

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

24/03/2011

Par

Christophe MERCERON

**INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE : HYDROGEL ET
CELLULES SOUCHES**

Devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :

Mme Danièle NOEL
M. Hervé PETITE

Chargée de Recherche INSERM, Montpellier.
Directeur de Recherche INSERM, Paris.

Directeur de thèse :

M. Jérôme GUICHEUX

Directeur de Recherche INSERM, Nantes.

Co-directeur de thèse :

Mme Sylvia COLLIEC-JOUAULT

Cadre de recherche IFREMER, Nantes.

Examineurs :

M. Didier MAINARD
Mme Claire VINATIER

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Nancy
Chercheur associée INSERM, Nantes.

Membres invités :

M. Pierre WEISS
M. Olivier GAUTHIER

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Nantes.
Professeur Ecole Nationale Vétérinaire-ONIRIS, Nantes.

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

Liste des publications et communications

Articles publiés :

- 1. C. Merceron**, C. Vinatier, J. Clouet, S. Collic-Jouault, P. Weiss, J. Guicheux.
Adipose derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering.
Joint Bone Spine (2008); 75(6):672-674. (IF : 2.250)
- 2. C. Merceron**, C. Vinatier, S. Portron, M. Masson, M. Gatus, L. Guigand, J. Amiaud, Y. Chérel, P. Weiss, J. Guicheux.
Differential effects of hypoxia on the osteo-chondrogenic potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells.
American Journal of Physiology-Cell Physiology (2010); 298 (2):355-364. (IF : 4.013)
Nominated by P. Insel: Editor-in-Chief of the American Journal of Physiology - Cell Physiology as “Highlights from the literature” in Physiology (2010); 25:59-63.
- 3. C. Merceron**, S. Portron, M. Masson, B. H. Fellah, O. Gauthier, J. Lesoeur, Y. Chérel, P. Weiss, J. Guicheux, C. Vinatier.
Cartilage tissue engineering: from hydrogel to mesenchymal stem cells.
Biomedical Materials and Engineering, (2010); 20 (3):159-166. (IF : 0.615)
- 4. C. Merceron**, S. Portron, M. Masson, J. Lesoeur, B. H. Fellah, O. Gauthier, O. Geffroy, P. Weiss, J. Guicheux, C. Vinatier.
The effect of two and three dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel.
Cell Transplantation (in press). (IF : 5.126)
- 5. C. Merceron**, E. Rederstorff, S. Portron, C. Colombeix, M. Masson, J. Lesoeur, S. Sourice, S. Collic-Jouault, P. Weiss, J. Guicheux.
Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically over-sulphated polysaccharide from marine origin: potential application for cartilage regenerative medicine.
Stem cells (soumis) (IF : 7.747)

6. J. Clouet, C. Vinatier, **C. Merceron**, M. Pot-Vaucel, Y. Maugars, P. Weiss, G. Grimandi, J. Guicheux.
From osteoarthritis treatment to future regenerative therapies of cartilage.
Drug Discovery Today (2009) invited review; 14(19-20):913-25. (IF : 6.630)
7. C. Vinatier*, C. Bouffi*, **C. Merceron**, J.-M. Brondello, C. Jorgensen, P. Weiss, J. Guicheux, D. Noel.
Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy.
Current stem cell research and therapy (2009) invited review; 4(4):318-329.* co-first authors. (IF : in progress)
8. J. Clouet, C. Vinatier, **C. Merceron**, M. Pot-Vaucel, O. Hamel, P. Weiss, G. Grimandi, J. Guicheux.
The intervertebral disc: from pathophysiology to tissue engineering.
Joint Bone Spine (2009) invited review; 76(6):614-8. (IF : 2.250)
9. C. Vinatier, O. Gauthier, A. Fatimi, **C. Merceron**, M. Masson, A. Moreau, F. Moreau, B. Fellah P. Weiss, J. Guicheux.
An injectable cellulose based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defect.
Biotechnology and Bioengineering (2009); 102(4):1259-1267. (IF : 3.377)
10. E. Rederstorff, A. Fatimi, C. Sinquin, J. Ratiskol, **C. Merceron**, C. Vinatier, P. Weiss, S. Collic-Jouault.
Sterilization of exopolysaccharides produced by deep-sea bacteria: impact on their stability and degradation.
Marine Drugs (in press). (IF : 2.863)

Brevet :

C. Merceron, E. Rederstorff, S. Collicec-Jouault, P. Weiss, J. Guicheux

Pharmacological modulation of adipose-derived mesenchymal stem cell chondrogenesis using a marine sulphated GAG-mimetic.

Ref : EB11027-GUICHEUX

Proceedings :

1. **C. Merceron**, C. Vinatier, M. Masson, L. Guigand, J. Amiaud, Y. Chérel, M. Poupon, P. Weiss, J. Guicheux.

Chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells.

Calcified Tissue International. 2007may; 80 supl 1.

2. **C. Merceron**, C. Vinatier, M. Masson, L. Guigand, J. Amiaud, Y. Chérel, M. Poupon, P. Weiss, J. Guicheux.

Chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells.

Bone. 2007 Jun ; 40(6):S172

3. **C. Merceron**, C. Vinatier, M. Masson, L. Guigand, J. Amiaud, Y. Chérel, M. Gatius, P. Weiss, J. Guicheux.

Hypoxia exerts differential effects on the chondrogenic and osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells.

Bone.2008; 42(S1).

4. **C. Merceron**, C. Vinatier, M. Masson, L. Guigand, J. Amiaud, Y. Chérel, P. Weiss, J. Guicheux.

Impact of oxygen tension on the osteo-chondrogenic potential of human adipose-derived stem cells.

Annals of the Rheumatic Diseases. 2009 July;68 (S3)-p154

5. **C. Merceron**, C. Vinatier, S. Portron, M. Masson, J. Amiaud, L. Guigand, Y. Chérel, P. Weiss, J. Guicheux.

The differential effects of hypoxia on the osteo-chondrogenic potential of human adipose-derived stem cells.

Bone. 2010 March ; 46 (S1)-p 77 (185)

- 6. C. Merceron**, M. Masson, S. Portron, J. Lesoeur, V. Grybeck, B. H. Fellah, O. Gauthier, P. Weiss, J. Guicheux, C. Vinatier.
Chondrogenic potential of human adipose-derived stem cells after *in vivo* transplantation with a cellulose hydrogel.
Bone. 2010 March ; 46 (S1)-p 77 (186)
- 7. C. Merceron**, M. Masson, S. Portron, J. Lesoeur, V. Grybeck, B. H. Fellah, O. Gauthier, P. Weiss, J. Guicheux, C. Vinatier.
Effects of oxygen tension on the chondrogenic potential of differentially cultured human adipose-derived stem cells.
Bone. 2010 March ; 46 (S1)-p 77 (187)
- 8. S. Portron**, **C. Merceron**, M. Masson, M. Gatius, O. Gauthier, P. Weiss, J. Guicheux, C. Vinatier.
Effects of oxygen tension on the hypertrophic terminal differentiation of chondrogenic cells.
Bone. 2010 March ; 46 (S1)-p 81 (197)

Communications orales invitées :

C. Merceron, C. Vinatier, P. Weiss, J. Guicheux.

Cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux pour la régénération du cartilage.

3^{èmes} journées Jacques Courtin, November 20th, 2010, Paris, France.

C. Merceron, C. Vinatier, P. Weiss, J. Guicheux.

Cartilage tissue engineering: a crucial combination of biomaterials, cells and biofactors.

4^{èmes} journées du pôle lorrain d'ingénierie du cartilage (PLIC), February 4-5th, 2010, Nancy France.

Communications orales soumises à comité de lecture (26) :

- 12 communications orales en 1^{er} auteur dont 2 ont été primées.
- 5 communications orales en 2^{ème} auteur dont 2 ont été primées.
- 2 communications orales en 3^{ème} auteur.
- 1 communication orale en 4^{ème} auteur.
- 6 communications orales en 5^{ème} auteur dont 1 a été primée.

Communications affichées (31) :

- 20 communications affichées en 1^{er} auteur dont 1 a été primée.
- 7 communications affichées en 2^{ème} auteur.
- 2 communications affichées en 3^{ème} auteur.
- 1 communication affichée en 4^{ème} auteur.
- 1 communication affichée en 5^{ème} auteur.

Encadrement :

- 2005-2006 Thomas Cordonnier, étudiant en Master 1 : Sciences Biologiques et Médicales - Biotechnologies et Physiopathologies Animales et Humaines. Nantes, France.
- 2006-2007 Eric Giang, étudiant en Master 1 : Sciences Biologiques et Médicales - Biotechnologies et Physiopathologies Animales et Humaines. Nantes, France.
- 2006-2007 Coraly Briand, étudiante en 1^{ère} année de BTS : Analyses de Biologie Médicale. Rezé, France.
- 2008-2009 Sophie Portron, étudiante en Master 1 : Sciences Biologiques et Médicales Biologie Biotechnologies et Recherche Thérapeutique. Nantes, France.
- 2011 Maurine Vaslot, étudiante en Licence professionnelle 3^{ème} année : Biotechnologies Appliquées à la Santé - Biomédicament. Reims, France.

Collaborations :

- 2007-2008 Bruno Jorge Antunes Colaço, Université du Léon - Faculté Vétérinaire, Département de Médecine, Chirurgie et Anatomie Vétérinaire. Léon, Espagne.
“Ingénierie tissulaire du cartilage : obtention de cartilage *in vitro* en vue de son utilisation en ingénierie tissulaire”.
- 2009-2010 Erika Hue, Lisa Oliver, François Valette, Centre de recherche en cancérologie. Unité Inserm 892, Nantes, France.
“Rôle potentiel de la caspase-3 dans la différenciation des cellules souches”.
- 2009-2011 Jessica Pereira - Dominique Helley, Faculté de pharmacie Paris Descartes. Unité Inserm 765, Paris, France.
“Méthodes et techniques pour l’isolement et la caractérisation de cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux humain”.
- 2009-2011 Pierre Corre, Faculté de chirurgie dentaire, Unité Inserm 791, Nantes, France.
“Cellules souches de la moelle pour la reconstruction osseuse”.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	I
LISTE DES TABLEAUX	III
LISTE DES ABREVIATIONS	V
I - INTRODUCTION	1
II - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	5
1 - Le cartilage articulaire	6
1.1 - Généralités	6
1.2 - Composition du cartilage articulaire	7
1.2.1 - Le chondrocyte	7
1.2.2 - La matrice extracellulaire du cartilage articulaire	8
1.2.2.1 - Les collagènes : synthèse et fibrillogenèse	9
1.2.2.2 - Les collagènes du cartilage articulaire	10
1.2.2.3 - Les protéoglycanes du cartilage articulaire	15
1.2.2.3.1 - Les hyalectanes	17
1.2.2.3.2 - Les protéoglycanes de membranes basales	18
1.2.2.3.3 - Les petits protéoglycanes riches en leucines (SLRPs)	19
1.2.2.3.4 - Les protéoglycanes de surface	22
1.2.2.4 - Autres constituants	24
1.2.3 - Les propriétés mécaniques du cartilage articulaire	28
1.2.4 - Le remodelage de la matrice extracellulaire	29
1.3 - Histologie du cartilage articulaire	30
1.3.1 - La zone tangentielle	30
1.3.2 - La zone de transition	31
1.3.3 - La zone radiale	31
1.3.4 - La couche de cartilage calcifiée	31
1.4 - La chondrogenèse	32
1.4.1 - Condensation des cellules souches et détermination	33
1.4.2 - Différenciation chondrocytaire	34
1.4.3 - Prolifération des chondrocytes	34
1.4.4 - Différenciation pré-hypertrophique et hypertrophique des chondrocytes	36
1.4.5 - Différenciation terminale des chondrocytes	38
2 - Les atteintes du cartilage articulaire	40
2.1 - Généralités	40
2.2 - Pertes de substance du cartilage articulaire	40
2.2.1 Classification des pertes de substance du cartilage articulaire	40
2.2.2 - Réparation spontanée du cartilage articulaire	41
2.2.3 - Atteintes traumatiques du cartilage articulaire	42
2.2.4 - Ostéochondrite disséquante	42
2.2.4.1 - Classification des lésions	43
2.2.4.2 - Etiologie	43
2.2.4.3 - Causes potentielles de l'ostéochondrite disséquante (OCD)	44
2.2.5 - Traitements des lésions du cartilage	45
2.2.5.1 - Traitements des lésions stables	45
2.2.5.2 - Traitements des lésions instables	46
2.3 - Physiopathogénie de l'arthrose	49
Article I : From osteoarthritis to future regenerative therapies for cartilage – Drug Discovery Today	52
3 - Ingénierie tissulaire du cartilage articulaire	53
3.1 - Généralités	53
3.2 - Les matrices et les facteurs de croissance	53
Article II : Cartilage Tissue Engineering: Towards a Biomaterial-Assisted Mesenchymal Stem Cell Therapy – Current Stem Cell Research & Therapy	57
3.3 - Les cellules réparatrices	58
3.3.1 - Le chondrocyte	58

3.3.2 - Les cellules souches.....	59
3.3.2.1 - Définitions et généralités	59
3.3.2.1.1 - Les cellules souches totipotentes.....	59
3.3.2.1.2 - Les cellules souches pluripotentes	60
3.3.2.1.3 - Les cellules souches multipotentes	60
3.3.2.1.4 - Les cellules souches unipotentes.....	61
3.3.2.2 - La notion de niche des cellules souches.....	61
3.3.2.3 - Les cellules souches mésenchymateuses	62
3.3.2.3.1 - Phénotype des cellules souches mésenchymateuses	63
3.3.2.3.2- Potentiel de différenciation des CSM.....	63
3.3.2.3.3 - Plasticité des CSM	67
3.3.2.3.4 - CSM et immunomodulation.....	70
3.3.2.3.5 - Les différentes sources de CSM.....	76
3.3.2.3.6 - Tissu adipeux et ingénierie tissulaire	79
Article III : Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering – Joint Bone Spine.....	82
3.4 - Modes et conditions de culture.....	83
3.4.1 - La dimensionnalité	83
3.4.1.1 La culture en 2D.....	83
3.4.1.2 - La culture en 3D	84
3.4.2 - Les facteurs morphogènes	84
3.4.2.1 - Les adjuvants	85
3.4.2.2 - La tension en oxygène	86
3.4.2.3 - Les contraintes mécaniques	93
3.4.3 - Les bioréacteurs.....	94
3.5 - La thérapie génique	94
III - DONNEES EXPERIMENTALES	96
1 - Evaluation du potentiel chondrogénique des hCSTA associées à un hydrogel.....	97
1.1 - Problématique	97
Article IV : 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	101
1.2 – Discussion.....	103
2 - Modulation environnementale et pharmacologique de la différenciation chondrogénique des hCSTA.....	106
2.1 - Problématique	106
Article V : Differential effects of hypoxia on the osteo-chondrogenic potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells – American Journal of Physiology-Cell Physiology	110
Article VI : Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cells chondrogenesis by a chemically over-sulphated polysaccharide from marine origin: potential application for cartilage regenerative medicine – Stem cells	112
2.2 - Discussion	113
IV - CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES.....	118
Article VII : Cartilage tissue engineering: from hydrogel to mesenchymal stem cells – Bio-Medical and Materials Engineering	123
Article VIII : The intervertebral disc: from pathophysiology to tissue engineering – Joint Bone Spine.	124
V - BIBLIOGRAPHIE.....	126

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les différents types de cartilage	6
Figure 2 : Représentation schématique de la composition moléculaire du cartilage articulaire.	7
Figure 3 : La matrice extracellulaire du cartilage.	8
Figure 4 : Modélisation et structure du collagène.	9
Figure 5 : Biosynthèse du collagène.	10
Figure 6 : Assemblages supramoléculaires des différents types de collagène.	10
Figure 7 : Structure générale et organisation de l'agrécane.	17
Figure 8 : Organisation phylogénétique, structurelle et chromosomique des SLRPs humaines	19
Figure 9 : Organisation histologique du cartilage articulaire.	31
Figure 10 : Représentation schématique du processus d'ossification endochondrale.	32
Figure 11 : Représentation schématique des étapes de la chondrogenèse.	39
Figure 12 : Classification des lésions cartilagineuses selon l'ICRS.	41
Figure 13 : Représentation schématique de la technique de perforation trans-chondrale ou "Pridie drilling".	45
Figure 14 : Représentation schématique (A) et vue arthroscopique (B) de lésion traitées par la technique de refixation.	45
Figure 15 : Représentation schématique de la technique de transplantation de chondrocytes autologues, technique de Brittberg.	47
Figure 16 : Représentation schématique de la technique de greffe ostéochondrale autologue multiple (mosaicplastie).	48
Figure 17 : Degré de potentialité des cellules souches au cours du développement.	59
Figure 18 : Représentation schématique du processus de différenciation adipogénique	64
Figure 19 : Représentation schématique du processus de différenciation ostéogénique	65
Figure 20 : Effets immunomodulateurs des CSM. D'après Nauta et al. [614].	74
Figure 21 : Structure des sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β .	87
Figure 22 : Régulation oxygène-dépendante de la stabilité et de l'activité transcriptionnelle de HIF.	88
Figure 23 : Gènes et fonctions directement régulés par HIF.	90
Figure 24 : Stimuli modulant l'activation de HIF.	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Intégrines des chondrocytes et leurs ligands	24
Tableau II : Bilan d'études cliniques sur la procédure d'allogreffe ostéochondrale	49
Tableau III : Expression des marqueurs de surface de CSM humaines isolées à partir de différents tissus	63
Tableau IV : Sources de CSM à potentiel chondrogénique	79
Tableau V : Agents modulant l'activité de HIF	93
Tableau VI : Caractéristiques des différents vecteurs utilisés pour le transfert de gènes.	94

LISTE DES ABREVIATIONS

ACI	autologous chondrocyte implantation
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motif
ADN	acide désoxyribonucléique
AFBP	adipocyte fatty acid binding protein
AH	acide hyaluronique
ALP	phosphatase alcaline
Ank	progressive ankylosis
ARD-1	arrest defective-1
ARN	acide ribonucléique
ARNT	aryl-hydrocarbon nuclear translocator
ATP	adénosine triphosphate
bHLH	basic helix-loop-helix
BiP	Binding immunoglobulin protein
BMP	bone morphogenetic protein
BSP	bone sialoprotein
C/EBP	CAAT/enhancer binding protein
CAD	C-terminal activation domain
CBP	cAMP response element-binding (CREB) binding protein
CFU-F	colony forming unit-fibroblastic
CHAD	chondroadhérine
CILP	cartilage intermediate layer protein
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
COMP	cartilage oligomeric matrix protein
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CRP	complement regulatory protein
CS	chondroïtine sulfate
CSH	cellules souche hématopoïétique
CSM	cellules souche mésenchymateuse
CSN	cellule souche neurale
DHH	desert hedgehog
DMEM	dubelcco's modified eagle medium
DMP1	dentin matrix protein 1
DS	dermatane sulfate
DSPP	dentin sialophosphoprotein
EG	embryonic germ cell
EGF	epidermal growth factor
EPO	érythropoïétine
ES	embryonic stem cell
FACIT	fibrils associated collagen with interrupted triple-helix
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FIH	factor inhibiting HIF
GAG	glycosaminoglycane
GDF	growth differentiation factor

GFP	green fluorescent protein
gp46	colligine
GRP78	glucose-regulated protein 78
GVHD	graft versus host disease
HDAC	histone deacetylase
HGF	hepatocyte growth factor
HIF	hipoxia inducible factor
HLA	human leukocyte antigen
HRE	hypoxia response element
HS	héparane sulfate
Hsp	heat-shock protein
IDO	indoléamine 2,3-dioxygénase
IFN- γ	interféron gamma
IGF	insulin-like growth factor
IGFR	insulin-like growth factor receptor
IHH	indian hedgehog
IL	interleukine
iNOS	inducible nitric oxide synthase
iPS	induced pluripotent stem cells
IR	insulin receptor
ITS	insuline-tranferrine-sélénite
KS	kératane sulfate
LRR	leucine rich repeat
MAPC	multipotent adult progenitor cell
MEC	matrice extracellulaire
MGP	Matrix Gla Protein
MIAMI	marrow-isolated adult multilineage inducible
MLR	mixed lymphocyte reaction
MMP	matrix metalloproteinase
NAD	N-terminal activation domain
N-CAM	neural cell adhesion molecule
NK	natural killer
NLS	nuclear localization sequence
NO	oxyde nitrique
OCD	ostéochondrite disséquante
OCDA	ostéochondrite disséquante adulte
OCDJ	ostéochondrite disséquante juvénile
OCN	ostéocalcine
ODD	oxygen dependent degradation domain
OMD	ostéomoduline
ON	ostéonectine
OPN	ostéopontine
OSX	ostérix
P4-H	Prolyl-4-Hydroxylase

PAC	PAS associated C-terminal domain
PAS	Per-ARNT-SIM
PDGF	platelet derived growth factor
PDI	protein disulfide isomerase
PG	protéoglycane
PGE2	prostaglandine E2
PHD	prolyl-hydroxylase
Pi	phosphate inorganique
PiT	type III Pi transport system
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPi	pyrophosphate
PPIase	Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase
Pref-1	preadipocyte factor-1
PRELP	proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein
PTH	parathyroïd hormone
PTHrP	parathyroïd hormone related peptide
RACK	receptor of activated kinase
REG	reticulum endoplasmique granuleux
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
Runx2	runt domain transcriptional activator-2
SHH	sonic hedgehog
SIBLING	Small Integrin-binding LIgand, N-linked Glycoprotein
SLRP	Small Leucine-Rich Repeat Proteoglycans
Sox	sex related Y-type high-mobility-group box
SSAT	spermidine/spermine N1-acetyltransferase
SZP	superficial zone protein
TCR	T-cell receptor
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TNF α	tumor necrosis factor alpha
TSP	thrombospondine
UCMA	upper zone of growth plate and cartilage matrix-associated protein
UCP-1	uncoupling protein-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel Lindau
Wnt	wingless related
XT	beta-D-xylose transférase

I - INTRODUCTION

“Contexte de la thèse”

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif spécialisé recouvrant la surface des articulations. Ce tissu a la particularité d'être non innervé, alymphatique et avasculaire et de n'être constitué que d'un unique type cellulaire : le chondrocyte. Cette cellule est responsable de la synthèse et du renouvellement d'une matrice extracellulaire (MEC) abondante riche en fibres de collagènes et en protéoglycanes. De par sa composition et son organisation, le cartilage articulaire possède des propriétés biomécaniques uniques. Il a pour rôle d'amortir et de répartir les contraintes mécaniques ainsi que de réduire les forces friction appliquées sur les articulations lors de leur sollicitation.

Le cartilage articulaire peut être le siège de nombreuses atteintes liées à des pertes de substance (origine traumatique, ostéochondrite disséquante), liées au vieillissement (arthrose) ou d'origine inflammatoire (polyarthrite rhumatoïde). L'établissement de ces atteintes cartilagineuses conduit, à plus ou moins long terme, à une dégradation de la MEC et une diminution de la cellularité. Sa nature avasculaire et le faible potentiel prolifératif des chondrocytes confèrent au cartilage articulaire des capacités de réparation spontanée très limitées. Ces faibles capacités de réparation spontanée rendent les processus cataboliques irréversibles et peuvent, à terme, mener à la perte de fonctionnalité de l'articulation. Les pathologies du cartilage articulaire concernent aujourd'hui une part importante de la population et représentent donc un enjeu majeur de santé publique. Dans ce contexte, la communauté scientifique s'intéresse depuis de nombreuses années aux moyens de régénérer un tissu cartilagineux fonctionnel.

Les techniques chirurgicales développées pour tenter de réparer les lésions cartilagineuses comme la chondroplastie abrasive, la micro fracture et la spongialisation [1] conduisent à la néoformation d'un tissu cartilagineux de réparation 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 conduit au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques comme l'ingénierie tissulaire.

L'ingénierie tissulaire offre en effet une alternative aux procédures chirurgicales classiques en associant des cellules à des biomatériaux et à des agents biologiques actifs. Ce domaine se situe au carrefour de la thérapie cellulaire, de la science des matériaux et de l'ingénierie des procédés.

Les principes de l'ingénierie du cartilage articulaire découlent en droite ligne de la technique de transplantation de chondrocytes autologues développée il y a une quinzaine d'années par Brittberg et *al.* [3]. Une biopsie de cartilage est prélevée dans une zone non portante afin d'isoler des chondrocytes. Ceux-ci sont alors amplifiés *in vitro* en monocouche puis réimplantés sous un lambeau périosté au niveau de la lésion. Cette technique a permis la formation d'un tissu de réparation et l'amélioration des signes cliniques des atteintes cartilagineuses. Cependant, le tissu néoformé s'est révélé être de nature fibrocartilagineuse. Les propriétés biomécaniques de ce tissu sont moindres en comparaison à celles du tissu sain. Cette technique se trouve également confrontée à certaines limites comme le prélèvement de cartilage en site articulaire qui peut entraîner une morbidité du site donneur, et ne permet d'obtenir qu'une quantité limitée de chondrocytes. De plus, l'amplification des chondrocytes en monocouche entraîne leur dédifférenciation vers un phénotype fibroblastique [4].

La nécessité de surmonter ces obstacles a donc orienté les recherches en ingénierie tissulaire vers 2 axes majeurs. Le premier s'intéresse à l'obtention de sources alternatives de cellules chondrogéniques afin de s'affranchir du prélèvement de cartilage en site articulaire. De précédents travaux ont proposé l'utilisation de chondrocytes costaux ou nasaux comme source cellulaire [5, 6]. Bien que le chondrocyte semble logiquement le type cellulaire adapté à l'ingénierie tissulaire du cartilage, la faible cellularité du tissu cartilagineux ne permet pas l'obtention de cellules en grande quantité nécessaire à une telle application. Le deuxième axe s'attache au développement de conditions optimales et adaptées à la culture et à la vectorisation du type cellulaire sélectionné. Dans le contexte de l'ingénierie tissulaire du cartilage, ceci passe (1) par la mise en œuvre de systèmes de culture au sein d'un environnement tridimensionnel (culture en gouttes suspendues, en micromasses, en pellets ou au sein de matrices) afin de promouvoir la différenciation chondrogénique des cellules et (2) par l'utilisation de biomatériaux injectables afin de permettre, lors d'un acte chirurgical mini-invasif, de véhiculer et de maintenir les cellules chondrogéniques sur le site lésé.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été d'une part, d'évaluer le potentiel chondrogénique de cellules isolées à partir de la fraction stromale du tissu adipeux humain, et d'autre part, de déterminer l'influence de paramètres environnementaux (dimensionnalité, tension en oxygène, agents pharmacologiques) dans l'engagement vers la différenciation chondrogénique de ces cellules afin d'optimiser leurs conditions de culture.

Dans une première partie, les généralités relatives au cartilage articulaire, à ses atteintes et à son ingénierie tissulaire seront présentées. Il y sera décrit comment sa composition et son

organisation participent à la fonction hautement spécialisée du cartilage. Les mécanismes gouvernant la différenciation des chondrocytes y seront également détaillés.

Il sera, ensuite, fait état des processus conduisant à la formation des lésions du cartilage articulaire, en allant des atteintes traumatiques aux pertes de substances associées aux pathologies dégénératives. La physiopathogénie de l'arthrose et les traitements correspondants feront l'objet d'un article de revue (article I). Enfin un intérêt particulier sera porté à l'ingénierie tissulaire du cartilage, en termes de matrice et de facteurs de croissance (article II). La place des cellules souches mésenchymateuses (CSM) dans l'ingénierie tissulaire du cartilage sera également développée, particulièrement concernant les CSM du tissu adipeux (article III). Il sera ensuite traité des modalités de culture permettant le maintien ou l'engagement vers le phénotype chondrocytaire. La stratégie de thérapie génique sera également abordée.

La deuxième partie, consacrée aux résultats expérimentaux de notre travail s'articulera, dans un premier temps, autour de l'évaluation du potentiel chondrogénique des cellules souches du tissu adipeux en association avec un hydrogel injectable développé au laboratoire (article IV). Dans un second temps, les effets de facteurs morphogéniques (hypoxie et polysaccharides marins) sur la modulation de la différenciation chondrogénique des cellules souches du tissu adipeux seront étudiés (articles V et VI).

Pour clore cette thèse, une conclusion générale récapitulera l'ensemble de ces travaux (article VII) et permettra d'aborder les perspectives d'application de l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire à d'autres tissus et notamment au disque intervertébral (article VIII).

II - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

“Le cartilage articulaire : de la physiopathologie aux thérapies innovantes”

Article I : From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage

J. Clouet, C. Vinatier, **C. Merceron**, M. Pot-Vaucel, Y. Maugars, P. Weiss, G. Grimandi and J. Guicheux.

Drug Discovery Today (2009) 14: 913-925.

Article II : Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy

C. Vinatier, C. Bouffi, **C. Merceron**, J. Gordeladze, J. M. Brondello, C. Jorgensen, P. Weiss, J. Guicheux and D. Noël.

Current Stem Cell Research & Therapy (2009) 4: 318-329.

Article III : Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering

C. Merceron, C. Vinatier, J. Clouet, S. Collicec-Jouault, P. Weiss and J. Guicheux.

Joint Bone Spine (2008) 75 : 672-674.

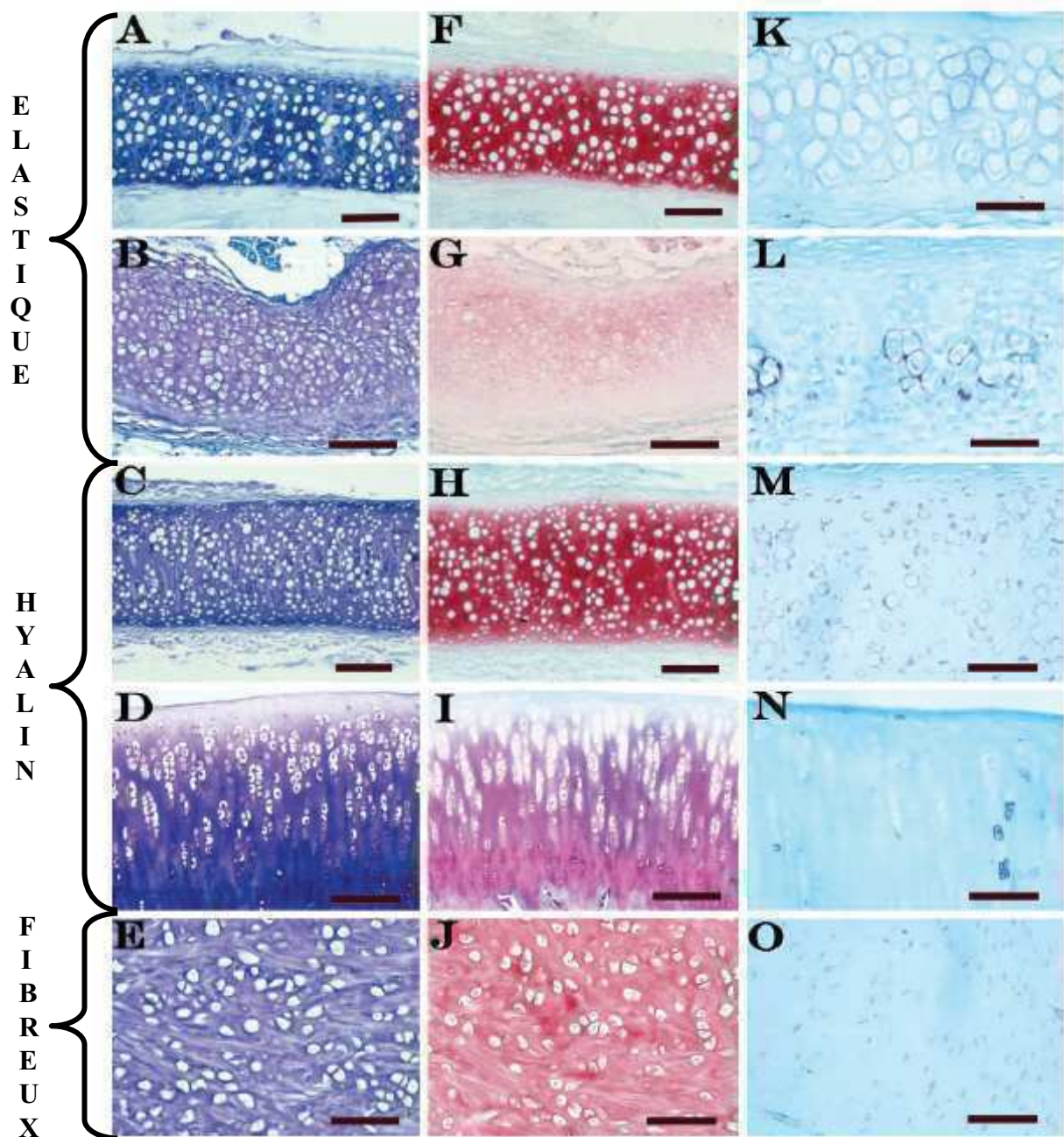


Figure 1: Les différents types de cartilage. Différents échantillons de cartilage auriculaire (A, F, K), de l'épiglotte (B, G, L), nasal (C, H, M), articulaire (D, I, N) et du ménisque (E, J, O) après coloration au bleu de toluidine (A-E) à la safranine-O (F-J) et après immunomarquage contre l'élastine (K-O). barre = 100 mm. Modifié d'après Naumann *et al.* [7].

1 - Le cartilage articulaire

1.1 - Généralités

Le cartilage est un tissu abondant chez les Vertébrés et est un composant essentiel du squelette. Ce tissu conjonctif remplit plusieurs fonctions fondamentales au sein de l'organisme et au cours de son développement.

Trois types de cartilage peuvent être distingués de par leur composition (Figure 1) [7].

Le cartilage hyalin se présente sous un aspect blanc translucide et vitreux (d'où son nom de hyalin du grec: qui a la transparence du verre). Le cartilage hyalin est essentiellement composé de protéoglycanes (PG) qui lui confèrent son indice de réfraction élevé et de fibres de collagène majoritairement de type II. Ce type de cartilage se rencontre essentiellement au niveau des surfaces articulaires (Figure 1 C-H-M), où il permet le glissement des pièces osseuses en permettant l'absorption et la répartition des forces de compression et des frictions qui s'exercent lors de la mobilisation des articulations. Il se retrouve également au niveau de la cloison nasale, des jonctions costo-sternales, du larynx (Figure 1 D-I-N), de la trachée et des bronches (anneaux cartilagineux). Au stade fœtal, l'ébauche du squelette est essentiellement constituée de cartilage hyalin qui, par un processus d'ossification endochondrale, va permettre le développement et la croissance des os longs.

Le cartilage élastique se différencie du cartilage hyalin par l'abondance de fibres d'élastine lui conférant des propriétés d'extension et une grande flexibilité. Ce type de cartilage se retrouve au niveau de sites anatomiques tels que l'oreille externe (Figure 1 A-F-K), les ailes du nez et l'épiglotte (permettant l'obturation des voies respiratoires au moment de la déglutition) (Figure 1 B-G-L).

Le cartilage fibreux se distingue du cartilage hyalin par sa composition en collagène qui est essentiellement constituée de collagène de type I [8]. Cette spécificité lui confère une résistance accrue à la compression et à la tension. Pour cette raison le cartilage fibreux se retrouve à la jonction du cartilage hyalin et des points d'insertion des ligaments ou des tendons. Il constitue également le cartilage des ménisques (Figure 1 E-J-O), de la symphyse pubienne et des anneaux fibreux du disque intervertébral.

Le cartilage articulaire à proprement parler est donc de type hyalin. Il est constitué d'un unique type cellulaire : le chondrocyte, responsable de la synthèse et du renouvellement d'une abondante matrice extracellulaire (MEC). Le cartilage articulaire est un cartilage stable, il se différencie de ce fait du cartilage de la plaque de croissance, également appelé cartilage de conjugaison, qui lui, est transitoire. Le cartilage articulaire possède la particularité, de résister

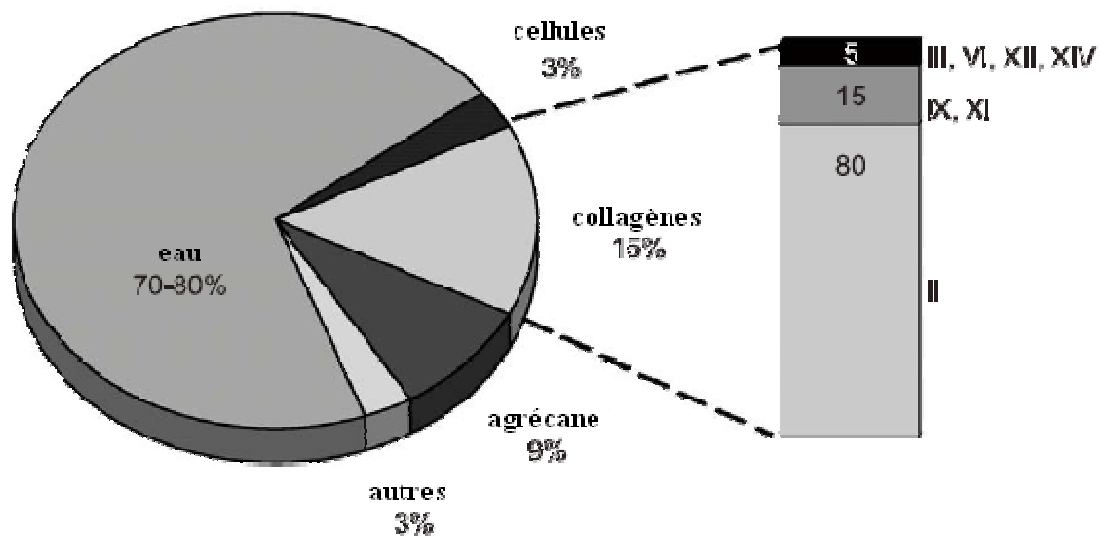


Figure 2 : La composition moléculaire du cartilage articulaire.
 D'après Aigner *et al.* [12].

à l'invasion vasculaire, à la minéralisation et à son remplacement par de l'os, contrairement au cartilage de la plaque de croissance.

Le cartilage articulaire est non innervé avasculaire et alymphatique. Sa nutrition s'effectue donc exclusivement par diffusion à partir du liquide synovial et de l'os sous-chondral qui est vascularisé [9, 10]. Ces voies de diffusion interviennent également dans l'évacuation des déchets métaboliques. La diffusion des nutriments dépend de la taille, de la forme et de la charge des molécules, ainsi que de la concentration en PG du cartilage. Cette concentration en PG constitue ainsi un facteur de régulation de la diffusion. La mise en charge de l'articulation entraîne une compression qui expulse les déchets vers le liquide synovial. Le relâchement, à l'inverse, entraîne un retour du liquide nutritionnel dans le cartilage. La MEC forme comme un tamis moléculaire qui sélectionne les molécules pouvant diffuser dans le cartilage. Ainsi, les éléments d'une masse moléculaire supérieure à 70kDa ne peuvent généralement pas diffuser [11].

1.2 - Composition du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est composé essentiellement d'eau (70 à 80%), retenue dans la MEC, constituée d'un maillage dense de fibres de collagène de type II, IX et XI et d'un gel de PG dont le représentant majoritaire est l'agrécan (Figure 2) [12].

1.2.1 - Le chondrocyte

Le chondrocyte est une cellule hautement différenciée qui constitue l'unique type cellulaire présent au sein du cartilage articulaire. Il représente environ 10% du volume total du tissu. Les chondrocytes ont une origine embryonnaire soit mésodermique comme pour les éléments des membres, soit ectodermique via les crêtes neurales qui donneront le squelette facial. Le chondrocyte articulaire présente une morphologie normalement ronde ou polygonale, mais il peut également présenter une morphologie aplatie ou discoïde en fonction de sa localisation au sein du cartilage articulaire. Les chondrocytes présentent de nombreux lysosomes, vacuoles lipidiques et grains de glycogène. L'absence de vascularisation du cartilage articulaire est également un facteur limitant de façon importante la capacité de prolifération des chondrocytes [13]. Nourri par diffusion, le chondrocyte se caractérise par un métabolisme anaérobie [14, 15]. Il assure à la fois la synthèse de la MEC et son renouvellement. Le chondrocyte synthétise les macromolécules constitutives de la MEC (procollagènes, PG, acide hyaluronique) ainsi que les enzymes responsables de sa dégradation : cathepsines B et L [16], métalloprotéases (MMP : prostromélysine, collagénase) [17-19], agrécanases et autres

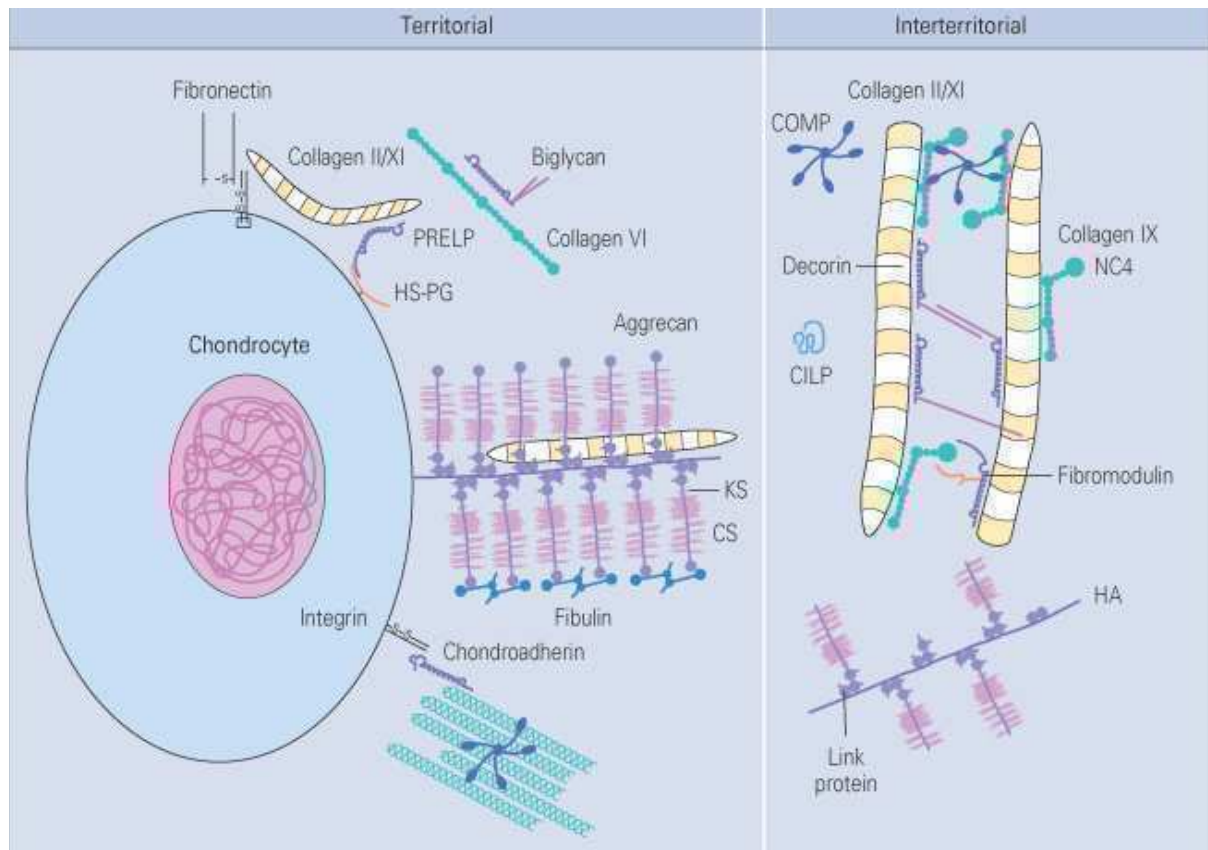


Figure 3 : La matrice extracellulaire du cartilage. Plusieurs classes de protéines existent et interagissent dans le cartilage articulaire: les collagènes (collagène II, VI, IX et XI), les PG (agrécan, syndécane), les petits PG riches en leucine (décorine, biglycane, chondroadhérine et fibromoduline, PRELP) et les protéines non collagéniques (COMP=cartilage oligomeric matrix protein, fibronectine, CILP, intégrines). D'après Heinegård *et al.*[28].

membres de la famille ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motifs) [20].

Le renouvellement des différentes protéines matricielles est variable d'une molécule à l'autre, la demi-vie du collagène de type II dépasse plusieurs centaines d'années (100 à 400 ans) [21-23] alors que celle de l'agrécan n'est que d'une vingtaine d'années [24, 25]. Ainsi, le phénomène de remodelage existe bien dans le cartilage et répond à différents stimuli. Le métabolisme des chondrocytes est en permanence influencé par les conditions physico-chimiques. En effet, les forces cycliques qui s'appliquent sur le cartilage articulaire retentissent sur l'espace péricellulaire, et sur la forme des chondrocytes. Il en résulte une modification des filaments d'actine du cytosquelette qui peut faire varier l'expression de certains gènes. Il existe donc un lien direct entre les contraintes mécaniques perçues par le chondrocyte et son activité métabolique [26].

En plus de la sollicitation mécanique, le phénotype chondrocytaire peut être influencé par de nombreuses cytokines, vitamines, hormones ou facteurs de croissance. Ainsi, les interleukines IL-1, l'IL-6, le tumor necrosis factor alpha (TNF α) inhibent la synthèse du collagène de type II, des PG et des inhibiteurs des MMP (tissue inhibitor of matrix metalloprotéases (TIMP)) et stimulent l'action des cathepsines et des MMP [27]. Tandis que les bone morphogenetic proteins (BMP 2, BMP 4, BMP 7), l'insulin-like growth factor (IGF), le transforming growth factor β (TGF β) stimulent la synthèse de collagène de type II et des PG et inhibent la production d'IL-1 et de MMP, intervenant ainsi dans la différenciation ou le maintien du phénotype chondrocytaire.

1.2.2 - La matrice extracellulaire du cartilage articulaire

La MEC du cartilage articulaire se compose d'un réseau de fibres de collagène, qui constitue la trame fibrillaire, baignant dans une substance fondamentale composée essentiellement de PG et d'eau. La MEC du cartilage est donc principalement constituée de fibres de collagène de type II, IX et XI dans lesquelles sont enchâssés des 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).

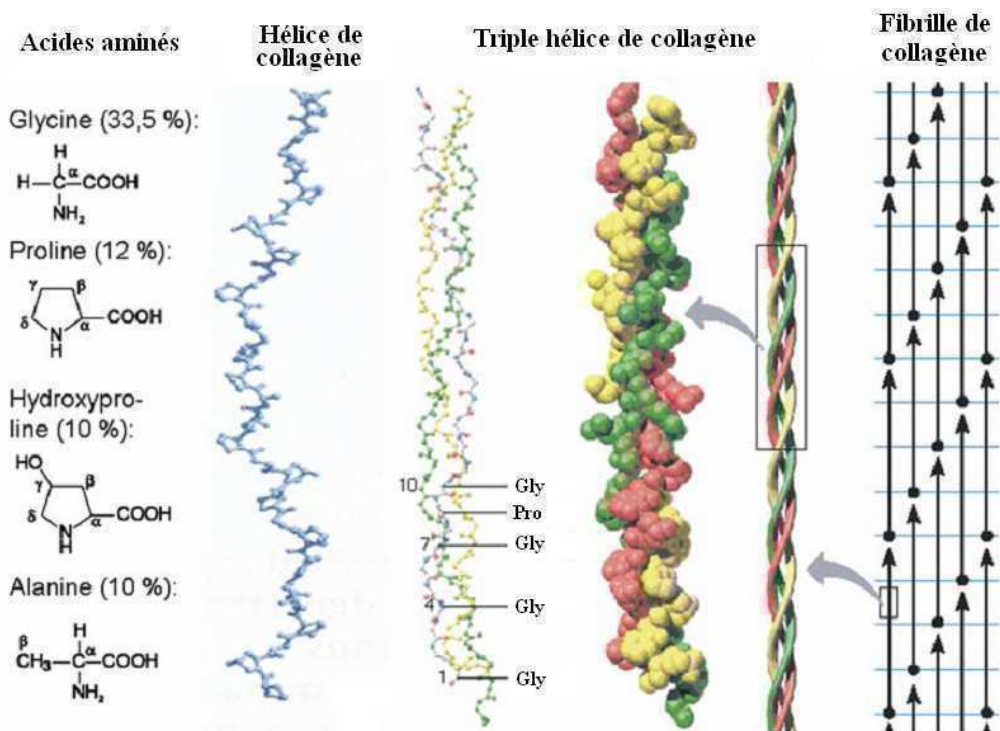


Figure 4 : Modélisation et structure du collagène. D'après Schulz *et al.* [34].

1.2.2.1 - Les collagènes : synthèse et fibrillogénèse

Les collagènes sont les protéines les plus répandues dans le règne animal. Chez l'homme, ils représentent approximativement un tiers des protéines de l'organisme, soit environ 5% de son poids. Les collagènes sont des protéines fibreuses participant à la structuration des organismes en assurant la cohésion et l'élasticité des tissus ainsi que leur résistance aux contraintes mécaniques. Il existe actuellement 29 types différents de collagènes identifiés [29-31]. Une des premières étapes de la production des protéines collagéniques consiste en la synthèse d'une chaîne α de collagène constituée d'une séquence répétitive d'acides aminés Gly-X-Y, dans laquelle X est généralement une proline et Y une hydroxyproline [32]. Cette structure primaire se replie sur elle-même et entraîne la formation d'une hélice de pas gauche de type hélice α . A la différence de l'hélice α , proprement dite, qui compte 3,6 résidus par tour avec un pas de 0,54 nm, l'hélice de collagène comporte moins de 3 résidus par tour avec un pas de 0.86 nm [33] (Figure 4). L'hélice de collagène est donc plus étirée qu'une hélice α classique. Ceci peut s'expliquer par l'absence de liaison H stabilisante entre les résidus d'une même hélice. La conformation hélicoïdale adoptée par les collagènes tient à leur séquence répétitive Gly-X-Y. En effet les résidus proline et hydroxyproline possèdent des chaînes latérales ayant un encombrement stérique tel que seule la conformation en hélice étirée permet de les projeter vers l'extérieur de l'hélice sans déstabiliser la chaîne polypeptidique. Toutes les protéines de la famille des collagènes sont des protéines sécrétées. Les chaînes de collagène comportent des domaines globulaires à leurs extrémités, les propeptides N- et C- terminaux qui restent libres. Au niveau des ribosomes, lors de la traduction des ARNm, le peptide naissant comporte, en sa partie N-terminale, une séquence d'adressage au reticulum endoplasmique granuleux (REG). De ce fait, le polypeptide de collagène est simultanément traduit et transloqué dans la lumière du REG. Durant cette étape, les modifications post-traductionnelles des chaînes telles que l'hydroxylation des résidus proline et lysine sont initiées. Certains des résidus hydroxylysine sont ensuite glycosylés par des motifs galactosyl- ou glucosyl-galactosyl- [35, 36]. Suite à la translocation des chaînes et à leurs modifications post-traductionnelles, celles-ci se trimérisent à partir des domaines C-terminaux pour former le pro-collagène. Cette triple hélice, de pas droit, peut être soit homotrimérique soit hétérotrimérique en fonction du type de collagène. Les molécules de procollagène après leur assemblage en triple hélice, sont ensuite transportées vers l'appareil de Golgi où elles s'agrègent les unes aux autres de manière parallèle [37], avant d'être excrétées dans l'espace extracellulaire. Une fois libérés, les agrégats de procollagène subissent le clivage enzymatique

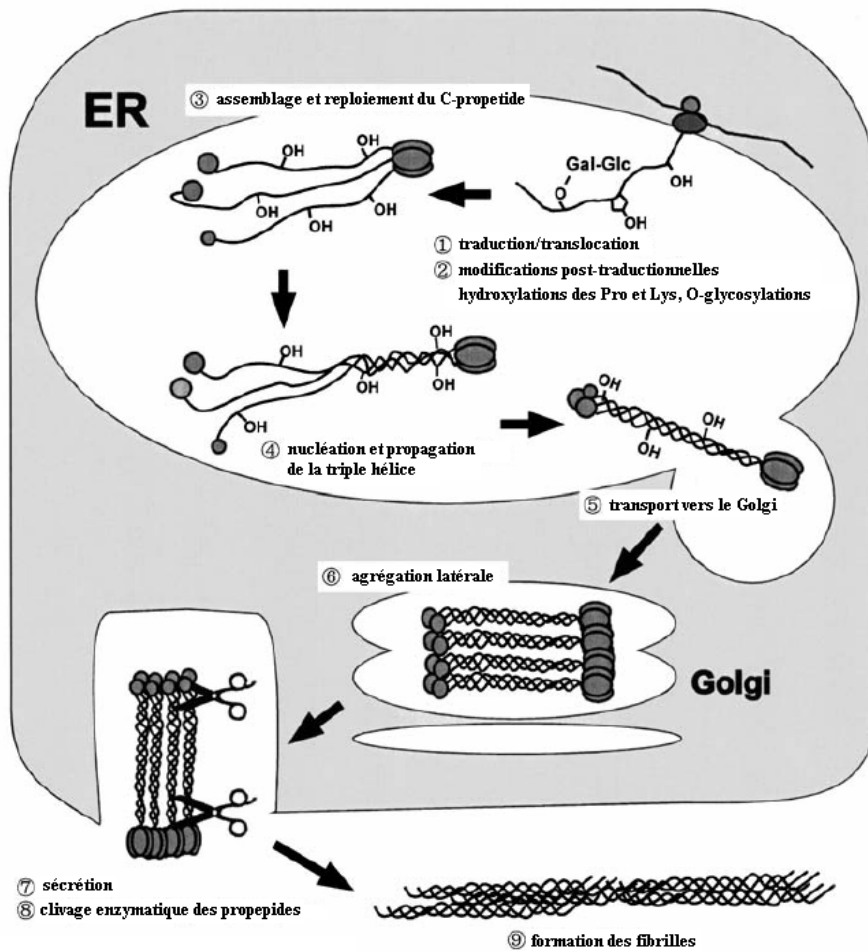


Figure 5 : Biosynthèse du collagène. D'après Koide *et al.* [49].




