 5540-5545.
359. Rossignol F, de Laplanche E, Mounier R, Bonnefont J, Cayre A, Godinot C, Simonnet H, Clottes E (2004) Natural antisense transcripts of HIF-1alpha are conserved in rodents. *Gene* 339: 121-130.
360. Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, Clerici C (2004) Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J Biol Chem* 279: 14871-14878.
361. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. (2001) HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 292: 464-468.
362. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468-472.
363. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 20: 5197-5206.

364. Freedman SJ, Sun ZY, Poy F, Kung AL, Livingston DM, Wagner G, Eck MJ (2002) Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5367-5372.
365. Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Schofield CJ (2004) Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J* 383: 429-437.
366. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK (2002) FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16: 1466-1471.
367. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW (2002) Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111: 709-720.
368. Baek JH, Liu YV, McDonald KR, Wesley JB, Zhang H, Semenza GL (2007) Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase-1 binds to hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and RACK1 and promotes ubiquitination and degradation of HIF-1 α . *J Biol Chem* 282: 33358-33366.
369. Dioum EM, Chen R, Alexander MS, Zhang Q, Hogg RT, Gerard RD, Garcia JA (2009) Regulation of hypoxia-inducible factor 2 α signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science* 324: 1289-1293.
370. Laemmle A, Lechleiter A, Roh V, Schwarz C, Portmann S, Furer C, Keogh A, Tschan MP, Candinas D, Vorburger SA, Stroka D (2012) Inhibition of SIRT1 impairs the accumulation and transcriptional activity of HIF-1 α protein under hypoxic conditions. *PLoS One* 7: e33433.
371. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, Georgatsou E, Bonanou S, Simos G (2006) Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* 281: 33095-33106.
372. Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 274: 32631-32637.
373. Koh MY, Darnay BG, Powis G (2008) Hypoxia-associated factor, a novel E3-ubiquitin ligase, binds and ubiquitinates hypoxia-inducible factor 1 α , leading to its oxygen-independent degradation. *Mol Cell Biol* 28: 7081-7095.
374. Bento CF, Fernandes R, Ramalho J, Marques C, Shang F, Taylor A, Pereira P (2010) The chaperone-dependent ubiquitin ligase CHIP targets HIF-1 α for degradation in the presence of methylglyoxal. *PLoS One* 5: e15062.
375. Luo W, Zhong J, Chang R, Hu H, Pandey A, Semenza GL (2010) Hsp70 and CHIP selectively mediate ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α but not HIF-2 α . *J Biol Chem* 285: 3651-3663.
376. Liu YV, Hubbi ME, Pan F, McDonald KR, Mansharamani M, Cole RN, Liu JO, Semenza GL (2007) Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1 α expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization. *J Biol Chem* 282: 37064-37073.
377. Minet E, Ernest I, Michel G, Roland I, Remacle J, Raes M, Michiels C (1999) HIF1A gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located upstream from the transcription initiation site and cis elements located within the 5'UTR. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 534-540.
378. Iyer NV, Leung SW, Semenza GL (1998) The human hypoxia-inducible factor 1 α gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics* 52: 159-165.
379. Bruick RK, McKnight SL (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294: 1337-1340.

380. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107: 43-54.
381. Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2005) Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 617-626.
382. Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadle JM (2004) Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 279: 38458-38465.
383. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399: 271-275.
384. Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM, Ratcliffe PJ, Pugh CW, Schofield CJ (2002) Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem* 277: 26351-26355.
385. Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J (2004) Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem* 279: 9899-9904.
386. Kaelin WG, Jr. (2005) The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 627-638.
387. Sutter CH, Laughner E, Semenza GL (2000) Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4748-4753.
388. Chen R, Dioum EM, Hogg RT, Gerard RD, Garcia JA (2011) Hypoxia increases sirtuin 1 expression in a hypoxia-inducible factor-dependent manner. *J Biol Chem* 286: 13869-13878.
389. Holmberg CI, Tran SE, Eriksson JE, Sistonen L (2002) Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends Biochem Sci* 27: 619-627.
390. Wei W, Yu XD (2007) Hypoxia-inducible factors: crosstalk between their protein stability and protein degradation. *Cancer Lett* 257: 145-156.
391. Chen S, Sang N Histone deacetylase inhibitors: the epigenetic therapeutics that repress hypoxia-inducible factors. *J Biomed Biotechnol* 2011: 197946.
392. Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, Liu S, Yan B, Huang Q, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Li CY (2007) Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol Cell* 26: 63-74.
393. Ryu JH, Li SH, Park HS, Park JW, Lee B, Chun YS (2011) Hypoxia-inducible factor alpha subunit stabilization by NEDD8 conjugation is reactive oxygen species-dependent. *J Biol Chem* 286: 6963-6970.
394. Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ, Kim KW (2004) Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 394-400.
395. van Hagen M, Overmeer RM, Abolvardi SS, Vertegaal AC (2010) RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic Acids Res* 38: 1922-1931.
396. Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E (2007) RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. *Cell* 131: 309-323.
397. Ulrich HD (2007) SUMO teams up with ubiquitin to manage hypoxia. *Cell* 131: 446-447.

398. Koh MY, Lemos R, Jr., Liu X, Powis G (2011) The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1alpha- to HIF-2alpha-dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res* 71: 4015-4027.
399. Makino Y, Uenishi R, Okamoto K, Isoe T, Hosono O, Tanaka H, Kanopka A, Poellinger L, Haneda M, Morimoto C (2007) Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells. *J Biol Chem* 282: 14073-14082.
400. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA (1998) Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 7: 205-213.
401. Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EH, Kondo Y, Hara S, Conaway RC, Conaway JW, Ohh M (2003) Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem* 278: 11032-11040.
402. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L (2002) Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. *J Biol Chem* 277: 32405-32408.
403. Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T, Hara S, Jewett MA, Ohh M (2005) Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J* 19: 1396-1406.
404. Maynard MA, Evans AJ, Shi W, Kim WY, Liu FF, Ohh M (2007) Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle* 6: 2810-2816.
405. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 271: 32253-32259.
406. Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, Semenza GL (1998) Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol* 275: L818-826.
407. Lofstedt T, Fredlund E, Holmquist-Mengelbier L, Pietras A, Ovenberger M, Poellinger L, Pahlman S (2007) Hypoxia inducible factor-2alpha in cancer. *Cell Cycle* 6: 919-926.
408. Domm C, Schunke M, Christesen K, Kurz B (2002) Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 13-22.
409. Egli RJ, Bastian JD, Ganz R, Hofstetter W, Leunig M (2008) Hypoxic expansion promotes the chondrogenic potential of articular chondrocytes. *J Orthop Res* 26: 977-985.
410. Malda J, van Blitterswijk CA, van Geffen M, Martens DE, Tramper J, Riesle J (2004) Low oxygen tension stimulates the redifferentiation of dedifferentiated adult human nasal chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 306-313.
411. Murphy CL, Polak JM (2004) Control of human articular chondrocyte differentiation by reduced oxygen tension. *J Cell Physiol* 199: 451-459.
412. Thoms BL, Dudek KA, Lafont JE, Murphy CL (2013) Hypoxia promotes production and inhibits destruction of human articular cartilage. *Arthritis Rheum.*
413. Duval E, Leclercq S, Elissalde JM, Demoor M, Galera P, Boumediene K (2009) Hypoxia-inducible factor 1alpha inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent redifferentiation of chondrocytes. *Arthritis Rheum* 60: 3038-3048.
414. Amarilio R, Viukov SV, Sharir A, Eshkar-Oren I, Johnson RS, Zelzer E (2007) HIF1alpha regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development* 134: 3917-3928.