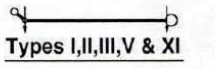
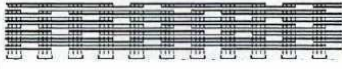

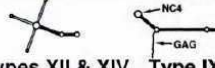
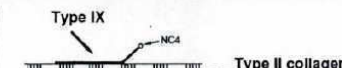

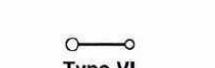
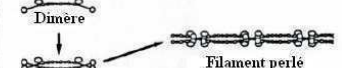

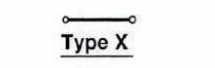


COLLAGENES 	AGREGATION représentation schématique 	AGREGATION observation au M.E.B. 
Collagènes formant des fibrilles striées périodiques ("Fibril-forming collagen") 90% des collagènes		
 Types I,II,III,V & XI		
Collagènes associés à des fibrilles avec des hélices interrompues (FACIT, "Fibril associated collagen with interrupted triple-helix")		
 Types XII & XIV Type IX		
Collagène formant des filaments perlés		
 Type VI		
Collagène formant des réseaux		
 Type X		

Figure 6 : Assemblages supramoléculaires des différents types de collagène. Modifié d'après Van der Rest *et al.* [32].

de leurs domaines N- et C- terminaux, générant ainsi des molécules de collagène matures : le tropocollagène (Figure 5). Les molécules de tropocollagènes sont capables de s'aligner les unes par rapport aux autres avec un décalage d'un quart de leur longueur selon l'axe des fibrilles leur donnant une striation périodique caractéristique de 670 Å.

La suite d'événements aboutissant à la sécrétion de tropocollagène fait intervenir successivement différentes protéines chaperones, certaines intervenant de manière générale dans les phénomènes sécrétoires telles que BiP/GRP78 [38, 39], calnexine-calreticuline [40], PDI (proteine disulfide isomérase) [41-43], PPIase (Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomérase) [44] et d'autres spécifiques du collagène comme Hsp47 (heat-shock protein 47), également connue sous le nom de colligine ou gp46 [45, 46] ou P4-H. (Prolyl-4-Hydroxylase) [41, 47, 48]. Ces protéines chaperones assurent un transport ainsi qu'un repliement correct du collagène lors de sa synthèse.

1.2.2.2 - Les collagènes du cartilage articulaire

Douze collagènes ont été identifiés dans le cartilage articulaire, les collagènes de type I, II, III, V, VI, IX, X, XI, XII, XIII, XIV et XVI. La présence des collagènes de type XII, XIII, XIV et XVI n'étant qu'anecdotique, seuls les collagènes de type I, II, III, V, VI, IX, X et XI seront abordés.

Les collagènes de type I, II, III et XI font partie de la famille des collagènes fibrillaires et présentent la structure décrite dans la partie fibrillogénèse des collagènes. Le collagène de type VI a la particularité de former des fibrilles de type "filament perlé". Les collagènes de type IX, XII et XIV sont des collagènes associés aux fibrilles ou FACIT collagène (fibrils associated collagen with interrupted triple-helix). Les fibrilles de collagène de type X ont la particularité de s'associer de manière à former un maillage hexagonal (Figure 6) [32].

Collagène de type I :

Le collagène de type I est le plus répandu dans l'organisme des Vertébrés. Il se retrouve également en grande proportion dans les tendons, les os, la peau, la cornée, les parois des vaisseaux sanguins et le cartilage. Le collagène de type I est composé de deux chaînes α_1 et d'une chaîne α_2 [2 $\alpha_1(I)$ et 1 $\alpha_2(I)$]. Les mutations touchant le gène codant pour le collagène de type I sont responsables de certaines pathologies. L'ostéogénèse imparfaite est le trouble le plus fréquent causé par une mutation du gène *COL1A1*. La présence de fibres de collagène de type I a été décrite dans la zone superficielle du cartilage articulaire et dans l'os sous-chondral [7].

Collagène de type II :

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 du cartilage articulaire [12]. La présence du collagène de type II a également été retrouvée dans d'autres tissus comme le disque intervertébral [50], la notochorde, la rétine, la cornée et l'humeur vitrée [51]. Le collagène de type II est le produit du gène *COL2A1*, et la protéine est un homotrimer composé de trois chaînes $\alpha_1(\text{II})$. Il existe deux formes majoritaires de transcrite 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 [52]. La forme longue, le collagène de type IIA, contient l'exon 2, codant pour un domaine de 69 acides aminés riche en cystéines au niveau N-terminal du propeptide. Elle est exprimée au cours du développement fœtal par les cellules préchondrogéniques et non chondrogéniques au niveau des bourgeons dentaires, du foie, du cortex surrénalien et des gonades. Le collagène de type IIA serait impliqué dans le remodelage, l'organisation et les interactions tissulaires [53, 54]. En revanche, la forme courte (IIB), ne contenant pas l'exon 2, est exprimée dans les chondrocytes matures et donc dans les tissus cartilagineux adultes [55]. Récemment, deux nouveaux isoformes IIC et IID ont été identifiés au cours de la différenciation chondrogénique de cellules souches de moelle osseuse chez le lapin et l'homme, mais leur rôle reste encore mal établi. L'isoforme IIC diffère de la forme IIA du fait qu'il ne possède que les 34 premiers nucléotides de l'exon 2, ceci étant dû à la présence d'un site d'épissage alternatif à ce niveau. Cela a pour conséquence de modifier le cadre de lecture et de faire apparaître un codon stop de manière prématurée, cet ARN est alors orienté vers la voie de dégradation des ARN non-sens, il n'existe donc pas de protéine correspondante. L'isoforme IID, quant à lui, présente un site d'épissage alternatif au-delà de la fin de l'exon 2 ce qui se traduit par la présence de 3 nucléotides additionnels, par rapport à l'isoforme IIA, il en résulte une protéine comportant un acide aminé supplémentaire. Ces deux isoformes IIA et IID sont coexprimés avec un ratio d'environ 3 : 1. *In vitro*, la suppression de ces sites d'épissage alternatifs provoque une diminution de l'expression des isoformes IIA et IIB [56]. Les souris transgéniques, pour lesquelles le gène *Col2a1* a été inactivé, présentent une chondrodysplasie létale caractérisée par un retard de développement des os longs et une absence totale de plaque de croissance. Ceci démontre l'importance du collagène II dans les mécanismes de formation du cartilage et particulièrement dans le processus d'ossification endochondrale [57]. Les mutations affectant le gène *COL2A1* sont responsables d'affections telles que l'achondrogenèse ou

l'hypochondrogenèse, de dysplasies de différents types ainsi que de certaines formes d'arthroses familiales.

Le collagène de type III :

Le collagène de type III est le deuxième collagène le plus abondant dans l'organisme humain après celui de type I [58]. Il est présent en grande quantité dans les tissus aux propriétés élastiques tels que l'os, le cartilage, la peau, les vaisseaux sanguins et différents organes internes [59, 60]. Le collagène de type III est un collagène homotrimérique [$3\alpha_1(\text{III})$] fibrillaire qui est présent dans le cartilage fœtal et est également détecté dans le cartilage articulaire adulte [61] sain et arthritique [62]. Le collagène de type III co-localise avec le collagène de type II au niveau du cartilage articulaire [63]. Les mutations affectant le gène *COL3A1* sont associées à la forme la plus sévère, le type IV, du syndrome d'Ehlers-Danlos [64]. Cette forme du syndrome, peut entraîner la mort suite à la rupture d'une artère principale ou de tout autre organe vital.

Le collagène de type VI :

La triple hélice de collagène de type VI est hétérotrimérique [$\alpha_1(\text{VI}), \alpha_2(\text{VI}), \alpha_3(\text{VI})$]. Son expression est quasi ubiquitaire. Il est exprimé dans différents tissus tels que le cartilage [65], le *nucleus pulposus* [66], la cornée [67], les muscles, la peau ... Le réseau de collagène VI est concentré autour des chondrocytes avec lesquels il interagit, au niveau de la zone péricellulaire [68]. Il a été démontré que ce collagène joue un rôle dans la maintenance des tissus en prenant part aux interactions cellule-matrice et matrice-matrice. En effet, le collagène de type VI interagit avec un grand nombre de protéines de la MEC telles que la fibronectine [69], la décorine, le biglycane [70, 71] et le hyaluronane [72]. Le rôle du collagène de type VI reste encore mal défini, mais il interviendrait dans l'organisation de l'architecture péricellulaire et dans la transduction de signaux mécaniques entre le chondrocyte et son microenvironnement [73]. Le collagène de type VI semble jouer un rôle prépondérant dans le muscle. En effet, les mutations dans les gènes codant le collagène de type VI sont associées à la myopathie de Bethlem [74] et à la dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich [75]. Il a également été démontré que l'inactivation du gène *Col6a1* chez la souris conduisait à l'apparition d'une myopathie [76]. De plus il a été observé qu'une sur-expression du collagène de type VI pourrait être associée au processus arthrosique [77].

Le collagène de type IX :

Le collagène IX est classé parmi les FACIT et représente environ 1% de la quantité totale de collagène dans le cartilage articulaire adulte, ce qui le classe parmi les collagènes dits mineurs. Le collagène de type IX est une molécule hétérotrimérique, composée de 3 chaînes α : $\alpha_1(\text{IX})$, $\alpha_2(\text{IX})$ et $\alpha_3(\text{IX})$ génétiquement distinctes et codées respectivement par les gènes *COL9A1*, *COL9A2* et *COL9A3* [78]. Chaque chaîne est constituée de 4 domaines non collagéniques (NC1 à NC4) séparés par 3 domaines collagéniques (COL1 à COL3) permettant la formation de la triple hélice [79]. Par ailleurs, il existe deux isoformes de la molécule de collagène $\alpha_1(\text{IX})$, issus d'un épissage alternatif. En effet, le domaine NC4 de la chaîne $\alpha_1(\text{IX})$ est codé par les exons 1 à 8 du gène *COL9A1*. La forme complète du domaine NC4 est exprimée dans le cartilage sous le contrôle d'un promoteur cartilage-spécifique. La forme tronquée, est quant à elle, exprimée dans l'humeur vitrée, la cornée ou la rétine sous le contrôle d'un promoteur situé entre les exons 6 et 7 [80]. Il a été démontré que le collagène de type IX peut se lier de manière covalente avec certains GAG tels que la chondroïtine sulfate (CS) et le dermatane sulfate (DS) via un site de liaison spécifique [78, 81, 82]. Dans le cartilage le collagène de type IX est présent à la surface des fibrilles et disposé suivant un arrangement spatial caractéristique. Le domaine hélicoïdal COL3 et le domaine globulaire NC4 se projettent vers l'extérieur de l'axe de la fibrille permettant ainsi l'établissement d'interactions avec d'autres molécules de l'espace périfibrillaire [83-85] telles que COMP [86] et la matriline-3 [87]. Il jouerait un rôle important dans l'organisation des composants de la matrice du cartilage en régulant le diamètre des fibrilles, l'espacement entre elles ainsi que les interactions avec les PG. Les souris n'exprimant pas le collagène de type IX ont un développement normal, mais présentent tardivement une dégénérescence des articulations semblable à l'arthrose, suggérant un rôle stabilisateur du collagène de type IX dans la structure du cartilage [88, 89]. Les mutations affectant le collagène de type IX ont été identifiées dans de multiples dysplasies épiphysaires responsables de l'apparition d'une arthrose précoce [90] ainsi que dans le syndrome de Stickler qui se traduit par des manifestations articulaires, ophtalmiques, auriculaires et au niveau du squelette oro-facial [91].

Le collagène de type X :

Le collagène de type X est un membre de la famille des collagènes à chaînes courtes. C'est un homotrimère de trois chaînes $\alpha_1(\text{X})$. Une chaîne $\alpha_1(\text{X})$ est constituée d'un court domaine N-terminal non hélicoïdal de 38 acides aminés (NC2), suivi d'un domaine collagénique de 463

acides aminés, puis d'un domaine C-terminal non collagénique (NC1) de 161 acides aminés [92, 93]. Le collagène de type X 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 [94], au niveau de la jonction ostéocondrale (tidemark) [95] et en quantité moindre au niveau de la surface du cartilage articulaire sain [96]. Le collagène de type X a la particularité de s'organiser de manière à former un réseau de fibrilles hexagonal et de se lier dans la MEC au collagène de type II et aux PG [32, 97]. L'expression du gène du collagène X a été détectée dans les chondrocytes du cartilage articulaire arthrosique où ils semblent réinitialiser une ossification endochondrale entraînant la formation d'ostéophytes et une sclérose de l'os sous-chondral [98]. Plus de 30 mutations du gène du collagène de type X ont été caractérisées chez des patients atteints de chondrodysplasie métaphysaire de Schmid (SMCD) [99]. Les souris invalidées pour le gène du collagène de type X présentent des malformations proches de celles observées dans les cas de SMCD [100] et des anomalies hématopoïétiques [101] ainsi que lymphocytaires [102].

Le collagène de type XI

Le collagène de type XI représente entre 3 et 10% de la quantité de collagène totale dans le cartilage articulaire adulte [103]. La triple hélice de collagène de type XI est une molécule hétérotrimérique, qui consiste en 3 chaînes α distinctes génétiquement, [α_1 (XI), α_2 (XI), α_3 (XI)]. La chaîne α_3 (XI) est en fait le produit du gène *COL2A1* et correspond à une version surhydroxylée de la chaîne α_1 (II) [104]. La présence du collagène de type XI est détectée au sein des fibrilles et associée au collagène de type II. Bien que la quantité de collagène XI soit faible dans le cartilage articulaire adulte, il y joue un rôle important dans l'assemblage et la régulation du diamètre des fibrilles de collagène. Le collagène de type XI joue également un rôle primordial dans l'organisation de la MEC dans les stades précoces du développement comme le démontre la présence de fibrilles de diamètre important et la structure désorganisée des plaques de croissance chez les souris chondrodystrophiques (*cho/cho*) [105]. Le collagène XI peut également lier les GAG présents dans la zone péricellulaire des chondrocytes (heparane sulfate (HS) et dermatane sulfate (DS)) [106, 107]. L'importance du collagène de type XI au sein du cartilage est également démontrée par l'identification de mutations des gènes de ce collagène dans le cadre de maladies. En effet, des mutations des gènes *COL11A1* et *COL11A2* ont été identifiées dans des chondrodysplasies telles que les syndromes de

Stickler de type I, II et III [108, 109], de Marshall [110] et dans les dysplasies oto-spondylo-megaépiphysaires. Par ailleurs, les souris déficientes en collagène XI meurent à la naissance et montrent des anomalies dans le cartilage des membres, de la mandibule et de la trachée [105].

1.2.2.3 - Les protéoglycanes du cartilage articulaire

Les protéoglycanes (PG) représentent 22 à 28% du poids sec du cartilage articulaire adulte. Ce sont des macromolécules dont le poids moléculaire est compris entre 6.10^4 et 4.10^6 Da. Un PG est défini par l'association de manière covalente d'une protéine axiale, comportant plusieurs domaines distincts, à des chaînes polysaccharidiques appelées glycosaminoglycanes (GAG) de différentes natures et qui peuvent être présentes en quantité variable (d'une à plusieurs centaines). Il existe, à l'heure actuelle plus d'une quarantaine de gènes distincts ayant été identifiés comme codant des protéines pouvant porter des GAG comme par exemple l'agrécan, le versican, le perlécan, le biglycan, la décorine, le syndécan...

Les GAG sont des hétéropolysaccharides formés par la répétition d'unités disaccharidiques. Les GAG sont chargés négativement de par la présence de groupements sulfates et carboxylates portés sur les unités osidiques [111]. Les unités disaccharidiques constitutives des GAG sont composées exclusivement d'hexosamines et d'acide hexuronique à l'exception du kératane sulfate (KS) pour lequel l'acide hexuronique est remplacé par un résidu galactose [112]. L'existence de 2 isomères de l'hexosamine : la N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et la N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc) permet de distinguer 2 groupes de GAG. D'une part, les glucosaminoglycanes tels que l'héparane sulfate (HS) et le KS et d'autre part, les galactosaminoglycanes que sont la chondroïtine sulfate (CS) et le dermatane sulfate (DS). L'acide hexuronique présente 2 épimères en 5' : l'acide D-glucuronique et l'acide D-iduronique [113]. 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.

La synthèse des PG débute par la synthèse de la protéine axiale dans le réticulum endoplasmique rugueux, puis l'addition des chaînes de GAG et leur maturation (épimérisation, sulfatation...) se font dans l'appareil de Golgi. Concernant les chaînes CS, DS et HS, elles sont liées à la protéine axiale par l'intermédiaire d'un tétrasaccharide greffé sous l'action des β -D-xylose transférases I ou II (XT-I ou II), au niveau de résidus de sérine

portés par la protéine axiale pour former l'enchaînement suivant : Ser-O- β -Xyl- β 1,4-Gal- β 1,3-Gal- β 1,3-GlcA [114, 115]. Le greffage de KS sur la protéine axiale ne se fait pas par le biais de ce tétrasaccharide de liaison, mais via un polysaccharide ramifié de 4 ou 7 résidus osidiques suivant le type cellulaire et la fonction du PG. Une fois constitué, le PG peut alors subir une phase de maturation au niveau de ses GAG pouvant faire intervenir des O-sulfatations ou des N-sulfatations et des désacétylations [111, 116].

La synthèse de l'AH, GAG ne se liant pas à une protéine axiale, est réalisée par une acide hyaluronique synthase intégrée à la membrane cellulaire et n'a donc pas lieu dans l'appareil de Golgi contrairement aux autres GAG.

Les PG, de par leur diversité en termes de nature et de taille de protéine axiale, de nature et de nombre de GAG qu'ils comportent, ont des caractéristiques physico-chimiques très variables. Ce qui leur confère des activités spécifiques en accord avec leur localisation et leurs fonctions biologiques [117-119]. Certains PG de la MEC jouent un rôle important dans la rétention d'eau. Leur haute charge négative attire les contre-ions augmentant ainsi l'osmolarité locale et permettant de drainer l'eau environnante. L'eau ainsi accumulée et associée au PG dans la matrice est responsable des propriétés biomécaniques du cartilage [28]. Une autre des propriétés des PG est de stocker et de préserver des facteurs de croissance ou cytokines et de les rendre disponibles lors des phases de croissance, différenciation ou de remodelage du tissu (crinopexie) [120]. De plus, les PG peuvent jouer le rôle de membrane d'exclusion en laissant passer les solutés de bas poids moléculaire tout en étant imperméable aux macromolécules, protégeant par exemple un facteur de croissance du complexe enzymatique responsable de sa dégradation [121]. Ils peuvent aussi établir des interactions entre différentes protéines de la MEC et intervenir dans la régulation et l'organisation de celle-ci, notamment au niveau de la fibrillogenèse des collagènes [122, 123]. Il existe également des PG localisés au niveau de la membrane cellulaire pouvant jouer un rôle dans la signalisation intracellulaire [124, 125].

Les PG peuvent être classés en 5 familles distinctes : les hyalectanes, les PG de membranes basales, les petits PG riches en leucine (SLRPs, Small Leucine-Rich Repeat Proteoglycans) qui sont des PG sécrétés au niveau matriciel, les PG de surface et les PG circulants. Ces derniers n'étant pas exprimés dans le cartilage, ne seront pas détaillés plus avant.

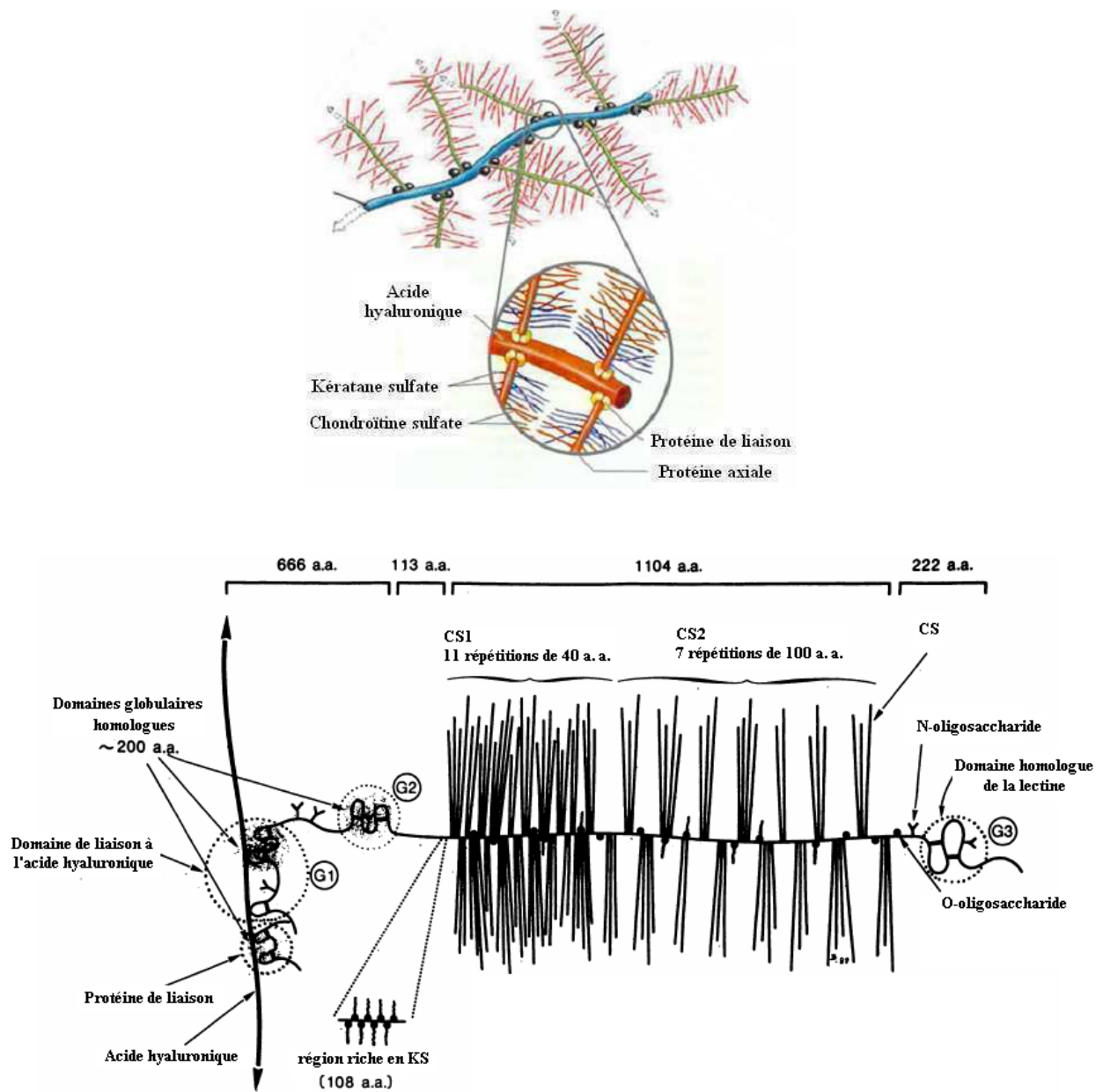


Figure 7 : Structure générale et organisation de l'agrécane. D'après Dudhia *et al.* Heinegard *et al.* et Schulz *et al.* [34, 112, 127]

1.2.2.3.1 - Les hyalectanes

Les hyalectanes sont nommés ainsi car ils présentent la particularité de pouvoir se lier aux AH et aux lectines. La famille des hyalectanes comprend 4 membres : l'agrécan, le brévicane, le neuronane et le versicane.

L'agrécan et le versicane sont essentiellement exprimés dans le cartilage tandis que le brévicane et le neurocane sont majoritairement exprimés au niveau du système nerveux et ne seront donc pas décrits plus avant. L'agrécan étant le PG majeur du cartilage articulaire, sa description sera plus largement détaillée.

L'agrécan

L'agrécan (Figure 7) est un large agrégat moléculaire contenant 30 chaînes de KS et plus d'une centaine de chaînes de CS liées de façon covalente à la protéine axiale d'environ 220kDa. Il représente 90% des PG du cartilage [126].

Le domaine I ou partie N-terminale possède deux domaines globulaires G1 et G2 séparés par une zone interglobulaire. Le domaine globulaire G1 contient le site d'interaction à l'acide hyaluronique (AH) [112]. Le domaine globulaire G2 est incapable de lier l'AH, la protéine de liaison ou le collagène. Cependant, il a été suggéré que le domaine G2 pourrait inhiber la sécrétion d'agrécan de mauvaise qualité, jouant ainsi un rôle de garant de la production d'une molécule d'agrécan fonctionnelle et mature [128].

Le domaine II ou domaine central, correspond à la région substituée par les chaînes de GAG. Ce domaine peut être divisé en deux domaines, le domaine kératane sulfate (KS) et le domaine chondroïtine sulfate (CS). Le domaine KS est substitué par environ 30 chaînes KS chez l'humain. Ce domaine KS contribuerait au développement tissulaire en interagissant avec les fibrilles de collagène et jouerait un rôle positif dans le processus de sécrétion de l'agrécan [129]. Le domaine CS a pour fonction majeure de maintenir l'hydratation du cartilage.

Le domaine III ou domaine C-terminal correspond au domaine globulaire G3, contenant un module de type lectine, un ou plusieurs modules de type Epidermal Growth Factor (EGF) et un domaine de type protéine régulatrice du complément (CRP). Le module lectine pourrait jouer un rôle dans les interactions cellules-cellules ou cellules-matrice. Par ailleurs, il a été suggéré que le domaine G3 pourrait moduler la formation du réseau d'agrégats. Le domaine G3 serait associé, en général, à l'agrécan immature fraîchement synthétisé [130].

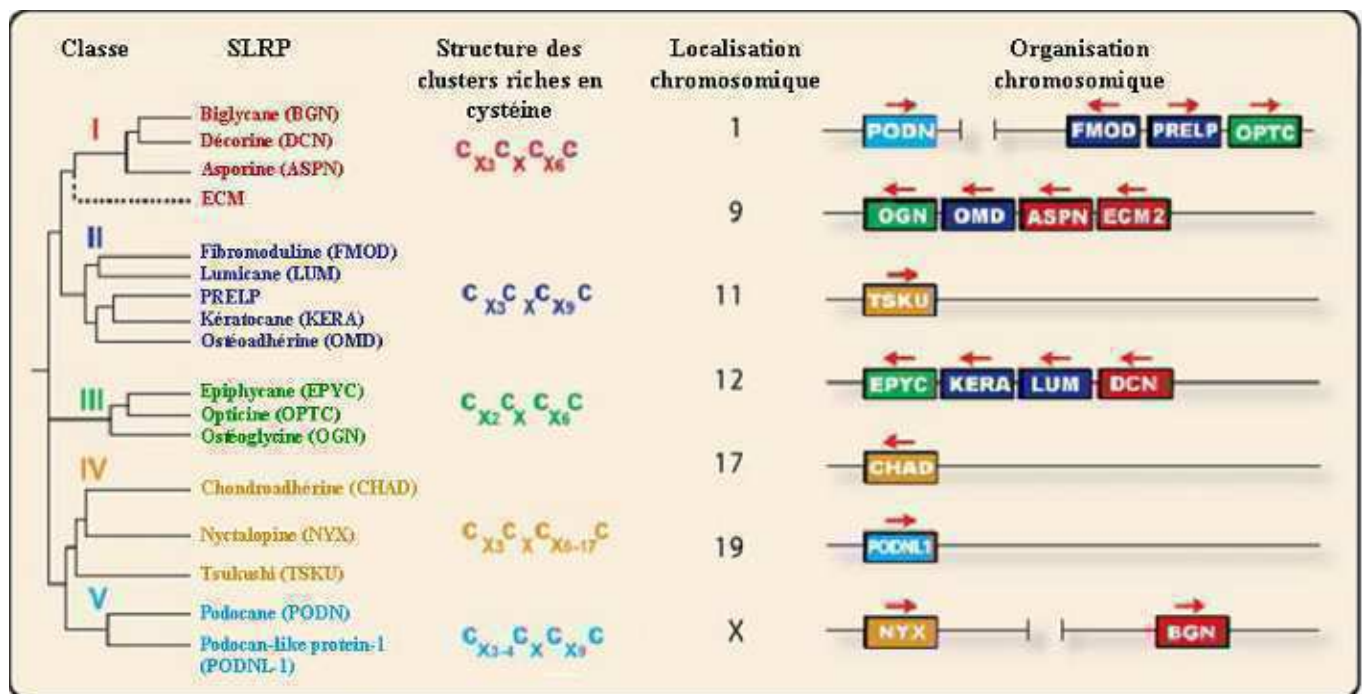


Figure 8 : Organisation phylogénétique, structurale et chromosomique des différentes SLRPs humaines. D'après Schaefer *et al.* [144]

Le versicane

Le versicane comporte un fort degré d'homologie avec l'agrécan. Les différences majeures qui peuvent être observées vis-à-vis de l'agrécan sont tout d'abord la taille de la protéine axiale de 450kDa contre 220kDa pour l'agrécan. La protéine axiale du versicane ne comporte pas de domaine globulaire G2 et est substituée exclusivement par des chaînes CS. Le versicane présente 2 profils d'expression distincts. Dans les tissus adultes, il est constitutivement exprimé au niveau du cœur, des vaisseaux sanguins, du cerveau et de la peau. Au stade embryonnaire, il est exprimé de manière transitoire dans les follicules des cheveux, l'ébauche du cœur, au niveau des condensations mésenchymateuses formant le cartilage et du périchondre [131]. Le versicane semble fortement impliqué dans la condensation cellulaire et la différenciation chondrogénique notamment en intervenant dans la régulation et la signalisation du TGF β [132, 133].

1.2.2.3.2 - Les protéoglycanes de membranes basales

Il existe une grande diversité de protéoglycanes (perlécane, bamacane, agrine, leprecan...) prenant part à la composition des membranes basales et à l'organisation de la MEC. Ils participent généralement à des interactions qui les associent aux laminines et collagènes de type IV et XVIII. Le perlécane est particulièrement intéressant, car il est également présent dans des tissus ne comportant pas de lame basale comme le cartilage, le disque intervertébral ou le liquide synovial [134, 135].

Le perlécane

La protéine axiale du perlécane (467kDa chez l'humain) est constituée de 5 domaines distincts et comporte plus d'une vingtaine de sites de glycosylation. En position N-terminale, le perlécane comporte 3 sites d'attachement aux chaînes d'HS et/ou CS. Ce domaine, grâce aux GAG qu'il porte joue un rôle primordial dans le stockage et la régulation de l'activité de nombreux facteurs de croissance (BMP, TGF, VEGF, FGF, PDGF...) [136].

Lors de la chondrogenèse, l'expression du perlécane se fait après celle du collagène de type II et précède celle du collagène de type X au niveau des chondrocytes prolifératifs, préhypertrophiques et hypertrophiques [137]. Il a récemment été décrit que la nature et la longueur des chaînes de GAG du perlécane jouerait un rôle primordial dans la maturation du cartilage [138]. Il a été constaté que lors du développement ostéochondral, la longueur des chaînes de GAG du perlécane diminuait suivant un gradient depuis la zone proliférative du

cartilage vers la jonction ostéocondrale sous l'effet d'héparanases et de chondroïtinases [138, 139]. Le clivage des GAG du perlécane aurait pour conséquence de modifier la biodisponibilité des facteurs de croissance, notamment BMP-2, modifiant ainsi leurs concentrations locales et favorisant la minéralisation [140]. Le perlécane, en plus de son rôle structural au sein de la matrice du cartilage, serait un acteur majeur dans la régulation des phénomènes de minéralisation.

Les souris dont le gène codant pour le perlécane (*Hspg2*) a été invalidé ne sont pas viables. Environ 50% d'entre elles meurent d'hémorragie cardiaque *in utero* à 10-12 jours. Les survivantes présentent des anomalies sévères au niveau céphalique et cartilagineux. Ces animaux meurent de détresse respiratoire au moment de la naissance. Chez l'humain, des mutations au sein du gène codant pour le perlécane ont été identifiées. Dans le cas de la dysplasie dyssegmentaire de type Silverman-Handmaker, une forme autosomique récessive de nanisme létale, une duplication de l'exon 34 est responsable de la synthèse de formes tronquées et non fonctionnelles du perlécane [141]. Une mutation impliquant le gène codant pour le perlécane a été identifiée dans le syndrome de Schwartz–Jampel qui est une affection de transmission autosomique récessive dont les signes cliniques sont une chondrodystrophie accompagnée d'une myotonie [142].

1.2.2.3.3 - Les petits protéoglycans riches en leucines (SLRPs)

Les SLRP sont des protéines de la matrice extracellulaire qui comprennent plusieurs répétitions riches en leucine (LRR). La famille grandissante des SLRPs comprend actuellement 17 membres exprimés dans une grande variété de tissus. Ils se répartissent en cinq classes distinctes selon plusieurs paramètres incluant la conservation et l'homologie de séquence à un niveau génomique et protéique, la présence et la séparation des quatre cystéines N-terminales et également l'organisation chromosomique (Figure 8) [143, 144].

La structure des SLRP répond à une structure commune avec une protéine axiale de 35 à 40kDa organisée autour d'un domaine central riche en leucine compris entre des domaines à cystéines [143]. Les chaînes de GAG sont localisées soit au niveau N-terminal (biglycane, décorine), soit dans le domaine central (fibromoduline). Ces SLRP peuvent intervenir dans l'adhésion cellulaire via leurs interactions avec la fibronectine ou la thrombospondine. Par ailleurs, les SLRP en se liant aux facteurs de croissance et aux cytokines, régulent leur stabilité, leur biodisponibilité et leurs activités biologiques. Elles semblent également jouer un

rôle important dans la fibrillogenèse et la stabilisation des composants de la matrice. En effet, elles peuvent, via leur domaine riche en leucine, se lier aux collagènes fibrillaires participant ainsi à leur organisation tout en protégeant leurs sites de clivage des collagénases [145]. Il a récemment été décrit que les SLRP pourraient moduler la voie classique du complément (immunité innée) dans les maladies liées à une inflammation chronique de la MEC telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrose, l'athérosclérose ou la broncho-pneumopathie chronique obstructive [146].

Les SLRP de classe I

Dans cette classe, nous retrouvons le biglycane, la décorine, l'asporine, tous trois exprimés dans le cartilage. Cette classe contient également l'ECM-2 et l'ECM-X (extra-cellular matrix protein 2 et liée au chromosome X) essentiellement exprimées au niveau du tissu adipeux et des glandes mammaires.

Le biglycane, la décorine et l'asporine sont capables d'interagir avec le TGF- β et les BMP et d'en réguler l'activité en les séquestrant dans la matrice extracellulaire [147, 148]. Ces 3 membres des SLRP de classe I semblent également fortement impliqués dans l'organisation de la MEC du cartilage et particulièrement dans le processus de la fibrillogenèse [149, 150] de par leurs interactions avec les collagènes de types I [151], II [152] et VI [70, 71]. Ces SLRP apparaissent également comme impliqués dans les phénomènes de régulation de la minéralisation [153-156]. Dans le cartilage articulaire humain, le biglycane est majoritairement présent au niveau de la matrice péricellulaire tandis que la décorine est essentiellement retrouvée au niveau de la matrice interterritoriale [157]. Au stade fœtal, le biglycane est exprimé de façon majoritaire par rapport à la décorine. A l'âge adulte, cette tendance s'inverse avec une chute de l'expression du biglycane dans le cartilage articulaire humain sain [158]. Certaines formes du gène codant pour l'asporine pourraient être associées à une inhibition de la chondrogenèse [159] et à une susceptibilité accrue à développer une arthrose [160] ou une dégénérescence discale [161]

Les SLRP de classe II

Ce groupe, comprenant cinq membres, peut être divisé en trois sous-familles distinctes. La fibromoduline et le lumican constituent la première sous-famille, le kératocane et PRELP (Proline/aRginine-rich End Leucine-rich repeat Protein) constituent la deuxième sous-famille et l'ostéoadhérine (ou ostéomoduline) forme la dernière sous-famille. Le kératocane et l'ostéoadhérine ne sont que peu ou pas exprimés au niveau du cartilage. Ils sont présents

essentiellement dans la cornée, les tendons pour le premier [162] et au niveau de l'os pour le deuxième [163].

La fibromoduline est le membre des SLRP le plus abondant de l'organisme. La fibromoduline intervient dans la régulation de la fibrillogenèse en se fixant sur le collagène de manière complémentaire à la décorine [123, 164], via ses LRR 5-7 [165]. La fibromoduline est impliquée dans la régulation de facteurs de croissance tels que la BMP-2 [166], le TGF [148]. Le lumican est essentiellement exprimé au niveau de la cornée, mais il est également retrouvé au niveau de la peau des tendons, du cartilage et des disques intervertébraux [167, 168].

La fibromoduline et le lumican sont exprimés dans le cartilage, aux stades de développement précoces sous forme de protéoglycane (substitués par des GAG), mais à l'âge adulte ils sont principalement sous forme de glycoprotéine (absence de GAG) [169]. La transition de l'état de protéoglycane à celui de glycoprotéine ne serait pas uniquement due à des phénomènes dégénératifs, mais le degré de substitution des protéines axiales serait modulé par des facteurs de croissance et/ou cytokines qui auraient un effet direct sur la synthèse de KS [170].

PRELP est une glycoprotéine (58kDa) qui contrairement aux autres membres des SLRP de classe II n'est pas substituée par des chaînes de GAG et est chargée positivement. PRELP a été isolée pour la première fois à partir de cartilage articulaire bovin et sa présence a également été détectée dans la plupart des tissus de nature cartilagineuse [171]. Cette protéine est capable de se lier aux collagènes de types I et II ainsi qu'au perlécane [172]. Il semblerait que PRELP soit impliquée dans la pathogenèse de la progeria de type Hutchinson-Gilford [173].

Les SLRP de classe III

Cette classe contient trois membres : l'épiphycane, le mimécane et l'opticine. L'épiphycane est essentiellement exprimé dans la zone intermédiaire du cartilage [174, 175], il est également retrouvé au niveau des ligaments et des tissus placentaires.

Le mimécane également appelé ostéoglycine ou facteur ostéoinductif a été initialement identifié à partir de l'os [176]. Par la suite, différents variants issus de l'épissage alternatif ont été détectés au niveau de la cornée [177], de la glande pituitaire [178] et du cartilage [179]. Sa fonction physiologique n'est pas encore clairement établie, mais il semblerait impliqué dans les phénomènes de calcification ectopique au niveau vasculaire [180, 181] et dans l'hypertrophie du ventricule gauche du cœur [182].

L'opticine est exprimée dans la plupart des tissus de l'œil (humeur vitrée, cornée, rétine, choroïde...). Les mutations affectant le gène correspondant (*OPTC*) seraient responsables de

la survenue de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. L'opticine pourrait également intervenir dans le développement ostéochondral. En effet, elle semblerait impliquée dans un syndrome dysplasique oculo-squelettique de transmission autosomique récessive se traduisant par une diminution de la viscosité de l'humeur vitrée conduisant à la cécité associée à un nanisme dû à un défaut de développement des plaques de croissance [183].

Les SLRP de classe IV

La quatrième classe est composée de la chondroadhérine (ou CHAD), de la nyctalopine et de deux nouveaux membres : tsukushi [184] et la synleurine (ou importine 11) [185] récemment identifiés. Actuellement, seules les expressions de CHAD et de la synleurine ont été détectées au niveau du cartilage.

CHAD est une glycoprotéine qui, comme son nom le suggère, est impliquée dans l'adhésion cellulaire. Elle est en effet capable d'établir des interactions avec le collagène [186], la fibronectine [26] et les intégrines de type $\alpha_2\beta_1$ [187]. Récemment, l'augmentation du niveau d'expression de CHAD a été décrite comme un marqueur potentiel de la dégénérescence discale due à une scoliose [188, 189].

La synleurine est une glycoprotéine dont l'expression a été détectée dans différents tissus incluant le cartilage, les muscles lisses, le pancréas, le cerveau, le tissu adipeux, la rate, les testicules... Elle semblerait impliquée dans des effets synergiques sur l'action de certains facteurs de croissance (bFGF, EGF, IGF, PDGF...) [185].

Les SLRP de classe V

Cette classe contient deux membres, le podocane et la podocane-like protein 1. Ces deux protéines (70 et 57kDa respectivement) sont principalement exprimées au niveau du rein, du cœur et des cellules vasculaires des muscles lisses [190].

1.2.2.3.4 - Les protéoglycanes de surface

Les PG de surface sont pour la plupart, des PG à HS. Ils sont localisés au niveau de la membrane plasmique des chondrocytes. Ils regroupent essentiellement les superfamilles des syndécans et des glypicanes. Ces PG de surface sont classifiés en fonction de leur type d'association avec la membrane plasmique. Situés à la surface des cellules, ils régissent de nombreux processus biologiques tels que les interactions cellule-cellule, cellule-matrice, la prolifération cellulaire et sont également capables de jouer le rôle de co-récepteur membranaire. Ils peuvent aussi fixer des cytokines et facteurs de croissance, régulant leurs actions en contrôlant leurs biodisponibilités [191].

Les syndécanes

Les syndécanes sont liés à la membrane directement grâce à une région hydrophobe transmembranaire de leur axe protéique. Chez les Vertébrés, quatre types de syndécanes sont dénombrés avec des expressions dépendantes du type cellulaire [192, 193]. Le syndécane-1 est présent essentiellement dans les cellules épithéliales. Le syndécane-2 est retrouvé de façon abondante dans les cellules mésenchymateuses alors que le syndécane-3 est exprimé de façon prépondérante dans le système nerveux. Le syndécane-4 est, lui, exprimé de façon ubiquitaire. L'expression des 4 types de syndécanes a été décrite au niveau des chondrocytes articulaires avec une expression majeure du syndécane-4. Le syndécane-3 serait plutôt exprimé dans les phases précoces de la chondrogenèse [157, 194, 195]. Les syndécanes seraient impliqués dans les phénomènes arthrosiques. Leur surexpression au sein des chondrocytes arthrosiques hypertrophiques activerait certaines enzymes responsables de la dégradation de la MEC (ADAMTS-4 et 5 = agrécanases I et II) [196, 197].

Le bétaglycane

Le bétaglycane (récepteur de type III du TGF- β), tout comme les syndécanes, est lié à la membrane directement grâce à une région hydrophobe de son axe protéique [111]. Cette fonction lui permet de réguler la prolifération et la différenciation cellulaire [130].

Les glypicanes

Les glypicanes sont des PG liés à la membrane plasmique, indirectement via un groupement glycosylphosphatidylinositol. La famille des glypicanes compte 6 membres chez l'homme. Les glypicanes modulent les réponses cellulaires pour différents facteurs de croissance tels que les BMP, IGF, FGF, Wnts et Hedgehog [198].

Le CD 44

Le CD 44 est un PG membranaire exprimé par les chondrocytes [195]. Il est l'acteur principal dans l'interaction entre le chondrocyte et l'AH. De par ses propriétés de liaison à l'AH, le CD 44 a une forte implication dans les phénomènes de migration cellulaire, car celui-ci peut être clivé, et de stabilisation de la matrice. Il a été démontré que l'expression du CD 44 se trouvait diminuée à la surface des chondrocytes ayant été dédifférenciés [199]. En revanche, elle se trouve augmentée lors de processus inflammatoires ou arthrosiques. En effet, le CD 44 est également impliqué dans le renouvellement de l'AH. Il a été démontré que seuls les macrophages et les chondrocytes étaient capables d'internaliser et de dégrader l'AH via le CD 44 [200]. Dans des conditions inflammatoires, le CD 44 ne permet plus de maintenir l'homéostasie du cartilage, sa surexpression conduit à une dégradation accélérée de l'AH.

Tableau I : Intégrines des chondrocytes et leurs ligands

Intégrine	Ligand	Références
$\alpha 1\beta 1$	Collagènes de types I,II, IV et VI	[203-206]
$\alpha 2\beta 1$	Collagènes I, II, IV et VI, chondroadhérine	[187, 203-208]
$\alpha 3\beta 1$	Collagène de type IV, Fibronectine, laminine	[203, 209]
$\alpha 4\beta 1$	Chondrocytes	[203]
$\alpha 5\beta 1$	Collagène de type II, Fibronectine	[210-212]
$\alpha 6\beta 1$	Laminine	[203]
$\alpha 10\beta 1$	Collagène de type II	[208, 213, 214]
$\alpha 11\beta 1$	Collagène de type I	[215]
$\alpha V\beta 3$	Collagène de type IV, Thrombospondine, Fibronectine	[216, 217]
$\alpha V\beta 5$	Collagène de type IV, Annexine V	[217, 218]

1.2.2.4 - Autres constituants

Outre les collagènes et les protéoglycanes, il existe un grand nombre de protéines ou glycoprotéines matricielles ou membranaires qui jouent un rôle essentiel dans l'organisation, la structure et le maintien du tissu cartilagineux.

Les intégrines

Les intégrines sont une famille de récepteurs membranaires hétérodimériques composés de deux sous-unités transmembranaires, α (120 à 180kDa) et β (90 à 110kDa), liées de manière non covalente. Chez l'homme, il a été dénombré 18 sous-unités α et 8 sous-unités β qui peuvent s'associer de façon hétérodimérique pour former au moins 24 récepteurs différents [201].

Les interactions entre la MEC et les chondrocytes sont principalement médiées via les intégrines et interviennent dans les processus de différenciation, de remodelage de la MEC et de réponse aux stimuli mécaniques. Il a été démontré que les chondrocytes articulaires expriment les intégrines $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha10\beta1$, $\alpha11\beta1$, $\alphaV\beta3$ et $\alphaV\beta5$ à leur surface [202]. Ces intégrines sont capables de reconnaître des motifs peptidiques des composants de la MEC du cartilage tels que les collagènes, la chondroadhérine, la fibronectine, les laminines et les thrombospondines (Tableau I).

Les intégrines jouent un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire et représentent le lien entre les stimuli environnementaux et la réponse cellulaire. Une fois l'interaction établie entre l'intégrine et son ligand, un signal est transduit au cytosquelette d'actine du chondrocyte via des protéines généralement associées à la sous-unité β telles que la tensine, la vinculine, la paxiline ou la taline. En parallèle, des voies de signalisation intracellulaires peuvent être activées via des protéines FAK (focal adhesion kinase) afin que des modifications au niveau transcriptionnel permettent une réponse adaptée du chondrocyte aux stimuli [201, 219].

La fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine ubiquitaire de haut poids moléculaire (440kDa). Elle existe sous forme soluble dans le plasma et sous forme insoluble dans la MEC de différents tissus. La fibronectine présente dans le cartilage articulaire joue un rôle dans les mécanismes d'adhésion, de prolifération, de différenciation et d'organisation de la MEC en établissant des liaisons avec l'héparine, la fibrine, la décorine, les intégrines, les syndécans à la surface des chondrocytes et le collagène [220, 221]. Lors d'arthrose ou de polyarthrite rhumatoïde, la production d'un fragment protéolytique de fibronectine est augmentée (fragment-f). Ce

fragement-f serait impliqué dans une cascade catabolique accélérant la dégradation du cartilage notamment par la libération de cytokines et de MMP [222, 223].

Les thrombospondines

Les thrombospondines (TSP) appartiennent à une famille de glycoprotéines matricielles multimériques dont 5 membres sont actuellement connus. Ceux-ci sont répartis en 2 sous-familles TSP-1 et -2 qui sont homotrimériques et TSP-3, -4 et -5 (COMP : cartilage oligomeric matrix protein) qui sont homopentamériques. Ces protéines interviennent dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice, elles ont également toutes une activité anti-angiogénique [224].

Les TSP-1 et -2 ont une distribution similaire à celle de la tenascine-c dans les tissus chondrogéniques pendant les stades précoces du développement. En effet, leur expression a été détectée au niveau du périchondre lors de la phase de condensation des cellules mésenchymateuses et elle diminue au fur et à mesure que les chondrocytes se différencient [225]. Chez l'humain, dans le cartilage articulaire adulte sain, la TSP-1 est principalement présente au niveau des zones médiane et profonde [226]. Il a été décrit que la TSP-1 avait des domaines de liaisons avec le CD 36 et qu'il résulte de cette coactivation un puissant effet inhibiteur de la vascularisation [227]. De plus, les TSP-1 et -2 ont la capacité à se lier à divers constituants de la MEC du cartilage ou protéines de surface des chondrocytes tels que les intégrines de type αV ou $\beta 1$, les syndécans, la fibronectine, le collagène de type V et les laminines. Elles seraient également impliquées dans la régulation de l'activité de certains facteurs de croissance (TGF- β , FGF-2 et bFGF) et de MMP [228, 229].

L'expression de la TSP-3 se fait consécutivement à celle des TSP-1 et -2 pendant les phases précoces du développement. Au stade adulte, elle est essentiellement exprimée dans les zones hypertrophiques et calcifiées du cartilage [230, 231].

La TSP-4 est retrouvée avec un niveau d'expression relativement faible au niveau des chondrocytes de la plaque de croissance et de manière plus importante au niveau de l'œil au stade fœtal [232].

La TSP-5 plus communément désignée par "cartilage oligomeric matrix protein" COMP est fortement exprimée au niveau de la matrice territoriale des chondrocytes. Elle contribue à l'intégrité structurale du cartilage hyalin en se liant entre les collagènes de type II et IX [233], la fibronectine [234] et l'agrécan [235]. Son dosage dans le liquide synovial ou le sérum peut être utilisé pour diagnostiquer et évaluer précocement une dégénérescence du cartilage

articulaire [236-238]. Par ailleurs, il a été suggéré que des mutations dans le gène de la COMP seraient à l'origine de syndromes autosomiques dominants tels que des pseudoachondrodysplasies ou des dysplasies épiphysaires multiples [239-241]. De façon intéressante, une étude récente a montré, dans un modèle de souris exprimant, de manière inductible, une forme mutée de COMP que les protéines non fonctionnelles s'accumulaient au sein du réticulum, entraînant ainsi l'apoptose des chondrocytes, mimant ainsi la pseudoachondrodysplasie [242].

La lubricine et la SZP (superficial zone protein)

La lubricine (227kDa) et la SZP (345kDa) sont des glycoprotéines, issues du même gène *PRG4*, secrétées respectivement par les synoviocytes et les chondrocytes de la zone superficielle du cartilage [243]. La dégradation du cartilage observée dans les cas de polyarthrite rhumatoïde fait suite à une augmentation des forces de frictions dans l'articulation [244]. Cette augmentation des forces de friction est due en partie à une diminution de la lubrification, résultant d'une diminution de la synthèse de lubricine par les fibroblastes synoviaux et de SZP par les chondrocytes de la zone superficielle [245, 246]. De plus, des modifications de la lubricine par sur-glycosylation entraîneraient le recrutement de neutrophiles participant ainsi à la réponse inflammatoire [247]. Les souris invalidées pour le gène *Prg4* codant la lubricine et la SZP montrent des signes d'hyperplasie synoviale, de fibrose de la subintima et un dépôt protéique à la surface du cartilage articulaire [248]. Cette dysfonction articulaire est très similaire à celle observée chez l'homme dans le syndrome associant camptodactylie, arthropathie, coxa vara et péricardite [249].

L'annexine V

L'annexine V est un complexe transmembranaire hexamérique ayant une fonction de liaison aux collagènes de type I, II et X et de transporteur de calcium [250]. L'annexine V est retrouvée au niveau de la zone superficielle du cartilage et au niveau des chondrocytes de la plaque de croissance [218]. Elle serait impliquée dans l'apoptose et en lien avec le processus de minéralisation de la MEC cartilagineuse par les chondrocytes hypertrophiques [251, 252]. Il a été démontré, *in vitro*, dans un modèle mimant les conditions arthrosiques, que des chondrocytes surexprimant l'annexine V, en présence importante de cristaux phosphocalciques devenaient apoptotiques [252]. Une hypothèse a également été émise, selon laquelle l'annexine V serait impliquée dans la mécanotransduction de par ses propriétés de liaison aux collagènes [253, 254].

Upper zone of growth plate and Cartilage Matrix-Associated protein (UCMA)

UCMA désignait initialement la "Unique Cartilage Matrix-Associated protein". Elle vient d'être dernièrement renommée "Upper zone of growth plate and Cartilage Matrix-Associated protein". Il s'agit d'une protéine récemment identifiée (2008) faisant partie de la famille des protéines riches en motifs γ -carboxyglutamates (protéines Gla) telles que la protéine Gla matricielle (MGP), la "bone sialoprotein" (BSP), l'ostéocalcine (BGP) ou la fétuine et dont la fonction est dépendante de la vitamine K [255]. Elle est essentiellement exprimée par les chondrocytes quiescents du cartilage de la plaque de croissance et les chondrocytes articulaires, mais aussi par les ostéoblastes [256, 257]. Cette protéine sécrétée semblerait jouer un rôle important dans les phases précoces de la différenciation chondrocytaire et semblerait impliquée dans l'inhibition de la minéralisation [258]. Son expression semble être régulée indépendamment de la voie IHH (indian hedgehog) [257]. Son accumulation a été détectée au niveau de sites de calcification ectopique (peau, système vasculaire) En effet, de par ses domaines "Gla", UCMA a la propriété de chélater le calcium extracellulaire et d'exercer un contrôle négatif sur la minéralisation [255].

Cartilage Intermediate Layer Protein (CILP)

CILP est une protéine constituée d'une seule chaîne peptidique (1184 a.a.) qui a été récemment mise en évidence à partir du cartilage articulaire humain [259]. Il a été démontré que son expression est majoritaire au niveau des chondrocytes du cartilage articulaire et plus spécifiquement dans la zone intermédiaire, elle est également retrouvée, à des niveaux moindres, dans les ménisques, les tendons, les ligaments, la membrane synoviale et les disques intervertébraux [260-263]. La transcription de CILP est induite d'une part par la voie de signalisation dépendante du TGF- β et est d'autre part inhibée par la voie de signalisation en aval d'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) [264]. Une fois le propeptide synthétisé celui-ci est clivé en 2 peptides. Il a été mis en évidence que peptide N-terminal est capable de se lier directement au TGF- β 1, prenant ainsi part à une boucle de régulation négative sur la voie de signalisation du TGF- β 1 [262, 263]. En plus de cette action antagoniste, le peptide N-terminal de CILP interfère sur la signalisation d'IGF-1 [260]. Les perturbations induites par une surexpression de CILP sur ces voies de signalisation engendrent une dérégulation du métabolisme du pyrophosphate inorganique (PPi), le TGF- β 1 et l'IGF-1 étant tout deux impliqués dans le maintien de la concentration extracellulaire en PPi. En effet le TGF- β 1 induit l'expression de ANK, une protéine membranaire responsable du transport de PPi vers le milieu extracellulaire et l'IGF-1 inhibe l'induction due au TGF- β 1 [265]. Ce mécanisme

suggère une implication de CILP dans les arthropathies cristallines. L'existence d'un polymorphisme sur le dernier des nucléotides (substitution d'un T par un C) se traduit par le remplacement de l'isoleucine 395 par une thréonine. Cette mutation est associée à l'apparition précoce de pathologies dégénératives telles que l'arthrose [266, 267], la dégénérescence discale [262, 268, 269] ou le dépôt de cristaux de pyrophosphate de calcium au niveau du cartilage articulaire [270].