415. Robins JC, Akeno N, Mukherjee A, Dalal RR, Aronow BJ, Koopman P, Clemens TL (2005) Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal cells in association with transcriptional activation of Sox9. *Bone* 37: 313-322.
416. Schipani E (2010) Posttranslational modifications of collagens as targets of hypoxia and Hif-1alpha in endochondral bone development. *Ann N Y Acad Sci* 1192: 317-321.
417. Myllyharju J, Schipani E (2010) Extracellular matrix genes as hypoxia-inducible targets. *Cell Tissue Res* 339: 19-29.
418. Horino Y, Takahashi S, Miura T, Takahashi Y (2002) Prolonged hypoxia accelerates the posttranscriptional process of collagen synthesis in cultured fibroblasts. *Life Sci* 71: 3031-3045.
419. Perhonen M, Wang W, Han X, Ruskoaho H, Takala TE (1997) Right ventricular collagen type III and IV gene expression increases during early phases of endurance training in hypobaric hypoxic condition. *Basic Res Cardiol* 92: 299-309.
420. Hirsila M, Koivunen P, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J (2003) Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 278: 30772-30780.
421. Bentovim L, Amarilio R, Zelzer E (2012) HIF1alpha is a central regulator of collagen hydroxylation and secretion under hypoxia during bone development. *Development* 139: 4473-4483.
422. Aro E, Khatri R, Gerard-O'Riley R, Mangiavini L, Myllyharju J, Schipani E (2012) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) but not HIF-2 is essential for hypoxic induction of collagen prolyl 4-hydroxylases in primary newborn mouse epiphyseal growth plate chondrocytes. *J Biol Chem* 287: 37134-37144.
423. Ghone NV, Grayson WL (2012) Recapitulation of mesenchymal condensation enhances in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*.
424. Muller J, Benz K, Ahlers M, Gaissmaier C, Mollenhauer J (2011) Hypoxic conditions during expansion culture prime human mesenchymal stromal precursor cells for chondrogenic differentiation in three-dimensional cultures. *Cell Transplant* 20: 1589-1602.
425. Markway BD, Tan GK, Brooke G, Hudson JE, Cooper-White JJ, Doran MR (2010) Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplant* 19: 29-42.
426. Morita K, Miyamoto T, Fujita N, Kubota Y, Ito K, Takubo K, Miyamoto K, Ninomiya K, Suzuki T, Iwasaki R, Yagi M, Takaishi H, Toyama Y, Suda T (2007) Reactive oxygen species induce chondrocyte hypertrophy in endochondral ossification. *J Exp Med* 204: 1613-1623.
427. Ronziere MC, Perrier E, Mallein-Gerin F, Freyria AM (2010) Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng* 20: 145-158.
428. Carrancio S, Lopez-Holgado N, Sanchez-Guijo FM, Villaron E, Barbado V, Tabera S, Diez-Campelo M, Blanco J, San Miguel JF, Del Canizo MC (2008) Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol* 36: 1014-1021.
429. Das R, Jahr H, van Osch GJ, Farrell E (2010) The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. *Tissue Eng Part B Rev* 16: 159-168.
430. Kanichai M, Ferguson D, Prendergast PJ, Campbell VA (2008) Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: a role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha. *J Cell Physiol* 216: 708-715.
431. Hirao M, Tamai N, Tsumaki N, Yoshikawa H, Myoui A (2006) Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J Biol Chem* 281: 31079-31092.
432. Duval E, Bauge C, Andriamanalijaona R, Benateau H, Leclercq S, Dutoit S, Poulain L, Galera P, Boumediene K (2012) Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in in vivo cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 33: 6042-6051.

433. Kawato Y, Hirao M, Ebina K, Shi K, Hashimoto J, Honjo Y, Yoshikawa H, Myoui A (2012) Nkx3.2 promotes primary chondrogenic differentiation by upregulating col2a1 transcription. *PLoS One* 7: e34703.
434. Kawato Y, Hirao M, Ebina K, Tamai N, Shi K, Hashimoto J, Yoshikawa H, Myoui A (2011) Nkx3.2-induced suppression of Runx2 is a crucial mediator of hypoxia-dependent maintenance of chondrocyte phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 416: 205-210.
435. Koh MY, Powis G (2012) Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci* 37: 364-372.
436. Stewart AJ, Houston B, Farquharson C (2006) Elevated expression of hypoxia inducible factor-2alpha in terminally differentiating growth plate chondrocytes. *J Cell Physiol* 206: 435-440.
437. Yang S, Kim J, Ryu JH, Oh H, Chun CH, Kim BJ, Min BH, Chun JS (2011) Hypoxia-inducible factor-2alpha is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction. *Nat Med* 16: 687-693.
438. Ahmed TA, Hincke MT (2010) Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration. *Tissue Eng Part B Rev* 16: 305-329.
439. Gigout A, Jolicoeur M, Buschmann MD (2005) Low calcium levels in serum-free media maintain chondrocyte phenotype in monolayer culture and reduce chondrocyte aggregation in suspension culture. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 1012-1024.
440. Temu TM, Wu KY, Gruppiso PA, Phornphutkul C (2010) The mechanism of ascorbic acid-induced differentiation of ATDC5 chondrogenic cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E325-334.
441. Hering TM, Kollar J, Huynh TD, Varelas JB, Sandell LJ (1994) Modulation of extracellular matrix gene expression in bovine high-density chondrocyte cultures by ascorbic acid and enzymatic resuspension. *Arch Biochem Biophys* 314: 90-98.
442. Torres ES, Andrade CV, Fonseca EC, Mello MA, Duarte ME (2003) Insulin impairs the maturation of chondrocytes in vitro. *Braz J Med Biol Res* 36: 1185-1192.
443. Takano T, Takigawa M, Suzuki F (1985) Stimulation by glucocorticoids of the differentiated phenotype of chondrocytes and the proliferation of rabbit costal chondrocytes in culture. *J Biochem* 97: 1093-1100.
444. Awad HA, Halvorsen YD, Gimble JM, Guilak F (2003) Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng* 9: 1301-1312.
445. Sekiya I, Koopman P, Tsuji K, Mertin S, Harley V, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M (2001) Dexamethasone enhances SOX9 expression in chondrocytes. *J Endocrinol* 169: 573-579.
446. Derfoul A, Perkins GL, Hall DJ, Tuan RS (2006) Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells* 24: 1487-1495.
447. Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, Payette JN, Wang J, Bouchez LC, Meeusen S, Althage A, Cho CY, Wu X, Schultz PG (2012) A Stem Cell-Based Approach to Cartilage Repair. *Science*.
448. Cleary MA, van Osch GJ, Brama PA, Hellingman CA, Narcisi R (2013) FGF, TGFbeta and Wnt crosstalk: embryonic to in vitro cartilage development from mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*.
449. de Caestecker M (2004) The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 1-11.
450. Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425: 577-584.
451. Sakou T, Onishi T, Yamamoto T, Nagamine T, Sampath T, Ten Dijke P (1999) Localization of Smads, the TGF-beta family intracellular signaling components during endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 14: 1145-1152.