1.2.3 - Les propriétés mécaniques du cartilage articulaire

La fonction du cartilage articulaire est assurée par la matrice extracellulaire plus que par les cellules elles-mêmes, contrairement aux autres organes (foie, rein, pancréas...). Pour le cartilage articulaire, c'est la composition biochimique de la MEC et son organisation en zones distinctes qui créent la fonction et expliquent ses propriétés mécaniques uniques. Le cartilage assure le glissement des surfaces articulaires avec un coefficient de frottement très bas et permet de supporter des contraintes mécaniques élevées aussi bien en compression qu'en cisaillement [271].

Le cartilage de par sa constitution et ses propriétés est considéré comme un matériau visco-élastique perméable consistant en 2 phases :

- Une phase solide composée majoritairement d'un réseau fibrillaire dense de collagènes et d'un gel à haute concentration en protéoglycanes.
- Une phase aqueuse constituée d'eau fluide et d'électrolytes dissouts (Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} ...) permettant de neutraliser les charges portées par la matrice solide.

Le cartilage articulaire possède un double rôle primordial quant à la réalisation de tout mouvement. D'une part, il assure une fonction dynamique (en association avec le liquide synovial) en diminuant les forces de friction présentes lors du déplacement des segments osseux. D'autre part, sa fonction statique lui permet d'assurer la transmission, la répartition et l'amortissement des contraintes subies par l'articulation [272].

La fonction dynamique assure le glissement des surfaces articulaires en présence dans des conditions de frottement minimales avec un coefficient de friction très faible. Cette propriété du cartilage articulaire est due à l'interaction entre sa couche superficielle et le liquide synovial. Ce dernier forme une mince pellicule protectrice à la surface du cartilage articulaire. Lors d'un mouvement de glissement, ce film protecteur se déforme, évitant ainsi l'usure du cartilage. A ce mécanisme s'ajoute, lors de la mise en charge de l'articulation, une fuite de

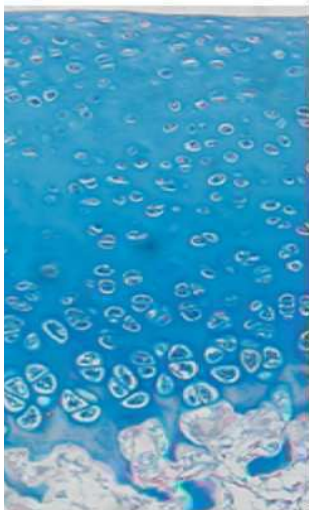
l'eau contenue dans le cartilage vers les régions voisines moins sollicitées et vers le milieu intra-articulaire. Cette fuite du liquide interstitiel joue également un rôle de lubrification de la surface cartilagineuse.

La fonction statique assure la transmission et l'amortissement des charges. Lorsqu'il est en décharge, le cartilage articulaire se trouve dans un état de tension constant grâce à ses protéoglycanes hydrophiles. Le réseau fibreux limite la captation d'eau à environ 50% des capacités du système de sorte qu'il règne au sein du cartilage articulaire au repos, une pression de 2 atmosphères. Lors de la mise en charge de l'articulation, la transmission et l'amortissement des contraintes s'effectuent en deux temps. Dans un premier temps, on observe une montée de la pression intracellulaire brusque due à l'inextensibilité de réseau fibreux et sans déformation de la surface cartilagineuse. Dans un deuxième temps, via les pores de la substance cartilagineuse, l'eau et les électrolytes migrent vers les zones où règne une pression plus faible. Cette fuite de liquide entraîne une augmentation de la concentration en protéoglycanes ainsi qu'une augmentation de la pression osmotique de rappel d'eau. Ce phénomène entraîne dès lors une résistance à la pression croissante ainsi qu'une déformation cartilagineuse modérée, qui permet de mieux répartir les contraintes subies. Lors de la décharge articulaire, le phénomène inverse s'observe : chute rapide de la pression intracellulaire suivie d'un retour de liquide vers les zones de faible pression. Les forces appliquées au niveau des surfaces articulaires sont donc graduellement converties et atténuées [273]. L'organisation et la distribution des composants de la phase solide du cartilage en fonction de son épaisseur lui confèrent des propriétés mécaniques anisotropiques [274].

Le cartilage doit son intégrité à l'ensemble des structures constitutives de l'articulation qui assurent la stabilité nécessaire à une bonne répartition des pressions au sein de l'articulation, sans pour autant gêner le mouvement.

1.2.4 - Le remodelage de la matrice extracellulaire

Le renouvellement de la MEC est assuré par les chondrocytes qui en synthétisent les constituants ainsi que les enzymes responsables de leur dégradation (MMP, ADAMTS...) [17, 20]. Ces activités anaboliques et cataboliques sont finement régulées par des stimuli physico-chimiques ou mécaniques. La sollicitation d'une articulation stimule l'activité de synthèse des chondrocytes ainsi que le remodelage de la MEC. De manière générale, une charge physiologique (<15MPa) intermittente, favorise l'anabolisme du cartilage. A l'inverse, une contrainte statique ou intermittente mais à une fréquence trop élevée, une charge trop



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

Figure 9 : Organisation histologique du cartilage articulaire. Modifié d'après Clouet *et al.* [290].

importante, ou à vitesse trop élevée entraînent la diminution de la synthèse des composants de la matrice du cartilage et peut provoquer des lésions [275, 276]. En effet, la sollicitation des articulations peuvent engendrer des modifications du volume cellulaire, du pH, de la force ionique créant ainsi des signaux régulant le remodelage de la MEC. Ces différents stimuli entraînent une réponse cellulaire se traduisant par la production de cytokines (interleukines, IFN, TNF...) et de facteurs de croissance ayant des effets anaboliques ou cataboliques. La production d'IL-1 β [277] ou de TNF- α [278] par les chondrocytes stimule la production d'enzymes cataboliques telles que les MMP et les ADAMTS responsables de la dégradation de collagènes et des PG [20] ou la synthèse de composés pro-inflammatoires comme NO ou PGE2 [279]. En revanche certains facteurs de croissance comme le PDGF [280], le FGF [281], l'IGF [282], le TGF- β [283] et les BMP [284] stimulent la synthèse des composants de la matrice du cartilage. Différentes hormones comme l'hormone de croissance, l'insuline [285], la calcitonine et les stéroïdes stimulent la prolifération des chondrocytes et leur activité de synthèse des constituants de la matrice [286, 287]. Ces données montrent que la biologie du cartilage est finement régulée et est étroitement liée aux facteurs environnementaux.

1.3 - 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 articulaire [288]. Classiquement, 4 zones sont décrites à partir de la surface du cartilage articulaire vers l'os sous-chondral, nommément : la zone tangentielle (ou superficielle), la zone de transition (ou médiane), la zone radiale (ou profonde) et la zone calcifiée. Ces subdivisions sont basées sur des critères bien définis tels que le volume et la morphologie des cellules, le diamètre et l'orientation des fibres de collagène ainsi que la concentration en PG [289] La description de ces structures a fait l'objet d'un article de revue paru dans la revue Drug Discovery Today [290] (Article I p) (Figure 9).

1.3.1 - La zone tangentielle

La zone tangentielle ou superficielle, en contact avec le liquide synovial, constitue la surface de glissement du cartilage et représente 5 à 10% de l'épaisseur du cartilage. Cette zone superficielle peut être subdivisée en 2 sous-couches. La première est une couche matricielle acellulaire qui recouvre la surface articulaire. Elle est essentiellement constituée de fibres de collagènes de type I, II et III, et est pauvre en PG [291]. Elle est recouverte de

macromolécules telles que la SZP et l'AH qui jouent un rôle prépondérant dans la lubrification des surfaces articulaires [292]. La deuxième couche, plus profonde, renferme des chondrocytes de faible volume, plats et ellipsoïdaux orientés tangentiellement à la surface articulaire [293]. Les chondrocytes de cette zone synthétisent des couches de collagène superposées dont la taille des fibres n'excède pas 30 nm de diamètre. Les fibres de collagènes sont disposées parallèlement à la surface. Cette zone est également riche en fibronectine mais relativement pauvre en PG. En raison de la disposition particulière du réseau de fibres de collagène et de son association à la fibronectine, cette zone résiste particulièrement bien aux forces de cisaillement.

1.3.2 - La zone de transition

La zone de transition représente 40 à 45% de l'épaisseur du cartilage. Les chondrocytes de cette zone sont de forme sphérique ou ovalaire et ont un volume plus important que ceux de la couche tangentielle. Ils sont disposés de manière aléatoire dans la MEC et ont une forte activité de synthèse de PG et de collagènes. Les collagènes essentiellement synthétisés dans cette zone sont de type II, IX et XI sous forme de fibres d'une épaisseur comprise entre 30 et 80nm. Ces fibres s'enchevêtrent pour former un réseau non orienté, moins dense et moins hydraté que celui de la zone superficielle. Cette zone a pour rôle de répartir et d'absorber les contraintes essentiellement d'origine compressive

1.3.3 - La zone radiale

La zone radiale occupe environ 40 à 45% de l'épaisseur du cartilage. Elle tire son nom des chondrocytes organisés en colonnes et des fibres de collagènes de type II, IX et XI qui la constituent, orientées de manière perpendiculaire à la surface du cartilage. Ici les fibres de collagène atteignent leur épaisseur maximale, environ 100 nm de diamètre. Par ailleurs, la proportion de PG présents au sein de la MEC y est la plus importante en comparaison aux autres couches du cartilage articulaire alors que le contenu en eau y est faible. De par l'orientation radiale des fibres de collagène et sa richesse en PG cette zone confère au cartilage articulaire ses propriétés de résistance aux forces de compression.

1.3.4 - La couche de cartilage calcifiée

La couche calcifiée ne représente que 5 à 10% de l'épaisseur du cartilage. Cette couche sépare le cartilage articulaire de l'os sous-chondral. L'organisation des constituants de la MEC dans cette zone est proche de celle observée dans la zone radiale. Toutefois les chondrocytes, en

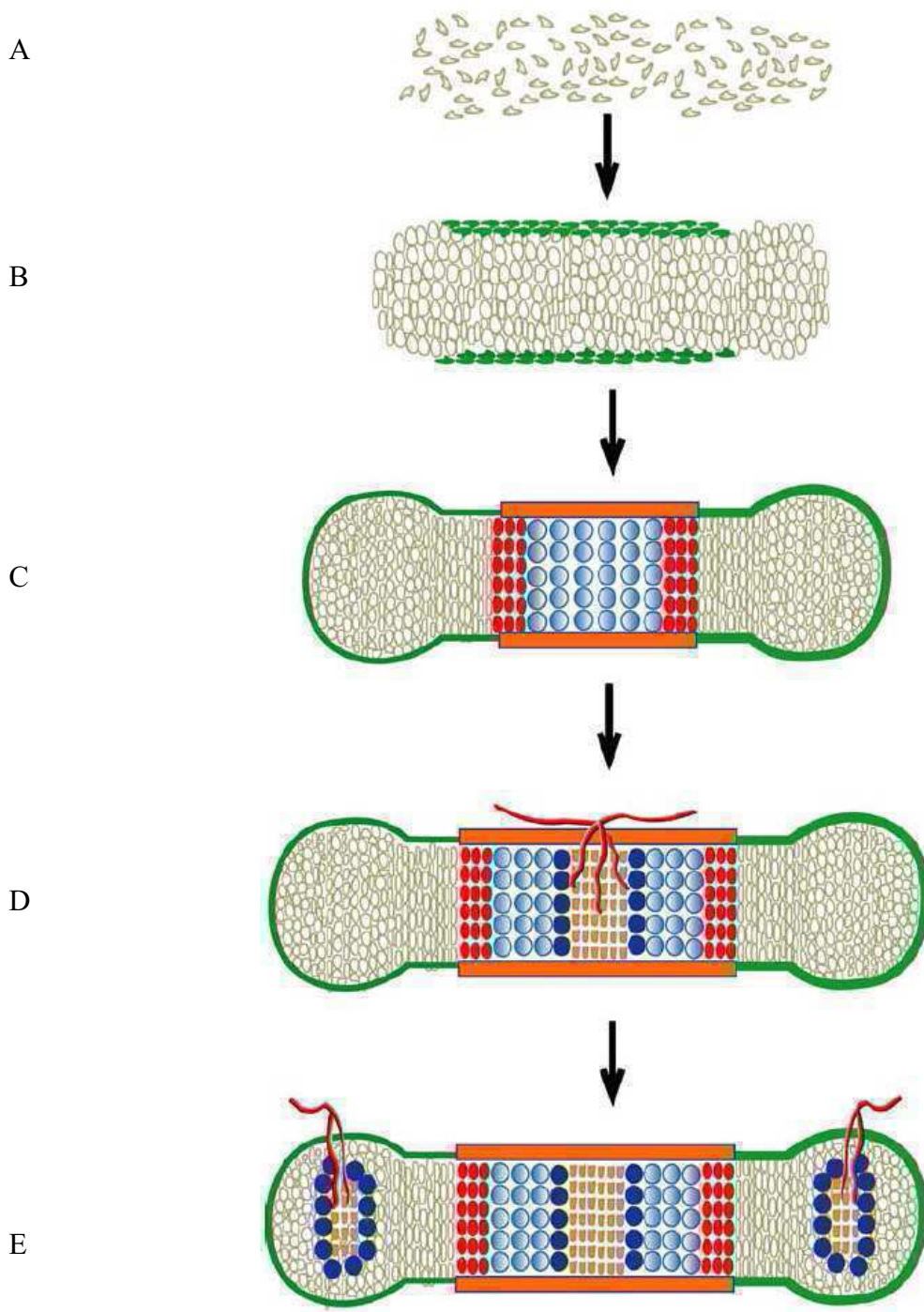


Figure 10 : Représentation schématique du processus d'ossification endochondrale. D'après Wuelling *et al.* [296]. (A) Condensation des CSM. (B) Différenciation des cellules périphériques en cellules du périchondre et détermination des CSM vers un phénotype chondrocytaire. (C) Différenciation des chondrocytes avec l'établissement de différentes sous-populations : les chondrocytes prolifératifs (gris), pré-hypertrophiques (rouge), hypertrophiques (bleu) et la mise en place du périoste (orange). (D) Invasion par les vaisseaux sanguins et constitution du centre d'ossification primaire. (E) Mise en place des centres d'ossification secondaires.

plus faible densité, sont dits hypertrophiques, ils se caractérisent par la synthèse de collagène de type X et une augmentation importante de leur volume cytoplasmique. Une apatite biologique carbonatée se dépose sur les fibres de collagène (fragment C-terminal du collagène de type II, collagène de type X) qui pénètrent directement dans l'os épiphysaire permettant ainsi l'ancrage du cartilage. La couche de cartilage calcifié est séparée des couches de cartilage non minéralisé par une ligne dense appelée "tidemark". Cette ligne dense est riche en fibres de collagène et contient de l'acide hyaluronique, mais elle ne semble pas contenir d'autres GAG [95].

1.4 - La chondrogenèse

Chez l'embryon, le cartilage est le premier des tissus squelettiques à se mettre en place au cours d'un processus appelé 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 y est graduellement remplacé par de l'os. Au contraire, le cartilage articulaire ne se calcifie jamais et est permanent [294].

La chondrogenèse est initiée par la différenciation de cellules dérivant de trois sources principales [295]:

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

La chondrogenèse, comme décrit lors des processus d'ossification endochondrale, se déroule en plusieurs étapes (Figure 10):

- condensation des cellules mésenchymateuses
- orientation vers le lignage chondrocytaire,

- prolifération des chondrocytes,
- différenciation en sous-populations distinctes de chondrocytes : prolifératifs, préhypertrophiques et hypertrophiques entourés du périchondre ou du périoste
- vascularisation et minéralisation de la matrice cartilagineuse, puis remplacement progressif par de l'os.
- apparition des centres d'ossification secondaires au niveau distal.

1.4.1 - Condensation des cellules souches et détermination

L'étape la plus précoce de la chondrogenèse se traduit par une étape de migration et de recrutement des CSM au niveau des sites présomptifs de la squelettogenèse suivie d'une étape de prolifération-condensation [297]. Avant le début de la condensation, les CSM produisent une matrice riche en acide hyaluronique, en fibronectine, en collagène de type I et en collagène de type IIA (isoforme contenant l'exon 2). Puis, la condensation cellulaire est initiée par la dégradation des acides hyaluroniques [298, 299]. En parallèle, la synthèse de molécules d'adhésion telles que N-CAM et N-Cadhérine, COMP, tenascine-c permet la mise en place d'interactions cellule-cellule et cellule-matrice [300]. Le TGF- β semble être un des facteurs les plus précocement impliqués dans la chondrogenèse et notamment dans la régulation de l'expression des molécules d'adhésion lors de la condensation [301]. Au centre des agrégats cellulaires, sous l'influence de différents facteurs de croissance tels que FGF, BMP, SHH (Sonic hedgehog) et Wnt, les cellules commencent à exprimer les marqueurs chondrocytaires dont le facteur de transcription Sox9 (Sry-type high-mobility-group box) qui joue un rôle essentiel dans l'orientation des CSM vers la différenciation chondrogénique [302]. L'expression de Sox9 se fait de manière précoce et reste maintenue au cours de la différenciation, jusqu'au stade préhypertrophique. Son expression est essentielle et contribue au bon déroulement de l'organogenèse. En effet, il a été démontré que l'inactivation du gène codant pour Sox9 chez des embryons de souris entraînait une absence de développement du squelette appendiculaire [303, 304]. Ce processus finement régulé de manière spatio-temporelle, permet donc de contrôler les signaux nécessaires au développement de la matrice cartilagineuse tant au niveau des orientations dorso-ventrale et antéro-postérieure qu'au niveau de la composition de la MEC [305, 306].

1.4.2 - Différenciation chondrocytaire

La différenciation des cellules chondroprogénitrices en chondrocytes est principalement caractérisée par le dépôt d'une MEC contenant des collagènes de type IIB (avec extinction de l'expression de l'isoforme IIA), IX et XI, des PG tel que l'agrécan, le versicane, le perlécane et le biglycane [295].

Le facteur de transcription Sox9 joue un rôle central dans le déroulement de cette étape [307]. Il est en effet nécessaire à l'expression du collagène de type II [308] ainsi qu'à l'expression de certaines autres molécules comme les collagène de type IX [309] et XI [310], COMP [311] ou l'agrécan [312]. Sox9 intervient également dans la régulation de l'expression de deux autres membres de la famille Sox : L-Sox5 et Sox6, qui ne sont pas exprimés lors de la phase de condensation [304]. L-Sox5 et Sox6 ne reconnaissent pas de sites d'inhibition ou d'activation de la transcription. Cependant, L-Sox5 et Sox6 sont d'une importance primordiale dans la différenciation chondrocytaire [313]. Ils peuvent former des homo- ou hétérodimères, qui agiraient de manière coopérative avec Sox9 et différents cofacteurs (S100A, S100B, CBP/P300) stabilisant ainsi le complexe transcriptionnel [312, 314]. En plus de son rôle dans la différenciation chondrogénique, Sox9 semble jouer un rôle dans l'inhibition de la minéralisation [315] en prévenant la vascularisation de la MEC [316], ce qui concorde parfaitement avec son profil d'expression car Sox 9 n'est plus exprimé dans les chondrocytes au stade hypertrophique. De plus, diverses études ont démontré que certains facteurs de transcription tels que Pax1, Pax9, Nkx3.1, Nkx3.2, Hif-1a sont capable de se fixer sur le promoteur de Sox9 et d'activer sa transcription [303].

1.4.3 - Prolifération des chondrocytes

Les chondrocytes métaphysaires des os longs en développement commencent à s'organiser en colonnes alors que les chondrocytes diaphysaires ont déjà atteint le stade préhypertrophique et s'orientent vers la différenciation terminale [294].

Au départ, de petite taille et sphériques, les chondrocytes s'aplatissent et s'organisent en colonnes parallèles. Au sein de ces colonnes, les chondrocytes les plus éloignés du centre d'ossification présentent le plus fort taux de prolifération. Ce taux de prolifération diminue ensuite progressivement à l'approche du centre d'ossification [317]. Puis, les chondrocytes cessent de proliférer dès qu'ils atteignent, couche par couche, le stade de différenciation préhypertrophique. En ce qui concerne l'expression des gènes, il n'y a pas de marqueur spécifique de ces cellules, mais il est bien établi que l'expression de certains gènes sont

augmentées. Des gènes codant pour des protéines de la MEC tels que l'agrécan, PRELP, protocadhérine 17 et COMP, et des gènes codant pour des régulateurs de la différenciation ou de la prolifération, tels que GDF-10 (growth differentiation factor-10), FGFR3 (récepteur de type 3 au FGF), Ihh (Indian hedgehog) ou PTHrP (parathyroïd hormone related peptide) sont augmentés [318]. Au niveau des chondrocytes prolifératifs, l'expression d'Ihh permet de réprimer la différenciation hypertrophique par induction de la production de PTHrP. En effet, l'activation de la voie de signalisation de PTHrP via le récepteur PTH/PTHrP (Ppr1) au niveau des chondrocytes prolifératifs et préhypertrophiques empêche la différenciation hypertrophique de cellules exprimant Ihh. [319, 320].

Durant toute la chondrogenèse, la balance des signaux BMP et FGF détermine le taux de prolifération des chondrocytes. Les protéines de la famille des BMP ainsi que leurs récepteurs sont largement exprimés par les chondrocytes au cours de la chondrogenèse. La signalisation des BMP est médiée par des complexes hétérodimériques, constitués d'une sous-unité Alk-1a ou b associée à une sous-unité Alk-2, qui permettent la phosphorylation des facteurs de transcription Smad 1, 5 et 8. Les protéines Smad phosphorylées peuvent alors interagir avec un médiateur commun : Smad 4 et activer la transcription de leurs gènes cibles [321, 322]. Par ailleurs, les protéines de la famille des FGF ont pour effet de réguler négativement la prolifération et d'induire l'hypertrophie des chondrocytes, antagonisant ainsi les effets des BMP [323]. La signalisation des FGF conduit à l'activation des MAPK (mitogen-activated protein kinase) et à la phosphorylation du facteur de transcription STAT1 [324]. L'effet des FGF ne dépend pas seulement de leur expression, mais aussi de l'expression de leurs récepteurs [325]. En effet, le FGFR2 (récepteur de type 2 au FGF) est exprimé précocement dans les condensations mésenchymateuses et tardivement en périphérie des condensations. L'expression de FGFR3 est, elle, associée aux chondrocytes prolifératifs. Dans la plaque de croissance, FGFR3 est un régulateur important de la prolifération des chondrocytes [326]. Dans le cas d'achondroplasie humaine, la forme la plus courante de nanisme, l'inhibition de la prolifération des chondrocytes et l'accélération de leur différenciation hypertrophique conduisent à un retard de croissance. Celui-ci est dû à l'expression d'un mutant du FGFR3 constitutivement actif [327-329]. L'expression du FGFR1, quant à elle, est augmentée dans les chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques, suggérant un rôle dans la survie, la différenciation ou la mort cellulaire [325].

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 double mutants (L-Sox5 et Sox6), alors que la zone préhypertrophique est présente [313, 330]. Sox9, en revanche, semble inhiber la prolifération des chondrocytes. Les souris surexprimant Sox9 présentent, en effet, des colonnes de chondrocytes prolifératifs raccourcies [331].

Runx2 (runt domain transcriptional activator-2 ou core binding factor $\alpha 1$:Cbfa1) stimule la prolifération et l'organisation des chondrocytes en colonnes. Runx2 est ensuite exprimé dans les chondrocytes hypertrophiques. Les souris invalidées pour Runx2 présentent une diminution de la prolifération des chondrocytes et une maturation chondrocytaire perturbée [332]. Ce rôle important de Runx2 sur les chondrocytes prolifératifs est indirect et serait réalisé via une activation de l'expression d'Ihh dans les chondrocytes préhypertrophiques. En effet, Ihh a été montré stimuler la prolifération des chondrocytes en colonnes [320].

Les facteurs de transcription de la famille Gli (Gli1, 2 et 3) interviennent dans les voies de signalisation des Hedgehog (sonic, indian et desert Hedgehog). Gli1 est capable d'activer les gènes cibles de Hedgehog, Gli2 et 3 peuvent également agir comme activateurs de la transcription dans leur forme complète (Gli2A et 3A) tandis que leurs formes issues d'un clivage protéolytique (Gli2R et 3R) peuvent agir comme répresseurs de la transcription [333]. Ce processus protéolytique est régulé par une boucle de rétro-contrôle négatif médiée par hedgehog [334]. Les souris déficientes pour l'expression de Gli3R présentent une zone distale réduite, indiquant que la fonction répressive de Gli3 est nécessaire à son développement. De manière complémentaire, les formes activatrices de Gli2A et 3A conduisent à la réduction de la zone distale mais sont nécessaires au maintien et à l'organisation en colonne des chondrocytes de la zone proliférative. [335].

1.4.4 - Différenciation pré-hypertrophique et hypertrophique des chondrocytes

La différenciation des chondrocytes prolifératifs en chondrocytes préhypertrophiques 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 [336]. 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 intra-cellulaire et une captation d'eau extra-cellulaire pour compenser celle-ci [337].

Au stade préhypertrophique, les chondrocytes ont une activité de synthèse importante essentiellement orientée vers la production de protéines matricielles (collagènes de type II, IX et XI, agrécan, COMP...). De plus, les chondrocytes préhypertrophiques activent séquentiellement l'expression des gènes codants pour PTH, le récepteur du PTHrP, Ihh et le collagène X. Au stade hypertrophique, les chondrocytes cessent d'exprimer les gènes précoces du cartilage et expriment les récepteurs de PTHrP et Ihh. Les récepteurs à PTHrP et Ihh stimulent l'expression du collagène X et activent l'expression des gènes VEGF (vascular endothelial growth factor, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) [338].

Dans le reste de la maquette cartilagineuse, la boucle de régulation négative PTHrP/Ihh ainsi que les voies de signalisation FGF, BMP jouent un rôle important dans le contrôle du nombre de chondrocytes qui vont se différencier vers la préhypertrophie [339]. Ihh, exprimé par les chondrocytes préhypertrophiques, inhibe la différenciation hypertrophique des chondrocytes et retarde la minéralisation. Ihh stimule également la synthèse de PTHrP dans les chondrocytes périarticulaires. PTHrP va alors bloquer la différenciation des chondrocytes prolifératifs, ce qui va diminuer le nombre de chondrocytes préhypertrophiques et ainsi diminuer l'expression d'Ihh, créant ainsi une boucle de régulation négative [340].

L-Sox5 et Sox6, retardent la préhypertrophie, mais sont nécessaires à l'hypertrophie. Dans les embryons de souris invalidés pour Sox5 et Sox6, les chondrocytes s'orientent prématurément vers le stade préhypertrophique [317]. Ces chondrocytes expriment FGFR3 ce qui favorise leur maturation. Chez les souris invalidées pour Sox5/Sox6, les chondrocytes préhypertrophiques ne deviennent pas hypertrophiques et n'expriment pas le collagène X. Les expressions de L-Sox5, Sox6 et Sox9 sont réprimées dans les chondrocytes hypertrophiques, ce qui explique la perte d'expression des marqueurs précoces du cartilage observée lors de l'hypertrophie.

Runx2 est important dans l'induction de l'hypertrophie. En effet, les souris déficientes en Runx2 présentent une absence de cartilage hypertrophique et d'os [341]. Par ailleurs, Runx2 stimule la synthèse de collagène X [342] et également l'expression d'Ihh [343]. PTHrP intervient également sur la stabilité des facteurs de transcription Runx2 et 3 [344, 345], Runx2 étant le facteur de transcription régulant la transcription du collagène de type X [342]. 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. D'autre part, HDAC4

(histone deacetylase 4) exprimé au niveau des chondrocytes pré-hypertrophiques, dans les stades tardifs, empêche l'hypertrophie prématurée des chondrocytes en inhibant l'activité de Runx2 [346].

Les étapes de la chondrogenèse, jusqu'à ce stade se déroulent au sein d'un environnement avasculaire et par conséquent pauvre en oxygène. Dans ces conditions il apparaît que la famille de facteurs de transcription HIF (hypoxia inducible factor) joue un rôle primordial dans la différenciation et le contrôle de l'hypertrophie ainsi que dans le maintien d'un phénotype pré-hypertrophique des chondrocytes du cartilage articulaire adulte. Une partie ultérieure intitulée "3.5.2.2 la tension en oxygène" s'attachera à décrire en détails les mécanismes de régulation et les implications de HIF au sein du cartilage.

1.4.5 - Différenciation terminale des chondrocytes

Les chondrocytes hypertrophiques subissent une nouvelle fois un bouleversement phénotypique lors de leur différenciation terminale. Lors de cette transition, les chondrocytes cessent d'exprimer le collagène X et activent l'expression de nouveaux gènes tels que les matrix metalloproteinases (MMP) et les ADAMTS, 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 intracellulaire vers le milieu extérieur [347, 348]. 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 [349]

L'ossification de la matrice cartilagineuse implique l'invasion du périchondre et de la zone hypertrophique par les vaisseaux sanguins. Ce mécanisme se met en place grâce aux actions concertées des enzymes responsables de la dégradation de la matrice cartilagineuse (MMP, ADAMTS) [20, 350] et du facteur angiogénique VEGF [338, 351].

Parmi les enzymes des familles MMP et ADAMTS, comptant respectivement 28 [352] et 19 membres [20] chez l'humain, certaines sont directement responsables de la dégradation de la matrice cartilagineuse.

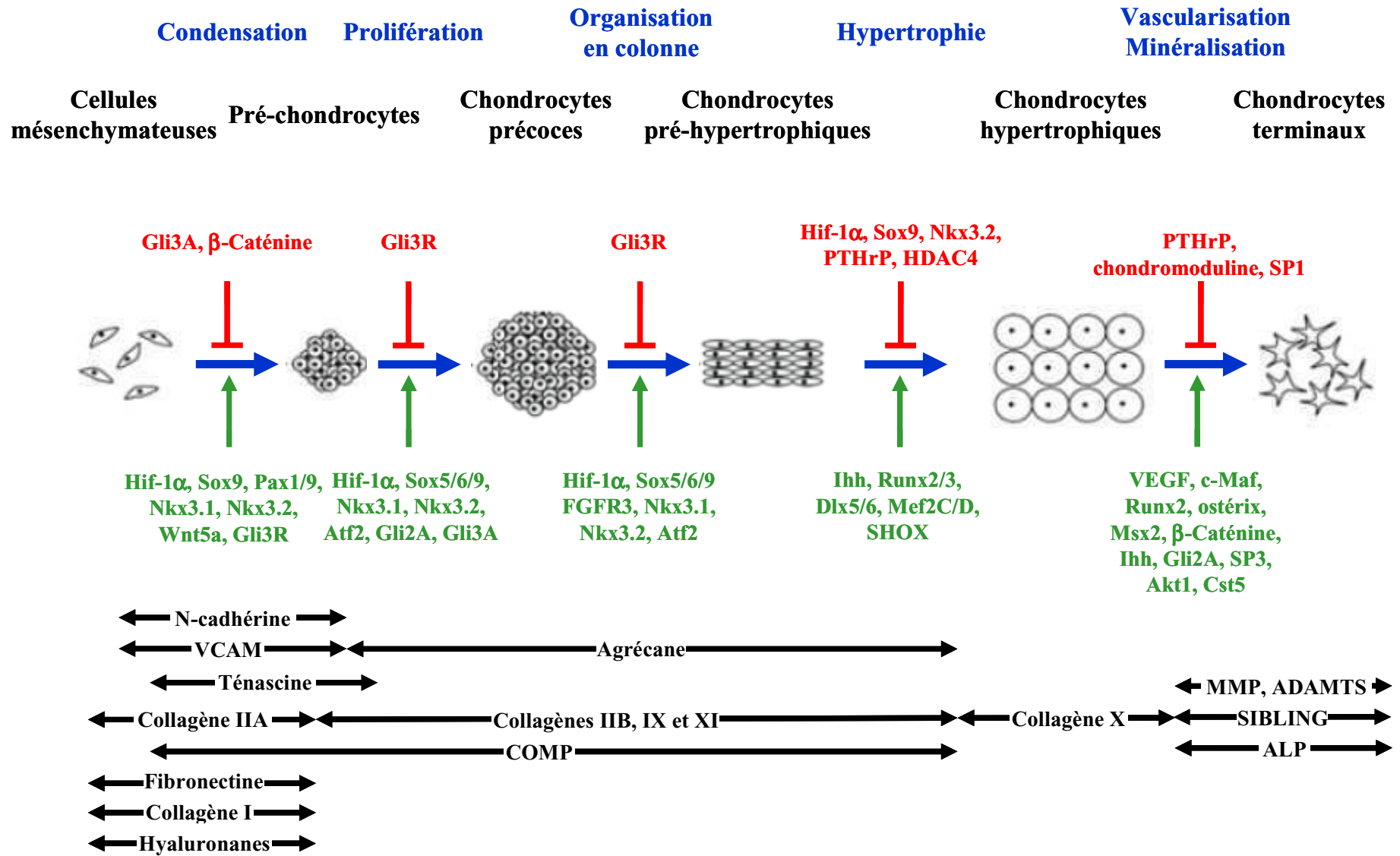


Figure 11 : Représentation schématique des étapes de la chondrogenèse. Modifié d'après Lefebvre *et al.*, Shimizu *et al.*, Goldring *et al* Vinatier *et al.* et Samee *et al.* [294, 300, 363-365].

Les MMP sont classifiées en 4 groupes : les collagénases (MMP-1, 2, 8, 9, 13, 14, et 18), les gélatinases (MMP- 2 et 9), les stromélysines (MMP-3, 10 et 11) et les MMP de type membranaire (MT-MMP) (MMP- 11, 14, 15, 16, 17, 18, 24 et 25).

Il a été démontré que les souris déficientes pour MMP-13 (collagénase) présentent une importante accumulation de collagène interstitiel responsable de l'augmentation de l'épaisseur de la zone hypertrophique et un retard de minéralisation [18, 353]. Il a également été clairement démontré que la MMP-13 est responsable du clivage du collagène de type II et que son activité est dépendante de la MMP-14 [354].

De récentes études ont mis en évidence que la MMP-9 et la MMP-14 ou MT1-MMP sont essentielles à la lyse des composants du cartilage afin de permettre son invasion par le système vasculaire. En effet, les souris KO pour MMP-9 ou MMP-14 présentent des défauts de vascularisation au niveau épiphysaire se traduisant par des malformations de la plaque de croissance et une croissance réduite de leurs os [351, 355-358].

Parmi les 19 membres de la famille ADAMTS, les ADAMTS-1, 4, 5, 8, 9, 15, 16, 18 et 20 ont été identifiées comme combinant une activité catalytique dirigée contre les hyaléctanes, associée à une activité angiostatique. Les ADAMTS-2, 3 et 14 sont responsables de la dégradation des procollagènes. Quant aux ADAMTS-7 et 12, elles ont été identifiées comme impliquées dans la dégradation de COMP. Concernant les membres 6, 10, 11, 13, 14, 17 et 19 leur rôle reste à ce jour encore mal défini [20, 359].

Les facteurs angiogéniques, VEGF-A, B, C ou D sont exprimés par les chondrocytes hypertrophiques [338]. Une fois synthétisé, le VEGF est capté par ses récepteurs VEGFR-1, 2 ou 3 ou les co-récepteurs que sont les neuropilines (Npn) 1 et 2. Le VEGF se retrouve ainsi séquestré dans la MEC. C'est uniquement sous l'action des enzymes responsables de la dégradation de la matrice (MMP et ADAMTS) que le VEGF va être libéré et va pouvoir exercer son activité angiogénique [360, 361].

Ensuite, le devenir des chondrocytes est sujet à controverse; soit ils meurent par apoptose, soit ils subsistent par un mécanisme d'autophagie et se trans-différencient vers un phénotype ostéoblastique [362]. L'hypothèse la plus acceptée reste que la majorité des chondrocytes meurt par apoptose. 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.

La succession des événements moléculaires de la chondrogenèse sont récapitulés Figure 11.

2 - Les atteintes du cartilage articulaire

2.1 - Généralités

Le cartilage articulaire peut être le siège de lésions d'origines traumatiques, génétiques ou liées au vieillissement. Ce tissu étant exempt de terminaison nerveuse, les lésions sont rarement détectées dans leurs stades précoces. De plus, l'absence de circulation sanguine et de drainage lymphatique confère au cartilage articulaire des capacités de réparation spontanée limitées. Ces lésions peuvent aller d'une simple contusion cartilagineuse jusqu'à un défaut ostéochondral. L'établissement de ces altérations sur le long terme peut conduire à une dégradation irréversible de la MEC et finalement à la perte du rôle fonctionnel de l'articulation [1]. Les dommages cartilagineux sont généralement causés par des processus dégénératifs faisant suite à une instabilité post traumatique (entorse, rupture de ligaments, fracture de ménisque...) [366-368]. L'incidence des lésions chondrales, toutes natures confondues, est estimée à environ 60% au sein d'une population subissant un examen arthroscopique. Ces lésions classées selon l'importance de leur survenue peuvent être de natures traumatiques (67%), arthrosiques (29%), ostéochondritiques (2%) [369, 370]. Les maladies à composante majoritairement inflammatoire comme la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrite juvénile ou la spondylarthrite ankylosante ne seront pas abordées. Ces pathologies inflammatoires ne font en effet pas partie des cibles privilégiées de l'ingénierie tissulaire en raison des processus inflammatoires sous-jacents à l'atteinte dégénérative du cartilage, même si toutefois, aujourd'hui la question reste posée notamment par la mise en évidence récente des propriétés immunomodulatrices des CSM [371, 372].

2.2 - Pertes de substance du cartilage articulaire

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

2.2.1 Classification des pertes de substance du cartilage articulaire

Les lésions du cartilage articulaire peuvent être classées selon leur profondeur. L'ICRS ("International Cartilage Repair Society") a établi une classification des lésions

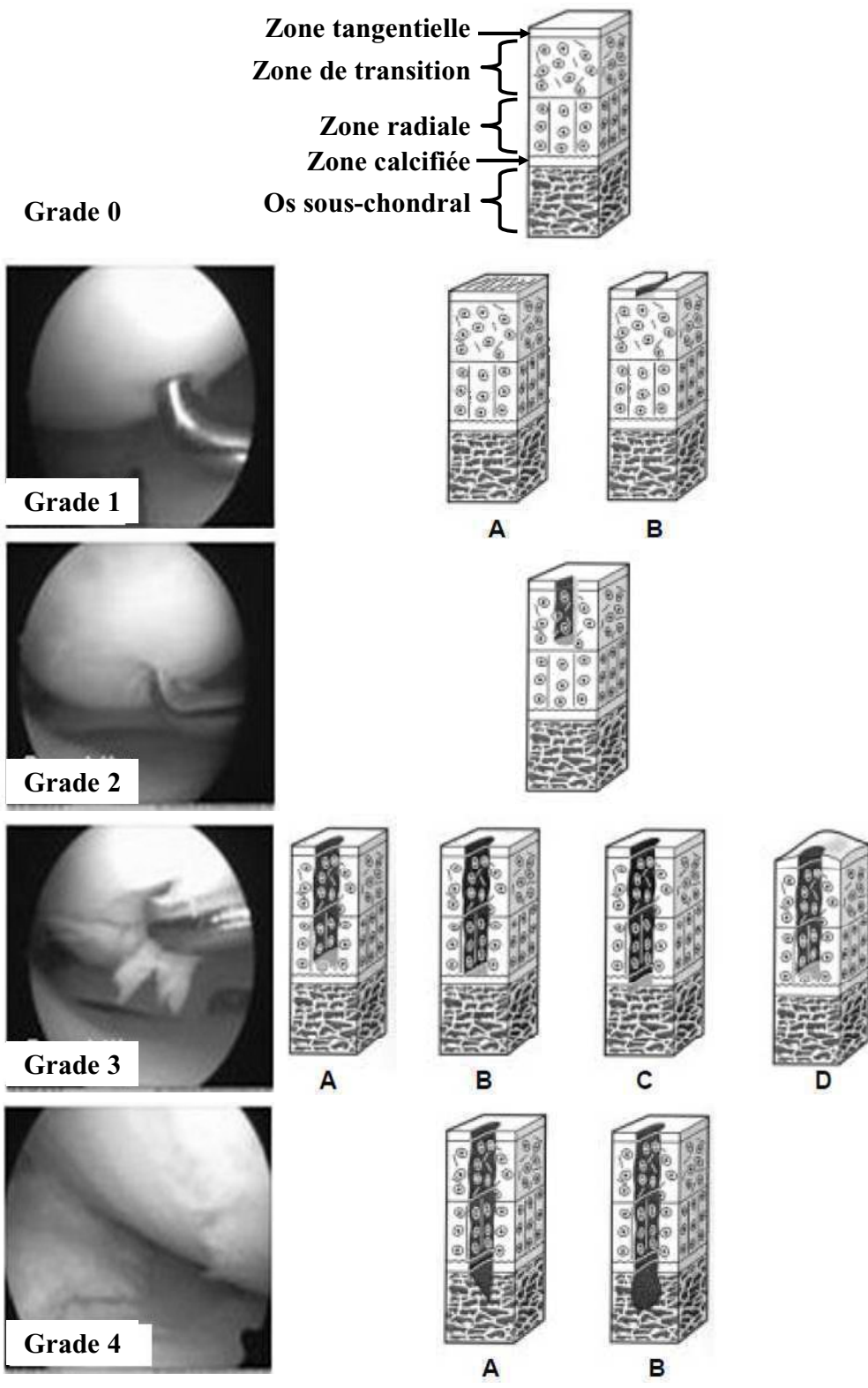


Figure 12 : Classification des lésions cartilagineuses selon l'ICRS. D'après (www.cartilage.org) et Spahn et al. [373]

cartilagineuses, ce qui a permis d'homogénéiser la description des lésions focales du cartilage (Figure 12):

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 [374].

2.2.2 - Réparation spontanée du cartilage articulaire

Les défauts n'affectant que partiellement l'épaisseur du cartilage (grade 1 à 3) sont incapables de cicatriser par eux-mêmes. Cette incapacité est due au fait que le cartilage n'est pas vascularisé et que les lésions n'atteignent pas l'os sous-chondral [375]. Cette situation ne permet donc pas l'invasion du site lésé par les cellules réparatrices provenant de la circulation sanguine ou de la moelle osseuse. Par conséquent, dans le cas de défaut d'épaisseur partielle, le cartilage constitue une barrière à sa cicatrisation [376]. En revanche, seul un défaut affectant la totalité de l'épaisseur du cartilage (grade 4) et atteignant l'os sous-chondral permet de déclencher un processus de réparation [377]. 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 [2, 378]. 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, fragmentation, irrégularités) conduisant à sa dégénérescence et à l'installation de lésions arthrosiques [379].

2.2.3 - Atteintes traumatiques du cartilage articulaire

La cause majeure de l'apparition de lésion du cartilage articulaire non pathogénique est l'atteinte traumatique et ceci principalement chez les patients jeunes et actifs. Ces lésions traumatiques peuvent être dues à des activités sportives ou récréatives régulières, une activité professionnelle soumettant les articulations à des contraintes répétées ou de forte intensité.

L'examen anatomopathologique de telles lésions met en évidence la diminution de la synthèse de PG accompagnée de ruptures du réseau de fibres de collagènes. Les fibres de collagènes rompues ne peuvent plus s'opposer au gonflement des PG, le cartilage ainsi fissuré est alors hyperhydraté. Fortement chargé en eau, le cartilage est alors fragilisé et n'assure plus ses fonctions d'absorption/répartition des charges de manière optimale.

Les atteintes traumatiques associées à une sollicitation intense et répétée peuvent accélérer le processus de dégénérescence du cartilage articulaire lié à l'âge, conduisant par conséquent à une survenue précoce de 12% des cas d'arthrose [380] ou d'ostéochondrite disséquante.

Les lésions traumatiques du cartilage articulaire sont généralement associées à des lésions plus complexes pouvant toucher les différents composants de l'articulation comme les ménisques, l'os sous-chondral, les ligaments ou la membrane synoviale [381]. Elles ne se réparent pas lorsqu'elles affectent uniquement la partie cartilagineuse de l'articulation. Lors de lésions plus profondes affectant l'os sous-chondral, l'organisme tente de réparer la lésion par la formation d'un tissu de réparation cartilagino-fibreux qui demeure transitoire. Les lésions du cartilage articulaire évoluent donc très souvent vers des lésions plus étendues de type ostéochondritiques ou arthrosiques.

2.2.4 - Ostéochondrite disséquante

L'ostéochondrite disséquante (OCD) est un processus pathologique évolutif affectant la surface articulaire et conduisant, à terme, au détachement d'un fragment de cartilage de l'os sous-chondral dans la cavité articulaire. Le terme ostéochondrite fait référence à une composante inflammatoire de la pathologie, initialement l'inflammation a été suggérée comme une des causes de l'OCD, mais il s'est avéré par la suite qu'aucun phénomène inflammatoire n'intervenait, mais l'appellation ostéochondrite a persisté. Cette affection reste cependant rare avec une prévalence estimée à une vingtaine de cas pour 100 000 [382]. Classiquement l'OCD est décrite comme une pathologie de l'os sous-chondral et classée dans

la catégorie des nécroses osseuses aseptiques. Ces dernières années, différentes études se sont intéressées à l'implication du cartilage dans la mise en place du processus de l'OCD et notamment au niveau de la composition de la MEC et des mécanismes d'ossification endochondrale [383-386]. Toutefois les mécanismes intervenant dans la pathogenèse de l'OCD n'ont pas encore été complètement élucidés. Ce manque de connaissance limite le développement d'approches thérapeutiques adéquates concernant cette pathologie.

2.2.4.1 - Classification des lésions

L'OCD est classiquement décrite suivant 4 stades. Dans un premier temps, le cartilage est intact et conserve son aspect lisse, cependant il présente une déformabilité anormalement élevée due à une nécrose de l'os-sous-chondral. Au stade II, le cartilage présente des signes de fibrillation et de fissuration avec des signes de discontinuité partielle avec le reste du cartilage, en parallèle des kystes osseux sont observables par IRM ou radiographie. Au stade III, la discontinuité de la lésion est totale, mais le fragment de cartilage reste en place. Enfin, au stade IV, le fragment se disloque complètement et est libéré dans la cavité articulaire, il est alors désigné comme séquestre ou "souris".

2.2.4.2 - Etiologie

Deux types d'OCD sont décrits, l'OCD juvénile (OCDJ) et l'OCD adulte (OCDA). L'OCDJ est la forme la plus fréquente d'OCD et survient avant la fermeture complète des plaques de croissance [387, 388]. En effet, l'âge moyen de la survenue de l'OCD est compris entre 10 et 15 ans [389-391]. Il existe également un facteur lié au sexe, car les sujets masculins sont plus fréquemment touchés que les femmes avec un ratio de 2 : 1 à 5 : 3 [392, 393]. La pratique intensive du sport semble augmenter le risque de l'OCD.

Bien que l'OCD puisse affecter n'importe quelle articulation, le genou apparaît comme celle la plus communément touchée avec 75% des cas, puis, le coude (6% des cas), suivi de la cheville (4% des cas), et, plus rarement, l'épaule et la hanche [383, 394]. Au niveau du genou, le condyle interne du fémur est le site le plus fréquemment touché (70 à 80% des lésions) [389, 395]. Bon nombre de cas d'OCD ne sont pas diagnostiqués, car indolores. Mais l'OCD peut, cependant, se manifester par des douleurs, gonflement, boiterie, perte d'amplitude des mouvements de flexion et extension, sensation d'accrochage accompagnée de "cliquetis" pouvant conduire jusqu'au blocage complet de l'articulation. L'évolution de l'OCD est

fortement dépendante de l'âge du patient. Ainsi, une OCDJ reste stable dans environ 55% des cas avant l'âge de 15 ans [396, 397], tandis qu'elle ne l'est plus que dans 11% des cas pour une OCDA [398, 399]. Elle évolue ensuite, chez l'adulte, vers l'arthrose dans presque 100% des cas sur un suivi de 20 ans, alors que l'arthrose n'apparaît que dans 20% des cas d'OCDJ [391, 395]. Bien entendu, les formes peu stables de lésions, ou situées dans les zones de cartilage portantes sont de plus mauvais pronostic.

2.2.4.3 - Causes potentielles de l'ostéochondrite disséquante (OCD)

Les causes de l'OCD restent à ce jour encore mal connues. Toutefois elles pourraient s'expliquer par une origine traumatique (traumatismes aigus ou micro-traumatismes répétés). En effet, la pratique d'activités sportives intenses, les chocs ou les sollicitations répétées des articulations semblent être des facteurs prépondérants dans l'apparition de l'OCD [400]. De plus, les lésions annexes (entorses, luxations, rupture de ligaments...) semblent être associées au caractère post-traumatique de l'OCD [401].

Un défaut de vascularisation de l'os sous-chondral est également souvent associé à l'OCD, mais il n'est pas clairement déterminé si celui-ci est à l'origine de la survenue de l'OCD ou une conséquence traumatique. La rupture du flux sanguin, au niveau de l'os sous-chondral, conduit à sa dégradation mais pas obligatoirement à une nécrose. Dès lors, le cartilage articulaire n'est plus soutenu mécaniquement et se trouve fragilisé [393]. Il a effectivement été reporté dans la littérature des nécroses associées à l'OCD, mais il reste délicat de distinguer celles-ci des cas d'ostéonécrose proprement dits [394].

Il a également été suggéré que l'OCD serait due à un défaut d'ossification. Lors de la croissance et sous l'influence de facteurs génétiques, des centres d'ossification dits "accessoires" se formeraient, conduisant à des anomalies développementales. Ces anomalies se traduisent par la formation d'îlots de tissu anormalement fibreux [387, 392, 394]. L'analyse des séquestres a en effet révélé que l'OCD serait due à une altération locale de la MEC cartilagineuse au niveau de son organisation et de sa composition. Il a été mis en évidence une quantité anormalement élevée de collagènes de types I et X ainsi que de phosphatase alcaline typique d'un processus hypertrophique accompagnée d'une altération de l'intégrité du réseau de fibres de collagènes et d'une diminution de la synthèse de GAG [383, 384]. En parallèle, différentes études ont mis en évidence des mutations, dans les gènes de l'agrécan et du collagène de type II, qui pourraient être corrélées avec la survenue de l'OCD. Les formes mutées de l'agrécan et du collagène de type II ne peuvent pas adopter une conformation

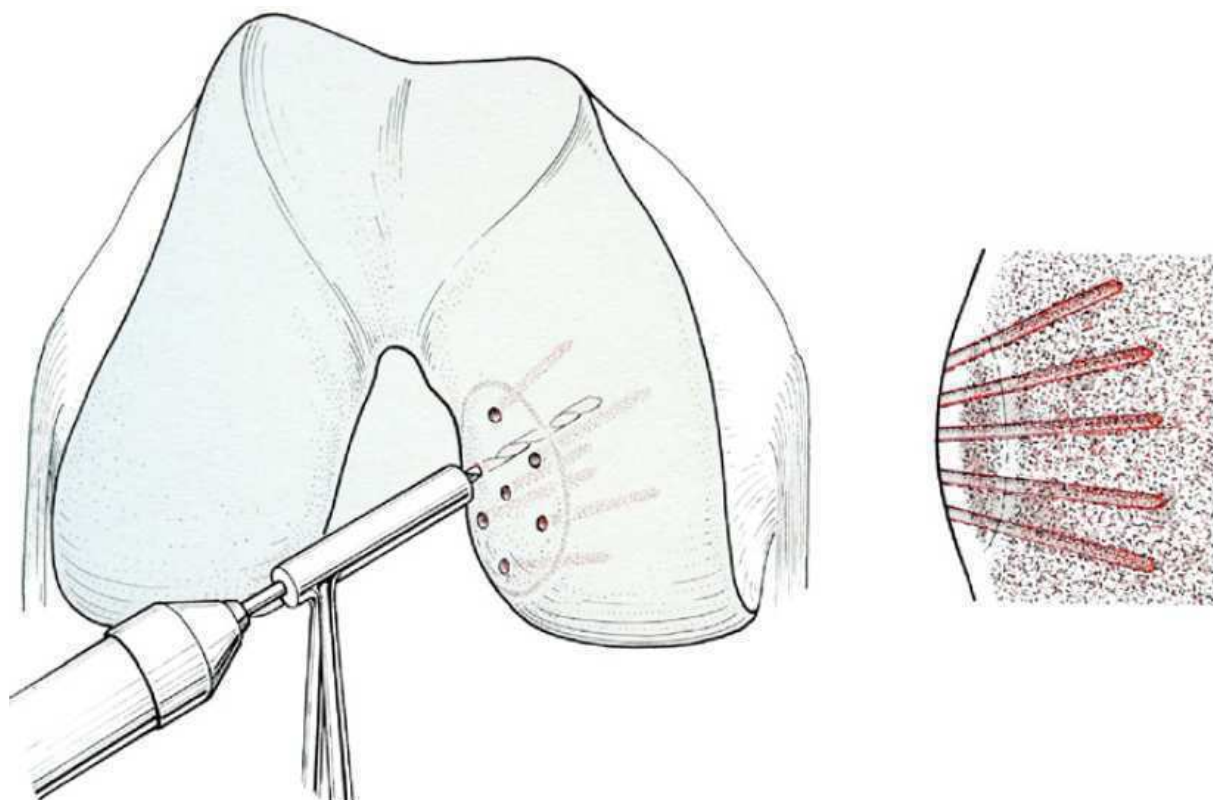


Figure 13 : Représentation schématique de la technique de perforation trans-chondrale ou “Pridie drilling”. D’après Schindler *et al.* [392].

protéique correcte et ne seraient pas secrétées, elles resteraient piégées au niveau du reticulum endoplasmique [385, 386].

2.2.5 - Traitements des lésions du cartilage.

Les lésions du cartilage articulaire nécessitent un traitement adapté en fonction de l'âge du patient, du degré de la lésion et de la localisation anatomique de celle-ci. C'est pourquoi un arsenal thérapeutique adapté aux différentes situations cliniques a été développé. Les lésions sont généralement classifiées suivant le degré de stabilité du fragment ostéo-chondral atteint (grade I et II : lésions stables, grade III et IV : lésions instables).

2.2.5.1 - Traitements des lésions stables

Les traitements des lésions stables visent essentiellement une population de patients jeunes ou présentant des lésions détectées de manière précoce.

Les traitements non chirurgicaux :

Le premier traitement proposé est un arrêt de l'activité sportive pouvant aller jusqu'à une durée de 18 mois. Dans certains cas, il est nécessaire de soulager l'articulation des contraintes auxquelles elle est soumise par le port d'un dispositif adapté (genouillère). Pour les patients les moins compliants l'immobilisation par un plâtre peut être prescrite [402].