452. Minina E, Schneider S, Rosowski M, Lauster R, Vortkamp A (2005) Expression of Fgf and Tgfbeta signaling related genes during embryonic endochondral ossification. *Gene Expr Patterns* 6: 102-109.
453. Pogue R, Lyons K (2006) BMP signaling in the cartilage growth plate. *Curr Top Dev Biol* 76: 1-48.
454. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, Hozack WJ, Danielson KG, Hall DJ, Tuan RS (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.
455. Furumatsu T, Ozaki T, Asahara H (2009) Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1198-1204.
456. Oka K, Oka S, Hosokawa R, Bringas P, Jr., Brockhoff HC, 2nd, Nonaka K, Chai Y (2008) TGF-beta mediated Dlx5 signaling plays a crucial role in osteo-chondroprogenitor cell lineage determination during mandible development. *Dev Biol* 321: 303-309.
457. Ferguson CM, Schwarz EM, Reynolds PR, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ (2000) Smad2 and 3 mediate transforming growth factor-beta1-induced inhibition of chondrocyte maturation. *Endocrinology* 141: 4728-4735.
458. Yang X, Chen L, Xu X, Li C, Huang C, Deng CX (2001) TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol* 153: 35-46.
459. van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, Blom A, van den Berg WB (2009) TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis Cartilage* 17: 1539-1545.
460. Retting KN, Song B, Yoon BS, Lyons KM (2009) BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Development* 136: 1093-1104.
461. Horiki M, Imamura T, Okamoto M, Hayashi M, Murai J, Myoui A, Ochi T, Miyazono K, Yoshikawa H, Tsumaki N (2004) Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia. *J Cell Biol* 165: 433-445.
462. Hellingman CA, Davidson EN, Koevoet W, Vitters EL, van den Berg WB, van Osch GJ, van der Kraan PM (2011) Smad signaling determines chondrogenic differentiation of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: inhibition of Smad1/5/8P prevents terminal differentiation and calcification. *Tissue Eng Part A* 17: 1157-1167.
463. Leboy P, Grasso-Knight G, D'Angelo M, Volk SW, Lian JV, Drissi H, Stein GS, Adams SL (2001) Smad-Runx interactions during chondrocyte maturation. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1: S15-22.
464. Miyazono K, Maeda S, Imamura T (2004) Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF-beta superfamily and Runx proteins. *Oncogene* 23: 4232-4237.
465. Javed A, Afzal F, Bae JS, Gutierrez S, Zaidi K, Pratap J, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB (2009) Specific residues of RUNX2 are obligatory for formation of BMP2-induced RUNX2-SMAD complex to promote osteoblast differentiation. *Cells Tissues Organs* 189: 133-137.
466. Javed A, Bae JS, Afzal F, Gutierrez S, Pratap J, Zaidi SK, Lou Y, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB (2008) Structural coupling of Smad and Runx2 for execution of the BMP2 osteogenic signal. *J Biol Chem* 283: 8412-8422.
467. Puetzer JL, Petitte JN, Lobo EG (2010) Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng Part B Rev* 16: 435-444.
468. Freyria AM, Mallein-Gerin F (2011) Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. *Injury* 43: 259-265.

469. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ (2005) Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 320: 269-276.
470. Lengner CJ, Hassan MQ, Serra RW, Lepper C, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Stein GS (2005) Nkx3.2-mediated repression of Runx2 promotes chondrogenic differentiation. *J Biol Chem* 280: 15872-15879.
471. Caron MM, Emans PJ, Cremers A, Surtel DA, Coolen MM, van Rhijn LW, Welting TJ (2013) Hypertrophic differentiation during chondrogenic differentiation of progenitor cells is stimulated by BMP-2 but suppressed by BMP-7. *Osteoarthritis Cartilage* 21: 604-613.
472. Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B, Wuisman PI, Klein-Nulend J (2006) Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 902-908.
473. Hennig T, Lorenz H, Thiel A, Goetzke K, Dickhut A, Geiger F, Richter W (2007) Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *J Cell Physiol* 211: 682-691.
474. Itoh N (2010) Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Res* 342: 1-11.
475. Ornitz DM, Itoh N (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2: REVIEWS3005.
476. Henson FM, Bowe EA, Davies ME (2005) Promotion of the intrinsic damage-repair response in articular cartilage by fibroblastic growth factor-2. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 537-544.
477. Stevens MM, Marini RP, Martin I, Langer R, Prasad Shastri V (2004) FGF-2 enhances TGF-beta1-induced periosteal chondrogenesis. *J Orthop Res* 22: 1114-1119.
478. Veilleux N, Spector M (2005) Effects of FGF-2 and IGF-1 on adult canine articular chondrocytes in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 278-286.
479. Murakami S, Kan M, McKeehan WL, de Crombrughe B (2000) Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1113-1118.
480. Solchaga LA, Penick K, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF (2010) Fibroblast growth factor-2 enhances proliferation and delays loss of chondrogenic potential in human adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 16: 1009-1019.
481. Khan WS, Tew SR, Adesida AB, Hardingham TE (2008) Human infrapatellar fat pad-derived stem cells express the pericyte marker 3G5 and show enhanced chondrogenesis after expansion in fibroblast growth factor-2. *Arthritis Res Ther* 10: R74.
482. Chiou M, Xu Y, Longaker MT (2006) Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 644-652.
483. Praul CA, Ford BC, Leach RM (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.
484. Dupont J, Holzenberger M (2003) Biology of insulin-like growth factors in development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69: 257-271.
485. Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Lajeunesse D, Pelletier JP (1998) IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis. *Inflamm Res* 47: 90-100.
486. Davies LC, Blain EJ, Gilbert SJ, Caterson B, Duan VC (2008) The potential of IGF-1 and TGFbeta1 for promoting "adult" articular cartilage repair: an in vitro study. *Tissue Eng Part A* 14: 1251-1261.
487. Sah RL, Chen AC, Grodzinsky AJ, Trippel SB (1994) Differential effects of bFGF and IGF-I on matrix metabolism in calf and adult bovine cartilage explants. *Arch Biochem Biophys* 308: 137-147.

488. Schalkwijk J, Joosten LA, van den Berg WB, van de Putte LB (1989) Chondrocyte nonresponsiveness to insulin-like growth factor 1 in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 32: 894-900.
489. Tyler JA (1989) Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem J* 260: 543-548.
490. Oh CD, Chun JS (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.
491. Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE (2006) A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 403-412.
492. Kiepe D, Andress DL, Mohan S, Standker L, Ulinski T, Himmele R, Mehls O, Tonshoff B (2001) Intact IGF-binding protein-4 and -5 and their respective fragments isolated from chronic renal failure serum differentially modulate IGF-I actions in cultured growth plate chondrocytes. *J Am Soc Nephrol* 12: 2400-2410.
493. Kiepe D, Ulinski T, Powell DR, Durham SK, Mehls O, Tonshoff B (2002) Differential effects of insulin-like growth factor binding proteins-1, -2, -3, and -6 on cultured growth plate chondrocytes. *Kidney Int* 62: 1591-1600.
494. Kobayashi T, Chung UI, Schipani E, Starbuck M, Karsenty G, Katagiri T, Goad DL, Lanske B, Kronenberg HM (2002) PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps. *Development* 129: 2977-2986.
495. Guo J, Chung UI, Kondo H, Bringham FR, Kronenberg HM (2002) The PTH/PTHrP receptor can delay chondrocyte hypertrophy in vivo without activating phospholipase C. *Dev Cell* 3: 183-194.
496. Kim YJ, Kim HJ, Im GI (2008) PTHrP promotes chondrogenesis and suppresses hypertrophy from both bone marrow-derived and adipose tissue-derived MSCs. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 104-108.
497. Fischer J, Dickhut A, Rickert M, Richter W (2010) Human articular chondrocytes secrete parathyroid hormone-related protein and inhibit hypertrophy of mesenchymal stem cells in coculture during chondrogenesis. *Arthritis Rheum* 62: 2696-2706.
498. Kawano Y, Kypta R (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116: 2627-2634.
499. Macsai CE, Foster BK, Xian CJ (2008) Roles of Wnt signalling in bone growth, remodelling, skeletal disorders and fracture repair. *J Cell Physiol* 215: 578-587.
500. Church V, Nohno T, Linker C, Marcelle C, Francis-West P (2002) Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J Cell Sci* 115: 4809-4818.
501. Rudnicki JA, Brown AM (1997) Inhibition of chondrogenesis by Wnt gene expression in vivo and in vitro. *Dev Biol* 185: 104-118.
502. Dong YF, Soung do Y, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Drissi H (2006) Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *J Cell Physiol* 208: 77-86.
503. Ling L, Nurcombe V, Cool SM (2009) Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene* 433: 1-7.
504. Lane Smith R, Trindade MC, Ikenoue T, Mohtai M, Das P, Carter DR, Goodman SB, Schurman DJ (2000) Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism. *Biorheology* 37: 95-107.
505. Carter DR, Beaupre GS, Wong M, Smith RL, Andriacchi TP, Schurman DJ (2004) The mechanobiology of articular cartilage development and degeneration. *Clin Orthop Relat Res*: S69-77.
506. Sundaramurthy S, Mao JJ (2006) Modulation of endochondral development of the distal femoral condyle by mechanical loading. *J Orthop Res* 24: 229-241.
507. Arokoski JP, Jurvelin JS, Vaatainen U, Helminen HJ (2000) Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand J Med Sci Sports* 10: 186-198.

508. Kisiday JD, Frisbie DD, McIlwraith CW, Grodzinsky AJ (2009) Dynamic compression stimulates proteoglycan synthesis by mesenchymal stem cells in the absence of chondrogenic cytokines. *Tissue Eng Part A* 15: 2817-2824.
509. Shieh AC, Athanasiou KA (2003) Principles of cell mechanics for cartilage tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 31: 1-11.
510. Bian L, Zhai DY, Zhang EC, Mauck RL, Burdick JA (2012) Dynamic compressive loading enhances cartilage matrix synthesis and distribution and suppresses hypertrophy in hMSC-laden hyaluronic acid hydrogels. *Tissue Eng Part A* 18: 715-724.
511. Campbell JJ, Lee DA, Bader DL (2006) Dynamic compressive strain influences chondrogenic gene expression in human mesenchymal stem cells. *Biorheology* 43: 455-470.
512. Huang CY, Hagar KL, Frost LE, Sun Y, Cheung HS (2004) Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22: 313-323.
513. 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.
514. Yang X, Vezeridis PS, Nicholas B, Crisco JJ, Moore DC, Chen Q (2006) Differential expression of type X collagen in a mechanically active 3-D chondrocyte culture system: a quantitative study. *J Orthop Surg Res* 1: 15.
515. Suga H, Matsumoto D, Eto H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Yoshimura K (2009) Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev* 18: 1201-1210.
516. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM (2006) Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 24: 376-385.
517. Astori G, Vignati F, Bardelli S, Tubio M, Gola M, Albertini V, Bambi F, Scali G, Castelli D, Rasini V, Soldati G, Moccetti T (2007) "In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med* 5: 55.
518. Maumus M, Peyrafitte JA, D'Angelo R, Fournier-Wirth C, Bouloumie A, Casteilla L, Sengenès C, Bourin P (2011) Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)* 35: 1141-1153.
519. Woods A, Wang G, Beier F (2007) Regulation of chondrocyte differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions. *J Cell Physiol* 213: 1-8.
520. Benoit DS, Schwartz MP, Durney AR, Anseth KS (2008) Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells. *Nat Mater* 7: 816-823.
521. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW (2009) Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 324: 1673-1677.
522. Prante C, Bieback K, Funke C, Schon S, Kern S, Kuhn J, Gastens M, Kleesiek K, Gotting C (2006) The formation of extracellular matrix during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells correlates with increased levels of xylosyltransferase I. *Stem Cells* 24: 2252-2261.
523. Estes BT, Guilak F (2012) Three-dimensional culture systems to induce chondrogenesis of adipose-derived stem cells. *Methods Mol Biol* 702: 201-217.
524. Merceron C, Vinatier C, Portron S, Masson M, Amiaud J, Guigand L, Cherel Y, Weiss P, Guicheux J (2010) Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C355-364.