Les traitements chirurgicaux :

La perforation transchondrale (Pridie drilling) est une option visant à promouvoir la revascularisation de l'os sous-chondral tout en prévenant le détachement du fragment ostéo-chondral et en préservant la congruité de l'articulation [392]. Cette intervention est réalisée sous arthroscopie et consiste à perforer l'os sous-chondral, au travers du cartilage stable, de trous d'un diamètre de 1,5 à 2 mm de façon radiale par rapport au défaut (Figure 13). Cette technique donne de bons résultats particulièrement dans les cas d'OCDJ avec 80 à 90% de taux de rémission. En revanche, dans les cas d'OCDA, le taux de succès de l'intervention tombe aux environs de 50% [389, 392]. Cette technique est donc plutôt destinée aux patients jeunes et est proscrite dans les cas de fissuration du cartilage.

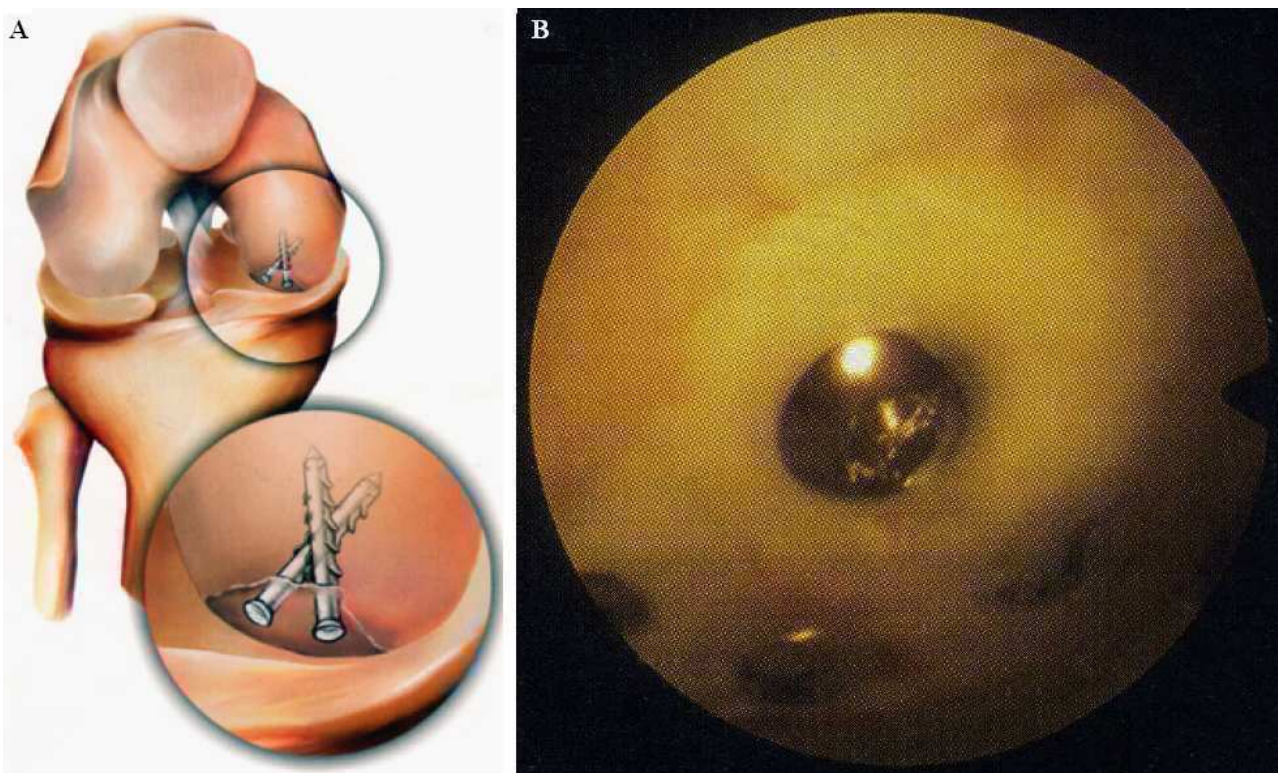


Figure 14 : Représentation schématique (A) et vue arthroscopique (B) de lésion traitée par la technique de refixation. D'après Schindler *et al.* et Detterline *et al.* [392, 395].

2.2.5.2 - Traitements des lésions instables

Les traitements non chirurgicaux :

Dans le cadre du traitement de lésions instables, il n'est pas envisageable de s'en tenir à une approche non chirurgicale afin de garantir des résultats satisfaisants. Seule une intervention chirurgicale permet un gain en termes de soulagement de la douleur et de récupération fonctionnelle.

Les traitements chirurgicaux :

Différentes options existent pour traiter les lésions instables. Le choix de l'approche à mettre en œuvre est basé sur le degré d'évolution de la lésion, sa localisation et si elle est associée ou non à une perte osseuse.

La refixation est une procédure mise en œuvre uniquement dans les cas de lésions instables partiellement détachées permettant la préservation du cartilage articulaire natif (Figure 14) [392]. Cette technique est réalisée par arthroscopie et consiste en la pose de vis orientées de manière divergente afin d'assurer la stabilité rotationnelle du fragment. L'utilisation de vis métalliques, par rapport à des matériaux résorbables, permet d'appliquer une compression sur le fragment afin de favoriser sa réintégration. Mais, elle nécessite une deuxième intervention pour pouvoir les retirer. Dernièrement, une approche utilisant des plots ostéo-chondraux a été proposée en remplacement des vis [403, 404].

La séquestrectomie est envisagée quand le fragment ostéo-chondral est complètement détaché ou quand la refixation n'est pas possible (hypertrophie ou dégénérescence du cartilage, résorption de l'os sous-chondral...). C'est le geste chirurgical le plus pratiqué. Il permet, par un abord arthroscopique, de réduire la douleur et les symptômes mais ses conséquences à moyen terme conduisent à une apparition précoce de l'arthrose [391]. L'excision du fragment ostéo-chondral permet seulement d'éviter la propagation de la lésion, mais ne permet pas la restauration de la congruité de l'articulation, c'est pourquoi cette technique est réservée aux lésions situées en zones non-portantes ou doit être complémentée par des approches restauratrices telles que la microfracture, l'implantation de chondrocytes autologues (ACI : autologous chondrocyte implantation) et les greffes ostéochondrales.

La technique de microfracture vise à déclencher la réparation spontanée des lésions chondrales en accédant à l'os sous-chondral et à la moelle osseuse [389]. Cette technique est

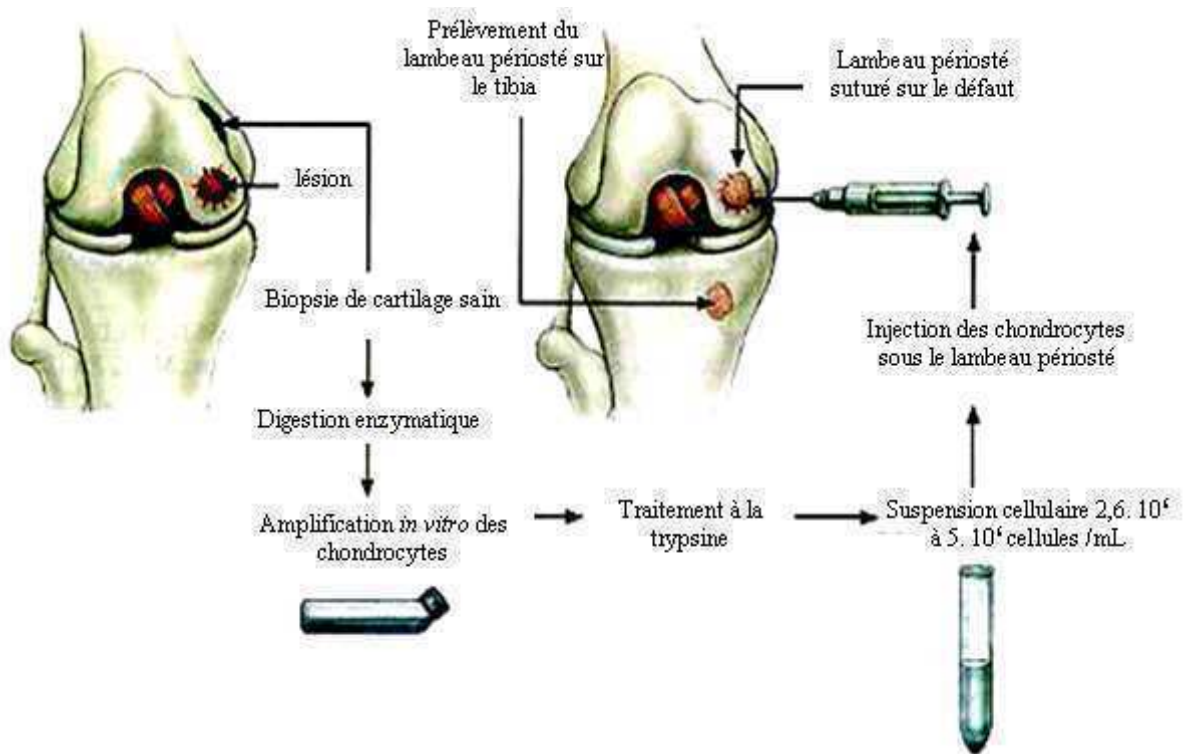


Figure 15 : Représentation schématique de la technique de transplantation de chondrocytes autologues, technique de Brittberg. D'après Brittberg et *al.*[3].

en fait une modification de la technique de Pridie, elle a été développée par Steadman et consiste en des perforations de petite taille de 4 mm de profondeur et réalisées tous les 3 à 4 mm [405]. La technique de microfracture est indiquée dans les cas de lésions sans perte osseuse associée et pour des défauts d'une surface inférieure à 2,5 cm². Sur la base d'observations cliniques, histologiques et radiographiques, la technique de microfracture permet d'obtenir un taux de résultats satisfaisant de 77% [406]. Toutefois, cette technique a montré la formation d'un tissu de nature fibrocartilagineuse dont les propriétés mécaniques et la stabilité dans le temps sont moindres par rapport à celle du cartilage hyalin [407, 408].

L'ACI, tout comme la technique de microfracture, est indiquée seulement dans les cas de lésions chondrales sans atteinte osseuse. L'ACI se déroule en trois temps, une phase de prélèvement de cartilage articulaire sain réalisée sous arthroscopie au niveau d'une zone non portante, une phase de culture des chondrocytes *in vitro* et une phase nécessitant une arthrotomie au cours de laquelle un lambeau de périoste est prélevé au niveau du tibia afin d'étanchéifier la cavité du défaut et d'y permettre l'injection des chondrocytes (Figure 15) [409]. Dans le cadre d'ACI spécifiquement indiquées dans le traitement de l'OCD avec un suivi de 2 à 10 ans, des études montrent une amélioration des signes cliniques qualifiés de bons à excellents pour 91% des patients [410, 411]. L'ACI apparaît donc comme une option de choix dans le traitement de l'OCD. Cependant cette technique se heurte à certains inconvénients tels que la morbidité du site donneur engendrée par le prélèvement de cartilage articulaire sain [1], l'étanchéité imparfaite du lambeau de périoste qui entraîne une fuite des cellules dans la cavité articulaire et le processus de dédifférenciation des chondrocytes en culture monocouche [4] qui conduit à la formation d'un tissu fibrocartilagineux transitoire [1]. Dans le cas de lésions présentant une perte osseuse associée, la greffe ostéocondrale est préconisée. Deux cas de figure doivent être distingués : la greffe ostéocondrale autologue et la greffe ostéocondrale allogénique. La greffe ostéocondrale autologue est préférée pour une population de patients jeunes (<50 ans) présentant des lésions peu étendues (<2,5 cm²). Pour des patients plus âgés ou présentant des lésions importantes la greffe ostéocondrale allogénique sera alors plus indiquée. La greffe ostéocondrale consiste à transférer un ou plusieurs (mosaïcplastie) greffons cylindriques constitués de cartilage articulaire intact et d'os sous-chondral au niveau du site de la lésion. L'intérêt des greffes ostéocondrales réside dans l'intégration de la partie spongieuse de la greffe qui fusionne avec le lit spongieux receveur, et par l'intégration du cartilage transplanté avec le cartilage hyalin adjacent.

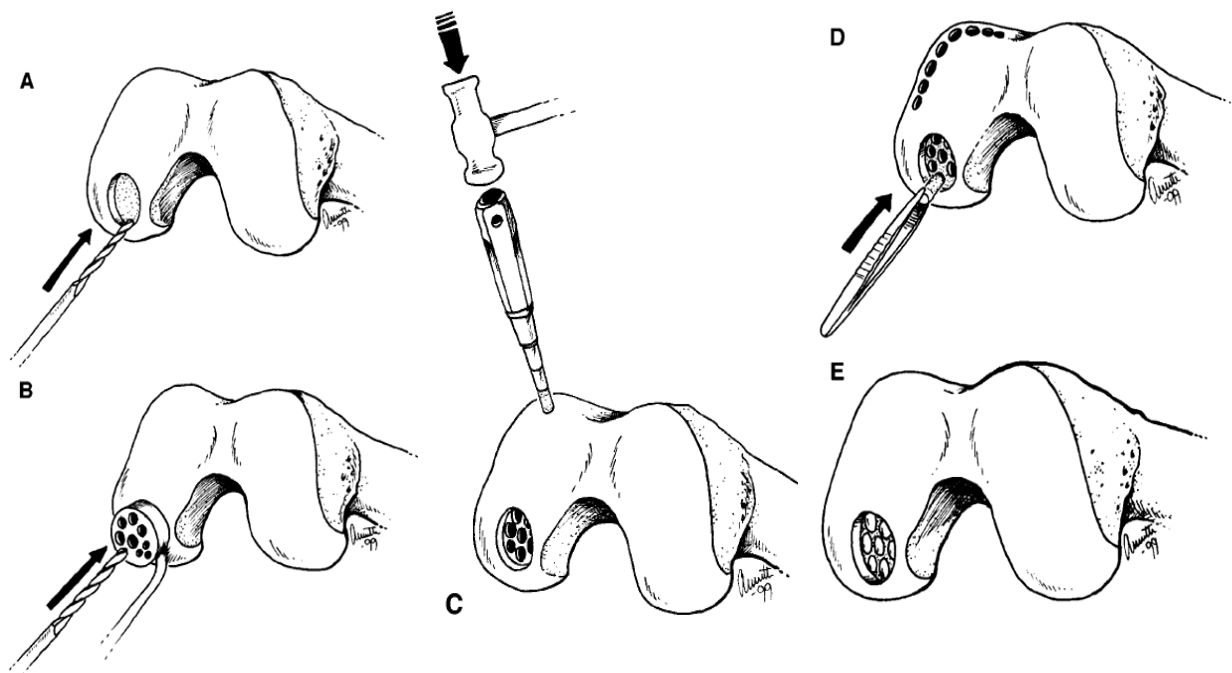


Figure 16 : Représentation schématique de la technique de greffe ostéocondrale autologue multiple (mosaïcplastie). A, le défaut est nettoyé et mesuré. B, à l'aide d'un guide, des trous sont percés dans le défaut et recevront les greffons. C, les greffons sont prélevés sur une zone moins portante de l'articulation. D, les greffons sont mis en place dans le défaut par pression. E, les greffons sont tous mis en place dans les trous. D'après Tyyni et *al.*[412].

Pour une greffe autologue, des greffons ostéochondraux cylindriques sont prélevés au niveau d'un site donneur en zone faiblement portante de l'articulation. Ces greffons sont ensuite transférés dans des puits receveurs préalablement percés au niveau de la lésion. La lésion chondrale est auparavant préparée, par un rasage du cartilage dégénéré bordant la lésion, et par une abrasion de la base du défaut afin de mettre à nu l'os sous-chondral (Figure 16) [412]. L'intérêt de la greffe ostéochondrale autologue réside dans le fait d'éviter la transmission de maladies virales ou d'agents transmissibles non conventionnels et cette intervention ne se fait qu'en un seul temps opératoire. Mais cette technique présente également certains inconvénients, notamment concernant la morbidité du site donneur et la quantité limitée de greffons qui peuvent être obtenus chez le patient. Une des difficultés de cette technique est de restaurer la congruité de la surface articulaire traitée. En jouant sur la disposition et la taille des greffons, le comblement de la lésion est compris entre 80 et 100%. Toutefois, si le comblement n'est pas total, un fibrocartilage se forme entre les différents greffons à partir de l'os sous-chondral mis à nu [413].

Différentes études, mettent en évidence les bons résultats cliniques obtenus à partir de cette technique. Dans une première étude portant sur 57 patients, traités par mosaïcplastie, avec un suivi supérieur à 3 ans, les auteurs rapportent un taux de 91% de résultats qualifiés de "bon" à "excellent" [414]. Des études ultérieures, corroborent ces résultats cliniques avec environ 92% de résultats qualifiés de "bon" à "excellent" [413, 415, 416].

Les greffes ostéochondrales allogéniques permettent le comblement de lésions plus étendues [417]. Cette technique présente l'avantage de ne pas être tributaire du nombre de greffons prélevables chez le patient et permet de prélever des greffons chez le donneur provenant du même site anatomique que celui où ils seront implantés chez le receveur, contournant ainsi la problématique liée à la morbidité du site donneur dans le cas de greffe autologue [395]. De plus, les greffons peuvent être conservés pendant plusieurs années, par des procédés de réfrigération [418, 419], de congélation [420, 421], cryopréservation [422, 423], ou par l'ajout de milieu de conservation défini [424].

Cette procédure reste coûteuse, et est limitée par la disponibilité des greffons, qui proviennent généralement de cadavres et par le risque potentiel de transmission d'agents pathogènes [425, 426]. Du fait de leur nature, les greffes ostéochondrales allogéniques peuvent entraîner des réactions immunologiques [427-429]. Toutefois, ces réactions peuvent être minimisées, en effet, des études menées respectivement chez le rat et chez le chien ont montré une survie du

Tableau II : Bilans d'études cliniques sur la procédure d'allogreffe ostéochondrale. (C : coude, F : fémur, T : tibia, P : patelle).

Année	Site anatomique	Nombre de patients	Méthode de préservation	Suivi moyen (année)	Taux de succès	Références
1989	T, F, P	31	Frais	3,5	78% bon à excellent	[433]
1991	F	12	Frais	5,3	67% bon à excellent	[434]
		17	Frais	2	71% bon à excellent	
1992	T, F	92	Frais	5	75% de survie	[435]
				10	64% de survie	
				14	63% de survie	
1994	F	17	Frais	3,5	94% bon à excellent	[436]
1994	F	17	Congelé	4,2	70% bon à excellent	[437]
1997	T, F, P	126	Frais	7,5	85% de survie	[438]
1998	T, F, P	33	Cryopréservé	1,6	67% bon à excellent	[439]
1999	F, P	55	Frais	6,2	76% bon à excellent	[440]
1999	T, F, P, C	29	Cryopréservé	10,6	79% bon à excellent	[441]
2000	F	122	Frais	5	91% de survie	[442]
				10	75% de survie	
2001	F	60	Frais	10	84% bon à excellent	[443]
2003	T	65	Frais	5	95% de survie	[444]
				10	80% de survie	
				15	65% de survie	
				20	46% de survie	
2005	F, T	60	Frais	5	95% de survie	[445]
				10	80% de survie	
				15	65% de survie	
2005	F, P	20	Frais	7,8	79% bon à excellent	[446]
2007	F	65	Frais	7,7	72% bon à excellent	[447]

transplant sur un temps relativement long en conditions immunosuppressives [430, 431] et lorsque la compatibilité donneur/receveur était optimisée [432].

Les résultats cliniques chez l'homme se révèlent être particulièrement satisfaisants (Tableau II).

2.3 - Physiopathogénie de l'arthrose

L'arthrose est la principale affection ostéo-articulaire au sein des populations des pays industrialisés et constitue le premier motif de consultation auprès du médecin généraliste. Elle représente la deuxième cause d'incapacité après les maladies cardio-vasculaires [366]. En 2006, en France, le nombre de patients souffrant d'arthrose a été estimé entre 4,6 à 5 millions et a représenté, en termes de coûts directs, 1,6 à 1,8 milliard d'euros dont 270 millions pour les seuls traitements médicaux. [448].

Le vieillissement des populations va alourdir ce bilan dans les années à venir, avec un impact au niveau socio-économique qui n'en sera que plus important. L'endémie croissante d'obésité est également un facteur aggravant dans les pays occidentaux. Ainsi, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) : 10% des plus de 60 ans souffrent d'arthrose, 80% d'entre eux présentent des mouvements limités et 25% se trouvent dans l'incapacité de réaliser leurs activités quotidiennes [366]. Il a été estimé que la prévalence de l'arthrose pourrait doubler entre 2000 et 2020 [449, 450].

Deux formes d'arthrose sont reconnues, l'arthrose primaire ou idiopathique (sans cause apparente) et l'arthrose secondaire due à une cause sous-jacente. La forme primaire de l'arthrose est assez rare, une cause annexe est, dans la plupart des cas, présente pour expliquer l'arthrose. Parmi ces causes, peuvent être citées les anomalies génétiques, les désordres métaboliques, les traumatismes, les infections, les tumeurs, l'instabilité au niveau d'une articulation ou les désaxations osseuses [451, 452].

Le risque d'arthrose augmente avec l'âge et touche davantage les femmes que les hommes en suggérant fortement l'importance du statut hormonal [453, 454]. Elle peut potentiellement affecter n'importe quelle articulation mais touche essentiellement les genoux, les hanches, les étages lombaires et cervicaux de la colonne vertébrale, les premières articulations métatarsophalangiennes, les interphalanges distales, proximales et la première métacarpienne [366].

Une fois établie l'arthrose se caractérise par une diminution de l'épaisseur du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral, une formation d'ostéophytes et une

modification des caractéristiques du liquide synovial (augmentation du volume, diminution de la viscosité et modification de ses propriétés de lubrification) [9, 455].

Les mécanismes régulant le processus arthrosique, ont fait l'objet d'un article de revue qui détaille leur implication tant au niveau tissulaire, cellulaire que moléculaire (article I). Cet article aborde aussi l'aspect de la pathologie arthrosique d'un point de vue global en considérant le cartilage, la membrane synoviale et l'os sous-chondral comme entité physiologique, voire un "organe" à part entière. Les différents types de traitements : non-pharmacologiques, pharmacologiques et chirurgicaux y sont également décrits avec un accent particulièrement porté sur les méthodes innovantes de régénération du cartilage que représentent les greffes ostéochondrales, la thérapie cellulaire, l'ingénierie tissulaire et la thérapie génique.

Article I

From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage

J. Clouet, C. Vinatier, C. Merceron, M. Pot-Vaucel, Y. Maugars, P. Weiss,
G. Grimandi and J. Guicheux.

Drug Discovery Today (2009) 14: 913-925.

Article I : From osteoarthritis to future regenerative therapies for cartilage – Drug Discovery Today

Résumé :

L'arthrose est associée à la dégénérescence du cartilage, accompagnée d'un syndrome inflammatoire de la membrane synoviale, en plus d'une altération de l'os sous-chondral. Les événements moléculaires et cellulaires impliqués dans le phénomène arthrosique n'ont, à ce jour, été que partiellement élucidés. Cette revue donne une vision globale de la physiopathologie de l'arthrose ainsi que des traitements pharmacologiques et non-pharmacologiques de cette affection. De plus, les données présentées permettent de faire un état des lieux actuel sur les traitements chirurgicaux et leurs indications, sur la prise en charge de l'arthrose et sur la réparation du cartilage de manière principalement axée sur la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire. Ces biotechnologies prometteuses peuvent potentiellement jouer un rôle majeur dans le traitement des pathologies associées au cartilage.



Therapeutic strategies for the effective management of OA and cartilage defects.

From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage

**Johann Clouet^{1,2}, Claire Vinatier^{1,3}, Christophe Merceron¹,
Marianne Pot-vaucel⁴, Yves Maugars⁴, Pierre Weiss¹,
Gaël Grimandi^{1,2} and Jérôme Guicheux¹**

¹INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), U791, Centre for Osteoarticular and Dental Tissue Engineering, Group Physiopathology of Skeletal Tissues and Cartilage Engineering, University of Nantes, France

²Pharmacy, University Hospital of Nantes, France

³GRAFTYS SAS, Aix en Provence, France

⁴Department of Rheumatology, University Hospital of Nantes, France

Osteoarthritis (OA) is associated with cartilage degeneration and an accompanying inflammatory syndrome of the synovium in addition to alteration of the subchondral bone. The molecular and cellular events involved in OA have only partially been elucidated. This review provides a global view of the physiopathology of OA, as well as non-pharmacological and pharmacological treatments for the disorder. An update on surgical treatments and their indications is given with an orientation towards the management of OA and cartilage repair by cell-based regenerative therapies. These promising biological technologies will, potentially, play a major role in the treatment of cartilage-associated diseases.

Osteoarthritis (OA) is a public health concern particularly in modern society and is the leading osteoarticular pathology of developed countries. In the United States, OA is the primary reason for medical consultation in persons older than 60 years of age and affects at least 30% of this subpopulation [1]. Population ageing will probably worsen the socio-economic impact of such pathologies. The growing epidemic of obesity is also an exacerbating factor, with an indisputable role in knee OA [2].

The current view is that OA is a complex syndrome that is, in fact, the ultimate outcome of various factors affecting the joint [3]. Once established, OA is characterised by a decrease in articular cartilage (AC) thickness, subchondral bone sclerosis (bone thickening), formation of osteophytes (bone outgrowth on the joint margin) and modification of the synovial fluid composition (Fig. 1). Several joints might be affected by OA but the sites most commonly affected are knees, hips, fingers and the lumbar and cervical spine. Given that many questions, particularly those concerning the physiopathology of OA, remain unanswered, it is not surprising that treatments, either pharmacological or surgical, only partially address the clinical issue.

Corresponding author: Guicheux, J. (jerome.guicheux@inserm.fr)

Johann Clouet was born in Châteaubriant, France, on 26 November 1975. He obtained his doctorate degree in pharmacy in 2006 and his research master's degree in 2007 at the University of Nantes,



(France). Presently he is working in the department of physiopathology of skeletal tissues and cartilage engineering in the centre for osteoarticular and dental tissue engineering (LIOAD-INSERM U791) at the University of Nantes (France). His research work focuses predominantly on the development of scaffolds and the use of stem cells for cartilage tissue engineering.

Jérôme Guicheux was born in Le Mans (France) on 20 February 1970. He obtained his PhD thesis in 1997 and his degree for directing research in 2002. Currently, he is working as a research director/professor at the national institute for health and medical research (INSERM). He is head of the department of physiopathology of skeletal tissues and cartilage engineering in the centre for osteoarticular and dental tissue engineering (LIOAD-INSERM U791) at the University of Nantes (France). His research focuses on the differentiation process of osteoarticular cells and the use of scaffolds and reparative cells for cartilage tissue engineering.



3 - Ingénierie tissulaire du cartilage articulaire

3.1 - Généralités

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 [456]. Aux côtés des thérapies existantes telles que la médication, la pose de dispositifs médicaux ou de prothèses, la greffe ou la transplantation pour remplacer, dans certaines limites, la structure et la fonction de l'organe lésé, 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 [457]. Le principe de l'ingénierie tissulaire est donc d'utiliser une matrice biocompatible chargée ou non avec des molécules biologiquement actives afin de favoriser la différenciation et la maturation de cellules appropriées à la réparation du tissu ou de l'organe ciblé [458, 459]. Deux approches sont développées en ingénierie tissulaire. La première approche est de fabriquer entièrement *in vitro* un tissu fonctionnel avant son implantation. La deuxième approche est, au contraire, d'implanter un greffon immature, c'est-à-dire ayant été cultivé peu de temps *in vitro*, puis de permettre sa maturation *in vivo* [460].

Avec sa faible cellularité et sa matrice avasculaire, le cartilage articulaire est considéré comme un bon candidat pour l'ingénierie tissulaire, notamment parce qu'il demande moins d'apport métabolique [461]. Trois composants sont essentiels dans l'ingénierie tissulaire, les matrices, les cellules et les morphogènes. L'une des voies de recherche concerne donc le développement de matrices capables de répondre aux attentes de l'ingénierie tissulaire du cartilage. L'autre voie tente de déterminer la source de cellule idéale. Enfin, le dernier volet de cette recherche est orienté vers l'optimisation des conditions de culture permettant de stimuler la chondrogenèse *in vitro* ou *in vivo* (à l'aide de bioréacteur par exemple). Finalement, le récent développement et la maîtrise des techniques de biologie moléculaire et de thérapie génique, permettent d'envisager des approches utilisant le génie génétique pour l'ingénierie du cartilage articulaire.

3.2 - Les matrices et les facteurs de croissance

Les matrices, dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage, sont développées de manière à fournir un environnement tridimensionnel favorisant et orientant les processus de

prolifération, migration et différenciation des cellules auxquelles elles sont associées [462]. La matrice idéale doit être biocompatible, et ne doit pas provoquer de réaction inflammatoire, ni immunologique liée à son implantation, afin de préserver le tissu receveur. La matrice doit présenter une certaine porosité pour permettre la migration des cellules et la diffusion des molécules, des nutriments et de l'oxygène. La matrice doit également permettre la fixation des cellules pour les maintenir dans l'implant et sur le site d'implantation. Elle peut aussi être bioactive et permettre la libération homogène et contrôlée de facteurs de croissance ou de morphogènes. Enfin, la matrice doit adhérer aux tissus, posséder une certaine résistance et conserver son intégrité mécanique afin d'éviter sa dégradation, son écoulement ou sa fuite après implantation. La matrice doit être, de préférence, applicable par chirurgie mini-invasive donc si possible injectable. Dans le cas contraire, sa forme et sa taille doivent pouvoir être adaptées à la lésion. Elle doit, bien sûr, pouvoir être stérilisée afin d'éviter les contaminations par des agents pathogènes, et ce sans subir de modification de ses propriétés physiques, chimiques ou biologiques. Enfin, elle doit être dégradable pour s'intégrer dans les processus physiologiques de remodelage tissulaire [463].

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

Il existe une grande variété de protéines pouvant affecter la différenciation ou le maintien de l'expression des marqueurs chondrocytaires, notamment les facteurs de croissance tels que TGF, BMP, FGF, IGF, Hh ou Wnt. Ces facteurs de croissance sont connus pour avoir une large palette d'activités comprenant des effets sur la prolifération, la synthèse et le dépôt d'une matrice cartilagineuse, l'orientation de la différenciation de CSM. La majorité des facteurs de croissance étudiés *in vitro* le sont par simple ajout de la protéine soluble dans le milieu de culture. Dans le cadre d'une application clinique, il est important d'avoir un effet des facteurs de croissance qui soit stable et continu dans le temps. L'association de facteurs de croissance à des matrices prend ici tout son sens.

Les différentes caractéristiques et natures des cellules, facteurs de croissance et matrices pouvant être associées dans le cadre d'une stratégie d'ingénierie tissulaire du cartilage ont fait l'objet d'un article de revue publié dans *Current Stem Cell Research & Therapy* (Article II).

Article II

Cartilage Tissue Engineering: Towards a Biomaterial-Assisted Mesenchymal Stem Cell Therapy

C. Vinatier, C. Bouffi, C. Merceron, J. Gordeladze, J. M. Brondello,
C. Jorgensen, P. Weiss, J. Guicheux and D. Noël.

Current Stem Cell Research & Therapy (2009) 4: 318-329

Article II : Cartilage Tissue Engineering: Towards a Biomaterial-Assisted Mesenchymal Stem Cell Therapy – Current Stem Cell Research & Therapy

Résumé :

Dans le cadre de la médecine musculo-squelettique, le traitement des lésions du cartilage reste un point critique, en raison des faibles propriétés de réparation intrinsèques de ce tissu. Malgré les progrès en chirurgie orthopédique, l'absence de moyens efficaces pour le traitement de défauts cartilagineux de grande taille a orienté la recherche en ingénierie tissulaire vers l'utilisation combinée de cellules chondrogéniques, de biomatériaux et de facteurs environnementaux. L'objectif de cette revue est de focaliser sur les progrès récents réalisés dans le cadre de la thérapie cellulaire et d'exploiter leur potentiel dans l'ingénierie tissulaire du cartilage. Il s'agit notamment pour cela de 1) définir les meilleures cellules candidates entre les chondrocytes ou les CSM en termes de disponibilité de la source de cellules, d'isolement, de prolifération et de potentiel de réparation 2) concevoir des matrices naturelles ou synthétiques biocompatibles et biodégradables capables de véhiculer les cellules sur le site lésé, de libérer des facteurs favorisant la chondrogenèse et de combler le défaut pour compenser la perte de substance 3) identifier des facteurs de croissances spécifiques et des modes de libération appropriés, permettant ainsi la différenciation chondrocytaire et le maintien du phénotype différencié au cours du temps et 4) évaluer et estimer les combinaisons optimales qui apporteront un gain de fonction dans le cadre de réparation de cartilage articulaire dans des modèles animaux ou en clinique. Enfin, certains des obstacles majeurs, généralement rencontrés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage ainsi que les perspectives à venir pour les surmonter sont discutés.

Cartilage Tissue Engineering: Towards a Biomaterial-Assisted Mesenchymal Stem Cell Therapy

Claire Vinatier^{#,1,2,6}, Carine Bouffi^{#,3,4}, Christophe Merceron^{1,2}, Jan Gordeladze^{3,4}, Jean-Marc Brondello^{3,4}, Christian Jorgensen^{3,4,5}, Pierre Weiss^{1,2}, Jérôme Guicheux^{1,2} and Danièle Noël^{*,3,4}

¹Inserm, U 791, LIOAD, Nantes, F-44042, France; ²Université de Nantes, UFR Odontologie, Nantes, F-44042 France; ³Inserm, U 844, Montpellier, F-34091 France; ⁴Université MONTPELLIER I, UFR de Médecine, Montpellier, F-34000 France; ⁵Service d'Immuno-Rhumatologie, Hôpital Lapeyronie, Montpellier, F-34295 France; ⁶Graftys SARL, Aix en Provence, F-13854 France

Abstract: 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 orthopaedic surgery, the lack of efficient modalities of treatment for large chondral defects has prompted research on tissue engineering combining chondrogenic cells, scaffold materials and environmental factors. The aim of this review is to focus on the recent advances made in exploiting the potentials of cell therapy for cartilage engineering. These include: 1) defining the best cell candidates between chondrocytes or multipotent progenitor cells, such as multipotent mesenchymal stromal cells (MSC), in terms of readily available sources for isolation, expansion and repair potential; 2) engineering biocompatible and biodegradable natural or artificial matrix scaffolds as cell carriers, chondrogenic factors releasing factories and supports for defect filling, 3) identifying more specific growth factors and the appropriate scheme of application that will promote both chondrogenic differentiation and then maintain the differentiated phenotype overtime and 4) evaluating the optimal combinations that will answer to the functional demand placed upon cartilage tissue replacement in animal models and in clinics. Finally, some of the major obstacles generally encountered in cartilage engineering are discussed as well as future trends to overcome these limiting issues for clinical applications.

INTRODUCTION

Structure and Function of Articular Cartilage

Articular cartilage is a highly specialized tissue that reduces joint friction and protects the bone ends from the shear forces associated with high mechanical load. The articular cartilage consists of chondrocytes and few progenitor cells [1] which are organized in various layers, from the fibrotic to the mature and hypertrophic mineralizing layer of chondrocytes in direct contact with the sub-chondral bone. The extracellular matrix (ECM) of chondrocytes is distinct from that of other connective tissues. This ECM is composed of a network of fibrillar collagens that give the tissue its shape, strength and tensile force and, proteoglycans that give resistance to compression [2]. It contains the large aggregating proteoglycan aggrecan which is attached to hyaluronic acid polymers via a link protein and predominantly, the collagens type II (80-90% of total collagens), IX and XI. Once the cartilage is formed in the adult, the turn-over of ECM protein replacement is low with a collagen and proteoglycan half-life of 100 and 3-24 years, respectively [3]. This low rate of matrix remodelling partly explains why chondrocytes are relatively inactive metabolically although they can respond to various stimuli to maintain normal homeostasis.

Poor Intrinsic Capacity of Cartilage for Repair

After injury due to traumas or osteo-articular diseases, the articular cartilage is frequently damaged resulting in fibrillation and subsequent degradation which can also lay down into the sub-chondral bone. This is the result of the limited capacity of cartilage for repair due to the absence of vasculature that cannot provide the progenitor cells from the blood or the bone marrow to enter the tissue. Accordingly, the resident articular progenitor cells or chondrocytes entrapped within the surrounding matrix do not migrate into the lesions to secrete a reparative matrix. Consequently, the limited repair capacity and the absence of pharmacological agents have prompted researchers and surgeons to develop surgical methods to restore cartilage surfaces using tissue grafts or cell-based therapies (for review, see [4]). However, none of the current cartilage repair approaches allowed the generation of long term hyaline cartilage replacement tissue.

Limitations of Current Surgical Methods for Cartilage Repair

Among the possible explanations for the limited results described with the current methods of cartilage repair is the lack of integration of the chondrocytes within the existing cartilage. This is likely to be due to the insufficient capacity of implanted cells to secrete the cartilaginous matrix and to recapitulate the complex events resulting in the zonal organization of the cartilaginous tissue [5]. The lack of integration may also be due to the incomplete differentiation of chondroprogenitor cells or instability of the chondrocytic phenotype. The implantation of undifferentiated cells has already

*Address correspondence to this author at the Inserm U 844, Hôpital Saint-Eloi, Bat INM, 80 Avenue Augustin Fliche, 34295 Montpellier Cedex 5, France; Tel: 33 (0) 4 99 63 60 26; Fax: 33 (0) 4 99 63 60 20; E-mail: danièle.noel@inserm.fr

[#]These authors contributed equally.

been applied in humans and although a significantly improved patient outcome was observed after one to five years, the defects were filled with a fibrocartilaginous tissue [6]. Finally, leakage of the cell suspension may be the cause of loss or decreased viability of the implanted cells as currently reported in autologous chondrocyte transplantation [7]. In summary, cell-based therapies have proved their feasibility but showed no superiority over other surgical methods on the long-term highlighting a crucial need for optimizing various combinations of cell types, scaffolds and/or chondrogenic factors (Fig. 1).

CELL SOURCES FOR CARTILAGE REPAIR

Chondrocytes

Chondrocytes, the resident cells of cartilage, produce the components of the ECM and represent the cells of choice for engineering articular cartilage. Adult chondrocytes have been isolated from various sources like articular cartilage, nasal septum, ribs or ear cartilage [8, 9]. However, ear cartilage is an elastic cartilage, which exhibits different mechanical properties as compared to the hyaline cartilage found in joint and nasal septum. Isogai *et al.* have shown that chondrocytes give rise to cartilage tissue having the characteristics of its original tissue [8]. A chondrocyte from ear cartilage will thus give rise to an elastic cartilage. With a view to an application to the repair of articular cartilage, it therefore seems more appropriate to use hyaline cartilage as a source of chondrocytes. A comparison between different sources of hyaline chondrocytes (nasal, costal, and articular) has shown the superiority of costal and nasal chondrocytes on articular chondrocytes in term of quantity of cartilage formed after transplantation in subcutaneous sites [8]. One of the main limits related to the use of chondrocytes, is their instability in monolayer culture resulting in the loss of their phenotype. Indeed, chondrocytes lose the expression of the chondrocytic markers which are collagen II and aggrecan mainly, but also SZP (superficial zone protein) [10]. This loss of the chon-

drocytic phenotype is accompanied by a phenotypic shift towards a fibroblastic one. This fibroblastic phenotype is characterized by an increased expression of collagen I and the adoption of the spindle-shape characteristic of fibroblasts [11]. This process of dedifferentiation is however reversible. Indeed, if dedifferentiated chondrocytes are placed in a three-dimensional environment, they retrieve their differentiated phenotype [12, 13]. Chondrocytes from osteoarthritic (OA) cartilage have also been considered. However, OA chondrocytes undergo metabolic alterations, which can lead to a low response to inductive environmental factors [14, 15]. Although chondrocytes derived from OA patients appear less appropriate for articular cartilage repair, it has been reported that OA chondrocytes may be able to recover a normal chondrocytic phenotype after *in vitro* three-dimensional (3D) culture [16]. However, additional studies are required to clearly decipher whether OA chondrocytes could be manipulated *in vitro* to be suitable for cell therapy of cartilage.

Mesenchymal Stem Cells

Multipotent mesenchymal stromal cells or mesenchymal stem cells (MSC) are an attractive source of cells for cartilage engineering due to their easy access and high capacity of *in vitro* expansion. They are mainly isolated from bone marrow or adipose tissue but have been isolated from a number of other tissues including synovium, periosteum, umbilical cord vein or placenta [17]. MSC were first characterized by their clonogenic potential determined by the capacity to form Fibroblast Colony Forming Units (CFU-F). In the bone marrow, the frequency of CFU-F is in the range of 1 cell in 10^4 - 10^5 mononuclear cells [18, 19]. They are now characterized by their capacity to adhere to plastic, their phenotype (CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD14⁻ ou CD11b⁻, CD19⁻ ou CD79 α ⁻, CD34⁻, CD45⁻ and HLA-DR⁻) and their trilineage differentiation potential [20]. MSC also exhibit the potential to differentiate into myocytes, tendinocytes, ligamentocytes [21], cardiomyocytes [22], neuronal cells [23, 24] and other cell types [25]. More recently, these cells have been described as immunoregulatory cells since they were shown to escape the immune recognition and to inhibit the host defence mechanisms (for review, see [26]). The interest of various other progenitor cells, such as multipotent adult progenitor cells (MAPC) or marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, for cartilage differentiation has been shown *in vitro* but has still to be validated *in vivo* [27, 28].

DIFFERENTIATION FACTORS REQUIRED FOR CARTILAGE ENGINEERING

A number of growth and differentiation factors that regulate cartilage development and homeostasis of mature articular cartilage have been identified. The most characterized factors which stimulate the anabolic activity in cartilage include Transforming Growth Factor (TGF)- β , Bone Morphogenetic Protein (BMP), Fibroblast Growth Factors (FGF), Insulin Growth Factor (IGF)-1, Hedgehog (hh) and Wingless (Wnt) proteins.

Transforming Growth Factor- β Family

The TGF- β superfamily of polypeptides includes TGF- β , BMP, activins and inhibins. Because TGF- β and BMP are

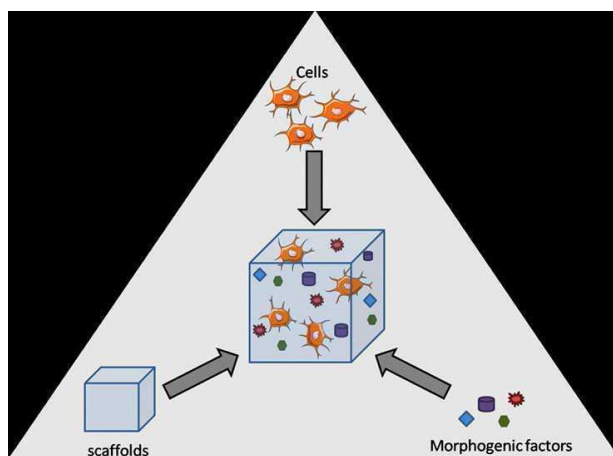


Fig. (1). Schematic representation of the components required for cartilage tissue engineering. Cells (stem cells with chondrogenic potential or chondrocytes), morphogenic factors and scaffolds (natural or synthetic) are combined *in vitro* to form an engineered scaffold suitable for implantation. Illustration with permission from Servier (<http://www.servier.fr/smart/TermsOfUse.asp>).

the best characterized peptides and their role in osteogenesis and chondrogenesis is well documented [3], we will focus on these molecules in the following paragraphs. The TGF- β family includes 5 members (TGF- β 1-5) which are produced by many different cell types. However, the concentration of TGF- β is approximately 100-fold greater in bone than in other tissues [29]. Articular cartilage itself contains large amounts of latent TGF- β . Although present in tiny quantities in normal physiological conditions, active TGF- β 1, 2 and 3 are generally considered to be potent stimulators of proteoglycans and type II collagen synthesis in primary chondrocytes (for review, see [3, 29]). *In vitro*, TGF- β 1, 2 and 3 were also shown to induce the chondrogenic differentiation of MSC [30-32]. Recently, rabbit MSC encapsulated with thermo-reversible hydrogel releasing heparin-bound TGF- β 3 were shown to differentiate toward chondrocytes [33]. *In vivo*, a porous gelatin-chondroitin-hyaluronate scaffold in combination with a controlled release of TGF- β 1 could induce the chondral differentiation of MSC to form ectopic cartilage [34]. The same group also reported that implantation of rabbit MSC in a full-thickness defect resulted in better chondrocyte morphology, integration, continuous subchondral bone, and much thicker newly formed cartilage layer when compared to control group [34]. However, several studies have shown that injection of TGF- β or TGF- β -expressing adenoviruses results in side effects in the joints, such as osteophyte formation, swelling and synovial hyperplasia [35-37].

Bone Morphogenetic Proteins

BMPs constitute a large sub-class of polypeptides whose role is essential for chondrogenesis during skeletal development. Indeed, mutations in *BMP-5* and *BMP-14* genes result in brachypodism in mice and chondrodysplasia in humans. A number of mice deficient for BMP are nonviable but in *BMPR-IB*, *ActR-IA*, *BMP-7* or *BMP-14* deficient mice, severe appendicular skeletal defects have been observed suggesting that they play important synergistic or overlapping roles in cartilage and bone formation *in vivo* [38]. A number of BMP, including BMP-2, -4, -6, -7, -13, -14 can stimulate the chondrogenic differentiation of MSC [39-42] and enhance the synthesis of collagen type II and aggrecan by chondrocytes *in vitro* [43]. *In vivo*, healing of full-thickness cartilage defects in the rabbit was improved when combining microfracture and recombinant BMP-7 [44]. Similarly, the implantation of a type I collagen sponge containing BMP-2-expressing naked plasmid DNA implanted in full-thickness cartilage defects stimulated the transfection of MSC subjacent to the defect and cartilage repair [34]. The use of *ex vivo* retrovirally transduced muscle-derived stem cells isolated from mouse skeletal muscle to express BMP-4 enhanced chondrogenesis and significantly improved articular cartilage repair in rats [45]. A more recent study indicated that repair of chondral lesions in the knee joints of miniature pigs by periosteal precursor cells is facilitated in deeper hypoxic zones of cartilage repair tissue and is stimulated by BMP-2, and to a lesser extent IGF-1, which enhance HIF-1 α activity [46]. However, when implanted in ectopic localizations, BMPs led to bone formation via endochondral ossification which has to be avoided for articular cartilage engineering [47]. This observation points to the notion that optimal regulation of BMPs may enhance their efficacy in a

regulated tissue engineering strategy. Indeed, Huard's team showed that Noggin delivery can inhibit heterotopic ossification caused by BMP-4, demineralized bone matrix, and trauma in calvaria defect model [48, 49] suggesting that this strategy may be also useful for inhibiting endochondral ossification induced by hypertrophic cartilage. Although these BMP have shown great potential in animal models, no clinical studies have been conducted to validate their potential to enhance cartilage repair in humans.

Wingless Family

The Wnt family of secreted ligands contains more than 20 members in vertebrates that are characterized by conserved cysteine residues. These proteins exhibit unique expression patterns and distinct functions in development [50]. The Wnt family members signal through the canonical β -catenin-dependent pathway or β -catenin-independent pathways. Various Wnt members are involved both in early and late skeletal development and play a role in the control of chondrogenesis and hypertrophy. 9 *Wnt* genes are expressed in the postnatal growth plate, including *Wnt-4*, *-5a*, *-5b*, *-10b* and *-11* at high levels, and *Wnt-2b*, *-7b*, *-9a* and *-10a* at very low levels [51]. *Wnt-1*, *Wnt-4*, *Wnt-7a*, *Wnt-8* block chondrogenic differentiation but display different effects on hypertrophy. On the contrary, *Wnt-5a* and *Wnt-5b* promote chondrogenesis [52, 53]. *Wnt-5a* together with *Wnt-5b* were shown to regulate the proliferation of chondrocytes and their maturation into hypertrophic chondrocytes in both the embryonic and postnatal growth plate and *Wnt-11* does not affect chondrogenic differentiation. The role of *Wnt-3a* on chondrogenesis is more controversial. Importantly, we recently identified *Wnt-6* as a new factor able to induce the chondrogenic differentiation of primary MSC while inhibiting both osteogenic and adipogenic differentiation (pers. com.). The key genes identified in both embryonic cartilage development and postnatal endochondral bone formation include the *Wnt-5a/Fz-5 receptor* complex and *Wnt-7a* [54]. It is generally reported that Wnt members responsible for the induction of the osteogenic differentiation activate the β -catenin-dependent pathway. Indeed, *in vitro* inactivation of β -catenin in MSC causes chondrocyte differentiation under conditions allowing only osteoblasts to form [55]. Consistently, *in vitro* loss- and gain-of-function analyses reveal that β -catenin activity is necessary and sufficient to repress the differentiation of mesenchymal cells into Sox9-positive skeletal precursors [56]. However, β -catenin was recently shown to be required for both osteogenesis and chondrogenesis in adult mature tissues [57]. Overall, it appears that the Wnt network has dual roles in cartilage, as it has been described in other tissues: it is an important regulator of chondrocyte development, but deregulated signaling is detrimental to mature tissues and may lead to disease.

Fibroblast Growth Factor Family

In vertebrates, the FGF family comprises twenty-two structurally related proteins with a molecular mass from 17 to 34 kDA that bind one of four tyrosine kinase FGF receptors (FGFR) [58]. The importance of FGF signalling in skeletal development is highlighted by the number of dysplasias, mainly dwarfing chondrodysplasias and craniosynostosis syndromes, attributed to specific mutations in the genes encoding the FGFR-1, -2 and -3 [58]. During limb develop-

ment, *FGFR-2*, *Sox9* and *collagen type II* are among the earliest genes upregulated in condensing mesenchyme. Mice lacking *FGFR-3* develop skeletal overgrowth while mice overexpressing an activated form of *FGFR-3* develop skeletal dwarfism. These data have shown that signalling through *FGFR-3* negatively regulates chondrocyte proliferation through a *STAT1* pathway and differentiation through the *MAPK* pathway. Genetic studies have also identified defects in chondrogenesis in mice lacking *FGF18* whereas no apparent defects in chondrogenesis occur in mice lacking *FGF-2*, -5, -6, -7, -8 and -17 [59]. Additionally, the skeletons of *FGF-9^{-/-}* mice are slightly smaller than the wild type littermates [60].

In the adult cells, the chondrogenic effect of *FGF* and *FGFR* has been confirmed by very few studies. Indeed, forced expression of *FGFR-3* in the murine C3H10T1/2 MSC line was shown sufficient for chondrogenic differentiation [61]. Accordingly, *FGF-18* which was shown to be a selective ligand for *FGFR-3* in limb bud mesenchymal cells, suppress their proliferation while promoting differentiation to produce cartilage matrix [62]. In cultured chicken chondrocytes, *FGF-9*, another ligand for *FGFR3*, rapidly induces the upregulation and secretion of the matrix phosphoprotein osteopontin, known to be associated with chondrocyte and osteoblast differentiation. Unexpectedly, *FGF-9*-induced osteopontin was accompanied by inhibition of differentiation and increased proliferation of the treated chondrocytes [63]. In adult chondrocytes, *FGF-2* is mainly mitogenic although recent studies have shown that it can inhibit the anabolic activities of other growth factors, such as *IGF-1*. MSC expanded in *FGF-2*-supplemented medium proliferated more rapidly than control MSC and *FGF-2* treatment enhanced subsequent chondrogenic differentiation in a 3-dimensional culture [64, 65]. In addition, in a rabbit model, *FGF-2* can stimulate articular cartilage restoration in temporomandibular osteoarthritic defects, although the effective concentration range of *FGF-2* would have to be determined [66]. Implantation of a fibrin sealant incorporating *FGF-2* successfully induced healing of a mechanically induced defect with hyaline cartilage and concomitant repair of the subchondral bone [67]. One study reports the use of *FGF-18* in a setting of rapidly progressive osteoarthritis in rats. The data showed that *FGF-18* induced an increase in chondrocyte size and remodeling of the subchondral bone suggesting that it can stimulate repair of damaged cartilage [68]. The important issues coming from the contradictory results reported to date include a better characterization of the signalling pathways activated by *FGFs*, a better understanding of the interplay between these pathways as well as understanding the contribution of additional factors, such as heparan sulfate, in regulating *FGF* activity in cartilage and bone development.

Insulin-Like Growth Factor Family

The *IGF* family is composed of two ligands (*IGF-1* and *IGF-2*), two cell surface receptors (*IGF1R* and *IGF2R*), at least six different *IGF* binding proteins (*IGFBP-1* to *IGFBP-6*), and multiple *IGFBP* proteases, which regulate *IGF* activity in several tissues. *IGF-1* is the most studied form with respect to cartilage repair. In embryonic development, mice with *IGF-1^{-/-}* mutations display severe growth retardation, have developmental defects in various organs while *IGF-2^{-/-}* are 60% smaller than their wild-type littermates but grow

normally after birth. Accordingly, mice nullizygous for the *IGF1R* gene demonstrate severe fetal growth retardation [69]. In humans, a reported natural deletion of exons 4 and 5 of the *IGF-1* gene results in severe pre- and postnatal growth and developmental deficits, combined with mental retardation [70].

IGF-1 and *IGF1R* are expressed by chondrocytes, osteoblasts, and osteoclasts. *IGF-1* is considered an essential mediator of cartilage homeostasis through its capacity to stimulate proteoglycan synthesis and, promote chondrocyte survival and proliferation [71, 72]. *IGF-1* also induces the differentiation of MSC towards the chondrocytic phenotype as shown by the up-regulation of the specific markers [33, 73]. In a critical size full-thickness cartilage defect horse model, defects filled with fibrin clots loaded with *IGF-1* repaired better than empty defects and contained mainly chondrocytes with predominantly collagen type II rich matrix [74]. In the same model, the combined use of chondrocytes and *IGF-1* tend to improve the overall continuity and consistency of the repair tissue [74]. However, an age-related or OA-associated decline in the responsiveness of chondrocytes to *IGF-1* appears to be due at least in part to over-expression of *IGFBPs*. The titration of *IGFs* by *IGFBPs* may account for the variable results reported to date with *IGF-1* treatment for *in vivo* cartilage repair studies. Improvement will require optimizing the dose, injection regimen and/or combination with other growth factors.

Hedgehog Family

In mammals, the Hh family comprises 3 members of highly conserved proteins: Sonic hedgehog (*Shh*), Indian hedgehog (*Ihh*), and Desert hedgehog (*Dhh*). In concert with other signalling molecules, *Ihh* has been found to function as a central regulator of endochondral ossification, coordinating chondrocyte proliferation, differentiation, and ossification of the perichondrium. Expression of *Ihh* induces the upregulation of a second secreted factor, parathyroid hormone-related protein (*PTHrP*), which is expressed in distal chondrocytes of the skeletal elements. Mice overexpressing *Ihh* or a constitutively activated allele of *Smo* displayed an increased chondrocyte proliferation [75]. Furthermore, as *Gli3* is the major mediator of *Shh* signalling during limb patterning, it is not surprising that mutations in the human *Gli3* gene cause a variety of inherited skeletal patterning defects [76]. The requirement of Hh signalling varies in different developmental processes: osteoblast differentiation in the perichondrium and chondrocyte differentiation in the sclerotome are induced by transient exposures to *Ihh* or *Shh*, respectively, whereas the onset of columnar and hypertrophic chondrocyte differentiation depends on continuous *Ihh* signalling to maintain the *Ihh-PTHrP* interactions. Furthermore, hedgehog signalling has been shown to interact with several other signalling pathways, including those of *FGFs*, *Wnts*, and *BMPs*.

Although hedgehog signalling has been mainly described in growth plate chondrocytes, the role of *Shh* during chondrogenesis has been shown. Indeed, *in vitro*, *Shh*-treated MSC showed expression of the cartilage markers aggrecan, *Sox9*, *CEP-68*, and collagens type II and type X within 3 weeks [77]. In addition, Hh pathway dramatically impaired adipogenesis of MSC, with reduced lipid accumulation, a decrease in adipocyte-specific markers, and acquisition of insulin-resistant phenotype stimulation [78]. *In vivo*, few

studies are available and report the role of Shh on bone regeneration [79].

NATURAL AND SYNTHETIC SCAFFOLDS FOR CARTILAGE ENGINEERING

A number of matrices have been tested *in vitro* and *in vivo* in preclinical and clinical studies. These matrices can be classified according to their nature (proteic, polysaccharidic, synthetic and natural) or to their form (mass, mass porous, foam, viscous liquid and hydrogel). The ideal properties of a matrix are biocompatibility to prevent the inflammatory reactions to protect host tissue; three-dimensional shape allowing proliferation and cellular differentiation and porosity permitting migration of cells and diffusion of molecules, nutrients and oxygen. The matrix must also allow cell adhesion to facilitate the implantation of cells in the lesion and maintainance in the implant. It can also be bioactive and allow the homogeneous and controlled release of growth factors or morphogens. Finally, the matrix has to adhere to the host tissue; maintain its mechanical integrity in order to avoid its flow after implantation and be degradable to integrate the physiological processes of tissue remodeling. The matrix must be applicable by mini-invasive surgery thus if possible injectable. Main matrices used in tissue engineering of the cartilage are referred in Table 1. Mixed matrices can be also obtained either by an association of two or several matrices, or by modifying them chemically or structurally [80].

Natural Matrices

Collagen Matrices

Collagen-based matrices or collagen sponges are among the mostly used matrices for cartilage engineering. Collagen

is naturally degraded by collagenases and serines proteases. Its degradation is controlled locally by the cells present in the tissue [81]. These collagen matrices implanted alone improve the spontaneous repair process of osteochondral defects in the rabbit [82]. They are however generally associated with chondrocytes [83, 84] or MSC. MSC seeded in type I and III collagen gels and implanted in osteochondral defects allowed the formation of cartilage and subchondral bone which was mechanically inferior to healthy articular cartilage and showed signs of degeneration after 24 weeks [85]. Moreover, the use of type I collagen from bovine origin may induce the production of antibodies by the host [86]. Collagen gels like Atelocollagen® (Koken Co Ltd, Tokyo, Japan) are favorable for the culture of chondrocytes and the synthesis of the ECM. These gels have been used *in vitro* as three-dimensional support for the culture of autologous human chondrocytes and in humans. This last study showed encouraging results, since 93% of the patients exhibited hyaline cartilage containing type II collagen with a biomechanical response similar between repaired tissue and healthy cartilage [87]. Another multicentric clinical study also showed positive preliminary results after implantation of grafts of collagen gel containing autologous chondrocytes and three-dimensional culture *in vitro* [88]. Collagen gels containing MSC formed hyaline-like tissue in cartilaginous defects after 7 months and after 1 year, patients had recovered a normal activity [6]. Despite immunoreactivity associated to its bovine origin, collagen gels therefore could appear as suitable matrices for cartilage tissue engineering.

Fibrin Glue

The fibrin adhesive is obtained by polymerization of fibrinogen in the presence of thrombin [89]. The fibrinogen is a physiologic liquid present in blood which is activated to

Table 1. Main Scaffolds Used for the 3-Dimensional Culture and Transplantation of Chondrogenic Cells in Cartilage Tissue Engineering

Proteic	Collagen [6, 83, 87, 88]
	Fibrin [89, 93-95]
	Laminin (Matrigel™) [148, 149]
	Gelatin [113, 150]
Polysaccharidic	Agarose [98-100]
	Alginate [103, 105, 106]
	Hyaluronic acid [32]
	Chitosan [115]
	Cellulose [118, 121, 151]
Synthetic	Poly lactic acid [152, 153]
	Poly glycolic acid [127]
	Carbon fibres [129]
	Dacron (polyethylene terephthalate) Teflon (polytetrafluoroethylene) [130, 131]
	Polyesterurethane [154]
	Polybutyric acid [155]
	Polyethylemethacrylate [156]

polymerization in vascular lesions or in pathological situations [90]. Physiologically, fibrin promotes the spontaneous repair activity of articular cartilage but also has a pro-inflammatory activity. Fibrin induces its own degradation by the ECM components into non toxic endpoint components. Several studies have reported that the use of fibrin glue and chondrocytes improve cartilage repair *in vivo* [91-94]. In horse, fibrin glue containing either chondrocytes or MSC allowed the formation of a new cartilaginous tissue containing high proteoglycan and type II collagen contents [95, 96]. After 30 days, the defects filled with fibrin containing MSC exhibited a higher arthroscopic score compared with fibrin alone but it was no more significant after 6 months [96]. Nevertheless, due to its lack of mechanical stability, the use of fibrin glue is restricted. In human, its use is limited to seal off the periosteal flap in the autologous chondrocyte implantation (ACI) technique [97].

Agarose

Agarose is a polysaccharide which contains residues of L and D-galactose and is isolated from Chinese algae. Agarose has been mostly used *in vitro* as a matrix for the 3D culture of chondrocytes. It has also been used to help the chondrogenic differentiation of stem cells [98]. Implantation of agarose containing chondrocytes or MSC in osteochondral defects allows the formation of a repaired tissue containing collagens and proteoglycans [99]. However, when implanted alone, agarose inhibits the process of spontaneous repair [100]. Moreover, due to its weak degradation, agarose has been poorly studied *in vivo*.

Alginate

Alginate is a linear polysaccharide purified from brown algae. It can undergo a reversible gelation in aqueous medium by crosslinking of bivalent cations and its dissolution can be obtained very quickly by using a calcium chelating agent. Alginate has been widely used *in vitro* as a matrix for the three-dimensional culture of chondrocytes because it allows the maintenance of the chondrocytic phenotype and the synthesis of ECM proteins [101-103]. In nude mice, the subcutaneous implantation of alginate beads containing MSC differentiated *in vitro* towards a chondrocytic phenotype allowed the production of cartilaginous proteins [104]. *In vivo*, the results were disappointing since alginate alone inhibits spontaneous repair [105] and when associated with chondrocytes, it did not repair osteochondral defects partly due to severe immunological reactions [106, 107]. Nevertheless, a hybrid agarose-alginate hydrogel, Cartipatch® (Tissue Bank of France, Lyon, France), was tested for *in vivo* implantation of autologous chondrocytes in human. After two years, all patients clinically improved and 8 out of 13 patients had hyaline cartilage in biopsies from neotissue [108].

Hyaluronic Acid

Hyaluronic acid (HA) is a component of the cartilaginous ECM which forms macromolecules of important size. HA is degraded naturally by hyaluronidases [81] but its degradation products are able to induce chondrolysis [109]. HA-based matrices increase the synthesis of ECM by chondrocytes *in vitro* and *in vivo* [110]. Nevertheless, under an unmodified form, HA is not suitable for cartilage repair [111] and needs crosslinking to enhance its biocompatibility [112].

HA may also be associated to other matrices. As an example, a tripolymer of gelatine, chondroitin and HA sulphate allowed the maintenance of the chondrocytic phenotype and type II collagen synthesis *in vitro* [113]. Hyalograft® (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy), a tissue engineered graft composed of autologous chondrocytes and HYAFF 11 (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy) showed improvement of cartilage function in 91.5% of patients [114].

Chitosan

Chitosan is a natural linear polymer pertaining to the glycosaminoglycan (GAG) family. Chitosan is mainly found in cuticles of arthropods, the endoskeleton of cephalopods and in mushrooms. Chitosan can be associated with chondroitin sulphate to form hydrogels [90] and can be degraded by lysosomes [81]. Matrices containing chitosan are biocompatible and are widely used for cellular encapsulation, drug release and cell culture [115]. Several *in vitro* studies indicate that matrices containing chitosan are able to improve cartilage repair, promote chondrogenic activity of human chondrocytes and synthesis of ECM proteins [90]; when used alone or in association with various other polymers, like alginate or hyaluronic acid [116]. *In vivo*, chitosan-based matrices were reported to induce the formation of a hyaline-like repair tissue in articular cartilage defects [117]. To our knowledge, chitosan-based matrices have not yet been evaluated in human.

Cellulose

Cellulose is a semicrystalline polymer of glucose. The cellulose is found in plants and is the most widely spread natural polymer. Cellulose is degradable by enzymes like cellulases [118]. The biocompatibility of cellulose and its derivatives is well established [119, 120]. *In vitro*, the use of a cellulose polymer allowed the proliferation of chondrocytes and showed good biocompatibility [118]. In addition, we report that injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel may be used for articular cartilage repair [121]. To date, however, few *in vivo* studies have been performed in this field of tissue engineering.

Artificial Matrices

Poly(lactic Acid) and Poly(glycolic Acid)

Poly(lactic acid) (PLA) and poly(glycolic acid) (PGA) are derived from alpha hydroxypolyesters. PLA and PGA are degraded either by hydrolysis, or specific cleavage of oligopeptides [81]. Their degradation products are however partially cytotoxic [80] and these polymers induce important immunological reactions [122, 123]. Originally, they were developed to form resorbable suture wire (vicryl™) and medical devices (screw, plates). Since twenty years, they are tested alone or mixed with other matrices for cartilage tissue engineering [124, 125]. Various forms of these polymers, from the fine fibrillary layer to the sponge, have been developed. PGA polymers provide the best *in vitro* results, with a cellular density near of that found *in vivo* and a continuous production of type II collagen [126]. *In vivo* studies were mainly performed in the rabbit model [127]. In human, BioSeed® (BioTissue Technologies, Freiburg, Germany) containing autologous articular chondrocytes was reported to

induce the formation of a hyaline cartilage and to improve significantly clinical scores [128].

Carbon Fibers

Carbon fibers are inert and therefore did not induce specific biological answer. They were used, without success, to fill rabbit cartilage defect in order to improve the spontaneous repair [129]. The neotissue was fibrous and exhibited only weak mechanical properties. Despite these unsatisfactory results, carbon fibers have been applied in human with very variable results [90].

Dacron and Teflon

Dacron (polyethylene terephthalate) and Teflon (polytetrafluoroethylene) have been used to improve spontaneous repair of articular cartilage in rabbit. Results have reported the formation of a repair tissue, which was either a vascularized fibrous tissue or a fibrocartilage [130, 131]. Due to an increased rigidity of joint after resurfacing with Teflon [132] and immunological reaction observed when these matrices was used as suture wires, these matrices seem not adequate for cartilage tissue engineering.

Hydrogel

The search for a minimally-invasive surgery has justified the development of injectable matrices for cartilage tissue engineering. These injectable matrices have to be able to solidify, once implanted, to gain the desired shape and present the mechanical properties of the tissue to repair [80]. Hydrogels are three-dimensional polymeric networks that are able to absorb and retain large volume of water. Viscous polymers from various origins (see Table 1) can be transformed in hydrogel by modifying their environment. Crosslinking of hydrogels can be initiated by physical stimuli like pH, temperature or ionic environment or chemical crosslink through crosslinking agent, photopolymerization or enzymatic reaction [81]. Hydrogels generally present good biocompatibility. Moreover, cells, growth factors or bioactive components can be homogeneously incorporated. Their high water content allowed rapid diffusion of nutrients and metabolites [133]. Hydrogels are produced from natural or synthetic polymers (see Table 2). Collagen gels represent the main protein-based polymer used for hydrogel production [134]. Among polysaccharide-based polymers, HA [114], alginate [135], chitosan [136] or cellulose derivatives

[94, 137] have been used with satisfactory results. Among synthetic polymers, polyvinyl alcohol, polyethylene glycols (PEG) and poly(lactide-coglycolide) represent the mostly used. Hydrogels therefore appeared as appealing materials for cartilage tissue engineering.

CELL THERAPIES IN CLINICS

Therapies currently used or available in clinics are bone marrow stimulation techniques (subchondral drilling [138], abrasion, microfracture [139]), multiple osteochondral graft like mosaicplasty [140] and autologous chondrocyte implantation (ACI) [141]. Clinical studies report an improvement in clinical outcome measures compared with preoperative assessment but no superiority of one technique over the others [142].

After a first generation of ACI, a second generation has recently been developed where autologous chondrocytes are associated with a matrix which provides a three-dimensional environment and support at the implantation site [143]. Various concepts are presently accessible in clinics: MACI[®] (Verigen, Leverkusen, Germany); Maix[®] (Matricel, Hezzenrath, Germany); Chondro-gide[®] (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland); Atelocollagen[®] (Koken Co Ltd, Tokyo, Japan), Hyalograft[®] C (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy), Bio-Seed[®]-C (BioTissue Technologies, Freiburg, Germany). Despite good clinical results, these above mentioned concepts suffer a major limitation related to the fact that matrices require a surgical incision into the joint to be implanted. To address the issue of less invasive transplantation technique, the development of injectable biomaterials as hydrogels suitable for minimally invasive transplantation of chondrogenic cells is the focus of current research. The second limitation of the ACI and matrix-induced ACI is the use of chondrocytes harvested from articular joints which implies a limited quantity of autologous chondrocytes [144]. Therefore, cellular therapies using MSC, an easily accessible source of autologous cells, have been proposed. Only a few case studies have been reported to date. Transplantation of bone marrow-derived MSC seeded on type I collagen membranes in articular cartilage defects resulted in increased arthroscopic and histologic grading scores [145]. Centeno *et al.* have injected bone marrow-derived MSC percutaneously in the knee of a patient with radiographic signs of degenerative joint disease [146]. 24 weeks later, they observed a significant cartilage growth

Table 2. Main Matrices Used to Prepare Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering

Natural	Hyaluronic acid	[157-159]
	Alginate	[160-162]
	Chitosan	[163]
	Chondroitin sulfate	[164]
	Collagen	[165]
	Cellulose	[121, 137]
synthetic	Poly lactic-co-glycolic	[166, 167]
	Polyethyleneglycol	[168-170]
	Polyvinyl alcohol	[171]

and the pain decreased. Kuroda *et al.* have also transplanted bone marrow MSC, incorporated in a collagen gel, in an athlete with a grade IV cartilage defect [6]. After seven months, the athlete has regained his normal activity and histologic analysis revealed the formation of hyaline cartilage within the defect. The third study is a three case report where undifferentiated bone marrow-derived MSC were associated with collagen sheet [147]. After 1 year, the three patients presented an increase IKDC score (International Knee Documentation Committee) and in 2 patients, a fibrocartilage-like repaired tissue totally recovered the defect [6]. Although the results suggest that autologous MSC transplantation may be an effective approach to promote the repair of articular cartilage defects, improvement is needed to achieve hyaline cartilage formation. Currently, only one Phase I clinical trial in cartilage tissue engineering using MSC is underway. This clinical trial is sponsored by the Royan Institute and Tehran University of Medical Sciences and concerns the use of bone marrow MSC mixed with type I collagen scaffolds and implanted in patients with knee cartilage defect or osteoarthritis.

CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

In conclusion, cell-based strategies not only have proved the feasibility of such approaches for cartilage repair but also have provided good clinical results. However, these protocols are still far from generating a tissue that is comparable to native cartilage with respect to quality and stability. The use of chondrogenic progenitors, in particular MSC, will

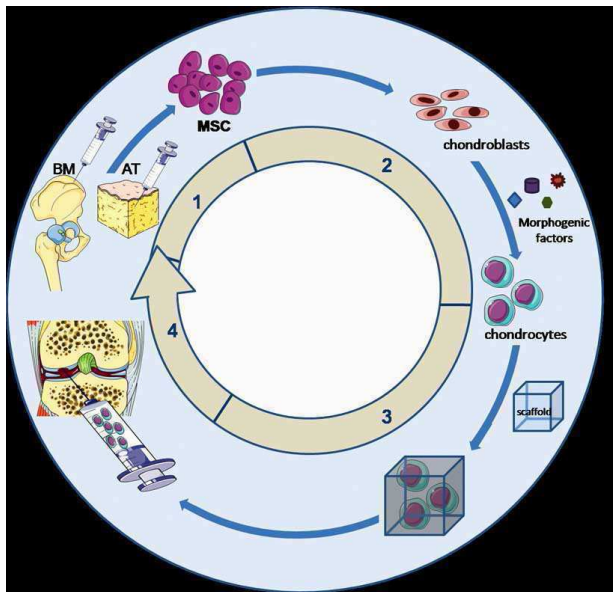


Fig. (2). Sequence of events from stem cell isolation to engineered scaffold implantation. The first step is the isolation of mesenchymal stem cell (MSC) from bone marrow (BM) or adipose tissue (AT) and *ex vivo* expansion. This step is followed by the second and third steps of MSC differentiation towards chondrocytes by the addition of morphogenic factors and inclusion into a scaffold, preferentially an injectable biomaterial that allows an easy and minimally invasive injection of bioengineered scaffold into the cartilage defect as shown in step 4. Illustration with permission from Servier (<http://www.servier.fr/smart/TermsOfUse.asp>).

undoubtedly be of high potential for such application. Nevertheless, more sophisticated approaches combining deliverable bioactive factors together with a chondro-conductive scaffold will be required (Fig. 2). Although some growth factors have been proposed, none are capable to specifically induce the desired lineage and a timely regulated combination of factors is likely to be required for the obtention of a functional and stable chondrocyte phenotype. These will rely on the understanding on the complex molecular events involved in chondrogenesis induction and maintenance of the chondrocyte phenotype taking place during embryogenesis that will have to be reproduced in adult tissue repair.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the "Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée", the "Fondation pour la Recherche Médicale", the "Arthritis-Fondation Courtin", the "Société Française de Rhumatologie", Graftys SARL and ANR "Scartifold" and ANR "Chondrograf".

REFERENCES

- [1] Alsalameh S, Amin R, Gamba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1522-32.
- [2] Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res* 2001; 391(Suppl): S26-33.
- [3] Goldring MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006; 20: 1003-25.
- [4] Smith GD, Knutsen G, Richardson JB. A clinical review of cartilage repair techniques. *J Bone Joint Surg Br* 2005; 87: 445-9.
- [5] Klein TJ, Schumacher BL, Schmidt TA, *et al.* Tissue engineering of stratified articular cartilage from chondrocyte subpopulations. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11: 595-602.
- [6] Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, *et al.* Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15: 226-31.
- [7] Wood JJ, Malek MA, Frassica FJ, *et al.* Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88: 503-7.
- [8] Isogai N, Kusuhara H, Ikada Y, *et al.* Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng* 2006; 12: 691-703.
- [9] Kafienah W, Jakob M, Demarteau O, *et al.* Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Eng* 2002; 8: 817-26.
- [10] Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res* 2005; 23: 425-32.
- [11] Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, *et al.* Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 62-70.
- [12] Domm C, Schunke M, Christesen K, Kurz B. Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 13-22.
- [13] Malda J, van Blitterswijk CA, Grojec M, Martens DE, Tramper J, Riesle J. Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances redifferentiation. *Tissue Eng* 2003; 9: 939-48.
- [14] Fukui N, Purple CR, Sandell LJ. Cell biology of osteoarthritis: the chondrocyte's response to injury. *Curr Rheumatol Rep* 2001; 3: 496-505.
- [15] Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 2001; 3: 107-13.
- [16] Tallheden T, Bengtsson C, Brantsing C, *et al.* Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R560-8.

- [17] Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 815-20.
- [18] Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403.
- [19] Gronthos S, Simmons PJ. The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J Hematother* 1996; 5: 15-23.
- [20] 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: 315-7.
- [21] Pittenger M, Vanguri P, Simonetti D, Young R. Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002; 2: 309-20.
- [22] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, *et al.* Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1999; 103: 697-705.
- [23] Phinney DG, Isakova I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 1255-65.
- [24] Tropel P, Platet N, Platel JC, *et al.* Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 2868-76.
- [25] Bhatia R, Hare JM. Mesenchymal stem cells: future source for reparative medicine. *Congest Heart Fail* 2005; 11: 87-91; quiz 92-83.
- [26] Noel D, Djouad F, Bouffi C, Mrugala D, Jorgensen C. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leuk Lymphoma* 2007; 48: 1283-9.
- [27] Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98: 2615-25.
- [28] D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 2004; 117: 2971-81.
- [29] Grimaud E, Heymann D, Redini F. Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 241-57.
- [30] Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998; 4: 415-28.
- [31] Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998; 238: 265-72.
- [32] Facchini A, Lisignoli G, Cristino S, *et al.* Human chondrocytes and mesenchymal stem cells grown onto engineered scaffold. *Biorheology* 2006; 43: 471-80.
- [33] Park JS, Woo DG, Yang HN, Lim HJ, Chung HM, Park KH. Heparin-bound transforming growth factor-beta3 enhances neocartilage formation by rabbit mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2008; 85: 589-96.
- [34] Fan H, Hu Y, Li X, *et al.* Ectopic cartilage formation induced by mesenchymal stem cells on porous gelatin-chondroitin-hyaluronate scaffold containing microspheres loaded with TGF-beta1. *Int J Artif Organs* 2006; 29: 602-11.
- [35] Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Stimulation of articular cartilage repair in established arthritis by local administration of transforming growth factor-beta into murine knee joints. *Lab Invest* 1998; 78: 133-42.
- [36] van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB. Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest* 1994; 71: 279-90.
- [37] Blaney Davidson EN, Vitters EL, van Beuningen HM, van de Loo FA, van den Berg WB, van der Kraan PM. Resemblance of osteophytes in experimental osteoarthritis to transforming growth factor beta-induced osteophytes: limited role of bone morphogenetic protein in early osteoarthritic osteophyte formation. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 4065-73.
- [38] Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22: 233-41.
- [39] Majumdar MK, Wang E, Morris EA. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol* 2001; 189: 275-84.
- [40] Gruber R, Mayer C, Bobacz K, *et al.* Effects of cartilage-derived morphogenetic proteins and osteogenic protein-1 on osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells. *Endocrinology* 2001; 142: 2087-94.
- [41] Jorgensen C, Gordeladze J, Noel D. Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 406-10.
- [42] Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on *in vitro* cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 2005; 320: 269-76.
- [43] Grunder T, Gaissmaier C, Fritz J, *et al.* Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 559-67.
- [44] Kuo AC, Rodrigo JJ, Reddi AH, Curtiss S, Grotkopp E, Chiu M. Microfracture and bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) synergistically stimulate articular cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14: 1126-35.
- [45] Kuroda R, Usas A, Kubo S, *et al.* Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 433-42.
- [46] Gelse K, Muhle C, Franke O, *et al.* Cell-based resurfacing of large cartilage defects: long-term evaluation of grafts from autologous transgene-activated periosteal cells in a porcine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 475-88.
- [47] Noel D, Gazit D, Bouquet C, *et al.* Short-term BMP-2 expression is sufficient for *in vivo* osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 74-85.
- [48] Hannallah D, Peng H, Young B, Usas A, Gearhart B, Huard J. Retroviral delivery of Noggin inhibits the formation of heterotopic ossification induced by BMP-4, demineralized bone matrix, and trauma in an animal model. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86-A: 80-91.
- [49] Peng H, Usas A, Hannallah D, Olshanski A, Cooper GM, Huard J. Noggin improves bone healing elicited by muscle stem cells expressing inducible BMP4. *Mol Ther* 2005; 12: 239-46.
- [50] Kikuchi A, Yamamoto H, Kishida S. Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell Signal* 2007; 19: 659-71.
- [51] Macsai CE, Foster BK, Xian CJ. Roles of Wnt signalling in bone growth, remodelling, skeletal disorders and fracture repair. *J Cell Physiol* 2008; 215: 578-87.
- [52] Church V, Nohno T, Linker C, Marcelle C, Francis-West P. Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J Cell Sci* 2002; 115: 4809-18.
- [53] Rudnicki JA, Brown AM. Inhibition of chondrogenesis by Wnt gene expression *in vivo* and *in vitro*. *Dev Biol* 1997; 185: 104-18.
- [54] Andrade AC, Nilsson O, Barnes KM, Baron J. Wnt gene expression in the post-natal growth plate: regulation with chondrocyte differentiation. *Bone* 2007; 40: 1361-9.
- [55] Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 2005; 8: 739-50.
- [56] Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 2005; 8: 727-38.
- [57] Chen Y, Whetstone HC, Youn A, *et al.* Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation. *J Biol Chem* 2007; 282: 526-33.
- [58] Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001; 2: REVIEWS3005.
- [59] Liu Z, Xu J, Colvin JS, Ornitz DM. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev* 2002; 16: 859-69.
- [60] Ornitz DM. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16: 205-13.
- [61] Hoffmann A, Czichos S, Kaps C, *et al.* The T-box transcription factor Brachyury mediates cartilage development in mesenchymal stem cell line C3H10T1/2. *J Cell Sci* 2002; 115: 769-81.

- [62] Davidson D, Blanc A, Filion D, *et al.* Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals through FGF receptor 3 to promote chondrogenesis. *J Biol Chem* 2005; 280: 20509-15.
- [63] Weizmann S, Tong A, Reich A, Genina O, Yayon A, Monsonego-Ornan E. FGF upregulates osteopontin in epiphyseal growth plate chondrocytes: implications for endochondral ossification. *Matrix Biol* 2005; 24: 520-9.
- [64] Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2005; 203: 398-409.
- [65] Stewart AA, Byron CR, Pondenis H, Stewart MC. Effect of fibroblast growth factor-2 on equine mesenchymal stem cell monolayer expansion and chondrogenesis. *Am J Vet Res* 2007; 68: 941-5.
- [66] Takafuji H, Suzuki T, Okubo Y, Fujimura K, Bessho K. Regeneration of articular cartilage defects in the temporomandibular joint of rabbits by fibroblast growth factor-2: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007; 36: 934-7.
- [67] Ishii I, Mizuta H, Sei A, Hirose J, Kudo S, Hiraki Y. Healing of full-thickness defects of the articular cartilage in rabbits using fibroblast growth factor-2 and a fibrin sealant. *J Bone Joint Surg Br* 2007; 89: 693-700.
- [68] Moore EE, Bendele AM, Thompson DL, *et al.* Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 623-31.
- [69] Dupont J, Holzenberger M. Biology of insulin-like growth factors in development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003; 69: 257-71.
- [70] Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 1996; 335: 1363-7.
- [71] Davies LC, Blain EJ, Gilbert SJ, Caterson B, Duance VC. The potential of IGF-1 and TGFbeta1 for promoting "adult" articular cartilage repair: An *In vitro* Study. *Tissue Eng Part A* 2008.
- [72] Yoon DM, Fisher JP. Effects of exogenous IGF-1 delivery on the early expression of IGF-1 signaling molecules by alginate embedded chondrocytes. *Tissue Eng Part A* 2008; 14: 1263-73.
- [73] Uebersax L, Merkle HP, Meinel L. Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Control Release* 2008; 127: 12-21.
- [74] Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on *in vivo* cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14: 403-12.
- [75] Long F, Zhang XM, Karp S, Yang Y, McMahon AP. Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development* 2001; 128: 5099-108.
- [76] Ehlen HW, Buelens LA, Vorkamp A. Hedgehog signaling in skeletal development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2006; 78: 267-79.
- [77] Warzecha J, Gottig S, Bruning C, Lindhorst E, Arabmothlagh M, Kurth A. Sonic hedgehog protein promotes proliferation and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro*. *J Orthop Sci* 2006; 11: 491-6.
- [78] Fontaine C, Cousin W, Plaisant M, Dani C, Peraldi P. Hedgehog signaling alters adipocyte maturation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008; 26: 1037-46.
- [79] Edwards PC, Ruggiero S, Fantasia J, *et al.* Sonic hedgehog gene-enhanced tissue engineering for bone regeneration. *Gene Ther* 2005; 12: 75-86.
- [80] Nestic D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 300-22.
- [81] Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003; 24: 4337-51.
- [82] Lubiatowski P, Kruczynski J, Grady A, Trzeciak T, Jaroszewski J. Articular cartilage repair by means of biodegradable scaffolds. *Transplant Proc* 2006; 38: 320-2.
- [83] Wakitani S, Goto T, Young RG, Mansour JM, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng* 1998; 4: 429-44.
- [84] Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Spector M. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *J Orthop Res* 2003; 21: 272-81.
- [85] Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, *et al.* Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 579-92.
- [86] McCoy JP, Jr., Schade WJ, Siegle RJ, Waldinger TP, Vanderveen EE, Swanson NA. Characterization of the humoral immune response to bovine collagen implants. *Arch Dermatol* 1985; 121: 990-4.
- [87] Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 2002; 84: 571-8.
- [88] Schneider U, Andereya S. First results of a prospective randomized clinical trial on traditional chondrocyte transplantation vs CaReS-Technology. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2003; 141: 496-7.
- [89] Sims CD, Butler PE, Cao YL, *et al.* Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast Reconstr Surg* 1998; 101: 1580-5.
- [90] Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 432-63.
- [91] Fussenegger M, Meinhart J, Hobling W, Kullich W, Funk S, Bernatzky G. Stabilized autologous fibrin-chondrocyte constructs for cartilage repair *in vivo*. *Ann Plast Surg* 2003; 51: 493-8.
- [92] Peretti GM, Randolph MA, Villa MT, Buragas MS, Yaremchuk MJ. Cell-based tissue-engineered allogeneic implant for cartilage repair. *Tissue Eng* 2000; 6: 567-76.
- [93] van Susante JL, Buma P, Schuman L, Homminga GN, van den Berg WB, Veth RP. Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. *Biomaterials* 1999; 20: 1167-75.
- [94] Vinatier C, Gauthier O, Masson M, *et al.* Nasal chondrocytes and fibrin sealant for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2009; 89: 176-85.
- [95] Hendrickson DA, Nixon AJ, Grande DA, *et al.* Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J Orthop Res* 1994; 12: 485-97.
- [96] Wilke MM, Nydam DV, Nixon AJ. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J Orthop Res* 2007; 25: 913-25.
- [97] Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med* 2002; 30: 2-12.
- [98] Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2004; 25: 3211-22.
- [99] Diduch DR, Jordan LC, Mierisch CM, Balian G. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy* 2000; 16: 571-7.
- [100] Rahfoth B, Weisser J, Sternkopf F, Aigner T, von der Mark K, Brauer R. Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6: 50-65.
- [101] Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, *et al.* Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res* 1994; 212: 97-104.
- [102] Carossino AM, Recenti R, Carossino R, *et al.* Methodological models for *in vitro* amplification and maintenance of human articular chondrocytes from elderly patients. *Biogerontology* 2007.
- [103] Almqvist KF, Wang L, Wang J, *et al.* Culture of chondrocytes in alginate surrounded by fibrin gel: characteristics of the cells over a period of eight weeks. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 781-90.
- [104] Erickson GR, Gimble 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* 2002; 290: 763-9.
- [105] Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, *et al.* Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials* 2000; 21: 795-801.

- [106] Mierisch CM, Wilson HA, Turner MA, *et al.* Chondrocyte transplantation into articular cartilage defects with use of calcium alginate: the fate of the cells. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A: 1757-67.
- [107] Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Schloo BL, Vacanti JP, Vacanti CA. De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs. *Plast Reconstr Surg* 1996; 97: 168-178; discussion 179-80.
- [108] Selmi TA, Verdonk P, Chambat P, *et al.* Autologous chondrocyte implantation in a novel alginate-agarose hydrogel: outcome at two years. *J Bone Joint Surg Br* 2008; 90: 597-604.
- [109] Knudson W, Casey B, Nishida Y, Eger W, Kuettner KE, Knudson CB. Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1165-74.
- [110] Tognana E, Padera RF, Chen F, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Development and remodeling of engineered cartilage-explant composites *in vitro* and *in vivo*. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 896-905.
- [111] Goa KL, Benfield P. Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs* 1994; 47: 536-66.
- [112] Bulpitt P, Aeschlimann D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *J Biomed Mater Res* 1999; 47: 152-69.
- [113] Chang CH, Liu HC, Lin CC, Chou CH, Lin FH. Gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24: 4853-8.
- [114] Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D, *et al.* Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res* 2005; (435): 96-105.
- [115] Montebault A, Tahiri K, Korwin-Zmijowska C, Chevalier X, Corvol MT, Domard A. A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering. *Biochimie* 2006; 88: 551-64.
- [116] Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 2005; 26: 5983-90.
- [117] Hoemann CD, Sun J, Legare A, McKee MD, Buschmann MD. Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 318-29.
- [118] Muller FA, Muller L, Hofmann I, Greil P, Wenzel MM, Staudenmaier R. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27: 3955-63.
- [119] Martson M, Viljanto J, Laipala P, Saukko P. Connective tissue formation in subcutaneous cellulose sponge implants in the rat. The effect of the size and cellulose content of the implant. *Eur Surg Res* 1998; 30: 419-25.
- [120] Andrews GP, Gorman SP, Jones DS. Rheological characterisation of primary and binary interactive bioadhesive gels composed of cellulose derivatives designed as ophthalmic viscosurgical devices. *Biomaterials* 2005; 26: 571-80.
- [121] Vinatier C, Gauthier O, Fatimi A, *et al.* An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnol Bioeng* 2009; 102: 1259-67.
- [122] Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, *et al.* Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 1996; 33: 57-63.
- [123] Spain TL, Agrawal CM, Athanasiou KA. New technique to extend the useful life of a biodegradable cartilage implant. *Tissue Eng* 1998; 4: 343-52.
- [124] Galois L, Freyria AM, Herbage D, Mainard D. [Cartilage tissue engineering: state-of-the-art and future approaches]. *Pathol Biol (Paris)* 2005; 53: 590-8.
- [125] Wang X, Grogan SP, Rieser F, *et al.* Tissue engineering of biphasic cartilage constructs using various biodegradable scaffolds: an *in vitro* study. *Biomaterials* 2004; 25: 3681-8.
- [126] Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Langer R. Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors. *J Cell Biochem* 1993; 51: 257-64.
- [127] Freed LE, Grande DA, Lingbin Z, Emmanuel J, Marquis JC, Langer R. Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1994; 28: 891-9.
- [128] Ossendorf C, Kaps C, Kreuz PC, Burmester GR, Sittinger M, Erggelet C. Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: Two year clinical results. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: R41.
- [129] Carranza-Bencano A, Armas-Padron JR, Gili-Miner M, Lozano MA. Carbon fiber implants in osteochondral defects of the rabbit patella. *Biomaterials* 2000; 21: 2171-6.
- [130] Messner K. Hydroxylapatite supported Dacron plugs for repair of isolated full-thickness osteochondral defects of the rabbit femoral condyle: mechanical and histological evaluations from 6-48 weeks. *J Biomed Mater Res* 1993; 27: 1527-32.
- [131] Messner K. Durability of artificial implants for repair of osteochondral defects of the medial femoral condyle in rabbits. *Biomaterials* 1994; 15: 657-64.
- [132] Defrere J, Franckart A. Teflon/polyurethane arthroplasty of the knee: the first 2 years preliminary clinical experience in a new concept of artificial resurfacing of full thickness cartilage lesions of the knee. *Acta Chir Belg* 1992; 92: 217-27.
- [133] Sontjens SH, Nettles DL, Carnahan MA, Setton LA, Grinstaff MW. Biodendrimer-based hydrogel scaffolds for cartilage tissue repair. *Biomacromolecules* 2006; 7: 310-6.
- [134] Wallace DG, Rosenblatt J. Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 1631-49.
- [135] Temenoff JS, Mikos AG. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21: 2405-12.
- [136] Kim IY, Seo SJ, Moon HS, *et al.* Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv* 2008; 26: 1-21.
- [137] Vinatier C, Magne D, Moreau A, *et al.* Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methyl-cellulose hydrogel. *J Biomed Mater Res A* 2007; 80: 66-74.
- [138] Insall J. The Pridie debridement operation for osteoarthritis of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 1974; 61-7.
- [139] Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ. [The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]. *Orthopade* 1999; 28: 26-32.
- [140] Hangody L, Kish G, Karpati Z, Szerb I, Udvarhelyi I. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1997; 5: 262-7.
- [141] 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.
- [142] Magnussen RA, Dunn WR, Carey JL, Spindler KP. Treatment of focal articular cartilage defects in the knee: a systematic review. *Clin Orthop Relat Res* 2008; 466: 952-62.
- [143] Cherubino P, Grassi FA, Bulgheroni P, Ronga M. Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2003; 11: 10-5.
- [144] Wakitani S, Kawaguchi A, Tokuhara Y, Takaoka K. Present status of and future direction for articular cartilage repair. *J Bone Miner Metab* 2008; 26: 115-22.
- [145] Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 199-206.
- [146] Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D. Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician* 2008; 11: 343-53.
- [147] Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1: 74-9.
- [148] Bradham DM, Passaniti A, Horton WE, Jr. Mesenchymal cell chondrogenesis is stimulated by basement membrane matrix and inhibited by age-associated factors. *Matrix Biol* 1995; 14: 561-71.
- [149] Bulic K. Articular chondrocytes interact with basement membrane Matrigel through laminin active binding sites. *Acta Med Croatica* 1996; 50: 69-74.

- [150] Fan H, Hu Y, Li X, *et al.* Ectopic cartilage formation induced by mesenchymal stem cells on porous gelatin-chondroitin-hyaluronate scaffold containing microspheres loaded with TGF-beta1. *Int J Artif Organs* 2006; 29: 602-11.
- [151] Pulkkinen H, Tiiu V, Lammentausta E, *et al.* Cellulose sponge as a scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomed Mater Eng* 2006; 16: S29-35.
- [152] Douchis JS, Bae WC, Chen AC, Sah RL, Coutts RD, Amiel D. Cartilage repair with autogenic perichondrium cell and polylactic acid grafts. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 248-64.
- [153] Yan J, Qi N, Zhang Q. Rabbit articular chondrocytes seeded on collagen-chitosan-GAG scaffold for cartilage tissue engineering *in vivo*. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007; 35: 333-44.
- [154] Grad S, Kupcsik L, Gorna K, Gogolewski S, Alini M. The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. *Biomaterials* 2003; 24: 5163-71.
- [155] Kose GT, Korkusuz F, Ozkul A, *et al.* Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials* 2005; 26: 5187-5197.
- [156] Estrada LE, Dodge GR, Richardson DW, Farole A, Jimenez SA. Characterization of a biomaterial with cartilage-like properties expressing type X collagen generated *in vitro* using neonatal porcine articular and growth plate chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9: 169-77.
- [157] Barbucci R, Lamponi S, Borzacchiello A, *et al.* Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials* 2002; 23: 4503-13.
- [158] Liao E, Yaszemski M, Krebsbach P, Hollister S. Tissue-engineered cartilage constructs using composite hyaluronic acid/collagen I hydrogels and designed poly(propylene fumarate) scaffolds. *Tissue Eng* 2007; 13: 537-50.
- [159] Sharma B, Williams CG, Khan M, Manson P, Elisseeff JH. *In vivo* chondrogenesis of mesenchymal stem cells in a photopolymerized hydrogel. *Plast Reconstr Surg* 2007; 119: 112-20.
- [160] Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Rowley JA, Mooney DJ. Engineering growing tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12025-30.
- [161] Atala A, Cima LG, Kim W, *et al.* Injectable alginate seeded with chondrocytes as a potential treatment for vesicoureteral reflux. *J Urol* 1993; 150: 745-7.
- [162] Elisseeff JH, Lee A, Kleinman HK, Yamada Y. Biological response of chondrocytes to hydrogels. *Ann NY Acad Sci* 2002; 961: 118-22.
- [163] Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 2000; 21: 2589-98.
- [164] van Susante JLC, Pieper J, Buma P, *et al.* Linkage of chondroitin-sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes *in vitro*. *Biomaterials* 2001; 22: 2359-69.
- [165] Taguchi T, Xu L, Kobayashi H, Taniguchi A, Kataoka K, Tanaka J. Encapsulation of chondrocytes in injectable alkali-treated collagen gels prepared using poly(ethylene glycol)-based 4-armed star polymer. *Biomaterials* 2005; 26: 1247-52.
- [166] Mercier NR, Costantino HR, Tracy MA, Bonassar LJ. A novel injectable approach for cartilage formation *in vivo* using PLG microspheres. *Ann Biomed Eng* 2004; 32: 418-29.
- [167] Mercier NR, Costantino HR, Tracy MA, Bonassar LJ. Poly(lactide-co-glycolide) microspheres as a moldable scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26: 1945-52.
- [168] Elisseeff J, Anseth K, Sims D, *et al.* Transdermal photopolymerization of poly(ethylene oxide)-based injectable hydrogels for tissue-engineered cartilage. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104: 1014-22.
- [169] Elisseeff J, McIntosh W, Anseth K, Riley S, Ragan P, Langer R. Photoencapsulation of chondrocytes in poly(ethylene oxide)-based semi-interpenetrating networks. *J Biomed Mater Res* 2000; 51: 164-71.
- [170] Kim TK, Sharma B, Williams CG, *et al.* Experimental model for cartilage tissue engineering to regenerate the zonal organization of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11: 653-64.
- [171] Burdick JA, Anseth KS. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2002; 23: 4315-23.

3.3 - Les cellules réparatrices

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

3.3.1 - Le chondrocyte

Les chondrocytes sont *a priori* les cellules de choix pour l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. Des chondrocytes adultes possédant la capacité de former une MEC ont été isolés à partir de différentes sources comme le cartilage articulaire, le septum nasal, les cartilages des côtes et le cartilage auriculaire [5, 6]. Cependant les chondrocytes auriculaires sont issus d'un cartilage de type élastique, qui ne présente pas les propriétés mécaniques du cartilage hyalin (articulation, septum nasal). Une étude a comparé la capacité des chondrocytes, de différents sites anatomiques, à former un tissu cartilagineux *in vitro* et *in vivo* [6]. Cette étude révèle que chaque type de chondrocytes forme un tissu présentant les caractéristiques de son tissu d'origine. Dans l'optique d'une application à la réparation du cartilage articulaire, il faudra donc préférer un prélèvement de cartilage hyalin comme source de chondrocytes. La comparaison rapportée aux chondrocytes hyalins (nasaux, costaux, et articulaires) montre une supériorité des chondrocytes costaux et nasaux sur les chondrocytes articulaires en termes de quantité de cartilage formé en sites sous-cutanés [5, 6]. Cependant une des limites importantes à l'utilisation des chondrocytes, quelle que soit leur origine, est relative à l'instabilité de leur phénotype en culture monocouche. Cela se traduit par une perte de l'expression des marqueurs du phénotype chondrocytaire que sont le collagène II et l'agrécan principalement, mais également de la SZP [464]. Cette perte du phénotype chondrocytaire s'accompagne de l'orientation des cellules vers un phénotype fibroblastique. L'acquisition de ce phénotype fibroblastique est caractérisée par une augmentation de l'expression du collagène I et l'adoption d'une forme en fuseau caractéristique des fibroblastes [4]. Ce processus de dédifférenciation est néanmoins réversible. En effet, si des chondrocytes dédifférenciés sont replacés dans un environnement tridimensionnel, ils réacquièrent leur phénotype différencié [465-467]. L'utilisation des chondrocytes se heurte donc à certaines limites en termes de quantité de prélèvement, de difficulté du maintien de leur phénotype en culture et de morbidité au niveau du site de prélèvement.

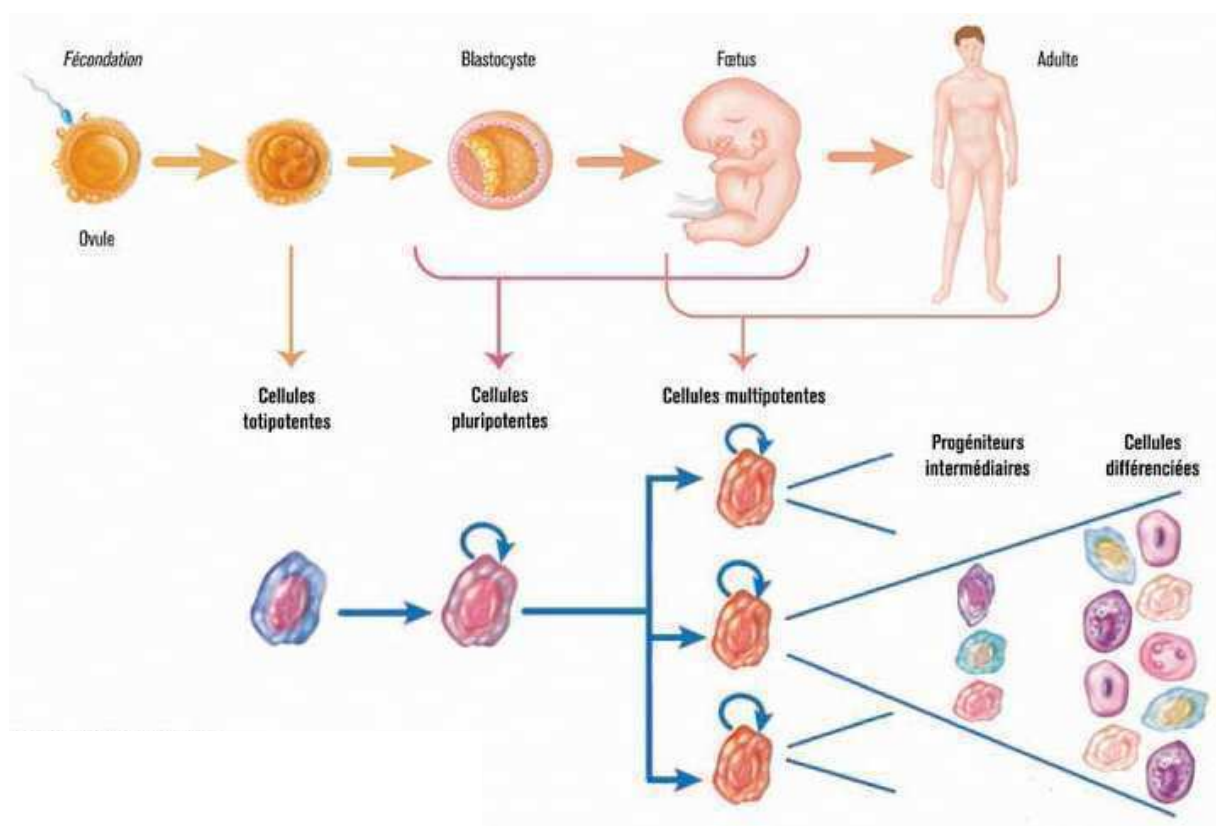


Figure 17 : Degré de potentialité des cellules souches au cours du développement.
 D'après INSERM cellules souches, thérapies du futur, collection Repères.

3.3.2 - Les cellules souches

3.3.2.1 - Définitions et généralités

Le concept de cellule souche comprend la capacité d'une cellule indifférenciée à proliférer en s'auto-renouvelant à l'identique de manière quasi-infinie, ainsi que la propriété de se différencier en au moins un type cellulaire [468]. De par leurs propriétés, les cellules souches participent au développement de l'organisme (cellules souches embryonnaires) et au maintien de l'homéostasie cellulaire au niveau, d'un organe ou d'un tissu (cellules souches adultes). Actuellement 2 hypothèses ont cours pour expliquer le phénomène d'auto-renouvellement/différenciation. La première repose sur la répllication asymétrique, une cellule-mère donnerait 2 cellules-filles différentes, l'une identique à la cellule-mère afin d'assurer le maintien de la population de cellules souches initiale et l'autre ayant un potentiel progéniteur qui serait à l'origine de la différenciation et de la constitution des tissus [469]. Cette division asymétrique implique, lors de la mitose, que certaines protéines et ARNm migrent préférentiellement à un pôle de la cellule [470]. La seconde hypothèse, appelée différenciation stochastique, est basée sur le fait qu'une cellule-mère donne 2 cellules-filles identiques par division symétrique et que ces 2 cellules-filles soient 2 cellules souches ou 2 cellules progénitrices avec la même probabilité.

Les cellules souches, de par leurs propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation représentent donc une alternative intéressante aux chondrocytes.

Il existe plusieurs types de cellules souches identifiés selon leur potentiel de différenciation (totipotence, pluripotence, multipotence, unipotence) et leur origine (Figure 17).

3.3.2.1.1 - Les cellules souches totipotentes

Les cellules souches totipotentes (ou omnipotentes) sont définies par leur capacité à donner un organisme viable au complet. Elles ont donc par conséquent, la propriété de se différencier en tous les types cellulaires d'un organisme issus des feuilletts endodermique, mésodermique et ectodermique, ainsi que de former les annexes embryonnaires (vésicule vitelline, amnios, membrane séreuse, allantoïde, chorion, cordon ombilical). Ces cellules ne sont observées dans un organisme qu'au stade de zygote (œuf fécondé) jusqu'au stade morula (8-16 cellules) soit pendant les quatre premiers jours après la fécondation chez l'homme. Les cellules souches totipotentes, de par leur difficulté d'obtention et les problèmes éthiques liés à leur utilisation représentent une source de cellules difficilement exploitable en ingénierie tissulaire [471, 472].

3.3.2.1.2 - Les cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes ont la capacité de se différencier en tous les types cellulaires d'un organisme issus des 3 feuillets embryonnaires à l'exception des annexes embryonnaires [473]. Cette propriété est le propre des cellules souches embryonnaires (ou cellules ES : embryonic stem cells). Ces cellules sont présentes au niveau de la masse interne du blastocyste à partir du 5^{ème} jusqu'au 7^{ème} jour après fécondation. Il existe également des cellules souches pluripotentes à des stades beaucoup plus tardifs (5-9 semaines de développement) il s'agit des cellules souches fœtales. Elles peuvent être isolées à partir de fœtus surnuméraires ou résultant d'une interruption volontaire de grossesse. Deux classes peuvent être distinguées : les cellules souches fœtales somatiques [474, 475] et les cellules souches fœtales de la lignée germinale dites cellules EG (Embryonic Germ cells) [476]. Ces dernières ont la particularité d'être déjà orientées [477] vers un type cellulaire particulier, cependant elles restent pluripotentes et ont la même capacité de prolifération que les cellules ES. Récemment, des cellules souches pluripotentes ont été obtenues de manière artificielle par reprogrammation de cellules somatiques, elles sont appelées cellules pluripotentes induites (ou iPS : induced pluripotent stem cells). Cette reprogrammation consiste en l'expression forcée de facteurs de transcription tels que Oct3/4, Sox2, Myc-C, Klf-4, Nanog et Lin 28 [478-480].

3.3.2.1.3 - Les cellules souches multipotentes

Les cellules souches multipotentes sont présentes dans l'embryon ainsi que dans l'organisme adulte, elles sont d'ailleurs également appelées cellules souches adultes. Bien qu'elles soient engagées dans une certaine spécialisation, elles possèdent une capacité de prolifération et d'auto-renouvellement qui reste toutefois plus restreinte que celle des cellules ES. Elles sont définies par la capacité à se différencier vers tous les types cellulaires du feuillet embryonnaire dont elles sont issues. Les cellules souches adultes sont présentes à l'état indifférencié au sein de la plupart des tissus et assurent l'homéostasie des organes et tissus tout au long de la vie de l'individu [481]. Plusieurs types de cellules souches répondant à cette définition ont été identifiés chez l'homme :

- Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) présentes au sein de la moelle osseuse sont à l'origine de la production de toutes les cellules sanguines : granulocytes, monocytes, macrophages, lymphocytes, érythrocytes, mégacaryocytes ainsi que certaines structures vasculaires [482].

- Les cellules souches mésenchymateuses (CSM), initialement isolées à partir de la moelle osseuse dans les années 60-70 [483-486], sont capables de s'engager vers au moins 3 voies de différenciation distinctes dont l'adipogenèse, l'ostéogenèse et la chondrogenèse. Depuis, de nombreux tissus ont été identifiés comme sources potentielles de CSM.
- Les cellules souches neurales (CSN) ont été isolées à partir de la zone sous-ventriculaire du 4^e ventricule et du gyrus denté de l'hippocampe. Ces cellules sont capables de se différencier en neurones, ainsi qu'en cellules du système nerveux comme les astrocytes et les oligodendrocytes [487-489].
- Les cellules souches musculaires sont présentes au niveau de l'espace situé entre la membrane basale et le sarcolemme de la fibre musculaire, d'où leur nom de cellules satellites [490-492].
- Les cellules souches de la peau se trouvent à la base du muscle pilo-érecteur et peuvent se différencier en kératinocytes [493, 494].
- Les cellules souches de l'épithélium intestinal sont présentes au niveau des cryptes intestinales et sont capables de redonner des villosités complètes [495].
- Les cellules souches hépatobiliaires, ou cellules ovales, isolées à partir des canaux de Héring sont capables de se différencier en hépatocytes [496].
- Les cellules souches du cartilage ont été démontrées comme capables de se différencier vers les lignages adipocytaire, ostéoblastique et chondrogénique [497, 498]

3.3.2.1.4 - Les cellules souches unipotentes

Les cellules souches unipotentes sont des cellules capables d'auto-renouvellement, tout comme les cellules souches multipotentes, mais qui ne peuvent générer qu'un seul type cellulaire. Les cellules souches unipotentes comme les précurseurs ou progéniteurs des kératinocytes ou des mélanocytes.

3.3.2.2 - La notion de niche des cellules souches

La notion de niche fait référence au microenvironnement des cellules souches et implique que celles-ci résident dans des compartiments fixes, lesquels sont favorables au maintien de leurs propriétés. Ces niches ne sont pas constituées uniquement des cellules souches proprement dites, mais aussi d'autres types cellulaires qui participent au maintien d'un environnement

propice à la survie, l'auto-renouvellement et à la conservation d'un état indifférencié des cellules souches. Une niche est donc définie d'une part par les interactions entre les cellules souches et les cellules de soutien qui produisent des signaux spécifiques et d'autre part, par le contexte tissulaire mettant en jeu des paramètres de contraintes physiques, d'oxygénation, de nutrition..., lui conférant une dimension anatomique et fonctionnelle précise [499-501].