525. Meretoja VV, Dahlin RL, Wright S, Kasper FK, Mikos AG (2013) The effect of hypoxia on the chondrogenic differentiation of co-cultured articular chondrocytes and mesenchymal stem cells in scaffolds. *Biomaterials* 34: 4266-4273.
526. Sheehy EJ, Buckley CT, Kelly DJ (2012) Oxygen tension regulates the osteogenic, chondrogenic and endochondral phenotype of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 305-310.
527. Merceron C, Portron S, Masson M, Lesoeur J, Fellah BH, Gauthier O, Geffroy O, Weiss P, Guicheux J, Vinatier C (2011) The effect of two- and three-dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel. *Cell Transplant* 20: 1575-1588.
528. Owen JR, Wayne JS (2006) Influence of a superficial tangential zone over repairing cartilage defects: implications for tissue engineering. *Biomech Model Mechanobiol* 5: 102-110.
529. Shirazi R, Shirazi-Adl A, Hurtig M (2008) Role of cartilage collagen fibrils networks in knee joint biomechanics under compression. *J Biomech* 41: 3340-3348.
530. Angele P, Yoo JU, Smith C, Mansour J, Jepsen KJ, Nerlich M, Johnstone B (2003) Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J Orthop Res* 21: 451-457.
531. Huang AH, Farrell MJ, Kim M, Mauck RL (2010) Long-term dynamic loading improves the mechanical properties of chondrogenic mesenchymal stem cell-laden hydrogel. *Eur Cell Mater* 19: 72-85.
532. Coleman CM, Vaughan EE, Browe DC, Mooney E, Howard L, Barry FP (2013) Growth Differentiation Factor-5 Enhances In Vitro Mesenchymal Stromal Cell Chondrogenesis and Hypertrophy. *Stem Cells Dev*.
533. Ichinose S, Tagami M, Muneta T, Sekiya I (2005) Morphological examination during in vitro cartilage formation by human mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 322: 217-226.
534. Steinert AF, Proffen B, Kunz M, Hendrich C, Ghivizzani SC, Noth U, Rethwilm A, Eulert J, Evans CH (2009) Hypertrophy is induced during the in vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene transfer. *Arthritis Res Ther* 11: R148.
535. Atsumi T, Miwa Y, Kimata K, Ikawa Y (1990) A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell Differ Dev* 30: 109-116.
536. Shukunami C, Ishizeki K, Atsumi T, Ohta Y, Suzuki F, Hiraki Y (1997) Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro. *J Bone Miner Res* 12: 1174-1188.
537. Chun YS, Choi E, Kim GT, Choi H, Kim CH, Lee MJ, Kim MS, Park JW (2000) Cadmium blocks hypoxia-inducible factor (HIF)-1-mediated response to hypoxia by stimulating the proteasome-dependent degradation of HIF-1alpha. *Eur J Biochem* 267: 4198-4204.
538. Mabeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS, Willard MT, Zhong H, Simons JW, Giannakakou P (2003) 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 3: 363-375.
539. Husa M, Liu-Bryan R, Terkeltaub R (2011) Shifting HIFs in osteoarthritis. *Nat Med* 16: 641-644.
540. Saito T, Kawaguchi H (2010) HIF-2alpha as a possible therapeutic target of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 1552-1556.
541. Penc SF, Pomahac B, Winkler T, Dorschner RA, Eriksson E, Herndon M, Gallo RL (1998) Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J Biol Chem* 273: 28116-28121.

542. Park JS, Woo DG, Yang HN, Lim HJ, Chung HM, Park KH (2008) Heparin-bound transforming growth factor-beta3 enhances neocartilage formation by rabbit mesenchymal stem cells. *Transplantation* 85: 589-596.
543. San Antonio JD, Winston BM, Tuan RS (1987) Regulation of chondrogenesis by heparan sulfate and structurally related glycosaminoglycans. *Dev Biol* 123: 17-24.
544. Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg JO (2011) Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J* 278: 28-45.
545. Vinardell T, Sheehy EJ, Buckley CT, Kelly DJ (2012) A comparison of the functionality and in vivo phenotypic stability of cartilaginous tissues engineered from different stem cell sources. *Tissue Eng Part A* 18: 1161-1170.
546. Mochizuki T, Muneta T, Sakaguchi Y, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I (2006) Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis Rheum* 54: 843-853.
547. Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T (2006) In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem* 97: 84-97.
548. Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya I (2008) Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res* 333: 207-215.
549. Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP (2003) Microenvironment and phenotypic stability specify tissue formation by human articular cartilage-derived cells in vivo. *Exp Cell Res* 287: 16-27.
550. Williams R, Khan IM, Richardson K, Nelson L, McCarthy HE, Analbelsi T, Singhrao SK, Dowthwaite GP, Jones RE, Baird DM, Lewis H, Roberts S, Shaw HM, Dudhia J, Fairclough J, Briggs T, Archer CW (2010) Identification and clonal characterisation of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage. *PLoS One* 5: e13246.
551. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M (2002) Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 18: 730-734.
552. Shelbourne KD, Jari S, Gray T (2003) Outcome of untreated traumatic articular cartilage defects of the knee: a natural history study. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 2: 8-16.
553. Aroen A, Loken S, Heir S, Alvik E, Ekeland A, Granlund OG, Engebretsen L (2004) Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med* 32: 211-215.
554. Hardaker WT, Jr., Garrett WE, Jr., Bassett FH, 3rd (1990) Evaluation of acute traumatic hemarthrosis of the knee joint. *South Med J* 83: 640-644.
555. Samuels J, Krasnokutsky S, Abramson SB (2008) Osteoarthritis: a tale of three tissues. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 66: 244-250.
556. Rannou F, Sellam J, Berenbaum F (2010) [Pathophysiology of osteoarthritis: updated concepts]. *Presse Med* 39: 1159-1163.
557. Wehling N, Palmer GD, Pilapil C, Liu F, Wells JW, Muller PE, Evans CH, Porter RM (2009) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF-kappaB-dependent pathways. *Arthritis Rheum* 60: 801-812.
558. Majumdar MK, Wang E, Morris EA (2001) BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol* 189: 275-284.

559. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G (2007) Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 56: 1175-1186.
560. Toupet K, Maumus M, Peyrafitte JA, Bourin P, van Lent P, Ferreira R, Orsetti B, Pirot N, Casteilla L, Jorgensen C, Noel D (2013) Long-term detection of human adipose derived mesenchymal stem cells after intra-articular injection. *Arthritis Rheum*.
561. Ter Huurne M, Schelbergen R, Blattes R, Blom A, de Munter W, Grevers LC, Jeanson J, Noel D, Casteilla L, Jorgensen C, van den Berg W, van Lent PL (2012) Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 64: 3604-3613.
562. Jukes JM, Both SK, Leusink A, Sterk LM, van Blitterswijk CA, de Boer J (2008) Endochondral bone tissue engineering using embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6840-6845.
563. Scherberich A, Muller AM, Schafer DJ, Banfi A, Martin I (2010) Adipose tissue-derived progenitors for engineering osteogenic and vasculogenic grafts. *J Cell Physiol* 225: 348-353.
564. Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, Garfein ES, Kohane DS, Darland DC, Marini R, van Blitterswijk CA, Mulligan RC, D'Amore PA, Langer R (2005) Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol* 23: 879-884.
565. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Peault B, Rubin JP, Donnenberg AD (2010) Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry A* 77: 22-30.
566. De Francesco F, Tirino V, Desiderio V, Ferraro G, D'Andrea F, Giuliano M, Libondi G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G (2009) Human CD34/CD90 ASCs are capable of growing as sphere clusters, producing high levels of VEGF and forming capillaries. *PLoS One* 4: e6537.
567. Muller AM, Mehrkens A, Schafer DJ, Jaquiere C, Guven S, Lehmicke M, Martinetti R, Farhadi I, Jakob M, Scherberich A, Martin I (2010) Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal vascular fraction of human adipose tissue. *Eur Cell Mater* 19: 127-135.
568. Rhee SC, Ji YH, Gharibjanian NA, Dhong ES, Park SH, Yoon ES (2011) In vivo evaluation of mixtures of uncultured freshly isolated adipose-derived stem cells and demineralized bone matrix for bone regeneration in a rat critically sized calvarial defect model. *Stem Cells Dev* 20: 233-242.

Modulation de la différenciation chondrogénique : Application en ingénierie tissulaire du cartilage

Le cartilage articulaire peut être le siège de nombreuses atteintes d'origine métabolique, inflammatoire ou traumatique. Pour traiter ces différentes affections, l'ingénierie tissulaire dont le principe réside dans l'association de cellules, de matrices et de morphogènes semble prometteuse. Notre stratégie consiste à combiner des cellules souches issues du tissu adipeux (CSA) à un hydrogel injectable et auto-réticulant. L'objectif de ces travaux fut de déterminer des conditions de différenciation optimales afin d'orienter les CSA vers un phénotype stable et de favoriser la synthèse d'une matrice cartilagineuse. Notre travail s'est fondé sur l'étude de facteurs environnementaux du cartilage articulaire. Ainsi, nous avons pu démontrer l'influence de la dimensionnalité, de la tension en oxygène et l'intérêt des glycosaminoglycanes-mimétiques en vue d'application clinique de l'ingénierie tissulaire du cartilage.

Mots clés : Cartilage, ingénierie tissulaire, cellules souches, chondrogenèse, dimensionnalité, tension en oxygène, glycosaminoglycanes-mimétiques.

Modulation of the chondrogenic differentiation: application for cartilage tissue engineering

Cartilage can be altered by traumatic injuries, inflammatory or degenerative diseases. To address this clinical issue, cartilage tissue engineering strategies combining cells, biomaterials and morphogenic factors are promising. Our strategy associates adipose stem cells (ASC) with an injectable and self-setting hydrogel. The aim of the present study was to determine the optimal culture conditions to promote the chondrogenic differentiation of ASC and therefore the formation of a cartilaginous matrix *in vitro* and *in vivo*. Our approach was based on the use of morphogenic factors mimicking the articular cartilage environment. Thus, we were interested in deciphering the effects of the dimensionality, oxygen tension and glycosaminoglycanes-mimetics on the chondrogenesis of ASC for their future use in cartilage engineering.

Keywords: Cartilage, tissue engineering, stem cells, chondrogenesis, dimensionality, oxygen tension, glycosaminoglycanes-mimetics.

PORTRON Sophie
1Place Alexis Ricordeau
44042 Nantes Cedex 01

Visa du Directeur de thèse