Les niches ont la capacité à fournir des signaux appropriés aux cellules souches afin d'assurer l'homéostasie d'un organe ou tissu en régulant le renouvellement et la différenciation cellulaire en conditions physiologiques ou pathologiques [499]. En effet, certains "tissus" comme la peau, l'épithélium intestinal ou le sang sont en renouvellement constant du fait de la durée de vie limitée des cellules qui les constituent. Dans ces conditions, la niche fournit des signaux permettant de conserver un équilibre entre auto-renouvellement et différenciation afin d'assurer la production de cellules spécialisées sans pour autant épuiser le stock de cellules souches. A l'inverse, dans d'autres tissus, tels que les muscles squelettiques, l'os ou le cartilage, les cellules différenciées possèdent une grande longévité. Leur remplacement est dans la plupart des cas dû à une situation pathologique ou traumatique. Dans ce type de situation, la niche doit fournir un environnement inhibant la différenciation des cellules souches en conditions physiologiques tout en maintenant leur sensibilité à des signaux morphogènes dans l'éventualité de leur mobilisation sur un site lésé [500].

Les différentes niches sont donc, pour les cellules souches, des entités anatomiques dynamiques leur apportant un environnement typique de par leur structure, les types cellulaires qui les composent, les signaux régulant la balance auto-renouvellement/différenciation [502].

Il a également été décrit que le nombre de CSM au sein d'une niche n'était pas constant dans le temps, mais inversement proportionnel à l'âge. En effet, leur nombre se réduit au cours du vieillissement (reste environ 50% du stock initial de CSM de la moelle osseuse à 80 ans) [503].

3.3.2.3 - Les cellules souches mésenchymateuses

Le terme de CSM désigne généralement les cellules souches mésenchymateuses adultes bien que cette appellation reste parfois controversée. Initialement, le terme de CSM désignait des cellules stromales de la moelle (marrow stromal cells) identifiées dans les années 60-70, par Friedenstein *et al.*, à partir de moelle osseuse, de thymus et de poumon comme étant capables de former des colonies de cellules d'aspect fibroblastique (CFU-F : colony-forming unit-

Tableau III : Expression des marqueurs de surface de CSM humaines isolées à partir de différents tissus. D'après [477, 512-519]

Antigène	Moelle osseuse	Synoviale	Périoste	Muscle squelettique	Tissu adipeux	Fat Pad
CD10 (CALLA: common acute lymphocytic leukemia antigen, neutral endopeptidase)	+	+	++	+	++	+/-
CD13 (APN: Aminopeptidase N)	++	?	?	?	++	+
CD29 (intégrine sous-unité VLA-b1)	++	?	?	?	++	++
CD44 (HCAM: homing-associated cell adhesion molecule, hyaluronic acid receptor)	++	++	++	++	++	++
CD54 (ICAM-1: intracellular adhesion molecule 1)	+	+	+	+	+	+
CD73 (ecto 5' nucleotidase, SH2 et SH3)	++	?	?	?	++	++
CD90 (Thy-1)	++	++	++	++	++	++
CD105 (SH4, endogline)	++	++	++	++	++	++
CD106 (VCAM: vascular cell adhesion molecule 1)	++	++	+	+	+	+
CD147	++	++	++	++	++	++
CD166 (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule)	++	++	++	+	++	+
CD271 (LNGFR: low-affinity nerve growth factor receptor)	+	+	+	++	+	-
HLA classe I	++	?	?	?	++	?
STRO-1	++	++	++	+	++	?
ASMA (alpha smooth muscle actine)	++	?	?	?	+	?
CD34	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
CD49d (intégrine sous-unité VLA-a4)	-	?	?	?	++	?
CD49e (intégrine sous-unité VLA-a5)	++	?	?	?	?	+/-
CD71 (récepteur à la transferrine)	++	?	?	?	++	?
CD14 (récepteur aux lipopolysaccharides)	-	-	-	-	-	-
CD31 (PECAM-1: platelet endothelial cell adhesion molecule)	-	-	?	?	-	-
CD45 (antigène commun aux leucocytes)	-	-	-	-	-	-
CD117 (Aka c-kit, stem cell factor receptor)	-	-	-	-	-	-
VEGFR2	-	-	++	-	-	-
HLA classe II	-	?	?	?	-	?

fibroblast) et de se différencier vers plusieurs lignages [477, 483-486, 504]. Par la suite, des cellules ayant ces propriétés ont été isolées à partir de nombreux tissus tels que le tissu adipeux, la membrane synoviale, les muscles squelettiques, le derme, le périoste, le périchondre, la gelée de Wharton issue du cordon ombilical, le sang, la pulpe dentaire...

3.3.2.3.1 - Phénotype des cellules souches mésenchymateuses

Les origines diverses de ces cellules souches adultes, l'hétérogénéité des populations, les différentes techniques d'isolement ne permettent pas une caractérisation directe des CSM. En l'absence de marqueurs spécifiques permettant de les isoler et de les distinguer des cellules déjà engagées dans une voie de différenciation, leur caractérisation est essentiellement basée sur un ensemble de propriétés. L'identification d'une cellule souche ne peut donc se faire que de manière rétrospective et indirecte, par la mise en évidence de ses propriétés de prolifération, CFU, expression de marqueurs de surface et capacités de différenciation... En 2006, la Société Internationale pour la Thérapie Cellulaire a défini la CSM comme une cellule devant répondre aux 3 critères suivants [505] :

- Les CSM sont des cellules adhérentes.
- Les CSM expriment les marqueurs de surface CD105, CD73 et CD90 et sont négatives pour CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 et HLA-DR.
- Les CSM sont capables de se différencier en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes.

Ces 3 critères sont les plus largement utilisés par la communauté scientifique, toutefois, plusieurs études ont proposé des caractérisations plus précises des CSM concernant l'expression des marqueurs de surface (Tableau III), la capacité d'autorenouvellement et ont mis en évidence des différences entre les populations de CSM dues à leur origine et/ou technique d'isolement.

3.3.2.3.2- Potentiel de différenciation des CSM

Une des principales caractéristiques des CSM est leur potentiel de différenciation. Par définition, les CSM sont capables, au moins, de se différencier en adipocyte, ostéoblaste et chondrocyte [505]. La chondrogenèse ayant été décrite précédemment (partie 1.4 - La chondrogenèse), ne seront abordées ici que l'adipogenèse et l'ostéogenèse.

L'adipogenèse

L'adipogenèse est le processus séquentiel au cours duquel des CSM se différencient en adipocytes. Ce processus est caractérisé par des phases successives de détermination, de croissance, d'expansion clonale post-mitotique et de différenciation terminale hypertrophique

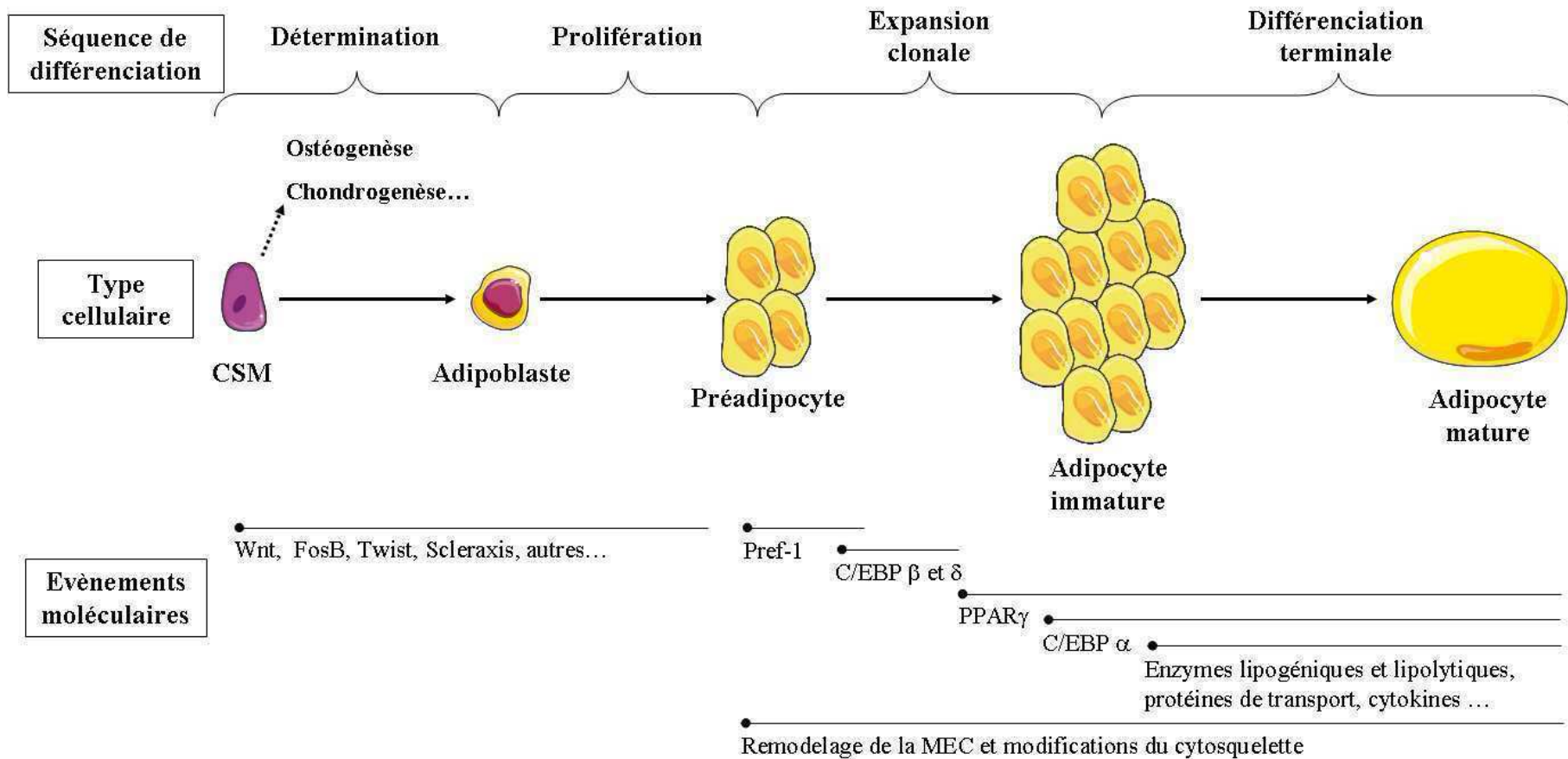


Figure 18 : Représentation schématique du processus de différenciation adipogénique Modifié d'après Grégoire *et al.* et Fonseca-Alaniz *et al.*[514, 522].

(Figure 18) [514]. Tout d'abord, les CSM, pendant la phase de détermination deviennent des adipoblastes sous l'influence de facteurs de croissance encore mal déterminés et l'activation des voies impliquant Twist, Wnt, Fos B et Scleraxis [514, 515]. Cette étape est associée à des modifications de la composition de la MEC. Celle-ci évolue d'une structure riche en fibronectine vers une lame basale essentiellement constituée de laminine, de collagène de type IV, de PG et d'entactine [516]. Ce remodelage matriciel modifie le cytosquelette et provoque l'arrondissement des cellules. Les adipoblastes deviennent ensuite des préadipocytes à l'issue d'une phase de prolifération. Au stade de la confluence, les préadipocytes subissent une phase d'expansion clonale résultant de mitoses clonogéniques. En parallèle à leur prolifération et à leur expansion, les préadipocytes s'engagent dans la différenciation par l'activation transitoire et successive des facteurs de transcription Pref-1 (Preadipocyte factor-1), C/EBP β/δ (CAAT/Enhancer Binding Protein), PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ) et C/EBP α [517-519]. Les activations de PPAR γ et de C/EBP α conduisent respectivement à la maturation des préadipocytes et à l'expression de la protéine de transport des acides gras AFBP/aP2 (Adipocyte Fatty acid Binding Protein), de la leptine [520]. La phase de différenciation terminale permet aux adipocytes d'acquérir la machinerie enzymatique et sécrétoire nécessaires à leur activité métabolique [514, 521]. Les adipocytes matures sont alors capables d'accumuler des lipides dans des compartiments cytoplasmiques appelés vacuoles, essentiellement sous la forme de triglycérides, et de les hydrolyser pour assurer l'essentiel de la production d'énergie nécessaire à l'organisme.

L'ostéogenèse

L'ostéogenèse ou ossification membranaire est le processus par lequel s'élabore le tissu osseux des os plats, par opposition à l'ossification endochondrale responsable de la genèse des os longs. Il est classiquement décrit en 4 étapes qui sont la détermination, la prolifération, la différenciation et la minéralisation (Figure 19). Dans un premier temps, les CSM sont recrutées au niveau de l'ébauche osseuse. Ces cellules indifférenciées prolifèrent et se condensent avant de s'engager vers la voie ostéoblastique. Les pré-ostéoblastes subissent une maturation leur permettant de devenir fonctionnels et d'assurer la synthèse d'une matrice organique et sa minéralisation. Les ostéoblastes sont responsables de la croissance au cours du développement embryonnaire, du renouvellement continu et de la réparation du tissu osseux.

Suite à leur recrutement et à leur prolifération, les CSM se condensent et créent des interactions cellule-cellule et cellule-matrice via l'expression de protéines telles que les intégrines, les connexines ou la N-cadhérine [297, 523]. Ce phénomène de condensation

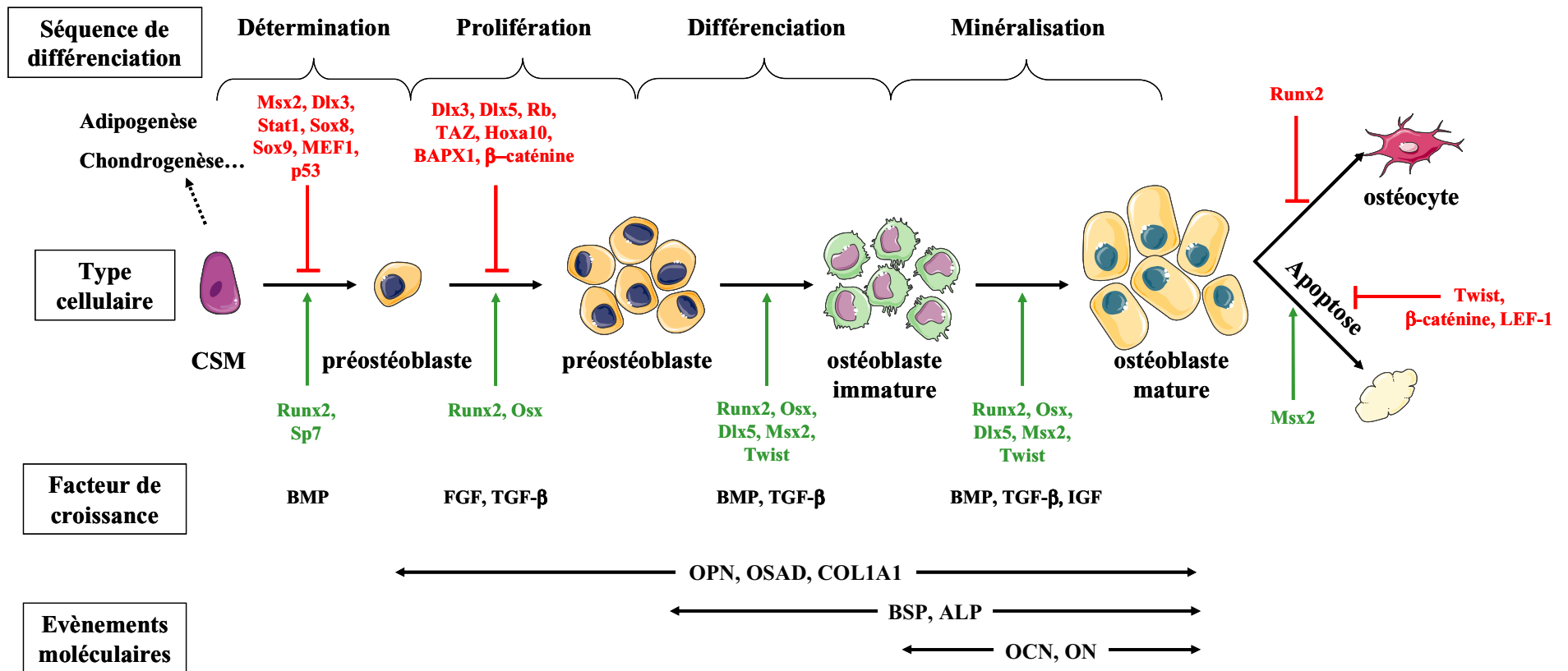


Figure 19 : Représentation schématique du processus de différenciation ostéogénique Modifié d'après Marie *et al.*[534, 535].

induit l'expression locale de facteurs de croissance. Les BMP jouent alors un rôle prépondérant dans l'induction de la différenciation en activant l'expression de facteurs de transcription précoces, notamment Runx2 [524-526]. Runx2 est essentiel dans la différenciation ostéoblastique, une fois activé il permettra de déclencher la transcription de nombreux gènes codant pour des protéines majeures dans la constitution de la matrice organique de l'os comme le collagène de type I, l'ostéopontine (OPN), l'ostéocalcine (OCN) et la sialoprotéine osseuse (BSP) [527, 528].

Passée la phase de détermination, les pré-ostéoblastes prolifèrent sous l'effet de FGF et TGF- β . La synthèse de FGF et l'expression des récepteurs correspondants jouent un rôle majeur tout au long du processus de différenciation ostéogénique. Les FGF-2, 4 et 18 ainsi que les récepteur FGFR-1 et 2 semblent particulièrement impliqués dans le contrôle des voies de signalisation régulant l'ostéogenèse [529]. A ce stade, ces facteurs de croissance, en plus de favoriser la prolifération, stimulent l'expression d'ostérix (OSX), un facteur de transcription essentiel au développement osseux [530]. L'expression d'OSX est sous le contrôle du facteur de transcription Runx2 et permet l'engagement définitif dans la voie ostéogénique, alors que Runx2 à lui seul n'est pas déterminant car il intervient également dans l'engagement vers la différenciation chondrogénique. A l'issue de cette phase de prolifération, les pré-ostéoblastes produisent la phosphatase alcaline (PAL) et l'ostéonectine (ON).

Tout au long de la différenciation ostéogénique, les cellules expriment des protéines de la matrice organique osseuse. Cette MEC est constituée à 90% de collagène de type I, qui est synthétisé précocément dans la différenciation, tout comme l'OPN et l'ostéoadhérine ou ostéomoduline (OMD) dont le rôle est de faciliter l'adhésion des cellules à la matrice [531]. La fonction principale des ostéoblastes étant de minéraliser la matrice osseuse, ces cellules nécessitent un apport important en calcium et en phosphate. Le transport des ions calcium, du milieu extracellulaire, vers le cytoplasme de l'ostéoblaste se fait passivement ou de manière active grâce à des pompes calciques exprimées à la membrane des cellules. Le transport des ions phosphate est également régulé de la même manière. Dans le cas d'un transport actif, le phosphate inorganique Pi est pris en charge par des transporteurs dépendants du sodium, PiT-1 et PiT-2 (type III Pi Transport system) [532, 533]. Le Pi provient de l'hydrolyse par l'ALP de pyrophosphate inorganique. Une fois au sein de l'ostéoblaste, le Pi se lie au calcium pour constituer des cristaux d'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, constituant ainsi la phase minérale de l'os.

En plus de l'adipogenèse, l'ostéogenèse et la chondrogenèse, de récentes études ont démontré la capacité des CSM à s'engager vers la myogenèse [536, 537], ténogenèse [538] ainsi que vers des lignages issus des feuilletts embryonnaires endo- et ectodermiques [539-541], allant ainsi au-delà du concept de multipotence. La notion de CSM doit encore de nos jours être considérée avec précaution. En effet, il n'est pas encore établi qu'une seule cellule ou une population de cellules progénitrices engagées dans des voies de différenciation distinctes ait la capacité de se différencier en chacun des types cellulaires issus du mésoderme. De plus, l'équipe de Verfaillie a décrit une population de cellules souches non-hématopoïétiques isolée à partir de la moelle osseuse nommée dans un premier temps MPC (mesodermal progenitor cells) [542] puis MAPC (multipotent adult progenitor cells). Mais à la différence des CSM, les MAPC lorsqu'elles sont cultivées sous certaines conditions sont capables de donner des cellules appartenant aux 3 feuilletts embryonnaires telles que des cellules musculaires lisses [543], des cellules endothéliales, des hépatocytes et des progéniteurs neuraux [544]. Il a également été démontré que les MAPC expriment de manière significative des facteurs de transcription embryonnaires spécifique de la pluripotence comme Oct-3/4, Rex-1, SSEA-1 [539]. Depuis, des cellules ayant les caractéristiques des MAPC ont été isolées à partir de différentes espèces (homme, rat, souris, porc...) et de différents tissus [545]. Parallèlement aux MAPC, une autre population de cellules souches isolée de la moelle osseuse humaine : les MIAMI (marrow-isolated adult multilineage inducible) a été caractérisée pour sa pluripotence. Cette population a été isolée à partir de moelle osseuse totale et sélectionnée par culture sur fibronectine en condition hypoxique (3% O₂). Ces cellules expriment des marqueurs des cellules souches embryonnaires tels que les facteurs de transcription Oct-4, Rex-1, SSEA-4 et la télomérase. Elles possèdent également la capacité à se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes (lignage mésodermique), en cellules neurales (lignage ectodermique) et en cellules pancréatiques (lignage endodermique) [546, 547]. Les caractéristiques des MAPC et des MIAMI sont actuellement controversées et vont au delà de la définition communément admise des CSM.

3.3.2.3.3 - Plasticité des CSM

Les CSM sont classiquement définies par leurs propriétés de prolifération/auto-renouvellement et de multipotence mises en évidence par la capacité de différenciation spécifique du feuillet embryonnaire à partir duquel les CSM ont été isolées. Mais dernièrement, 2 observations ont donné naissance à la notion de plasticité des cellules souches adultes. D'une part, il a été mis en évidence qu'une population de CSM différenciée en ostéoblaste pouvait conserver un potentiel de différenciation adipogénique et chondrogénique et de manière réciproque, des CSM différenciées en chondrocyte ou adipocyte conservaient des potentiels de différenciation ostéo-adipogénique et ostéo-chondrogénique respectivement [548]. D'autre part, certaines études ont démontré la capacité de CSM à se différencier vers des lignages autres que mésodermiques. En effet, il a été mis en évidence que des CSM isolées à partir de moelle osseuse étaient capables de se différencier en cellules du lignage ectodermique telles que des cellules gliales, des neurones, des astrocytes, des kératinocytes [539, 549-551] et endodermique telles que des hépatocytes, des cholangiocytes, des pneumocytes, des cellules stomacales ou intestinales [539, 552, 553]. Il a été démontré que des souris ou des patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse d'un donneur de sexe différent présentaient des neurones dérivés des cellules souches du donneur [554-556]. De manière similaire, des cellules ovales du foie ont été identifiées comme dérivant du donneur chez des rats ayant subi une greffe de moelle osseuse après irradiation létale [557]. Ces propriétés plastiques ne sont pas sans rappeler celles des MAPC ou des MIAMI.

Malgré le nombre croissant d'études, la notion de plasticité des cellules souches adultes est encore largement débattue en l'absence de définition rigoureuse et de preuve expérimentale irréfutable. Toutefois, 3 critères semblent essentiels à la définition de la plasticité des cellules souches :

- la capacité d'une cellule unique à se différencier en des types cellulaires dérivant de feuillets embryonnaires distincts
- la fonctionnalité des cellules différenciées *in vivo* et *in vitro*
- la persistance de ces caractéristiques au cours du temps [558].

Cependant, en l'absence d'outils permettant l'identification d'une population de cellules souche pure et devant le peu de connaissances relatives aux mécanismes impliqués dans la plasticité, il reste difficile de réaliser les manipulations permettant de prouver la pluripotence d'une cellule adulte unique, à moins de travailler à l'échelon clonal. Différentes hypothèses,

en plus de la pluripotence, ont malgré tout été émises quant à la nature des mécanismes pouvant être à l'origine de ce phénomène.

Tout d'abord, l'hétérogénéité de la population de cellules souches isolée a été une des premières hypothèses formulées pour expliquer l'apparente plasticité des cellules souches. Il existe, en effet, de multiples protocoles d'isolement de cellules souches plus ou moins stringents vis-à-vis du degré de pureté de la population cellulaire obtenue. Il n'est alors pas impossible que la plasticité observée des cellules souches soit due à la présence d'au moins 2 sous populations différentes de cellules souches, comme cela a été démontré par la présence de cellules souches d'origine hématopoïétique dans le muscle [559] ou par la présence de précurseurs hépatiques dans la moelle osseuse [560]. Cependant, certaines équipes par des techniques d'identification des cellules (détection des séquences d'ADN spécifique du chromosome Y chez des receveurs femelles [554, 555], de détection de l'expression de transgènes tels que la GFP [548, 556] ou la β -galactosidase [561]) ont pu écarter cette hypothèse.

Une deuxième hypothèse impliquant le phénomène de fusion cellulaire a également été mise en avant, celle-ci remettant en cause les techniques de détection préalablement utilisées. La fusion cellulaire est un mécanisme physiologique conduisant à la formation de cellules plurinuclées. Elle intervient lors de la formation des myofibres par fusion de myoblastes, ou lors de la formation des ostéoclastes par la fusion de cellules de type monocyte/macrophage [562]. Mais la fusion homotypique (entre des cellules de même nature) ne suffit pas à expliquer l'acquisition de la plasticité. La plasticité acquise par fusion cellulaire a pu être mise en évidence, *in vitro*, entre des cellules ES et des cellules souches de moelle osseuse [563] ou des cellules souches neurales [564], il s'agit donc d'une fusion hétérotypique. Dans ces conditions, les cellules fusionnées peuvent acquérir des propriétés de pluripotence inhérentes aux cellules ES tout en exprimant les marqueurs spécifiques du type cellulaire différencié (d'où la difficulté d'identification d'une population de cellules souches homogène). Cependant, le phénomène de fusion reste rare (fréquence estimée à 1/100000) et conduit à la formation d'une cellule tétraploïde. Cette anomalie sur le plan génétique ne permet pas la survie sur le long terme de telles cellules. Ces cellules ne satisfont donc pas le 3^{ème} critère de la plasticité cité précédemment. Le phénomène de fusion cellulaire, de par sa rareté et la nature transitoire des cellules générées ne permet pas d'expliquer à lui seul l'acquisition de la plasticité des cellules souches adultes. Mais, il a pu toutefois être observé (de manière

artefactuelle ?) ce qui implique la nécessité d'études caryotypiques lors de l'observation de telles cellules [563-565].

Une troisième hypothèse dite de transdifférenciation a été soulevée et est toujours sujet à controverse. Ce phénomène implique la conversion d'une cellule différenciée vers un type cellulaire différencié d'un lignage différent, accompagnée de la perte d'expression des marqueurs spécifiques du type cellulaire d'origine et l'acquisition des marqueurs et des fonctions du nouveau type cellulaire. Cette conversion se ferait directement, par l'activation ou la levée de l'inhibition d'un programme de différenciation latent. En effet une étude comparant des cellules ES, des cellules pluripotentes et des cellules multipotentes a clairement démontré que plus le potentiel de différenciation est grand, plus le degré de méthylation de l'ADN est important, réprimant ainsi sa transcription et inversement que plus les cellules s'engagent dans la différenciation plus le degré de méthylation de l'ADN diminue [566]. Ce mécanisme est à mettre en parallèle avec le rôle des protéines histones participant au remodelage de la chromatine, suivant leur degré d'acétylation, elles permettent d'exposer l'ADN à la machinerie transcriptionnelle [567]. HDAC4 semble représenter un des régulateurs majeurs dans le cadre de la différenciation chondrogénique [568, 569]. Ce phénomène de transdifférenciation a pu être démontré par la transition de cellules de moelle osseuse vers des neurones, des myocytes, des cardiomyocytes, des cellules hépatiques ou rénales [570-572] ainsi que par la commutation de CSM du tissu adipeux vers des cellules productrices d'insuline [573]. La transdifférenciation, chez les Vertébrés, est un mécanisme physiologique assez bien caractérisé chez certaines espèces de poissons, les Urodèles (ordre des amphibiens conservant une queue au stade adulte) et le poulet [574, 575]. Chez les Urodèles, ce mécanisme permet la régénération des structures complètes d'un membre, de la queue, de l'œil des dents ou du cœur. La cellule différenciée, lorsqu'elle est isolée de sa niche d'origine et replacée dans un nouveau microenvironnement, pourrait spontanément subir une reprogrammation génétique [576, 577].

Une alternative à la transdifférenciation serait la rétrodifférenciation/redifférenciation. Cette hypothèse implique qu'une cellule différenciée posséderait une "mémoire souche" et que lorsqu'elle perçoit des variations dans son microenvironnement, la cellule serait capable de s'adapter à ces changements en retournant à l'état pluripotent puis en se redifférenciant.

La dernière hypothèse qui ait été émise est l'effet paracrine des CSM. Les CSM produiraient des facteurs solubles spécifiques des niches dans lesquelles elles se trouvent, agissant ainsi sur

le recrutement et la différenciation des cellules environnantes [578]. Les CSM joueraient ainsi un rôle de soutien dans l'homéostasie du tissu ou de l'organe.

La notion de plasticité prend donc en compte la capacité de cellules différenciées à conserver un potentiel souche et la capacité de cellules souches à se différencier vers des types cellulaires de feuillet embryonnaires dont elles ne sont pas issues. Cette notion de plasticité reste toutefois difficile à mettre en évidence et les mécanismes qui la gouvernent ne sont pas encore clairement établis. La question de savoir si la plasticité des cellules souches est une réalité physiologique ou un artefact technique reste encore à être élucidée.

3.3.2.3.4 - CSM et immunomodulation

Récemment, plusieurs études ont démontré le caractère peu immunogène des CSM. En effet, ces cellules ont un rôle régulateur à la fois sur les effecteurs de l'immunité innée et adaptative tels que respectivement : les cellules NK (natural killer), les cellules dendritiques, les macrophages ou les lymphocytes T et B via des facteurs solubles ou des contacts physiques directs [579]. Les CSM expriment les molécules du CMH de classe I (HLA-A, B et C) mais n'expriment que très faiblement les molécules du CMH de classe II (HLA-DR), et de plus les CSM n'expriment pas les molécules de costimulation retrouvées habituellement à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) et CD 40 [580, 581]. Il a également été démontré que les CSM peuvent provoquer un arrêt de la division cellulaire en phase G0-G1 en association avec une inhibition de l'expression de la cycline D2 chez les lymphocytes T [582], B [583], NK [584] et les cellules dendritiques [585, 586].

CSM et lymphocytes T $\alpha\beta$

L'activation et la maturation des lymphocytes T nécessite trois signaux résultant d'interactions entre la CPA et le lymphocyte T. Le premier signal est issu de la reconnaissance par le TCR (T-cell receptor) d'un complexe CMH-peptide. Le deuxième signal est apporté par des molécules de costimulation (interaction entre les molécules CD80 et CD86 portée par les CPA et la molécule CD28 à la surface du lymphocyte T). Le troisième signal repose sur l'environnement cytokinique, et notamment sur la stimulation paracrine par l'IL-2. Il y a deux types principaux de lymphocytes T $\alpha\beta$: les lymphocytes T CD8+ qui reconnaissent un antigène porté par une molécule de CMH de classe I et les lymphocytes T

CD4+ qui reconnaissent un antigène porté par une molécule de CMH de classe II. Les lymphocytes T CD8+ sont caractérisés par leur fonction cytotoxique alors que les CD4+ secrètent un large panel de cytokines orientant la réponse immunitaire. De nombreux sous-types de lymphocytes T CD4+ ont été décrits. De manière traditionnelle, deux types de cellules T CD4+ "helper" (Th) sont distingués : les Th1 qui peuvent favoriser une réponse à médiation cellulaire, avec génération de cellules T CD8+ cytotoxiques en grand nombre et les Th2 qui orientent la réponse immunitaire vers une médiation humorale avec activation de la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps. De récentes données démontrent que des CSM humaines, de primates non-humains et de rongeurs n'activent pas la prolifération de lymphocytes T et inhibent, de manière persistante, la prolifération des CD4+, des CD8+ et des cellules T naïves ou mémoires, induite par la présence d'un antigène allogénique lors de réaction lymphocytaire mixte (MLR). Ces effets sont observés quelle que soit l'origine des CSM : identique aux lymphocytes, à l'antigène ou provenant d'un tiers et dépendants de la quantité de CSM introduite dans la MLR [580, 587, 588]. Les propriétés immuno-modulatrices des CSM ne semblent pas restreintes par l'antigène.

L'anergie des lymphocytes T induite par un contact avec les CSM est une des hypothèses avancées pour expliquer les propriétés de modulation de la réponse immunitaire par les CSM. L'anergie est induite en cas de stimulation incomplète des lymphocytes T (signal 1 sans signal 2) ou en cas de stimulation antigénique répétée. En effet, les CSM n'expriment pas les molécules de costimulation CD80 et CD86. Plusieurs études ont montré l'effet CSM sur la réponse des lymphocytes T [582, 589]. Il a été constaté que cet effet était réversible quand les CSM sont retirées de la culture [581, 588]. Cependant des résultats divergents ont été observés suivant l'espèce d'origine des CSM. Il a été démontré, chez la souris, que les CSM pouvaient induire un phénomène de tolérance [589]. Il a été démontré dans un modèle murin de réponse immunitaire de lymphocytes T dirigés contre l'antigène mineur d'histocompatibilité HY, qu'au contact de CSM, la production d'IFN- γ et la prolifération des lymphocytes T étaient inhibées. L'analyse du cycle cellulaire de ces cellules a démontré qu'elles étaient bloquées en phase G1 ceci étant corrélé au niveau moléculaire par une inhibition de la cycline D2. L'ajout d'IL-2 exogène, dans ce contexte ne permet pas de restaurer la prolifération des lymphocytes T, laissant suggérer un probable mécanisme d'anergie [582].

Récemment, l'expression constitutive d'une molécule appartenant au CMH de classe I : HLA-G soluble a été mise en évidence à partir de CSM humaines isolées de la moelle osseuse [590]. HLA-G exercerait un effet immunosuppresseur en induisant l'apoptose de cellules T CD8⁺ et en modulant la prolifération des cellules CD4⁺. De plus, les auteurs de cette étude ont montré que lors d'une MLR, en présence d'un anticorps dirigé contre HLA-G, la capacité de prolifération des lymphocytes T était restaurée. Les différences observées quant à l'étude du mécanisme d'anergie peuvent être liées aux variations des conditions expérimentales mises en œuvre ainsi qu'à la nature humaine ou murine des CSM utilisées.

Les propriétés immunomodulatrices des CSM s'appuient également sur la sécrétion de facteurs solubles. Ces derniers ont pour conséquence de prévenir la prolifération et la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T. La production de facteurs solubles tels que le TGF- β , l'HGF (hepatocyte growth factor), le VEGF, l'IL-6, l'IL-10, l'IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase), la PGE2 (prostaglandine E2) [580, 581, 591, 592] prévient l'activation des lymphocytes T et constituent autant de mécanismes conférant aux CSM des propriétés immunomodulatrices. Toutefois, les résultats contradictoires de la littérature reflètent probablement des différences de conditions expérimentales. Il a été décrit que lors d'une MLR, l'inhibition de prolifération des lymphocytes T était accompagnée d'une augmentation de la production d'IL-6 par des CSM murines et que l'ajout d'anticorps dirigés contre l'IL-6 permettait une restauration de la prolifération des lymphocytes T [592, 593]. La PGE2 produite par les CSM interviendrait dans les mécanismes immunitaires en induisant la prolifération de cellules T régulatrices (Treg) CD4⁺ CD25⁺ limitant ainsi l'ampleur de la réponse immunitaire. L'inhibition de la prolifération des cellules T induite par la PGE2 peut être réversée par l'indométhacine, un inhibiteur de la PGE2 [592, 594, 595]. L'IDO est une enzyme exprimée par les CSM dont l'expression est stimulée par l'IFN- γ [596]. L'IDO inhibe la prolifération des cellules T par dégradation du tryptophane du milieu en un composé : la kynurénine qui est un agent pro-apoptotique des lymphocytes T, B et des cellules NK mais sans effet sur les cellules dendritiques [597, 598]. Le rôle de l'IDO produite par les CSM dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T a récemment été remis en cause par des travaux démontrant que les capacités inhibitrices des CSM étaient indépendantes de l'expression de l'IDO et de la signalisation de l'IFN- γ [599].

Une étude récente fait mention d'un mécanisme impliquant la production, par les lymphocytes T, d'IFN- γ et d'au moins l'une des 3 cytokines suivantes : TNF- α , IL-1 α ou IL-1 β . Ce

cocktail de cytokines a pour conséquence d'induire la production de chemokines et de NO par les CSM via l'activation d'iNOS (inducible nitric oxide synthase) [600]. Par chimiotactisme, les lymphocytes T migrent à proximité des CSM et voient leur prolifération inhibée par la concentration locale élevée en NO. De plus, des CSM dont l'expression d'iNOS ou du récepteur 1 à l'IFN- γ a été invalidée ne permettent plus de modulation de la réponse immunitaire [601]. C'est donc dans un contexte pro-inflammatoire que les CSM exerceraient leur activité régulatrice. En effet, les cytokines pro-inflammatoires induisent la sécrétion de molécules inhibitrices de la réponse immunitaire.

CSM et lymphocytes B

Des études, réalisées dans les modèles murins, ont démontré que les CSM étaient capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes B, stimulés par un anti-CD40L et de l'IL-4 [582]. Ce mécanisme fait intervenir des contacts physiques entre les lymphocytes B et les CSM via le BCR (B-cell receptor) ou CD40. Chez l'homme, les capacités immunosuppressives des CSM ont été évaluées dans un modèle de cellules B stimulées par des anticorps anti-IgG, le ligand libre du CD40, de l'IL-1 et 2. Dans ces conditions, les CSM sont capables d'inhiber la prolifération, l'activation et la différenciation des lymphocytes B ainsi que la sécrétion d'IgG et cela via un mécanisme impliquant des facteurs solubles tels que PGE2 [602], sans nécessité d'interaction cellule-cellule [583, 603, 604, 605].

CSM et cellules NK

Différentes études ont mis en évidence que les CSM étaient capables d'inhiber la prolifération des cellules NK et leur sécrétion d'IFN- γ induite par l'IL-2, l'IL15 [594, 606-608]. Les effets des CSM sur la cytotoxicité des cellules NK restent controversés. Aucune inhibition de l'activité lytique des cellules NK fraîchement isolées sur des cellules cibles HLA-I positives ou négatives n'a pu être mise en évidence en présence de CSM [606]. Par contre, des cellules NK cultivées pendant 5 jours en présence de CSM et sous stimulation à l'IL-2 ou 15 présentent une cytotoxicité réduite pour des cellules tumorales HLA-1 positives [606] ou des cellules cibles de type K562 [609]. Les mécanismes impliqués dans la modulation de la réponse des cellules NK semblent également être dépendants des contacts cellulaires et de la synthèse de facteurs solubles. Comme pour les lymphocytes T, la signalisation via la PGE2 et le TGF- β semble fortement impliquée dans la réduction de la prolifération des cellules NK. Le blocage de ces voies par des inhibiteurs spécifiques permet de restaurer la capacité de

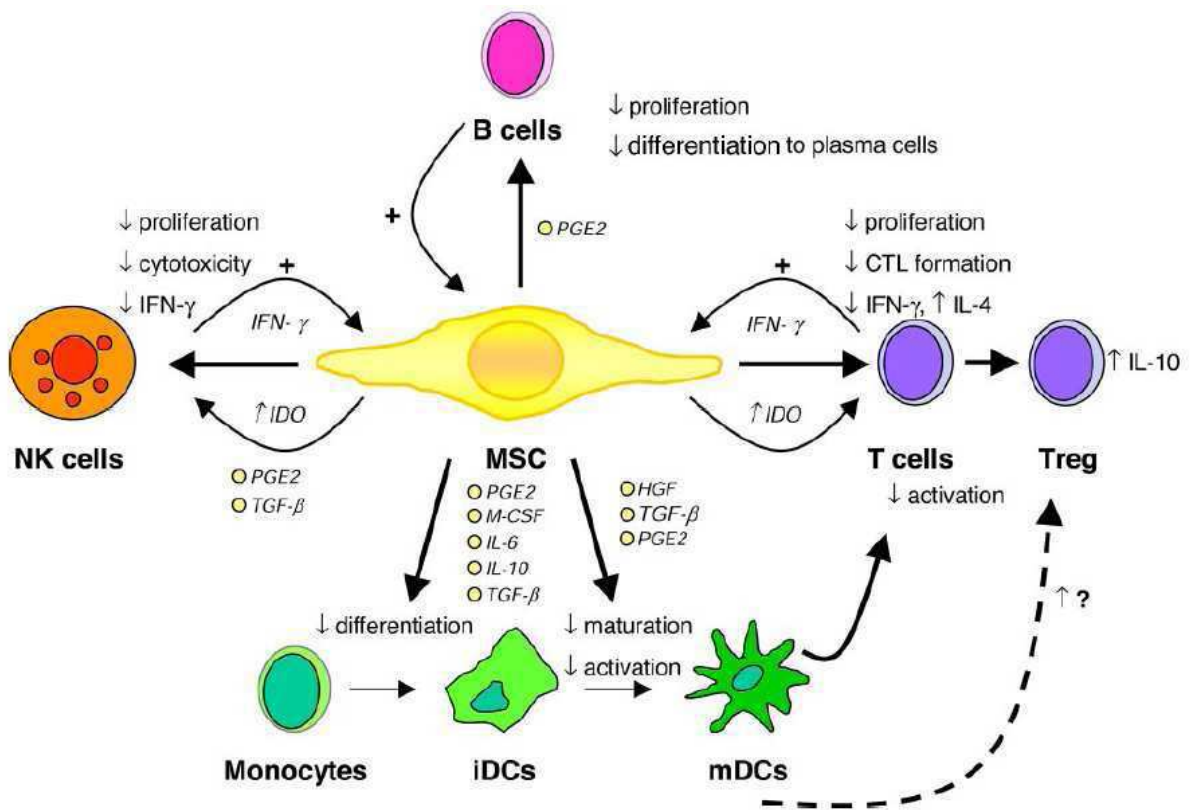


Figure 20 : Effets immunomodulateurs des CSM. D'après Nauta *et al.* [614].

prolifération des cellules NK [606]. Les CSM ont, dans un premier temps, été considérées comme des cellules immunoprivilégiées ne pouvant pas être lysées par des cellules NK [608, 610], mais des résultats plus récents remettent en cause cette hypothèse, notamment suite à la reconnaissance de certains ligands à la surface des CSM par les cellules NK activées [584].

CSM et cellules dendritiques

L'effet des CSM sur la modulation de la réponse immunitaire peut aussi s'expliquer par leur capacité à interagir sur la différenciation, la maturation et la fonction des cellules dendritiques. La maturation des cellules dendritiques peut être inhibée par les CSM en régulant de manière négative l'expression de CD11c (intégrine alpha X ; récepteur pour une protéine du complément l'iC3b), CD83 (intervenant dans la présentation d'antigènes), des molécules du CMH de classe II et des molécules de costimulation. De plus, les CSM induisent une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IFN- γ et IL-12) ainsi qu'une augmentation de la synthèse d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire [591, 594, 611, 612]. Les CSM conduiraient donc à maintenir les cellules dendritiques dans un état immature. L'effet immunomodulateur des CSM sur les cellules dendritiques est lié à leur production de facteurs solubles comme l'IL-6, le MCSF (macrophage colony-stimulating factor) ou la PGE2 [592, 594, 611, 613]. Les cellules dendritiques cultivées en présence de CSM voient leur sécrétion de TNF- α et IFN- γ restaurée lorsque la synthèse de PGE2 par les CSM est inhibée par de l'indométhacine. Il a également été décrit que les CSM pouvaient inhiber la prolifération des cellules dendritiques en bloquant leur entrée dans le cycle cellulaire en phase G0/G1 [585]. Cette action directe des CSM sur les cellules dendritiques conduit à l'émergence d'une population de CPA immatures ayant pour conséquence indirecte une diminution de l'activation et la prolifération des lymphocytes T.

Malgré la mise en évidence des propriétés immunomodulatrices des CSM, les mécanismes les régissant restent néanmoins mal connus. La régulation qu'exercent les CSM sur les différents acteurs de la réponse immunitaire semble être à la fois médiée par des contacts cellule-cellule nécessaires à la production de cytokines inflammatoires et par l'action de facteurs solubles pouvant être synthétisés par chacune des populations cellulaires (Figure 20).

CSM et maladie du greffon contre l'hôte : GVHD (graft versus host disease)

La GVHD résulte de la réaction de cellules immunocompétentes du greffon contre les antigènes de l'hôte, conduisant à l'activation des lymphocytes T du donneur et pouvant aller dans les formes les plus graves jusqu'à la mort du receveur. Dans le but d'évaluer le potentiel immunomodulateur des CSM, *in vivo*, il a été démontré que l'injection de CSM de moelle osseuse permettait de prolonger la survie d'un greffon de peau chez le babouin de manière comparable aux immunosuppresseurs conventionnels [587]. Cet effet de tolérance induite par les CSM avait été précédemment suggéré dans un modèle de souris recevant des greffons de moelle totale (CSM + CSH) allogéniques ou xénogéniques (rat) au niveau de la capsule rénale [615]. Plus récemment, différentes études ont mis en évidence que l'injection de CSM provenant de différents tissus ou organes permettait de réguler la GVHD [614, 616]. De nombreuses études ont été menées chez la souris [617, 618], le mouton au stade fœtal [619] et le primate non humain [620, 621], démontrant que les CSM améliorent la prise de greffe de CSH chez l'animal irradié ou immunodéficient et ceci que les CSM soient de la même origine que les CSH ou non.

CSM et maladies auto-immunes

Les CSM, de par leurs propriétés immunomodulatrices et leurs capacités à induire des mécanismes de réparation tissulaire, représentent un outil thérapeutique intéressant dans le traitement de pathologies autoimmunes [622]. Dans un modèle d'arthrite expérimentale induite par injection de collagène bovin de type II, une étude montre que l'injection de CSM issues d'une lignée murine (C3H10T1/2) aggravait la réponse inflammatoire et ceci proportionnellement à la dose de cellules injectées [623]. Au contraire, une autre étude démontre qu'une injection unique de CSM primaires allogéniques prévenait l'apparition de lésions ostéochondrales en inhibant la prolifération des lymphocytes T [624]. Dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune, une amélioration significative des signes cliniques a été observée après injection de CSM dans les phases précoces de la maladie. Cette amélioration semble être liée à une inhibition de la prolifération des cellules T et à l'induction d'un mécanisme de tolérance au niveau des organes lymphoïdes [589, 625]. L'utilisation de CSM dans un modèle murin de lupus pour lequel des souris MRL/lpr reçoivent, après irradiation, une greffe de moelle osseuse associée ou non à une injection de CSM, a montré que la survie à long terme de l'animal, la prise de la greffe de CSH et la prévention de la rechute de la maladie sont améliorées [626]. Dans un modèle proche, de lupus érythémateux (souris

BXSB), il a été montré que l'injection de CSM inhibait la prolifération des lymphocytes T et B autoréactifs [627]. Enfin, l'injection intraveineuse de CSM à des souris diabétiques NOD/scid conduit à l'augmentation du nombre d'îlots pancréatiques et de cellules β productrices d'insuline, les CSM humaines injectées ayant de façon intéressante un tropisme pour les organes atteints, pancréas et rein dans cette étude [628].

L'ensemble de ces données démontrent, que les CSM modulent l'action des différentes cellules impliquées dans la réponse immunitaire. Cependant, bien que les mécanismes moléculaires responsables de ces effets restent encore mal connus, cela ouvre des perspectives intéressantes dans le domaine des allo- ou xénogreffes [629].

3.3.2.3.5 - Les différentes sources de CSM

L'utilisation de cellules souches provenant de tissus adultes, dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, présente l'avantage de ne pas se confronter aux problèmes éthiques relatifs aux cellules souches embryonnaires et d'être moins coûteuse que la production d'iPS.

Les CSM de la moelle osseuse

Les CSM isolées à partir de la moelle osseuse ont été les premières identifiées [483, 485, 486]. Elles restent à l'heure actuelle les plus étudiées et donc les mieux caractérisées. C'est à partir de ces cellules qu'a été définie la notion de cellule souche multipotente qui comprend les propriétés de prolifération quasi-illimitée, d'auto-renouvellement, de différenciation auxquelles sont venues s'ajouter par la suite les notions d'expression d'un ensemble de marqueurs de surface caractéristique, d'immunomodulation ... Par conséquent, les CSM de la moelle osseuse sont considérées comme le gold-standard des CSM.

La moelle osseuse est prélevée sous anesthésie générale par ponction à l'aide d'un trocart en général au niveau de la crête iliaque et plus rarement (5 à 7% des procédures) au niveau du manubrium (partie supérieure du sternum) ou au niveau de la médullaire du tibia (dans le cas d'enfants âgés de moins de 18 mois). Le volume maximal pouvant être prélevé chez un patient est de 20mL/kg [630]. Cette procédure nécessite une hospitalisation pour une durée de 48 à 72 heures et peut parfois présenter certains inconvénients tels qu'une douleur persistante, une morbidité du site donneur liée à l'effraction de l'os cortical [631] ou une quantité limitée de cellules d'intérêt. En effet, il a été démontré que seule une faible proportion (0,01 à

0.001%) des cellules mononuclées isolées de la moelle osseuse (par gradient de densité ficoll/percoll) étaient capables de former des colonies (CFU assay) [477].

Dans le but de s'affranchir de ces limites, la communauté scientifique s'est alors mise en quête de sources alternatives de CSM. A ce jour, il a été mis en évidence une grande variété de tissus représentant des sources alternatives de CSM, mais certains critères biologiques (disponibilité du tissu, proportion de CSM, potentiel chondrogénique), pratiques (facilité de prélèvement, morbidité associée), techniques (facilité d'isolement des CSM, culture) et éthiques (utilisation de tissu adultes) doivent être pris en compte afin de définir une source alternative de CSM potentiellement utilisable dans le cadre d'une approche en ingénierie tissulaire.

Les CSM du tissu adipeux

Classiquement, chez les mammifères, 3 types de tissu adipeux se distinguent les uns des autres de par leur fonction et leur localisation anatomique. Il s'agit du tissu adipeux de la moelle osseuse ou tissu adipeux jaune, du tissu adipeux brun et du tissu adipeux blanc.

a) Le tissu adipeux de la moelle osseuse

Le rôle des adipocytes au sein de la moelle osseuse n'est, à l'heure actuelle, pas clairement établi. Ces adipocytes pourraient jouer un rôle passif en tant que constituant d'un tissu conjonctif de soutien vis-à-vis des cellules hématopoïétiques. Ces cellules pourraient également avoir un rôle dans la régulation systémique du métabolisme lipidique. Elles pourraient d'autre part constituer un réservoir local d'énergie nécessaire au métabolisme spécifique de la moelle osseuse ou encore être impliquées directement dans la différenciation hématopoïétique et/ou ostéoblastique par la sécrétion de cytokines [632]. Chez l'humain, le nombre et la taille des adipocytes présents dans la cavité médullaire augmentent avec l'âge, au détriment de l'hématopoïèse et de l'ostéogenèse [633, 634]. En effet, en plus d'intervenir dans le vieillissement, ce phénomène est aussi observé en situations pathologiques telles que l'anémie aplasique [635] ou l'ostéoporose [636]. L'origine de l'augmentation du nombre d'adipocytes dans ces conditions reste mal connue mais pourrait être due à une dérégulation entre les voies de différenciation adipo- et ostéogénique des CSM de la moelle osseuse, à des phénomènes de trans-différenciation ou recrutement de précurseurs adipogéniques circulants [637, 638].

b) Le tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun se retrouve essentiellement chez les nouveau-nés, les animaux hibernants et en quantité moindre chez l'adulte, se limitant à quelques sites anatomiques spécifiques. Sa fonction première est de permettre la production de la chaleur corporelle [639]. En effet, le tissu adipeux brun permet aux nouveau-nés de maintenir leur température corporelle en l'absence de réflexe de frissonnement. Les adipocytes du tissu adipeux brun sont dits multiloculaires, ils sont caractérisés par la présence de multiples gouttelettes lipidiques. Ils présentent également un nombre élevé de mitochondries très riches en fer, ce qui leur confère leur couleur brune. De plus, ce tissu est extrêmement vascularisé du fait de besoins en oxygène plus importants que dans la plupart des autres tissus [640]. De plus, au niveau moléculaire, les adipocytes du tissu adipeux brun sont les seules cellules connues pour synthétiser la "uncoupling protein 1" (UCP-1) également connue sous le nom de thermogénine. Cette protéine mitochondriale a pour rôle de débrayer la production d'énergie par phosphorylation oxydative en favorisant le reflux des protons vers l'espace matriciel sans passer par l'ATP synthase. L'énergie libérée par l'oxydation mitochondriale des acides gras n'est alors plus dédiée à la production d'ATP mais est dissipée sous forme de chaleur [641, 642]. La présence de tissu adipeux brun métaboliquement actif a été mise en évidence chez l'adulte au niveau cervical, supra-claviculaire et para-vertébral, mais son rôle reste encore à élucider [643-646].

c) Le tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc représente, en moyenne, entre 25 et 31% du poids chez une femme et 18 à 24% du poids chez un homme. Il est essentiellement présent aux niveaux hypodermique, intra-péritonéal où il assure un rôle de réservoir énergétique. Ce tissu est également retrouvé de manière sporadique au niveau orbital, palmaire, plantaire ou péri-articulaire où il assure plutôt un rôle de soutien et de protection mécanique. Le tissu adipeux blanc constitue la réserve énergétique la plus importante de l'organisme. Les adipocytes qui le constituent, contrairement au tissu brun, ont la particularité d'être uniloculaires. Cette unique vacuole lipidique est essentiellement constituée de triglycérides résultant de la lipogenèse [647]. Le tissu adipeux blanc ne constitue pas uniquement une réserve énergétique, il représente également un organe endocrinien à part entière en exerçant des effets auto-, paracrines ou systémiques via la sécrétion de cytokines [648]. Outre la sécrétion d'IL-1 ou de TNF- α connus pour leur rôle dans les processus de dégénérescence du cartilage, récemment, des adipokines telles que la leptine, l'adiponectine, la résistine [649, 650], la visfatine [651, 652]

Tableau IV : sources de CSM à potentiel chondrogénique

Tissu ou fluide source	Espèce	Origine embryonnaire	Références
Cartilage	Homme, Boeuf	Mésoderme	[497, 498, 655-657]
Périchondre	Homme, Souris, Lapin	Mésoderme	[658-663]
Périoste	Homme, Rat	Mésoderme	[664-668]
Membrane synoviale	Homme, Rat, Lapin	Mésoderme	[509, 511, 666, 669-677]
Liquide synovial	Homme	Mésoderme	[678-681]
Tendon	Homme, Souris, Rat, Lapin, Chèvre	Mésoderme	[166, 682-685]
Muscle	Homme, Souris, Rat, Lapin	Mésoderme	[666, 674, 686-689]
Pulpe dentaire	Homme, Singe	Mésoderme	[690-694]
Ligament périodontal	Homme	Mésoderme	[695-697]
Tissu adipeux - Fat pad	Homme, Porc	Mésoderme	[506, 698, 699]
Sang périphérique	Homme, Cheval	Mésoderme	[700-703]
Péricytes	Boeuf	Mésoderme	[704]
Glande parathyroïde	Homme	Endoderme	[705]
Epiderme (fibroblastes dermiques)	Homme, Souris, Rat, Lapin	Ectoderme	[689, 706-708]
Placenta	Homme, Souris	Annexe embryonnaire	[709]
Cellules de cordon ombilical ou Gelée de Wharton	Homme, Cheval	Annexe embryonnaire	[710-717]
Sang de cordon ombilical	Homme, Brebis	Annexe embryonnaire	[718-721]
Liquide amniotique	Homme	Annexe embryonnaire	[722, 723]
Membrane amniotique	Homme	Annexe embryonnaire	[724]
Pancréas foetal	Homme	Fœtus	[725]

ou encore l'apeline [653] ont été identifiées comme pouvant être également impliquées dans ce type de processus. Ces récentes avancées ont permis d'identifier que le facteur de risque "surpoids" dans l'arthrose, masquait en fait un effet systémique des sécrétions cytokines produites par le tissu adipeux.

Des populations de cellules souches ayant un potentiel chondrogénique ont été identifiées dans la plupart des organes, suggérant l'existence d'une niche périvasculaire dans laquelle résideraient ces cellules souches [654] (Tableau IV).

3.3.2.3.6 - Tissu adipeux et ingénierie tissulaire

Les CSM du tissu adipeux représentent une des sources alternatives de CSM, vers laquelle la communauté scientifique s'est orientée avec intérêt. Elles font actuellement l'objet de 23 essais cliniques répertoriés (clinicaltrials.gov).

En effet, le tissu adipeux représente un réservoir de cellules souches de premier ordre de par sa biodisponibilité et permet donc l'obtention de volumes importants de prélèvement (classiquement de 250 à 500mL pouvant aller jusqu'à 5L) [726]. Le tissu adipeux est majoritairement constitué d'adipocytes et de préadipocytes mais il contient également une population hétérogène de cellules désignée comme la fraction stromale vasculaire qui inclus des CSM, des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses vasculaires ainsi que des leucocytes [727-729]. De surcroît, en plus d'être largement biodisponible, le tissu adipeux a l'avantage d'être particulièrement riche en CSM, dans une proportion de 100 à 500 fois supérieure à celle de la moelle osseuse [730-732]. L'intérêt d'obtenir un tissu source riche en CSM et en volume considérable réside dans le fait de limiter les étapes d'expansion en culture afin de préserver le maintien de la capacité des CSM à se différencier [733].

Le tissu adipeux est généralement prélevé dans la région abdominale ou de la hanche. Chez l'humain, différentes procédures de prélèvement de tissu adipeux peuvent être envisagées. Des fragments de tissus peuvent être obtenus par résection de lambeaux adipeux, l'isolement des cellules à partir d'un tissu intègre nécessite une étape de dilacération précédant la digestion enzymatique. Les procédures de liposuction conduisent à l'obtention d'un lipoaspirat homogène contenant des fragments de tissus adipeux de petite taille permettant de s'affranchir de l'étape de dilacération tout en optimisant la digestion enzymatique. La procédure la plus couramment utilisée est la méthode dite de "Coleman" qui consiste à déstructurer le tissu adipeux par aspiration à l'aide d'une canule sous infiltration

d'épinéphrine et de lidocaïne. La canule est connectée à une seringue permettant de récupérer le produit de lipoaspiration. Cette intervention se fait sous anesthésie locale [734-736]. Ces dernières années, des appareils permettant le prélèvement et l'isolement quasi simultané des CSM du tissu adipeux ont été développés tels que le Celution™ (Cytospor Therapeutics) ou le Tissue Genesis Cell Isolation System platform™ (Tissue Genesis Incorporated), [737-739]. Ces deux systèmes bénéficient du marquage CE, mais seule l'utilisation du Celution™ a été approuvée par la F.D.A. (Food and Drug Administration).

Le développement des études sur les CSM du tissu adipeux et le nombre croissant d'équipes engagées dans ce champ de recherche a conduit à l'apparition de dénominations diverses telles que ADSC (adipose-derived stem cells), ADAS (adipose-derived adult stem cell), MADS (multipotent adipose-derived stem cells), PLA (processed lipoaspirate cells), ATSC (adipose tissue-derived stromal cells), ATMSC (adipose tissue-derived MSC), ADRC (adipose-derived regenerative cells). En 2004, l'International Federation of Adipose Therapeutics and Science (IFATS), dans le but d'harmoniser la nomenclature désignant ce type de cellules a adopté le terme d'ASC (adipose-derived stromal cells) [727, 740, 741]. Malgré l'adoption du terme d'ASC comme nomenclature "consacrée", la désignation des cellules souches du tissu adipeux reste encore très hétérogène.

Cette hétérogénéité se traduit également dans les différentes méthodes mises en œuvre pour isoler les CSM du tissu adipeux. Celles-ci varient de par la méthode de prélèvement utilisée (résection, liposuction...) [742], la localisation du site donneur (hanche, abdomen...) [731, 743], par la méthode de digestion enzymatique [744], l'âge du donneur [745] et l'indice de masse corporelle [746, 747] sont également des paramètres pouvant expliquer la grande variabilité inter-individuelle observée au travers des différentes études menées [748].

La place des CSM du tissu adipeux dans l'ingénierie tissulaire du cartilage a fait l'objet d'un article publié dans la revue *Joint Bone Spine* (Article III).

Article III

Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering

C. Merceron, C. Vinatier, J. Clouet, S. Collic-Jouault, P. Weiss
and J. Guicheux.

Joint Bone Spine (2008) 75 : 672-674.

Article III : Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering – Joint Bone Spine

Résumé :

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif spécialisé composé d'un unique type cellulaire, le chondrocyte et d'une matrice extracellulaire (MEC) hautement hydratée essentiellement constituée de collagènes et de glycosaminoglycanes. De plus, ce tissu présente la particularité d'être ni vascularisé, ni innervé. Le cartilage articulaire, de par sa composition et son organisation histologique, permet la transmission et la répartition des charges lors de la sollicitation des articulations. Le cartilage articulaire peut être altéré suite à des traumatismes ou diverses pathologies inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde) ou dégénératives (arthrose). L'absence de vascularisation du cartilage et de prolifération des cellules qui le composent confère à ce tissu de faibles capacités de réparation spontanée qui rendent ces processus cataboliques irréversibles. Dans ce contexte, la communauté scientifique s'intéresse depuis de nombreuses années aux moyens de régénérer un tissu cartilagineux fonctionnel. De nombreuses approches thérapeutiques ont été développées dans le but de favoriser la reconstruction cartilagineuse et, aujourd'hui, les cliniciens considèrent avec un intérêt croissant le développement des biomatériaux et de la thérapie cellulaire. Cette stratégie nécessite l'emploi de matrices adaptées qui combiné à l'utilisation de morphogènes, peut assurer un environnement idéal aux cellules sélectionnées pour leur capacité de réparation du cartilage.

3.4 - Modes et conditions de culture

Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage, après avoir identifié une source de cellules chondrogéniques, il est essentiel de promouvoir et de maîtriser leur différenciation ou tout du moins sa détermination vers le lignage cellulaire désiré. Cette étape passe par l'optimisation des conditions de culture en visant à reproduire les conditions environnementales physiologiques des chondrocytes dans les différentes couches du cartilage articulaire. Certains facteurs ont été décrits comme pouvant jouer un rôle dans l'induction et/ou le maintien du phénotype chondrocytaire tels que la dimensionalité, les agents morphogènes (facteurs de croissance, adjuvants de synthèse, tension en oxygène...) ou encore la mise sous contraintes mécaniques. C'est pourquoi le développement de bioréacteurs, visant à combiner ces différents paramètres est en plein essor. Il est toutefois primordial que ces conditions de culture mises en œuvre n'induisent pas la différenciation des cellules vers un phénotype chondrocytaire hypertrophique conduisant, à terme, à la formation d'un tissu minéralisé incompatible avec une application en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. 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.

3.4.1 - La dimensionnalité

3.4.1.1 La culture en 2D

La culture en monocouche est la méthode de culture de référence permettant d'amplifier des cellules rapidement. Dans le cas où la source de cellules réparatrices choisie est le cartilage, qu'il soit articulaire, costal ou nasal, la faible cellularité de ce tissu impose une étape d'amplification. Les chondrocytes cumulent alors deux inconvénients, d'une part ce sont des cellules qui, physiologiquement, prolifèrent très peu et d'autre part leur culture prolongée en monocouche provoque leur dédifférenciation [749]. Lors de ce processus, les chondrocytes perdent leur phénotype chondrocytaire et tendent vers un phénotype fibroblastique. Ceci se traduit par la perte d'expression du facteur de transcription Sox9 et des protéines matricielles telles que le collagène de type II et de l'agrécan à la faveur de la production de collagène de type I [464, 750, 751]. La culture monocouche à haute densité semble favoriser la rétention d'un phénotype différencié [752]. La culture en monocouche au contact d'une interface, qui peut être constituée d'un film soit de collagène, d'agarose ou de méthacrylate [753, 754] semble également ralentir le processus de différenciation. Dans ce domaine, la culture en "cell-sheet" représente une des dernières innovations dans la culture en monocouche des

chondrocytes [755-757] Concernant, la culture de CSM, la culture en monocouche ne présente aucun inconvénient à leur amplification, mais ne permet que peu ou prou leur orientation vers le phénotype chondrocytaire. En effet, la différenciation chondrogénique des CSM nécessite entre autre de cultiver les cellules dans un environnement tridimensionnel.

3.4.1.2 - La culture en 3D

La culture en 3D permet aux chondrocytes de conserver un phénotype différencié et aux chondrocytes dédifférenciés de réacquérir l'expression des marqueurs du phénotype chondrocytaire [758-760]. Concernant les CSM, cet environnement tridimensionnel s'avère nécessaire à l'orientation des cellules vers le phénotype chondrocytaire [761, 762]. Les principes de culture cellulaire 3D utilisés pour la différenciation chondrogénique des CSM s'inspirent directement des techniques développées pour la culture de chondrocytes. Deux méthodes peuvent être distinguées. La première est la culture 3D au sein d'un biomatériau. Le biomatériau utilisé doit être poreux afin de permettre son invasion par les cellules. L'utilisation de polymères tels que la gélatine, l'alginate, l'agarose, la fibrine, le PGA ou l'acide hyaluronique a largement été décrite [763-766]. La deuxième méthode s'affranchit de l'utilisation de biomatériaux. Selon cette méthode, les cellules peuvent être placées dans un environnement 3D sous la forme d'une suspension de haute densité cellulaire, dans le milieu de culture (techniques de gouttes suspendues "hanging drop" [767], micromasses [768, 769], pellets [770, 771]). Ces techniques ont pour but de mimer l'étape de condensation cellulaire se déroulant dans les phases précoces de la chondrogenèse. En effet, les cellules s'aggrègent pour former des nodules au sein desquels elles synthétisent une matrice qui leur sert de support. Ces techniques représentent de bons modèles de différenciation chondrogénique *in vitro* [772].

3.4.2 - Les facteurs morphogènes

Les morphogènes représentent des stimuli ayant la propriété d'induire la différenciation cellulaire vers un phénotype donné. Dans le cadre de la différenciation chondrogénique de CSM, en complément des facteurs de croissance certains adjuvants peuvent entrer dans la composition du milieu inductif. Il est également décrit que la tension en oxygène est un facteur jouant un rôle majeur dans la chondrogenèse.

3.4.2.1 - Les adjuvants

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 d'additifs pouvant entrer dans sa composition, et utilisés dans des concentrations variables.

Le milieu le plus couramment utilisé dans la différenciation chondrogénique, au regard de la littérature apparaît être le "DMEM-high glucose" (4,5g/L). 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 [773, 774]. L'usage d'un milieu sans serum permet également une formulation mieux contrôlée, reproductible et adaptée à l'usage clinique.

La vitamine D a également été démontrée comme jouant un rôle dans la maturation du phénotype chondrocytaire [775]. Cependant elle augmenterait le risque d'aboutir à l'apparition d'un phénotype hypertrophique et à terme à la minéralisation de la matrice.

L'ascorbate est un cofacteur essentiel des prolyl-lysyl-hydroxylases [776]. 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, favorisait la synthèse d'agrécan [777]. L'ascorbate est donc un composant majeur du milieu de différenciation chondrogénique [778].

L'ITS est l'association d'insuline, de transferrine et de sélénite de sodium. L'insuline via l'activation des récepteurs à l'insuline (IR) et l'insulin-like growth factor (IGFR) joue un rôle majeur dans la chondrogenèse, en stimulant l'activité anabolique des cellules [285, 779]. Le mode d'action du sélénium dans la différenciation chondrogénique n'est pas clairement établi. Il a toutefois été démontré qu'il agissait en tant que cofacteur de la glutathione peroxidase qui intervient dans la détoxification des ROS (reactive oxygen species) [780]. La transferrine est une protéine qui a pour rôle de transporter le fer sous forme soluble. Le fer intervient dans la différenciation chondrogénique comme cofacteur de certaines enzymes, notamment les PHD impliquées dans la réponse aux variations de tension en oxygène.

La dexaméthasone est un glucocorticoïde de synthèse capable d'activer la différenciation chondrogénique de CSM de manière dose et temps dépendants [781]. Cette hormone de synthèse semble potentialiser l'effet de facteurs de croissance [782] et a notamment pour effet

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 [783, 784]

La proline est un acide amine non essentiel, elle est fréquemment utilisée comme additif au milieu de culture, car elle entre, en proportions importantes, dans la composition des collagènes.

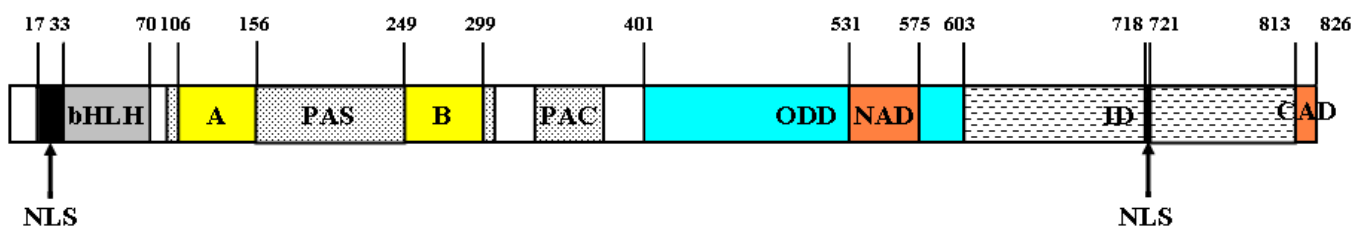
3.4.2.2 - La tension en oxygène

L'oxygène est l'agent oxidant majeur de la biosphère et joue un rôle primordial dans la plupart des processus biologiques. Son abondance et ses propriétés physico-chimiques lui permettent de diffuser au travers des membranes cellulaires, d'être soluble en milieu aqueux, de participer à des réactions d'oxydo-réduction, faisant de l'oxygène un élément essentiel à la vie. Au niveau d'un organisme, d'un tissu, d'une cellule, la tension en oxygène se doit d'être très finement régulée afin d'éviter les situations de privation ou d'excès qui peuvent conduire à sa mort. Considérant la nécessité de l'oxygène en tant que molécule essentielle à la vie, mais aussi ces effets délétaires, par manque ou excès, les différents organismes ont su s'adapter en développant des systèmes de régulation permettant de moduler l'équilibre entre hypoxie et hyperoxie [785]. Il a depuis longtemps été établi que de faibles tensions en oxygène sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques ou physiopathogéniques parmi lesquels peuvent être cités le développement embryonnaire, les mécanismes de réparation des lésions ou la croissance tumorale [786, 787]. Sur le plan moléculaire, ces mécanismes de réponse à l'hypoxie ont en commun d'être médiés par un régulateur clé : la famille de facteurs de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor).

Cartilage et hypoxie

Le cartilage articulaire étant avasculaire, la tension en oxygène qui y règne est particulièrement basse. Très peu de données expérimentales font mention de la tension en oxygène au sein du cartilage articulaire *in vivo*. Des mesures effectuées dans l'environnement immédiat du cartilage (fluide synovial) font état de tensions en oxygène variant de 10 à 1%, les tensions les plus basses ayant été enregistrées au plus proche du cartilage [788, 789]. Des données obtenues à partir de mesures réalisées sur des explants de cartilage bovins sains mentionnent des tensions en oxygène allant de 3% à la surface et diminuant à 1% au centre de l'explant (1,3mm de profondeur) [790, 791]. La présence d'oxygène dans la matrice peut

HIF-1 α



HIF-1 β

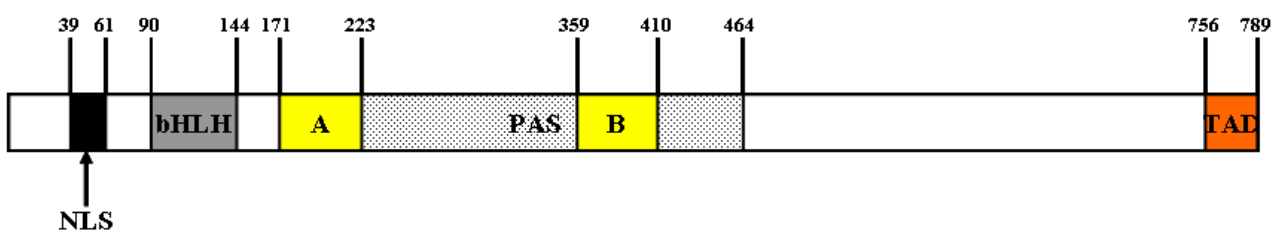


Figure 21 : Structure des sous-unités HIF-1a et HIF-1b. Modifié d'après Gaber *et al.* et Semenza *et al.*[804, 807]

résulter de la diffusion de l'O₂ à partir du liquide synovial, ou de l'os sous chondral, la contribution de chacune de ces composantes n'est pas encore clairement établie à ce jour [789]. Les chondrocytes apparaissent particulièrement adaptés aux conditions hypoxiques [792, 793]. Cette adaptation à un environnement pauvre en oxygène a été mise en évidence par le fait que même sous des tensions en oxygène très faible, leur activité métabolique reste optimale [794]. Les chondrocytes produisent environ 95% de l'énergie dont ils ont besoin par une glycolyse anaérobie de type Embden-Meyerhof-Parnas dont le produit final est l'acide lactique [795, 796]. Il a été mis en évidence que les HIF sont impliqués dans le développement [797], la survie [798] et l'activité métabolique des chondrocytes [799-801].

Structure de HIF

D'un point de vue évolutif, les HIF ont été identifiés chez toutes les cellules de mammifères étudiées à ce jour ainsi que chez l'insecte *Drosophila melanogaster* et le nématode *Caenorhabditis elegans*. Les facteurs de transcription de la famille HIF sont des hétérodimères constitués de sous-unités alpha et bêta. Ces 2 sous-unités appartiennent à la famille des basic-Helix Loop Helix / Per-ARNT-SIM (bHLH-PAS). La sous-unité β est également appelée ARNT pour Aryl-hydrocarbon Receptor nuclear Translocator. Chez l'humain, 3 gènes paralogues codant la sous-unité alpha (HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α) ainsi que 3 gènes paralogues codant la sous-unité bêta (HIF-1 β , HIF-2 β et HIF-3 β) ont été identifiés [802-804]. La fonction et la séquence de chacune de ces protéines restent extrêmement conservées entre les espèces [805]. Six isoformes issus de l'épissage alternatif de chacun des gènes HIF-1 α et HIF-3 α sont connus [804]. Les ARN messagers des sous-unités alpha et bêta ainsi que les protéines correspondantes sont constitutivement exprimés. Le complexe HIF le mieux décrit est HIF-1 qui consiste en l'association de HIF-1 α et de HIF-1 β . HIF-1 α , chez l'humain, correspond à une protéine de 120kDa pour 826 AA (Figure 21) codée par le gène HIF-1 α constitué de 15 exons et localisé sur le chromosome 14 (14q21-q24). HIF-1 β est une protéine de 94kDa pour 789 AA (Figure 21) codée par le gène HIF-1 β constitué de 23 exons et localisé sur le chromosome 1 (1q21) [806, 807].

HIF-1 α et HIF-1 β comportent un domaine bHLH situé au niveau de la partie N-terminale (AA 17-70 pour HIF-1 α et AA 90-144 pour HIF-1 β) qui précède le domaine PAS. Le domaine PAS est divisé en 2 régions PAS-A (AA 106-156 pour HIF-1 α et AA 171-223 pour HIF-1 β) et PAS-B (AA 249-299 pour HIF-1 α et AA 359-410 pour HIF-1 β) séparées par un espaceur [808]. La région basique intervient dans la fixation et la spécificité de la liaison à

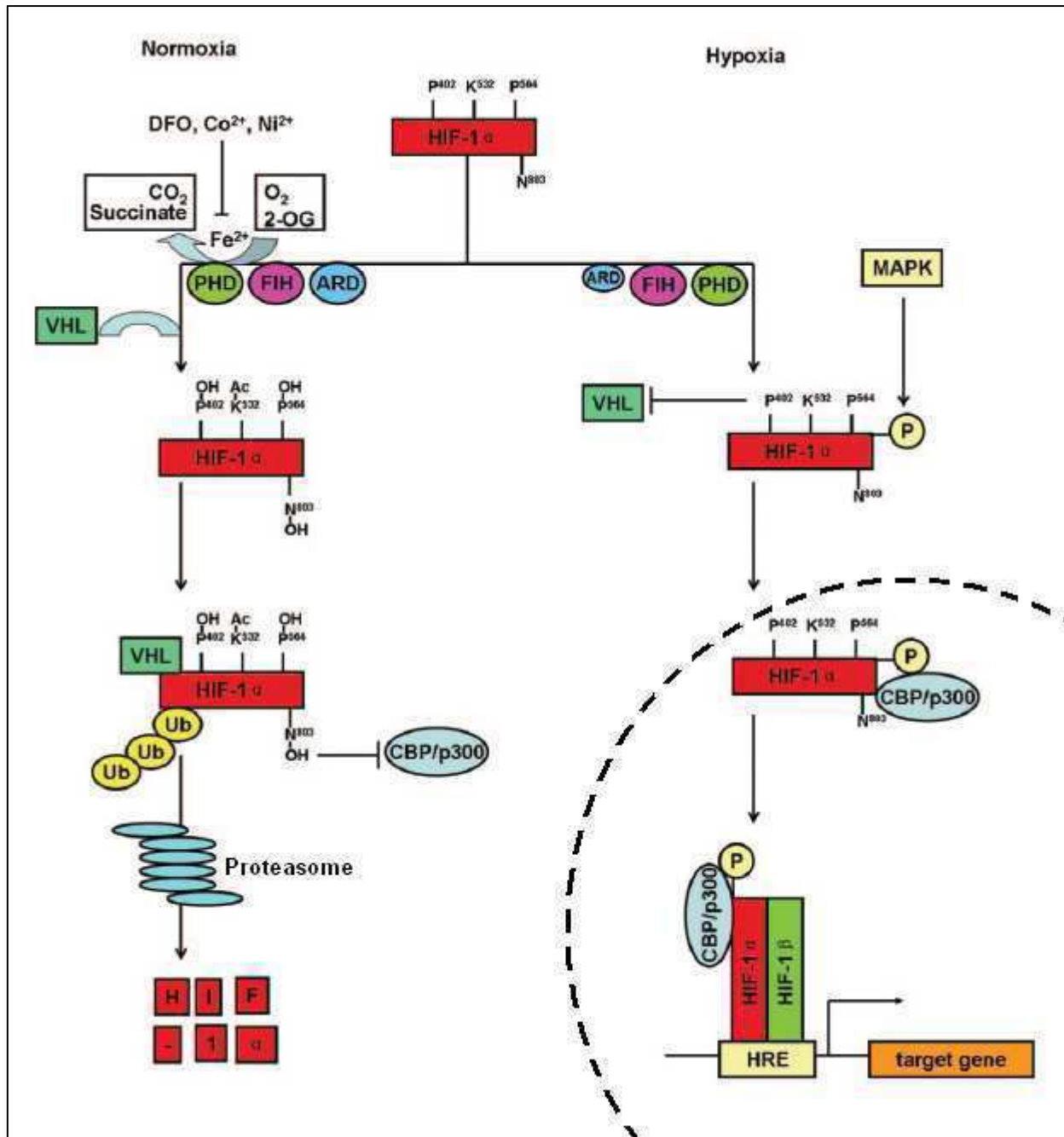


Figure 22 : Régulation oxygène-dépendante de la stabilité et de l'activité transcriptionnelle de HIF. D'après Wenger *et al.* [823]

l'ADN et les domaines HLH et PAS sont impliqués dans la dimérisation des deux sous-unités. La sous-unité alpha comporte également un domaine associé au domaine PAS vers l'extrémité C-terminale (PAC : PAS Associated C-terminal domain) jouant un rôle à la fois dans la liaison à l'ADN et la dimérisation avec la sous-unité β . La région C-terminale des HIF comporte également des domaines de régulation de l'activité transcriptionnelle [805]. HIF-1 α comporte 2 de ces domaines : NAD "N-terminal activation domain" (AA 531-575) et CAD "C-terminal activation domain" (AA 786-826) séparés par un domaine d'inhibition (ID) (AA 576-785) [809]. HIF-1 β comporte un unique domaine d'activation transcriptionnelle (TAD) (AA 756-789). De plus, HIF-1 α présente un domaine de dégradation dépendant de la tension en oxygène (oxygen-dependent degradation domain : ODD) qui chevauche le domaine NAD (AA 401-603). C'est ce domaine qui a uniquement été mis en évidence au niveau des sous-unités alpha qui est responsable de la modulation de leur stabilité en fonction des conditions d'oxygénation [810]. Et enfin, des séquences de localisation nucléaire (NLS) ont été identifiées, 2 au niveau de la sous-unité alpha NLS-N (AA 17-33) et NLS-C (AA 718-721) et une pour la sous-unité bêta (AA 39-61)

Mode d'action de HIF

L'induction de HIF en réponse à l'hypoxie est quasiment instantanée [811], et bien que la dénomination "hypoxia inducible factor" suggère une augmentation de l'expression de ce facteur de transcription en conditions hypoxiques, les ARN messagers codant les sous-unités HIF sont constitutivement exprimés dans la plupart des tissus. Au niveau protéique, HIF-1 β est stable par opposition à HIF-1 α qui est rapidement dégradé en conditions normoxiques avec un temps de demie-vie de l'ordre de 5 minutes [810, 812]. L'inductibilité des HIF réside donc dans le fait que la sous-unité alpha, en conditions normoxiques, est rapidement dégradée alors qu'en conditions hypoxiques elle est stabilisée (Figure 22).

En effet la stabilité de la protéine HIF-1 α est dépendante de son degré d'hydroxylation. En conditions normoxiques, HIF-1 α est hydroxylé par des hydroxylases oxygène-dépendantes (prolylhydroxylases (PHD) et factor inhibiting HIF (FIH)) dès sa sortie du noyau [813]. Ces résidus hydroxylés constituent des motifs de reconnaissance pour le complexe von Hippel Lindau/Elongine-C/Elongine-B/Culline-1/Rbx1/E2-3 ubiquitine ligase (pVHL) [814-816]. Ce complexe permet alors la polyubiquitinylation de HIF-1 α , l'orientant ainsi vers la voie de dégradation par le protéasome cytoplasmique [817].

En conditions hypoxiques, la sous-unité alpha n'est pas hydroxylée par les PHD et n'est plus reconnue par le complexe VHL. Elle est alors orientée vers le noyau par translocation nucléaire, grâce à ses séquences NLS. Au niveau nucléaire, les sous-unités alpha et bêta se dimérisent, ce complexe peut alors être stabilisé par des co-facteurs, tels que CBP/p300 (majoritairement), Heat Shock Protein 90 (HSP90), SRC-1, Ref-1 [818-821]. HIF ainsi stabilisé permet l'activation de la transcription de gènes cibles en se fixant, au niveau du promoteur, sur une séquence HRE (Hypoxia Response Element) [822]. La séquence HRE (5'-TACGTGCT-3') a été identifiée dans les promoteurs de plus d'une centaine de gènes dont l'expression est régulée par la tension en oxygène.

Régulation de HIF

Les mécanismes de régulation du complexe HIF se font à différents degrés et sont principalement ciblés sur la sous-unité alpha.

Tout d'abord au niveau transcriptionnel, bien que les HIF soient constitutivement exprimés, leur niveau d'expression est variable en fonction de différents paramètres (nature et intensité des stimuli, types cellulaires...).

La stabilité des ARN codant pour HIF est également une voie de régulation de son activité. L'existence naturelle d'ARN antisens de HIF (aHIF) a été mise en évidence [824, 825]. aHIF est capable de former un dimère avec l'ARN messager HIF entraînant ainsi sa dégradation par la voie du protéasome. Il a également été démontré que la séquence nucléotidique du gène aHIF comporte plusieurs HRE au sein de son promoteur. Ceci suggère fortement que aHIF est impliqué dans un mécanisme de rétro-contrôle négatif de l'expression de HIF [826].

HIF est également régulé au niveau de la stabilité de sa protéine. En effet la stabilité de la protéine HIF-1 α est dépendante de son degré d'hydroxylation, principalement de l'hydroxylation de 2 résidus proline hautement conservés (Pro 402 and Pro 564), localisés dans le domaine ODD [815, 816, 827]. En conditions normoxiques, HIF-1 α est hydroxylé au niveau de ces 2 résidus proline par des prolyl-hydroxylases (PHD1, 2 et 3), enzymes dont l'activité est liée à la présence d'oxygène moléculaire qu'elles utilisent comme co-facteur [828]. L'hydroxylation de ces résidus Pro permet la prise en charge de la protéine par le complexe pVHL et conduit à sa dégradation. L'hydroxylation d'autres résidus comme Ser 551, Thr 552, Leu 562 et Tyr 565 [815, 816, 829, 830] semble jouer un rôle important dans la dégradation de HIF α par la voie du protéasome. Cependant les mécanismes régissant ces processus ne restent que partiellement décrits aujourd'hui. En complément à cette régulation

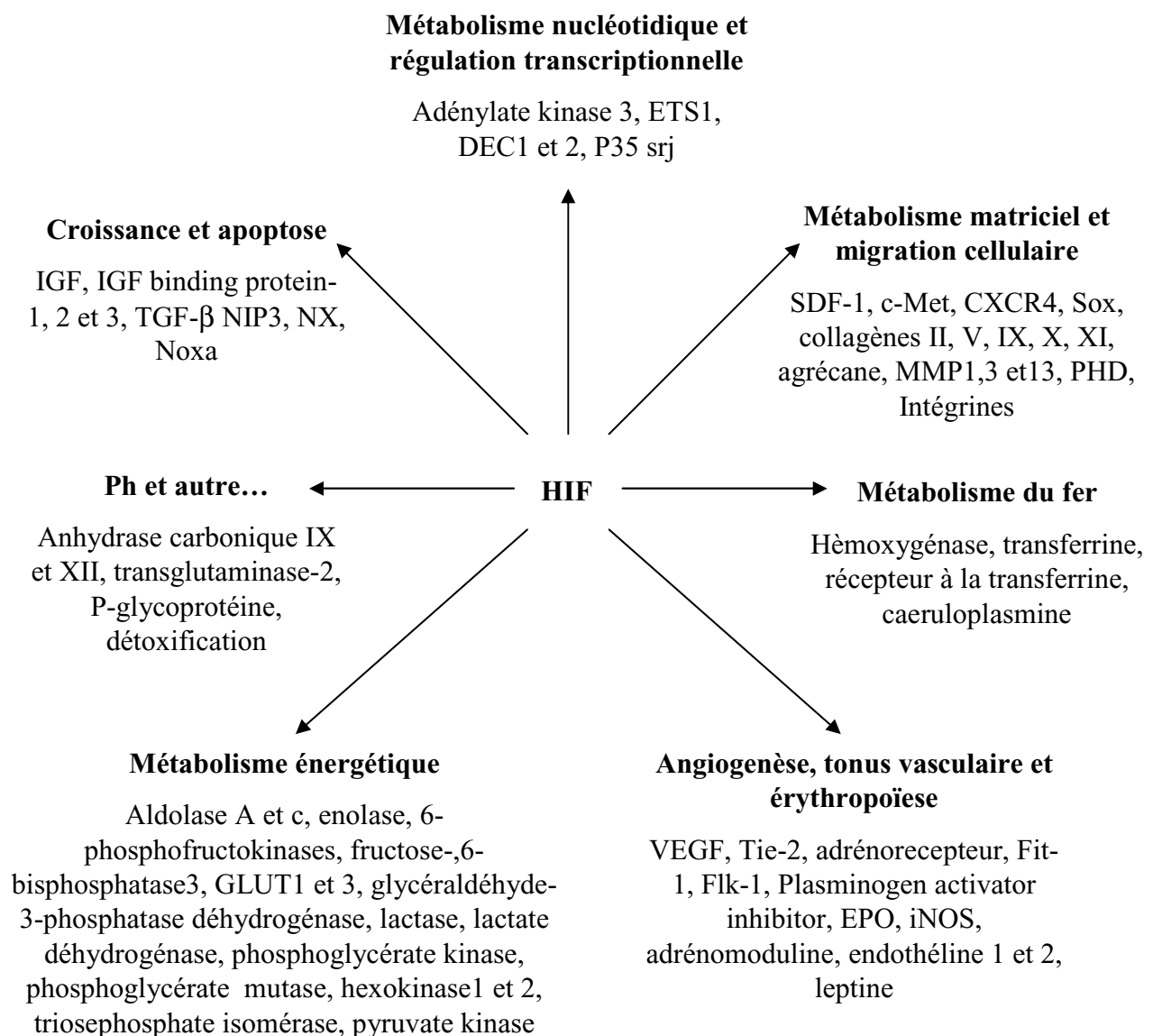


Figure 23 : Gènes et fonctions directement régulés par HIF. D'après Gaber *et al.* [804]

par les PHD, une acétyl transférase, ARD1 (arrest-defective 1) est responsable de l'acétylation du résidu Lys 532 favorisant l'interaction avec pVHL [831]. L'activité d'ARD1 n'est pas dépendante de la tension en oxygène, mais son niveau d'expression en termes d'ARN et de protéine est diminué sous conditions hypoxiques.

Certains co-facteurs interviennent en stabilisant et en co-activant le complexe HIF au niveau nucléaire. C'est le cas de CBP/p300 [818, 832], de SRC-1[819] Ref-1 [820] et HSP90 [821]. Au contraire, les facteurs RACK 1 [833, Liu, 2007 #2499] et SSAT1 ou 2 [834] par leur fixation au complexe HIF induisent sa dégradation par la voie du protéasome nucléaire, et ce, indépendamment du complexe pVHL.

La famille des enzymes FIH (factor inhibiting HIF) joue un rôle dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des HIF [835]. Ces enzymes, tout comme les PHD, utilisent l'oxygène moléculaire comme co-facteur et constituent donc le cœur du mécanisme de régulation vis-à-vis de la tension en oxygène. Par l'hydroxylation d'un résidu asparagine situé dans le domaine ID (Asp 803), les FIH inhibent la reconnaissance de HIF α par le complexe CBP/p300 [836-839]. L'hétérodimère HIF n'est alors plus stabilisé et ne peut donc plus exercer son activité de transcription.

En contrepartie, les histones déacétylases HDAC4 et 5 sont responsables de la phosphorylation de résidus thréonine en position 796 et 844 dans le CAD, ce qui protège le résidu Asp 803 de l'hydroxylation par FIH. Ces phosphorylations par HDAC4 et 5 permettent donc au complexe HIF de conserver une activité transcriptionnelle optimale et favorisent la fixation du co-activateur CBP/p300 [840, 841].

Rôles physiologiques de HIF

Les facteurs de transcription de la famille HIF (Hypoxia Inducible Factor) sont probablement les régulateurs les plus importants dans la réponse moléculaire à un stimulus hypoxique. HIF a été identifié pour la première fois en tant que complexe impliqué dans la stimulation de l'expression de l'érythropoïétine (EPO) [822]. Depuis, les implications des complexes HIF ont été répertoriées dans de nombreux processus physiologiques divers tels que la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire, de l'apoptose, l'érythropoïèse, de l'angiogenèse, du métabolisme du glucose, de la pression sanguine, le recrutement de précurseurs sur le site de lésé ... (Figure 23).

L'hypoxie semble également être un signal puissant de recrutement des cellules et particulièrement des cellules souches au niveau de sites ischémiques. Ce phénomène de

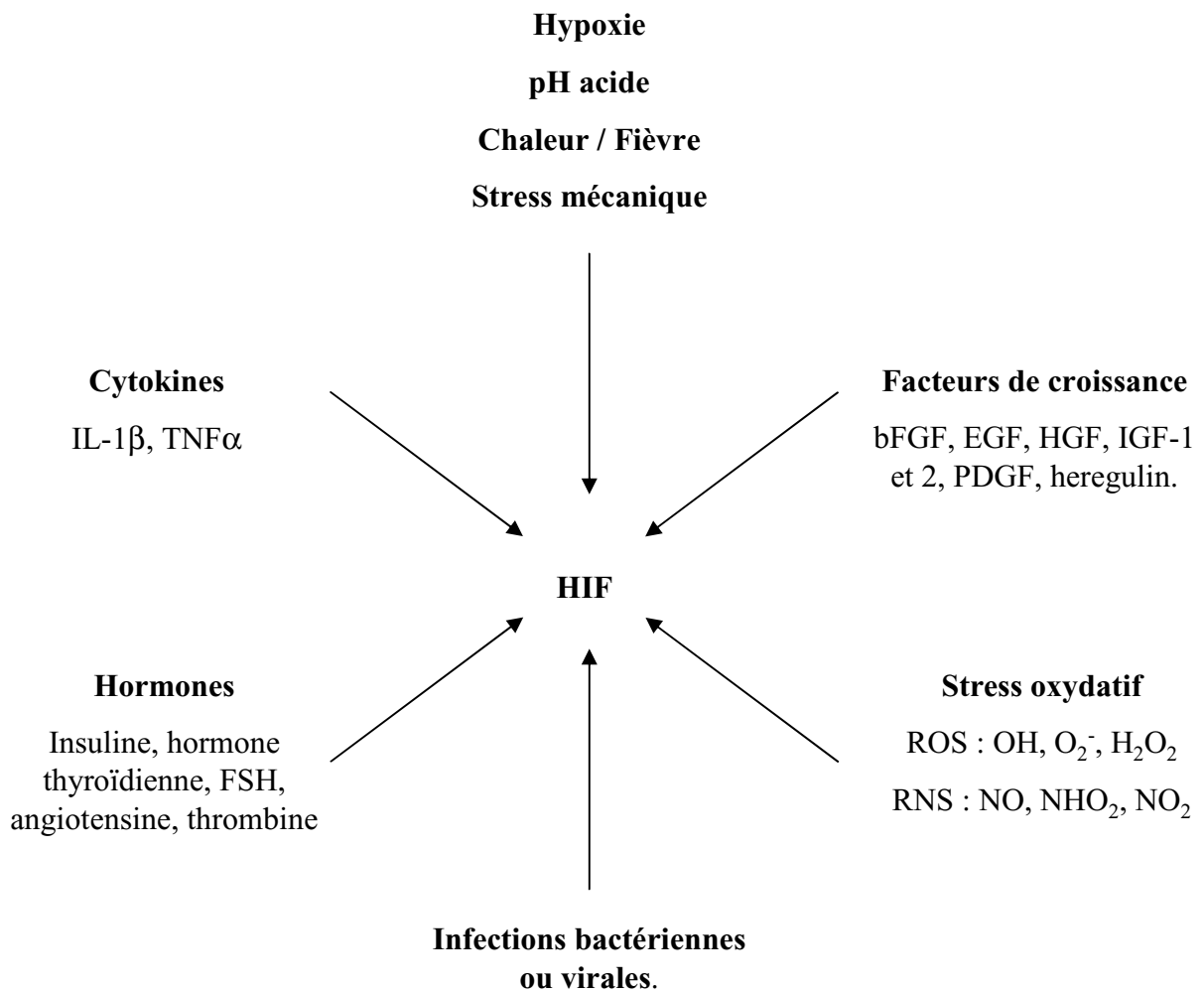


Figure 24 : Stimuli modulant l'activation de HIF. D'après Gaber *et al.* [804].

"homing" semble être dû à une augmentation locale de l'expression, par les cellules du tissu lésé, de chemokines telle que les CXCL10, CXCL12, CCL25 ou XCL1, sous le contrôle de HIF et conduisant au recrutement de CSM exprimant les récepteurs correspondants. [842 , 843 , 844, 845].

La diversité des réponses physiologiques impliquant HIF peut s'expliquer à différents niveaux. Premièrement, la nature du stimulus va influencer l'orientation de la réponse cellulaire. En effet, bien que l'hypoxie soit l'activateur majeur de HIF, d'autres facteurs tels les hormones, les phospholipides, certains facteurs de croissance, certaines cytokines (IL-1 β , TNF α), 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 (Figure 24).

Deuxièmement, la réponse va dépendre du type cellulaire impliqué [846] et de la nature des sous-unités constituant l'hétérodimère HIF. En fonction du type cellulaire les 3 types de sous-unités alpha et bêta ne sont pas exprimés dans les mêmes proportions et chacune des sous-unités alpha est capable de se dimériser avec l'ensemble des sous-unités bêta [807, 839]. L'expression de HIF-1 α est admise comme étant ubiquitaire, tandis que l'expression de HIF-2 α semble être beaucoup plus variable d'un type cellulaire à l'autre [847, 848]. HIF3 α , dont 6 variants issus d'épissage alternatif sont connus, semble plutôt impliqué dans la modulation de la réponse HIF en ayant une activité inhibitrice, l'un de ses transcrits a d'ailleurs été désigné IPAS, pour inhibitory PAS protein [849]. Troisièmement, la réponse à un stimulus implique également les PHD 1, 2 et 3. Tout comme HIF leur degré d'expression varie en fonction du tissu et de la nature du stimulus, il a été effectivement démontré que PHD1 seraient préférentiellement impliquée dans la réponse à des stimuli de nature hormonale alors que PHD2 et 3 dans le cas d'hypoxie prolongée [850]. Cependant il n'a pas été démontré, à ce jour, de site préférentiel d'hydroxylation entre Pro 402 et Pro 564 pour les 3 PHD [851]. En plus de la modulation de la réponse de HIF par les PHD, en termes de stabilité de la protéine, se superpose le niveau de régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF par FIH/HDAC4 et 5.

HIF dans la chondrogenèse

Le cartilage étant avasculaire, il se trouve physiologiquement en condition hypoxique (1 à 7% d'O₂). L'implication de HIF dans le métabolisme des chondrocytes prend donc ici tout son sens. Au-delà de la régulation énergétique, cette famille de facteurs de transcription a été démontrée comme essentielle à la chondrogenèse et particulièrement dans les phases d'arrêt de prolifération [852] et de différenciation des chondrocytes [853, 854]. Des données en ce sens, ont permis de constater que la stimulation de HIF, par une hypoxie à 5% d'O₂ ou par induction à l'aide de CoCl₂, favorisait la production de collagène de type II, d'agrécan via une augmentation de l'expression de Sox9, tout en diminuant l'expression des marqueurs de la dédifférenciation, notamment les collagènes de types I, III [855]. La vision "classique", de l'hypoxie comme facteur favorisant la chondrogenèse place HIF-1 α au centre des processus de régulation de la chondrogenèse. Cependant, d'après des données récentes, l'implication indéniable du facteur HIF-2 α remet en question cet ordre établi. En effet, il a été mis en évidence que l'expression des marqueurs chondrocytaires pourrait être dépendante de HIF-2 α via l'augmentation de la transcription de Sox9 [856-859]. Ces observations ont été confirmées par le fait qu'une exposition prolongée des chondrocytes à de faibles tensions en oxygène favorise la synthèse des PG (agrécan et versicane) et des collagènes de type II, IX et XI [860, 861].

De manière intéressante, il a été démontré que l'hypoxie joue un rôle important dans la prévention de l'hypertrophie des chondrocytes. Ce processus implique une réponse de HDAC4 oxygène-dépendante selon des mécanismes encore non élucidés permettant de moduler l'activité des HIF [346, 862]. Le phénomène de transition d'un phénotype chondrocytaire vers un phénotype hypertrophique semble être corrélé à une commutation de l'activité de transcription de HIF-1 α vers HIF-2 α [863-865]. Il a en effet été démontré que HIF-2 α est hautement exprimé dans les chondrocytes hypertrophiques [866] et certainement impliqué dans les processus cataboliques liés à l'arthrose [863-865].

L'hypoxie peut donc être considérée comme un facteur majeur du développement et de l'homéostasie du cartilage. L'ensemble de ces données suggère que HIF-1 α et HIF-2 α exercent des effets régulés de manière distincte selon des mécanismes qui restent à décrire.

Tableau V : Agents modulant l'activité de HIF

régulateur	voie/fonction impliquée	effet	références
Nickel	Substitution du fer Inhibition des PHD Diminution de l'expression de FIH et d'ARD1 Chélation de l'ascorbate intracellulaire Voie PI3K/Akt	activation HIF-1 α	[867-874]
Cobalt	Substitution du fer Diminution de l'expression de FIH et d'ARD1 Piégeage de l'ascorbate intracellulaire Voie PI3K	activation HIF-1 α	[869, 872, 875]
Arsenic	ROS Voies p38 MAPK	activation HIF-1 α	[879-878]
Chrome	ROS Voies p38 MAPK, PI3K/Akt	activation HIF-1 α	[876] [879]
Vanadate	AMP-activated protein kinase, PI3K/Akt	activation HIF-1 α	[879-880]
Desferrioxamine	Chélation du fer	activation HIF-1 α	[881, 882]
Insuline	PI3K	activation HIF-1 α	[883]
IL-1	PI3K	activation HIF-1 α	[883, 884]
IGF-1, IGF-2	ROS	activation HIF-1 α	[885]
serum de veau fœtal	ROS	activation HIF-1 α	[886]
Angiotensine II	ROS	activation HIF-1 α	[887]
NO	Inhibition des PHD MAPK, PI3K	activation HIF-1 α	[888, 889]
TGF	ROS	activation HIF-1 α	[890, 891]
Manganèse	Inhibition des PHD	activation HIF-1 α	[892, 893]
NO sous hypoxie	Inhibition de la consommation d'O ₂ au niveau mitochondrial Augmentation de la concentration de fer intracellulaire Activation des PHD	inhibition HIF-1 α	[894, 895]
Cadmium	Inhibition de la liaison de HIF à l'ADN Activation de la dégradation par le protéasome	inhibition HIF-1 α	[896]

Modèles d'activation et d'inhibition de HIF

Différents types d'hypoxie peuvent être simulés, d'une part en conditions hypobares et d'autre part en conditions normobares. L'hypoxie hypobare est due à une diminution de la pression atmosphérique conduisant à une diminution de la pression partielle des gaz qui composent l'air sans en changer leurs proportions. Ainsi en hypoxie hypobare la proportion en oxygène est toujours de 21% mais sa disponibilité est moindre, c'est typiquement le phénomène observé en altitude. Au contraire l'hypoxie normobare ne joue pas sur la pression partielle des gaz mais sur la modification de leurs proportions. Elle peut être simulée par exemple en augmentant la proportion d'azote dans l'air ou par piègeage de l'oxygène. Il existe également certains agents, principalement constitués de cations de métaux de transition, capables d'induire ou d'inhiber une réponse mimant l'hypoxie (Tableau V).

Récemment, des approches pharmacologiques, notamment dans le champ de la cancérologie se sont focalisées sur l'identification de molécules inhibitrices de la voie HIF afin d'empêcher la survie et la prolifération de cellules tumorales. Parmi ces actifs ont été identifiés l'acriflavine comme inhibiteur de la dimérisation des sous-unités HIF [897], l'antracycline comme inhibiteur de la liaison du complexe HIF à l'ADN [898] et la digoxine inhibant l'expression de HIF [899]. D'autres approches de biologie moléculaire, parmi lesquelles : l'ARN interférence visant HIF [900], les PHD [901, 902], FIH [903] ou l'inactivation des gènes HIF [904, 905] chez la souris, sont également développées dans le but de comprendre les mécanismes régissant les effets de l'hypoxie.

3.4.2.3 - Les contraintes mécaniques

Les contraintes mécaniques exercées sur l'articulation sont essentielles au développement et à l'homéostasie du cartilage articulaire. Dans le contexte physiologique, le cartilage articulaire est soumis à différents types de contraintes : compression, pression hydrostatique, tension et cisaillement [906]. Ces contraintes de différentes natures 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. Le cartilage articulaire étant avasculaire et alymphatique, les contraintes mécaniques sont le premier mode physiologique de diffusion des nutriments, de l'oxygène et d'évacuation des déchets cellulaires [907]. La compression exercée sur le cartilage permet l'exudation du liquide interstitiel et la décharge permet la pénétration des éléments nutritifs au sein de la matrice

Tableau VI : Caractéristiques des différents vecteurs utilisés pour le transfert de gènes. D'après Steinert *et al.* [921].

Vecteur	Description	Avantages	Inconvénients
ADN nu	ADN	Facile à produire Non-pathogène	Faible efficacité de transfection Expression transitoire du transgène (1 semaine) Inflammatoire
Liposomes	ADN plasmidique délivré dans des vésicules lipidiques qui fusionnent avec la membrane cellulaire.		
Autres	Injection d'ADN, Gene gun, électroporation, précipitation Ca/P		
Adénovirus	ADN double brin Capacité : 7,5kb	Infecte les cellules mitotiques et post-mitotiques Haute efficacité de transduction Haut niveau d'expression du transgène Usage clinique approuvé	Expression transitoire du transgène Immunogénicité Cytotoxicité
Virus adéno-associés	ADN simple brin Capacité : 4kb	Infecte les cellules mitotiques et post-mitotiques Pas de production de protéines virales Non-pathogène chez l'humain	Expression transitoire du transgène Efficacité de transduction modérée Difficile à produire Faible capacité
Herpes simplex	ADN double brin Capacité : 40kb	Infecte les cellules mitotiques et post-mitotiques Haute efficacité de transduction Haut niveau d'expression du transgène Grande capacité	Expression transitoire du transgène Production de protéines virales Immunogénicité Cytotoxicité
Virus spumeux	ARN Intégration au génome Capacité : 10-13kb	Grande capacité Pas de production de protéines virales Expression persistante du transgène	Risque de mutagenèse
Virus de la leucémie murine de Moloney	ARN Intégration au génome Capacité : 4-6kb	Pas de production de protéines virales Expression persistante du transgène	N'infecte que les cellules mitotiques Risque de mutagenèse
Lentivirus	ARN Intégration au génome Capacité : 4-6kb	Infecte les cellules mitotiques et post-mitotiques Haute efficacité de transduction Pas de production de protéines virales Expression persistante du transgène	Risque de mutagenèse

[11]. Il a été démontré *in vitro*, que la sollicitation mécanique d'explants de cartilage ou de cellules en culture stimulait la production des composants de la matrice, dans la mesure où celles-ci restent dans une gamme d'intensité et de fréquence physiologiques [908, 909].

3.4.3 - Les bioréacteurs

Les bioréacteurs représentent des systèmes de culture tridimensionnelle dynamiques. Ils ont été développés dans le but de préserver ou de promouvoir le phénotype chondrocytaire de cellules en culture ainsi que d'améliorer la structure et les propriétés des tissus générés [910]. Ces systèmes automatisés permettent 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 [911]. Les bioréacteurs permettent également l'application de contraintes mécaniques de différentes natures (compression cisaillement), mimant les conditions physiologiques [34]. Les bioréacteurs présentent également l'avantage de permettre la culture à grande échelle dans des conditions de grade clinique [912].

3.5 - La thérapie génique

La thérapie génique a pour objectif de modifier ou d'améliorer la fonction d'une cellule par transfert de gène, afin de délivrer, de manière contrôlée spatio-temporellement, une protéine d'intérêt. Dans le cadre de la réparation du cartilage, les gènes d'intérêt peuvent être sélectionnés sur la base de différents critères suivant la stratégie adoptée et la pathologie ciblée. Ces gènes d'intérêt peuvent avoir une implication dans la stimulation de la prolifération, dans la synthèse des composants de la matrice ou encore dans la modulation de l'inflammation. Les fonctions des protéines transgéniques peuvent inclure des facteurs de croissance comme par exemple le FGF-2 [913], le TGF- β [914, Shuler, 2000 #2594], les BMP [915] ou l'IGF-1 [916, 917], des facteurs de transcription comme le trio Sox [918, 919] ou brachyury [920], ou des récepteurs antagonistes de l'IL-1 (IL-1Ra) [921, 922]. Les gènes sélectionnés doivent être intégrés au sein de cellules adaptées à la physiologie du cartilage. Dans ce contexte, les chondrocytes et les CSM représentent des cellules candidates idéales.

Afin d'intégrer l'ADNc aux cellules, celui-ci doit être vectorisé par l'intermédiaire de vecteurs viraux ou par des liposomes [923] (Tableau VI). L'utilisation de vecteurs viraux

permet une délivrance efficace des acides nucléiques (~90% de transduction) en permettant le ciblage d'un type cellulaire donné. Il s'agit d'un vecteur de choix si la pathogénicité du virus peut être annihilée sans nuire au transfert de gène. Les vecteurs non viraux comme les liposomes présentent l'avantage d'être non pathogènes mais sont en revanche moins efficaces que les vecteurs viraux (~50% de transduction) [924].

Différentes techniques ont été mises en œuvre dans le cadre de transfert de gènes au niveau musculo-squelettique. Les cellules modifiées peuvent être administrées par voie systémique ou localement. L'administration systémique se fait par la voie sanguine et présente l'avantage de disséminer le vecteur dans tout l'organisme. Cette technique se heurte toutefois à certaines limites. La concentration du vecteur au niveau du tissu cible peut se trouver insuffisante pour obtenir un effet thérapeutique. De plus, un tissu non vascularisé comme le cartilage ne permet que peu l'application efficace d'une telle procédure. Deux techniques ont été développées pour la délivrance locale au niveau du cartilage articulaire : soit l'injection directe du vecteur dans l'articulation, soit la transplantation de cellules autologues génétiquement modifiées *ex vivo* [925].

L'utilisation de la thérapie génique en clinique nécessite une détermination des gènes candidats en fonction de leurs effets et du type cellulaire ciblé ainsi que de développer les techniques appropriées de transfert.

III - DONNEES EXPERIMENTALES

“Utilisation de cellules souches du tissu adipeux en ingénierie tissulaire du cartilage”

Article IV:

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.

C. Merceron, S. Portron, M. Masson, J. Lesoeur, B. H. Fellah, O. Gauthier, O. Geffroy, P. Weiss, J. Guicheux , C. Vinatier.

Cell Transplantation (2011) in press.

Article V:

Differential effects of hypoxia on the osteo-chondrogenic potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells.

C. Merceron, C. Vinatier, S. Portron, M. Masson, M. Gatius, L. Guigand, J. Amiaud, Y. Chérel, , P. Weiss and J. Guicheux.

American Journal of Physiology-Cell Physiology (2010) 2:355-364.

Article VI:

Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cells chondrogenesis by a chemically over-sulphated polysaccharide from marine origin: potential application for cartilage regenerative medicine.

C. Merceron, E. Rederstorff, S. Portron, C. Colombeix, M. Masson, J. Lesoeur, S. Sourice, S. Collic-Jouault, P. Weiss and J. Guicheux.

Stem cells (2011) soumis.

1 - Evaluation du potentiel chondrogénique des hCSTA associées à un hydrogel

1.1 - Problématique

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif composé d'un unique type cellulaire, le chondrocyte, enchâssé dans une abondante matrice dont il assure la synthèse et le renouvellement. Le cartilage articulaire est avasculaire et les cellules qui le composent sont peu prolifératives. Ces deux caractéristiques limitent ses capacités de réparation spontanée. Les lésions cartilagineuses articulaires sont par conséquent irréversibles et peuvent dégénérer vers des lésions de type arthrosique [377]. Dans ce contexte, l'ingénierie tissulaire appliquée au cartilage articulaire est considérée comme un outil potentiel pour la réparation des lésions cartilagineuses.

Les stratégies d'ingénierie tissulaire du cartilage utilisant les chondrocytes comme cellules réparatrices se heurtent à deux écueils majeurs : la nature des cellules réparatrices et l'utilisation d'une matrice adaptée à la culture, au transfert ainsi qu'au maintien de celles-ci sur le site lésé [1].

D'une part, le cartilage, de nature très faiblement cellularisée, par son prélèvement au niveau articulaire, costal ou nasal ne permet d'obtenir que de faibles quantités de chondrocyte. Une étape d'amplification s'impose donc. Malheureusement, les chondrocytes cumulent la particularité d'être très peu prolifératifs à celle de se différencier lorsqu'ils sont cultivés en monocouche [4, 926].

Dans ce contexte, la culture de chondrocytes ou de cellules chondrogéniques nécessite l'emploi de matrices tridimensionnelles répondant à des critères particuliers tels que : la biocompatibilité, l'injectabilité... afin de rendre possible le maintien du phénotype chondrocytaire ou l'engagement vers celui-ci aussi bien en conditions de culture *in vitro* que lors de l'implantation au niveau d'un site lésionnel.

C'est pourquoi la recherche s'oriente parallèlement vers l'utilisation de sources alternatives de cellules chondrogéniques et le développement de biomatériaux adaptés.

Parmi les cellules chondrogéniques potentielles, les CSM présentent certains avantages. En effet les critères les définissant mentionnent leur aptitude à proliférer de manière quasi-infinie en culture et à pouvoir se différencier vers le phénotype chondrocytaire [505]. Sur la base de ces critères, les CSM sont donc considérées avec un grand intérêt. Parmi les différentes sources de CSM potentielles 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 [730]. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à son utilisation dans le cadre d'une stratégie d'ingénierie tissulaire. En parallèle, de précédents travaux réalisés au laboratoire ont fait la preuve du concept de l'utilisation d'un hydrogel en tant que matrice tridimensionnelle et vecteur pour l'implantation de chondrocytes nasaux [467, 927, 928].

Cet hydrogel est constitué d'un polymère d'hydroxypropyl méthylcellulose silanisée (HPMC-Si) et présente les avantages d'être injectable, car il s'agit d'un liquide visqueux, capable, par addition d'un tampon spécifique, d'auto-réticuler *in situ*, c'est-à-dire d'établir des liaisons covalentes entre les différentes chaînes macromoléculaires [929-931].

Forts de ce constat, l'objectif de cette première étude expérimentale a donc été de déterminer les conditions de différenciation des cellules souches isolées du tissu adipeux humain (hCSTA) *in vitro* permettant la formation d'un tissu cartilagineux, en association avec l'HPMC-Si, en site sous cutané, chez la souris nude.

Nous nous sommes tout d'abord attachés à caractériser les cellules obtenues à partir du tissu adipeux, par l'étude de leur capacité à proliférer, à s'auto-renouveler, à exprimer un ensemble de marqueurs de surfaces décrit comme caractéristique des CSM et à se différencier vers les lignages adipo-, ostéo- et chondrogénique.

Les hCSTA ayant démontré leur potentiel chondrogénique dans un système de culture tridimensionnel en "pellet" ou culot, le second objectif de ce premier travail a donc été de valider l'utilisation de l'HPMC-Si comme matrice permettant la différenciation chondrogénique des hCSTA. Une approche au niveau transcriptionnel, par analyse PCR en temps réel, complétée par une approche histologique a permis de valider l'utilisation de l'HPMC-Si comme support tridimensionnel de la différenciation des hCSTA.

Dans le but d'une application d'ingénierie tissulaire, nous nous sommes trouvés confrontés au dilemme opposant l'efficacité de la différenciation chondrogénique à la faisabilité de la procédure d'implantation. En effet, la culture tridimensionnelle en pellet permet une différenciation chondrogénique optimisée mais induit des difficultés quant à la procédure d'association des cellules à l'hydrogel en vue de l'injection de ce biomatériau hybride. En revanche, l'efficacité de la culture en monocouche dans la différenciation chondrogénique reste toute relative mais est compensée par une facilité de mise en œuvre dans le contexte d'une potentielle application clinique.

L'objectif de cette première réalisation expérimentale est donc de valider l'utilisation de l'hydrogel d'HPMC-Si comme matrice tridimensionnelle et vecteur pour l'implantation de hCSTA. Pour parvenir à ce but, il est nécessaire de nous assurer que les hCSTA présentent les caractéristiques de cellules souches. De plus, il est indispensable que l'hydrogel d'HPMC-Si permette la différenciation chondrogénique des hCSTA. Et enfin, les conditions autorisant l'engagement des hCSTA vers le lignage chondrocytaire devront être déterminées. Cela afin de mettre en œuvre des paramètres de culture et un procédé d'association des cellules avec l'hydrogel d'HPMC-Si compatibles avec une procédure applicable à la thérapie du cartilage.

Article IV

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.

C. Merceron, S. Portron, M. Masson, J. Lesoeur, B. H. Fellah, O. Gauthier, O. Geffroy, P. Weiss, J. Guicheux and C. Vinatier.

Cell Transplantation (2011) in press.

Article IV : 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

RESUME :

Le cartilage articulaire est un tissu avasculaire constitué d'un unique type cellulaire, le chondrocyte responsable de la synthèse et du renouvellement d'une matrice abondante. Les lésions du cartilage articulaire sont, à long terme, irréversibles dans des conditions physiologiques. C'est pourquoi, l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses en association avec un hydrogel a été prise en considération pour la réparation du cartilage.

Cette étude vise à étudier l'influence des conditions de différenciation chondrogénique des cellules souches dérivées du tissu adipeux humain (hCSTA) *in vitro* sur la formation de cartilage *in vivo* en association avec un hydrogel auto-réticulant à base de cellulose (HPMC-Si).

Les hCSTA ont été caractérisées pour leur prolifération, l'expression de leurs marqueurs de surface et leur multipotence. Le potentiel de différenciation chondrogénique des hCSTA cultivées au sein de l'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* en PCR en temps réel. Des colorations au bleu alcian et immunomarquages pour le collagène de type II ont également été réalisés.

Afin de déterminer si les hCSTA chondrogéniquement différenciées, *in vitro*, peuvent permettre la formation de cartilage *in vivo*, des cellules différenciées en culture monocouche ou en culture tridimensionnelle en pellets ont été associées à l'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 hCSTA sont capables de proliférer et de s'auto-renouveler.

Les hCSTA expriment également les marqueurs de surface typiques des cellules souches 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'HPMC-Si permet la différenciation chondrogénique des hCSTA en présence de milieu inductif, 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 des hCSTA (monocouche ou pellet), elles ont la capacité de former, *in vivo*, un tissu cartilagineux comme l'indique la présence de glycosaminoglycanes sulfatés et de collagène de type II.

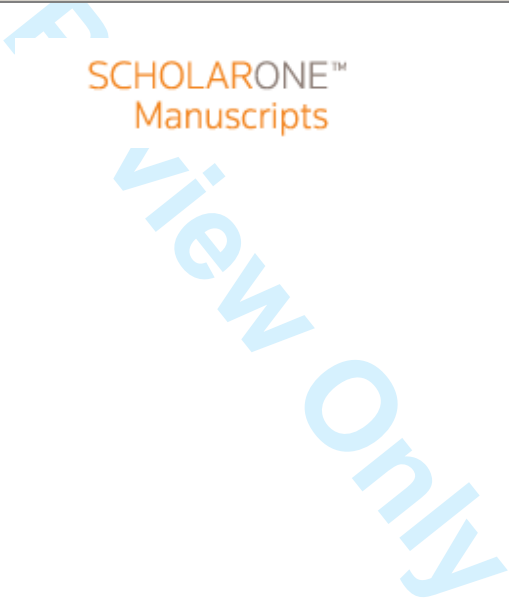
Cette étude suggère qu'*in vitro*, une induction de la différenciation chondrogénique en monocouche est suffisante pour obtenir la formation de tissu cartilagineux *in vivo*. L'utilisation combinée de l'HPMC-Si aux hCSTA autologues pourrait ainsi représenter un outil potentiellement intéressant en médecine régénératrice du cartilage.

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

Journal:	<i>Cell Transplantation</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Merceron, Christophe; INSERM U791, LIOAD, STEP group Portron, Sophie; INSERM U791, LIOAD, STEP group Masson, Martial; INSERM U791, LIOAD, STEP group Lesoeur, Julie; INSERM U791, LIOAD, STEP group Fellah, Borhane; INSERM U791, LIOAD, STEP group; National Veterinary School of nantes, ONIRIS, experimental surgery CRIP Gauthier, Olivier; INSERM U791, LIOAD, STEP group; National Veterinary School of nantes, ONIRIS, experimental surgery CRIP Geffroy, Olivier; INSERM U791, LIOAD, STEP group; National Veterinary School of nantes, ONIRIS, equine surgery Weiss, Pierre; INSERM U791, LIOAD, STEP group Guicheux, Jérôme; INSERM U791, LIOAD, STEP group Vinatier, Claire; INSERM U791, LIOAD, STEP group
Keywords:	tissue engineering, cartilage, human adipose-derived stem cells , hydrogels, chondrogenic differentiation
Abstract:	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 (hATSC) on in vivo cartilage formation when associated with a cellulose-based self-setting hydrogel (Si-HPMC). hATSC were characterized for their proliferation, surface marker expression and multipotency. The in vitro chondrogenic potential of hATSC cultured within Si-HPMC in control or chondrogenic medium was evaluated by measuring COL2A1 and ACAN expression by real time PCR. Alcian blue and type II collagen stainings were also performed. To determine whether in vitro chondrogenically-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	<p>differentiated hATSC may give rise to cartilage <i>in vivo</i>, 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 stainings.</p> <p>Our data demonstrate that hATSC exhibited proliferation and self-renewal. hATSC also expressed typical stem cell surface markers and were able to differentiate towards the adipo- osteo- and chondrogenic lineages. Real time-PCR and histological analysis indicated that Si-HPMC enabled chondrogenic differentiation of hATSC in inductive medium, as demonstrated by increased expression of chondrogenic markers. In addition, histological analysis of implants showed that chondrogenically-differentiated hATSC (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 <i>in vitro</i> induction of hATSC in 2D was sufficient to obtain cartilaginous tissue formation <i>in vivo</i>. Si-HPMC associated with autologous hATSC could thus be a significant tool for regenerative medicine in the context of cartilage damage.</p>



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

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.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Christophe Merceron^{1,2}, Sophie Portron^{1,2}, Martial Masson^{1,2}, Julie Lesoeur^{1,2}, Borhane

Hakim Fellah^{1,2,3,5}, Olivier Gauthier^{1,2,3}, Olivier Geffroy^{1,2,4}, Pierre Weiss^{1,2}, Jérôme

Guicheux^{1,2*,#}, Claire Vinatier^{1,2,5 #}.

Equally contributing authors

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 Physiopathologie", Faculté de chirurgie dentaire, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France.

² PRES-UNAM, UFR Odontologie, Université de Nantes, France.

³ Ecole Nationale vétérinaire de Nantes (ONIRIS), Service de chirurgie expérimentale (CRIP), Atlanpôle – La Chantrerie, BP40706, 44307 Nantes Cedex 3, France

⁴ Ecole Nationale vétérinaire de Nantes (ONIRIS), service de chirurgie équine, Atlanpôle – La Chantrerie, BP40706, 44307 Nantes Cedex 3, France

⁵ Graftys SA - Eiffel Park - Bâtiment D - 415, rue Claude Nicolas Ledoux
Pôle d'Activités d'Aix en Provence - 13 858 Aix en Provence Cedex 3, France.

Running title

Optimizing cell culture for engineering cartilage

*Corresponding author :

Prof. Jérôme Guicheux, PhD

INSERM U 791, Laboratoire d'ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire (LIOAD).

Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France

Phone : +33 240412919 ; Fax : +33 240083712 ; e-mail : jerome.guicheux@inserm.fr

Abstract

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 (hATSC) on in vivo cartilage formation when associated with a cellulose-based self-setting hydrogel (Si-HPMC).

hATSC were characterized for their proliferation, surface marker expression and multipotency. The in vitro chondrogenic potential of hATSC cultured within Si-HPMC in control or chondrogenic medium was evaluated by measuring COL2A1 and ACAN expression by real time PCR. Alcian blue and type II collagen stainings were also performed. To determine whether in vitro chondrogenically-differentiated hATSC 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 stainings.

Our data demonstrate that hATSC exhibited proliferation and self-renewal. hATSC also expressed typical stem cell surface markers and were able to differentiate towards the adipose- and chondrogenic lineages. Real time-PCR and histological analysis indicated that Si-HPMC enabled chondrogenic differentiation of hATSC in inductive medium, as demonstrated by increased expression of chondrogenic markers. In addition, histological analysis of implants showed that chondrogenically-differentiated hATSC (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 hATSC in 2D was sufficient to obtain cartilaginous tissue formation in vivo. Si-

1
2
3 HPMC associated with autologous hATSC could thus be a significant tool for regenerative
4
5
6 medicine in the context of cartilage damage.
7
8
9

10 **Keywords**

11
12 tissue engineering, cartilage, hydrogel, human adipose-derived stem cells, chondrogenic
13
14
15 differentiation.
16
17
18

19 **Introduction**

20
21
22 Articular cartilage (AC) is a highly specialized connective tissue that covers the end of bone
23
24 and forms the smooth surface on joints. It is composed of chondrocytes, a unique cell type
25
26 responsible for an abundant extra cellular matrix (ECM) synthesis and maintenance (13). This
27
28 matrix is composed of collagens and proteoglycans, mainly type II, IX and XI collagens and
29
30 aggrecan (1,22). The collagen network gives AC its shape and strength, while proteoglycans
31
32 contribute to hydrophilicity and resistance to mechanical stress.
33
34

35
36 AC is an avascular and aneural tissue (23,42) and as a consequence, damaged or degenerative
37
38 AC never heals spontaneously under normal circumstances. Therefore, damage to the articular
39
40 surface is irreversible and may lead to long-term joint degeneration.
41
42

43
44 Surgical treatments such as subchondral drilling or autologous periosteum (32),
45
46 perichondrium (10) and osteochondral (28) tissue transplants were initially considered in
47
48 early studies. However, none of these techniques resulted in a complete regeneration of native
49
50 cartilage (20,23,36). Consequently, the development of cell-based therapies for the
51
52 regeneration of AC has recently been contemplated (49). Among the various cell-based
53
54 therapies that have been investigated, autologous chondrocyte transplantation (ACT) (11) is
55
56 currently the only one that is FDA-approved. This technique, however, has significant
57
58 limitations such as donor site morbidity and the dedifferentiation of chondrocytes towards a
59
60

1
2
3 fibroblastic phenotype in monolayer culture (7). Consequently, this invasive surgery
4
5 ultimately leads to the formation of fibrous transitory cartilage which is biochemically and
6
7 biomechanically inferior to healthy articular cartilage. For this reason, much research has
8
9 focused on finding alternative sources of cells for cartilage repair. This research has led to the
10
11 identification of autologous mesenchymal stem cells (MSC) as candidate cells for the
12
13 regeneration of tissues or organs. Their self-renewal, long-term viability and multilineage
14
15 differentiation potential make them particularly suitable. Adult MSC were initially isolated
16
17 from bone marrow (4,26,31) and characterized for their ability to proliferate in culture and to
18
19 differentiate into a wide variety of cell types in response to the appropriate culture system
20
21 (30). However, bone marrow sampling is an uncomfortable and painful procedure and the
22
23 heterogeneity of the sample, which contains both hematopoietic and mesenchymal stem cells,
24
25 reduces the number of MSC obtained. Adipose tissue, like bone marrow, derives from the
26
27 embryonic mesenchyme and contains multipotent cells (54). This tissue type has the
28
29 advantage of being obtained under local anaesthesia with relatively little discomfort and less
30
31 donor site morbidity. It also contains MSC in larger numbers than in bone marrow (25).
32
33 Human adipose-derived stem cells (hATSC) have also been shown to have multilineage
34
35 potential, forming bone, cartilage and fat (3,53). hATSC therefore provide a promising
36
37 alternative to chondrocytes and bone marrow MSC for cartilage tissue engineering (21,44).
38
39

40
41 Tissue engineering strategies combining environmental factors and biomaterials to induce the
42
43 commitment of MSC to a chondrogenic phenotype show considerable promise as a means of
44
45 regenerating cartilage (33). Three-dimensional cultures within biomaterials are known to
46
47 provide a suitable environment for the induction and maintenance of the chondrogenic
48
49 phenotype (14,15,49,50). To date, various biomaterials have been evaluated for cartilage
50
51 repair, including protein-based, polysaccharide-based and synthetic matrices (23).
52
53 Unfortunately, some of these have been reported to induce inflammatory responses in vivo.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Within this context, we have developed a self-setting hydrogel consisting of silanized
4 hydroxypropylmethylcellulose (Si-HPMC) (8). Si-HPMC hydrogel has previously been
5 shown to stimulate the chondrogenic potential of chondrocytes both in vitro in 3D culture and
6 in vivo (45,47,48).
7
8
9

10
11
12 Given these data, we became interested in the potential breakthrough that the association of
13 hATSC and Si-HPMC could make in the development of biomaterial-assisted cell therapy for
14 cartilage repair.
15
16
17
18

19
20 This study was therefore aimed at investigating the influence of the in vitro chondrogenic
21 differentiation conditions of hATSC on in vivo cartilage formation when associated with Si-
22 HPMC hydrogel. We first characterized MSC isolated from human adipose tissue for their
23 propensity to self-renew, to express cell surface markers and to differentiate into adipogenic,
24 osteogenic and chondrogenic lineages. Next, we evaluated the in vitro chondrogenic potential
25 of hATSC cultured within Si-HPMC hydrogel. To conclude, we investigated the ability of a
26 hybrid construct combining hATSC and Si-HPMC hydrogel to form neocartilage in vivo. To
27 this end, hATSC were pre-differentiated in vitro in monolayers or pellets prior to injection
28 with Si-HPMC into subcutaneous pockets in nude mice.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 **Materials and methods**

44 **Materials**

45
46 Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) E4M1 was purchased from Colorcon-Dow chemical
47 (Bougival, France). Glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) was obtained from Acros
48 (Geel, Belgium). Cell culture plastic wares were purchased from Corning BV (Schipol-Rijk,
49 The Netherlands). Hank's Balanced Sodium Salt (HBSS), Dulbecco's Modified Eagle
50 Medium high glucose (4.5g/L) (DMEM), phosphate buffered salt (PBS),
51 penicillin/streptomycin, trypsin/EDTA (0.05%/0.53mM), L-glutamine and superscript III kit
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 were obtained from Invitrogen Corporation (Paisley, UK). HEPES, Collagenase crude type I
4
5 A, red blood cell lysis buffer, trypan blue, sodium L-ascorbate, vitamin D₃, ITS media
6
7 supplement, dexamethasone, 1-methyl-3-isobutylxanthine (IBMX), indomethacin, crystal
8
9 violet, alizarin red S, alcian blue and oil red O were purchased from Sigma-Aldrich (St.
10
11 Louis, MO). Rosiglitazone was obtained from Cayman chemical (Ann Arbor MI). Brilliant®
12
13 SYBR® Green Master Mix was obtained from Stratagene (La Jolla, CA). PCR primers were
14
15 synthesized by MWG Biotech (Ebersberg, Germany). Fetal calf serum (FCS) was purchased
16
17 from Dominique Dutscher (Brumath, France). Monoclonal antibody directed against human
18
19 type II collagen was purchased from MP biomedical (Solon, OH). Beta-glycerolphosphate
20
21 was obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Anti-human CD29 and CD105 FITC-
22
23 conjugated antibodies and CD44, CD, 49d, CD90, CD34 and CD45 PE-conjugated antibodies
24
25 were obtained from Becton Dickinson (Franklin Lake, NJ). TGF-β1 was obtained from
26
27 PeproTech Inc. (London, UK). Horseradish peroxide-conjugated streptavidin (STREPTA
28
29 PER) was obtained from Dako (Glostrup, Denmark). An RNeasy micro kit was purchased
30
31 from Qiagen (Courtaboeuf, France). All other chemicals were obtained from standard
32
33 laboratory suppliers and were of the highest purity available.
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 **Characterization of human ATSC**

44 *Cell isolation*

45
46
47 hATSC were isolated by collagenase digestion of lipoaspirates obtained from 3 different
48
49 patients undergoing liposuction and who had given their informed consent. All protocols were
50
51 approved by the local ethical committee. Briefly and as previously described (19,34),
52
53 lipoaspirates were washed extensively with HBSS to remove debris. Washed lipoaspirates
54
55 were treated with collagenase (0.025%) in HBSS for 1 hour at 37°C with gentle agitation. The
56
57 collagenase treatment was inactivated by adding an equal volume of DMEM containing 1%
58
59
60

1
2
3 penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine and 10% FCS (control medium). The digested
4
5 product was then centrifuged at 250 x g for 5 min to separate adipocytes from stromal cells.
6
7 The supernatant was removed and cells were re-suspended in the control medium and filtered
8
9 through a 70µm nylon mesh filter. The filtrate was centrifuged and cells re-suspended in red
10
11 blood cell lysis buffer. The lysis reaction was stopped by adding control medium. The
12
13 suspension was centrifuged and cells were finally re-suspended in control medium and plated
14
15 at 5×10^4 cells/cm² in 75cm² culture flasks. Cells were incubated at 37°C in a humidified
16
17 atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air and the culture medium was replaced 24 hours
18
19 after seeding to remove non adherent cells. Thereafter, the culture medium was renewed every
20
21 2-3 days. To prevent spontaneous differentiation, hATSC primary cultures (P0) were grown
22
23 to 90% confluence and then detached from the cell culture flask using trypsin/EDTA. For all
24
25 subsequent experiments hATSC were used at passage 2.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 *Proliferation assay*

37
38
39 hATSC were plated at a density of 1×10^4 cells/cm² in 24-well plates and maintained in control
40
41 medium. Cells were detached daily with trypsin/EDTA and counted using trypan blue
42
43 exclusion dye. hATSC from P0 to P3 were monitored over a 14-day period for each passage.
44
45 Results were expressed as doubling time. Cell doubling time (DT) and cell doubling number
46
47 (CD) were calculated from counts (N_f : final cell number, N_i : initial cell number) and cell
48
49 culture time (CT) according to the following 2 formulae:
50
51
52

$$53 \quad CD = \ln(N_f / N_i) / \ln(2)$$

$$54 \quad DT = CT / CD$$

55 56 57 58 59 60 *Clonogenic assay for fibroblastoid-like colony formation (CFU-F)*

1
2
3 hATSC were plated at a density of 10 cells/cm² in 100mm Petri dishes and cultured in the
4
5 presence of control medium. After 14 days, cells were rinsed with pre-warmed PBS, fixed and
6
7 stained at room temperature with 0.5% crystal violet in methanol for 30 min and afterwards
8
9 gently rinsed with PBS. Colonies were counted using a phase contrast light microscope and
10
11 aggregates of >50 stained hATSC were considered as positive for CFU-F (38). Results were
12
13 expressed as the percentage of cells able to form colonies.
14
15

16 17 18 *Flow cytometry*

19
20 hATSC (from P0 to P2) were characterized by flow cytometry using anti-human CD29 and
21
22 CD105 FITC-conjugated antibodies and anti-human CD44, CD 49d, CD90, CD34 and CD45
23
24 PE-conjugated antibodies (34). The adherent hATSC were detached using trypsin/EDTA,
25
26 centrifuged for 1 min at 1,200 x g, and re-suspended in PBS/BSA (1%)/ sodium azide (5%).
27
28 Aliquots containing 2x10⁵ hATSC were incubated with antibodies for 15 min at 4°C. The
29
30 suspended hATSC were washed and then analyzed using a FACSCalibur fluorescence-
31
32 activated cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ). For each sample, 10,000 events
33
34 were acquired and analyzed using CELLQUEST software. Results were expressed as the
35
36 percentage of positive cells compared with the isotype-matched negative control antibodies
37
38 on histogram plots.
39
40
41
42
43
44

45 46 47 **Multipotent cell differentiation assay**

48
49 For the in vitro adipogenic differentiation of hATSC, cells were seeded at a density of 3x10⁴
50
51 cells/cm² in 6-well plates and cultured either in the presence of control or adipogenic medium
52
53 for 14 days. The adipogenic medium consisted of the control medium supplemented with 1
54
55 μM dexamethasone, 0.5 mM IBMX, 200μM indomethacin, 10 μg/mL insulin, 10 μg/mL
56
57 transferin, 10 ng/mL sodium selenite and 5 μM rosiglitazone. hATSC were maintained at
58
59
60

1
2
3 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂ and 95% air). Media were changed every 2-3
4
5 days. Adipogenesis of hATSC was assessed by staining cells with Oil Red O for the lipid
6
7 droplet detection. hATSC cultured as described above were washed with ice-cold PBS and
8
9 fixed in 10% formalin successively for 5 min and one hour with fresh formalin at room
10
11 temperature. The formalin was then discarded and the wells rinsed with 60% isopropanol.
12
13 Once the wells had completely dried, 0.35% Oil Red O solution in 60% isopropanol was
14
15 added for 10 min. Stained cells were extensively washed with deionised water to remove any
16
17 non-specific staining. Samples were visualized using a light microscope (Zeiss Axioplan 2,
18
19 Göttingen, Germany) with red staining indicating the presence of lipid droplets.
20
21
22
23

24 For the in vitro osteogenic differentiation of hATSC, cells were seeded at a density of 1×10^4
25
26 cells/cm² in 6-well plates and cultured either in the presence of control or osteogenic medium
27
28 for 28 days, as previously described (34). The osteogenic medium was composed of the
29
30 control medium supplemented with 10 mM β-glycerophosphate, 50 μM Sodium L-ascorbate
31
32 and 10nM Vitamin D₃. hATSC were maintained at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂
33
34 and 95% air). Media were changed every 2-3 days. Osteogenesis was evaluated by the
35
36 deposition of calcified matrix that was detected using Alizarin Red S staining as previously
37
38 described (34). Briefly, hATSC cultured as described above were washed with cold PBS and
39
40 stained with 2% Alizarin Red S solution for 2 min. Stained samples were extensively washed
41
42 with deionised water to remove non-specific staining. Samples were visualized using a light
43
44 microscope with red staining indicating the presence of calcium deposits.
45
46
47
48
49

50 For the in vitro chondrogenic differentiation of hATSC, 5×10^5 cells were placed into a 15 mL
51
52 polypropylene tube containing 1mL of control medium, as previously reported (34). They
53
54 were then centrifuged for 5 min at 250 x g. The tubes were fitted with vented caps to permit
55
56 gas exchange, and the cell pellets were maintained at 37°C in a humidified atmosphere
57
58 containing 5% CO₂ and 95% air. After 24 hours, pellets of hATSC were divided into 2
59
60

1
2
3 experimental groups and cultured either in the presence of control (CT) or chondrogenic (CH)
4
5 medium. The chondrogenic medium was composed of serum-free control medium
6
7 supplemented with 1% L-glutamine, 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin, 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ transferin, 6.25 ng/mL
8
9 sodium selenite (ITS), 50 nM sodium L-ascorbate, 10^{-8} M dexamethasone and 10 ng/mL TGF-
10
11 β 1. Culture media were changed every 2-3 days for 28 days (12).
12
13

14
15 Chondrogenesis was evaluated by the production of sulphated glycosaminoglycans (GAG).
16
17 GAG production was investigated on pellets by alcian blue staining. Pellets were washed with
18
19 ice-cold PBS and fixed for 20 min in 100% ethanol. Pellets were then stained at room
20
21 temperature with 0.1% alcian blue solution in 0.1M HCl. After overnight incubation, the
22
23 solution was discarded and the pellets rinsed with 0.1M HCl to eliminate non-specific
24
25 staining. Samples were visualized using a stereomicroscope (Leica MZ6, Wetzlar, Germany).
26
27
28
29 Alcian blue staining indicated the presence of sulphated GAG.
30
31
32
33

34 **Three dimensional chondrogenic differentiation of hATSC into Si-HPMC hydrogel**

35 *Preparation of Si-HPMC hydrogel*

36
37
38 As previously described, the synthesis of Si-HPMC was performed by grafting 14.24% of 3-
39
40 glycidoxypropyltrimethoxysilane onto E4M1 in heterogeneous medium (9). Si- HPMC
41
42 powder (3% w/v) was solubilised in 0.2M NaOH under constant stirring for 48 h. The
43
44 solution was then sterilized by steam (121°C, 20 min). To allow the formation of a reticulated
45
46 hydrogel, the solution was finally mixed with 0.5 volume of 0.26M HEPES buffer.
47
48
49
50
51
52
53

54 *Culture of hATSC in Si-HPMC*

55
56 As previously described hATSC were collected and gently mixed with Si-HPMC hydrogel,
57
58 prepared (47) at a density of 2×10^6 cells/mL of hydrogel. The hATSC/Si-HPMC mixture
59
60

1
2
3 (1mL) was seeded in 12-well plates and incubated at 37°C and 5%CO₂. After a 2 hour-
4
5 incubation, control medium was added. After 24 hours, hATSC/Si-HPMC constructs were
6
7 separated into 2 experimental groups and cultured either in the presence of control (CT) or
8
9 chondrogenic (CH) medium. hATSC were maintained at 37°C in a humidified atmosphere
10
11 (5% CO₂ and 95% air) for 21 days. Media were changed every 2-3 days.
12
13
14
15
16
17
18

19 *Analysis of the chondrogenic differentiation of hATSC*

20
21
22 For real-time PCR analysis, total RNA was extracted from the construct samples using an
23
24 RNeasy micro kit in accordance with the manufacturer's instructions. After DNase I
25
26 digestion, RNA was quantified using a UV-spectrophotometer (Nanodrop ND-1000, Labtech,
27
28 Palaiseau, France) and the quality was determined with the Agilent Bioanalyser 2100 system.
29
30 One microgram of RNA per sample was reverse-transcribed using the superscript III kit in a
31
32 total volume of 20µL. Complementary DNA (cDNA) was amplified in a total volume of
33
34 25µL PCR reaction mix containing 12.5 µL of Brilliant[®] SYBR[®] Green Master Mix (1X) and
35
36 30nM of SYBR green reference dye. The sequence and concentration of each primer set are
37
38 provided in Table 1. The real-time polymerase chain reaction was carried out in a MX3000P[®]
39
40 real-time PCR system (Stratagene) under the following conditions: 10min at 95°C followed
41
42 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
43
44 each primer set was confirmed with standard curves of cycle threshold (Ct) values versus
45
46 serial dilution of total RNA and melting profile evaluation. Cycle Thresholds were
47
48 normalized to β-actin to control for cDNA quantification differences. Results were reported as
49
50 relative expression levels.
51
52
53
54
55
56

57 For histological and immunohistological analysis, construct samples were fixed in 10%
58
59 formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections (5 µm thick) were de-paraffinized using
60

1
2
3 toluene, rehydrated through a graded series of ethanol, and rinsed in distilled water. Tissue
4
5 sections were stained with alcian blue and immunostained for type II collagen as previously
6
7 described (34). Human nasal cartilage sections were used as a positive control. As a negative
8
9 control, sections were processed using identical protocols, but omitting the primary antibody.
10
11 Sections were then visualized using a light microscope with immunopositive areas exhibiting
12
13 brown staining.
14
15
16
17
18
19

20 **In vivo chondrogenic potential of hATSC**

21
22 To investigate whether constructs associating Si-HPMC and hATSC enable the formation of a
23
24 cartilaginous tissue *in vivo*, we implanted constructs into subcutaneous pockets of 1-month-
25
26 old nude mice (Swiss nude mice, Charles River, L'Arbresle, France). hATSC were cultured in
27
28 monolayers (10 000 cells/cm²) (2D) or in pellets (3D) in the presence of control (CT) or
29
30 chondrogenic (CH) medium for 3 weeks. At the end of the culture period, cells or pellets were
31
32 histologically processed for alcian blue staining. Samples were also processed for transcript
33
34 analysis by real-time PCR as described above.
35
36
37

38
39 For implantation into nude mice, human ATSC cultured for 3 weeks in monolayers (10 000
40
41 cells/cm²) (2D) or in pellets (3D) in the presence of control (CT) or chondrogenic (CH)
42
43 medium were individualized and collected by trypsin/EDTA treatment. 5x10⁵ individualized
44
45 hATSC were gently mixed with 250 µL of Si-HPMC hydrogel and implanted subcutaneously
46
47 into nude mice as previously described (46). Si-HPMC was also exclusively implanted and
48
49 used as a negative control. Primary Horse nasal chondrocytes (HoNC) were associated
50
51 (5X10⁵ HoNC/250µl Si-HPMC) with Si-HPMC and injected subcutaneously to serve as a
52
53 positive control. According to a protocol modified from (45), HoNC were isolated from the
54
55 nasal cartilage of an 18-month old adult female horse. Briefly, the nasal septum was cut into
56
57 small slices and digested at 37°C with 0.05% hyaluronidase in HBSS for 10 min, then with
58
59
60

1
2
3 0.2% trypsin for 15 min and with 0.2% type II collagenase for 30 min. Finally, slices were
4
5 digested overnight at 37°C in 0.03% collagenase in DMEM. The suspended HoNC were
6
7 plated at a density of 1×10^4 cells/cm² in 25 cm² culture flasks and cultured in control medium.
8
9
10 The cells were maintained for 21 days at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and the
11
12 culture medium was changed every 2–3 days.

13
14 The six different conditions (hATSC cultured in 2D CT, 2D CH, 3D CT, 3D CH, HoNC and
15
16 Si-HPMC alone) were tested in triplicate and 9 animals received implants (2 implants per
17
18 animal). Animal care was provided at the experimental therapeutic unit of the Nantes medical
19
20 school in compliance with European directives for conducting animal experiments. Animals
21
22 were sacrificed 5 weeks after implantation and the samples were processed histologically as
23
24 described above. A double-blind randomized scoring was performed by two well-versed
25
26 independent examiners on each section (n=3 per replicate) to evaluate the nodule density, the
27
28 alcian blue staining and the Type II collagen immunostaining intensity (a score from 0 to 4 for
29
30 each criterion with the highest score awarded reflecting the best condition).
31
32
33
34
35
36
37
38

39 **Statistical analysis**

40
41 Each experiment was repeated at least 3 times with similar results. Results are expressed as
42
43 mean \pm SEM of triplicate determinations. The comparative studies of means were performed
44
45 by using one-way ANOVA followed by a post hoc test (Fisher's projected least significant
46
47 difference) with a statistical significance at $p < 0.05$.
48
49
50
51
52

53 **Results**

54 *Cell characterization*

55
56
57 Firstly, we aimed at characterizing mesenchymal stem cells isolated from the stromal vascular
58
59 fraction (SVF) of human adipose tissue for their ability to proliferate and to self-renew. To
60

1
2
3 this end, the ability of hATSC to proliferate in culture as well as their propensity to self-renew
4
5 by forming fibroblastic colonies was evaluated at different passages (from P0 to P2). hATSC
6
7 were found to exhibit fibroblast-like morphology and were able to proliferate with a doubling
8
9 time of 5.15 days \pm 0.79. Moreover, this proliferation rate was constant over time and number
10
11 of passages (data not shown). In addition, 1.13% \pm 0.13 of cells from the SVF were able to
12
13 form colonies, as measured by CFU-F assay.
14
15

16
17 Secondly, mesenchymal stem cells are known to express typical surface markers. Therefore,
18
19 the expression of cell surface markers associated with adult stem cell phenotype was
20
21 investigated by flow cytometry on hATSCs from passages 0 and 2. The hATSC strongly
22
23 expressed the stem cell markers CD29, CD44, CD49d, CD90 and CD105 (Figure 1) but were
24
25 negative for the hematopoietic and macrophage/monocyte cell markers CD34 and CD45
26
27 (Figure 1). Considered together, these data demonstrate that the SVF of human adipose tissue
28
29 contains a cell population exhibiting adult stem cell features such as the ability to proliferate
30
31 in culture, to self renew and to express typical surface markers.
32
33
34
35
36
37
38

39 *Multi differentiation potential*

40
41 Another major characteristic of adult MSC is their ability to differentiate towards multiple
42
43 lineages. Adipogenesis, osteogenesis and chondrogenesis are the 3-differentiation pathways
44
45 most commonly described for MSC. Consequently, to evaluate their multilineage
46
47 differentiation potential, hATSC were differentiated towards adipogenesis, osteogenesis and
48
49 chondrogenesis. Cells cultured in control medium were negative for lipid droplet detection
50
51 (Figure 2a). In contrast to this, hATSC treated for 14 days with adipogenic medium exhibited
52
53 positive Oil Red O staining, revealing the presence of vacuoles containing neutral lipids
54
55 (Figure 2b). After a 28-day period in the presence of osteogenic medium, hATSC formed cell
56
57 nodules positively stained by alizarin red demonstrating the deposition of a mineralized
58
59
60

1
2
3 matrix (Figure 2d). As expected, control cultures did not form cell aggregates and were
4
5 negative for mineral deposition (Figure 2c). Finally, chondrogenically differentiated hATSC
6
7 displayed positive alcian blue staining (Figure 2f) demonstrating a high content of sulphated
8
9 GAG, whereas control-cells did not show specific staining (Figure 2e). Taken together, these
10
11 results highlight the in vitro adipogenic, osteogenic and chondrogenic potential of hATSC.
12
13
14
15
16

17 *In vitro chondrogenic potential of hATSC in Si-HPMC*

18
19 Prior to testing the ability of hATSC to form cartilage in vivo when transplanted with Si-
20
21 HPMC, we sought to investigate whether hATSC could differentiate towards the
22
23 chondrogenic lineage when cultured three-dimensionally within Si-HPMC hydrogel. For this
24
25 purpose, hATSC were cultured within Si-HPMC hydrogel in the presence of chondrogenic or
26
27 control medium for a 28-day period. The expression of transcripts encoding *COL2A1*, *ACAN*,
28
29 *SOX9* and *COMP* were evaluated by real-time PCR. The expression levels of these mRNA
30
31 substantially increased for hATSC cultured in chondrogenic medium compared to the control
32
33 condition, with a significant 8-, 123-, 4.5- and 36- fold increase for *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*
34
35 and *COMP* respectively (Figure 3A). The production of a cartilaginous matrix was also
36
37 evaluated by alcian blue staining for the presence of sulphated GAG (Figure 3B, a-b) as well
38
39 as the specific detection of type II collagen by immunostaining (Figure 3B, c-d). The
40
41 histological evaluation demonstrated that only hATSC cultured in chondrogenic medium
42
43 displayed nodules positive for sulphated GAG (Figure 3B-b) and type II collagen (Figure 3B-
44
45 d).
46
47
48
49
50
51

52
53 Taken together, these data demonstrate that the Si-HPMC hydrogel provides a three-
54
55 dimensional environment allowing for the in vitro differentiation of hATSC towards the
56
57 chondrogenic lineage.
58
59
60

In vivo cartilaginous tissue formation

To determine whether in-vitro differentially cultured hATSC can comparably give rise to cartilaginous tissue, we subsequently conducted an in vivo implantation experiment. hATSC were cultured for a 3-week period in monolayers (2D) or pellets (3D) and in the presence of control (CT) or chondrogenic (CH) medium. After the 3-week period of in vitro culture, chondrogenic differentiation of hATSC was investigated. Moreover, hATSC 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 hATSC 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 (Figure 4A). In fact, the expression levels of *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9* and *COMP* were significantly higher in 3D CH than in 2D CH and 3D CT conditions. Of note, inductive medium favoured the expression of chondrogenic markers (*COL2A1* and *COMP*) regardless of whether hATSC 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 hATSC, we also assessed whether hATSC produced GAG. The histological analysis revealed that hATSC cultured in monolayers were unable to synthesize GAG even in the presence of chondrogenic medium (Figure 4B). On the contrary, the hATSC cultured in pellets and in the presence of chondrogenic medium expressed GAG (Figure 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 (Figure 4C-d). These results indicate that only 3D pellet culture in the presence of

1
2
3 chondrogenic medium supports the concomitant production of GAG and type II collagen in
4 the ECM.
5
6

7
8 Ultimately, in order to ascertain whether hATSC from the same experiment were able to form
9 cartilaginous tissue in vivo, they were injected in association with Si-HPMC into the
10 subcutaneous pockets of nude mice. After 5 weeks of implantation, the mice were sacrificed
11 and explanted sections were stained with alcian blue as well as immunostained for type II
12 collagen. The histological examination revealed the formation of nodules for hATSC that had
13 been cultured in the presence of chondrogenic medium (CH) as either monolayers (2D)
14 (Figure 5A, c and d) or pellets (3D) (Figure 5A, g and h). These nodules exhibited positive
15 alcian blue staining and type II collagen immunostaining suggesting the production of a
16 cartilaginous matrix. On the contrary, in the presence of control medium (CT) (figure 5A, a,
17 b, e and f), no nodule formation could be detected. Primary horse nasal chondrocytes used as
18 positive controls were also implanted and displayed chondrocyte nodule formation containing
19 sulphated GAG and type II collagen (Figure 5A, i and j). Si-HPMC used exclusively as a
20 negative control did not show tissue formation (data not shown). To quantitatively assess the
21 formation of nodules and the production of sulphated GAG and type II collagen, a
22 histological scoring system was elaborated. Such scoring confirmed a significant difference
23 between hATSC cultured in monolayers or in pellets and in chondrogenic medium in
24 comparison to their respective controls (Figure 5B). Of note, while the histological features of
25 the nodules were different, no statistical difference was observed between the 2D and 3D
26 groups for the same culture medium (Figure 5B).
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 These results indicate that hATSC cultured in chondrogenic medium, regardless of its
54 dimension, and associated with Si-HPMC hydrogel, are able to form nodules with
55 cartilaginous features, in a subcutaneous site.
56
57
58
59
60

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 hATSC 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 pre-committed 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 multi-lineage differentiation was obtained by our study. These results indicate that hATSC display several stem cell characteristics (17). Our subsequent objective was to associate hATSC 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 hATSC. When placed in chondrogenic conditions, hATSC 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 three-dimensional environment able to support the *in vitro* chondrogenic differentiation of hATSC. 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 (2,18). Additionally, it is well

1
2
3 known that a three-dimensional environment involving cell/cell or cell/matrix interactions is
4 required for proper chondrogenic differentiation (7,18,27,29). Moreover, 3D-culture within
5 matrix can also be a more potent differentiation cue for MSCs than standard induction
6 cocktails, as has been previously demonstrated for osteogenesis and adipogenesis (5,6,16).
7
8
9

10
11
12 The ideal biomaterial for stem cell-based cartilage tissue engineering should not only allow
13 the maintenance of the chondrocyte differentiation state or the chondrogenic differentiation of
14 MSC but should also enable their transplantation via a mini-invasive surgical protocol in vivo.
15
16
17 Consequently, to decipher whether Si-HPMC hydrogel could represent this ideal scaffold, we
18 investigated its ability to support the transfer of hATSC and the formation of cartilage tissue
19 in vivo. In a first attempt, among the various in vitro conditions tested (2D CT, 2D CH, 3D
20 CT and 3D CH), the question was to know which one might meet the efficiency criteria to
21 form cartilage tissue and its feasibility within the context of a cartilage tissue engineering
22 application. Based on our real-time RT-PCR and histological analyses, hATSC cultured in 3D
23 CH were considered the most suitably committed cells as compared to those cultured in 2D or
24 in 3D but in the absence of chondrogenic medium. These results are in accordance with the
25 numerous studies using pellet culture systems to examine the in vitro chondrogenesis of MSC
26 (39,40).
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 Interestingly, after 5 weeks in vivo, hATSC cultured in chondrogenic medium, either in 2D or
44 3D, exhibited positive staining for sulphated GAG and type II collagen and were comparably
45 scored. In contrast, non-induced hATSC (without chondrogenic medium), grown in
46 monolayers or 3D pellets, failed to exhibit sulphated GAG and type II collagen production.
47
48
49 Consistently, a 3D matrix alone appears insufficient to initiate the chondrogenic
50 differentiation of hATSC in the absence of a specific induction medium. On the contrary,
51 cartilaginous tissue formation was achieved with hATSC treated with a chondrogenic medium
52 in both 2D monolayer and 3D pellet culture. Furthermore, while hATSC cultured in 2D
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 chondrogenic medium failed to achieve complete chondrogenic differentiation *in vitro*, once
4
5
6 in vivo within Si-HPMC they gave rise to a cartilaginous tissue to the same extent as hATSC
7
8 pre-differentiated in 3D. The discrepancy of nodule appearance between 2D CH and 3D CH,
9
10 however, requires careful analysis. The three-dimensional pellet culture system is widely used
11
12 to induce chondrogenic differentiation in vitro (24) albeit that a number of serious drawbacks
13
14 have to be surmounted so that 3D pellet culture can be considered for clinical application.
15
16 Firstly, this MSC pellet culture system mimics the endochondral ossification process. It has
17
18 thus been demonstrated that the *in vitro* chondrogenesis of MSCs is characterized by the
19
20 induction of a broad panel of hyaline cartilage molecules concomitant with early onset of
21
22 hypertrophic markers such as COL10A1 and alkaline phosphatase (ALP), markers for
23
24 terminal differentiation (MMP-13), and osteoblasts (osteopontin and bone sialoprotein II)
25
26 (35,41,51,52). This phenomenon could ultimately cause extensive in vivo calcification of the
27
28 ECM, vascular invasion and thus instability of the ectopic transplants (37). However, the
29
30 long-term phenotypic stability along with the functional suitability in-vivo and the adoption of
31
32 a non-hypertrophic chondrocyte phenotype are paramount for an effective and sustained
33
34 cartilage repair. Secondly, it is necessary to individualise the cells by disrupting the pellets in
35
36 order to associate them evenly in the biomaterial. This is a limiting step for clinical
37
38 application.

39
40
41 The rather similar histological scoring obtained for 3D and 2D-induced hATSC suggests that
42
43 chondrogenic medium could initiate the chondrogenic commitment of hATSC, even in
44
45 monolayer culture. This discrepancy observed between the in vitro and in vivo results may
46
47 arise from different commitment stages in vitro, which were waived after 5 weeks in a
48
49 favourable in vivo environment within Si-HPMC. It seems therefore reasonable to assume
50
51 that a simple commitment of hATSC towards the chondrogenic phenotype *in vitro* would be
52
53 sufficient to enable cells to undergo chondrogenic differentiation, once placed in favourable
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 conditions *in vivo*. The subcutaneous site is however rather far from a cartilage repair
4
5 situation due to the lack of mechanical constraints that are known to favour chondrogenic
6
7 commitment of MSC (43). Therefore, further studies must be performed and should address
8
9 the propensity of hATSC, induced chondrogenically or not, to repair a load-bearing AC defect
10
11 when implanted with Si-HPMC.
12
13

14
15 In summary, our study demonstrates that hATSC are able to differentiate towards the
16
17 chondrogenic lineage *in vitro* when cultured in a 3D environment in pellets or within a
18
19 polysaccharide hydrogel, and to form cartilaginous tissue *in vivo*. Moreover, this study
20
21 suggests that an *in vitro* 2-dimensionnal commitment of hATSC would be sufficient to obtain
22
23 cartilaginous tissue formation *in vivo*, which could provide an easier use of hATSC for
24
25 cartilage tissue engineering strategies. The long-term objective of this study is to develop a
26
27 clinically relevant cartilage tissue engineering procedure using hATSC as a source of
28
29 autologous chondrogenic cells and Si-HPMC as a vehicle able to maintain these cells and
30
31 foster chondrogenesis at the damaged site. Further experiments in suitable animal cartilage
32
33 lesion models therefore require further attention.
34
35
36
37

38 **Acknowledgments**

39
40 This study was financed by grants from the "foundation Arthritis Courtin", the "Société
41
42 Française de Rhumatologie", "ANR young researchers, project scartifold", ANR Tecsan
43
44 "Chondrograft", the "fondation de l'avenir pour la recherche médicale appliquée" and the
45
46 INSERM U791. C. Merceron and S. Portron received a fellowship from "Région Pays de la
47
48 Loire, program Bioregos I and Bioregos II". The authors also gratefully acknowledge Dr F.
49
50 Lejeune (clinique Brétéché Nantes), K. Rouger (INRA UMR 703-ENVN), R. Josien, M.
51
52 Heslan, S. Rémy, I. Anegon (INSERM U643) for their helpful assistance in flow cytometry
53
54 experiments and M. Gatus-Perré for helpful discussions. Authors also thank J. Ashton-Chess
55
56 for critical reading of the manuscript.
57
58
59
60

1
2
3 **Disclosures:**
4

5 Dr C. Vinatier is an employee of GRAFTYS SA company.
6

7
8 Dr. J. Guicheux owns shares and is a consultant to the GRAFTYS SA company.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Review Only

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.; Lasselin, 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.

- 1
2
3 9. Bourges, X.; Weiss, P.; Daculsi, G.; Legeay, G. Synthesis and general properties of
4
5 silated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv. Colloid*
6
7 *Interface Sci.* 99:215-228; 2002.
- 8
9
10 10. Bouwmeester, S. J.; Beckers, J. M.; Kuijer, R.; van der Linden, A. J.; Bulstra, S. K.
11
12 Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the
13
14 human knee. *Int. Orthop.* 21:313-317; 1997.
- 15
16
17 11. Brittberg, M.; Lindahl, A.; Nilsson, A.; Ohlsson, C.; Isaksson, O.; Peterson, L.
18
19 Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte
20
21 transplantation. *N. Engl. J. Med.* 331:889-895; 1994.
- 22
23
24 12. Bunnell, B. A.; Estes, B. T.; Guilak, F.; Gimple, J. M. Differentiation of adipose stem
25
26 cells. *Methods Mol. Biol.* 456:155-171; 2008.
- 27
28
29 13. Cancedda, R.; Dozin, B.; Giannoni, P.; Quarto, R. Tissue engineering and cell therapy
30
31 of cartilage and bone. *Matrix Biol.* 22:81-91; 2003.
- 32
33
34 14. Chung, C.; Burdick, J. A. Engineering cartilage tissue. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 60:243-
35
36 262; 2008.
- 37
38
39 15. Dawson, E.; Mapili, G.; Erickson, K.; Taqvi, S.; Roy, K. Biomaterials for stem cell
40
41 differentiation. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 60:215-228; 2008.
- 42
43
44 16. Discher, D. E.; Mooney, D. J.; Zandstra, P. W. Growth factors, matrices, and forces
45
46 combine and control stem cells. *Science.* 324:1673-1677; 2009.
- 47
48
49 17. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.;
50
51 Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining
52
53 multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy
54
55 position statement. *Cytotherapy.* 8:315-317; 2006.
- 56
57
58
59
60

- 1
2
3 18. Erickson, G. R.; Gimble, J. M.; Franklin, D. M.; Rice, H. E.; Awad, H.; Guilak, F.
4
5 Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo.
6
7 Biochem. Biophys. Res. Commun. 290:763-769; 2002.
8
9
- 10 19. Estes, B. T.; Diekman, B. O.; Gimble, J. M.; Guilak, F. Isolation of adipose-derived
11
12 stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. Nat. Protoc. 5:1294-1311;
13
14 2010.
15
16
- 17 20. Gilbert, J. E. Current treatment options for the restoration of articular cartilage. Am. J.
18
19 Knee Surg. 11:42-46; 1998.
20
21
- 22 21. Gimble, J. M.; Katz, A. J.; Bunnell, B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative
23
24 medicine. Circ. Res. 100:1249-1260; 2007.
25
26
- 27 22. Hardingham, T. E.; Fosang, A. J.; Dudhia, J. The structure, function and turnover of
28
29 aggrecan, the large aggregating proteoglycan from cartilage. Eur. J Clin. Chem. Clin.
30
31 Biochem.. 32:249-257; 1994.
32
33
- 34 23. Hunziker, E. B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A
35
36 review of the current status and prospects. Osteoarthritis Cartilage. 10:432-463; 2002.
37
38
- 39 24. Jin, X. B.; Sun, Y. S.; Zhang, K.; Wang, J.; Ju, X. D.; Lou, S. Q. Neocartilage
40
41 formation from predifferentiated human adipose derived stem cells in vivo. Acta.
42
43 Pharmacol. Sin. 28:663-671; 2007.
44
45
- 46 25. Jin, X. B.; Sun, Y. S.; Zhang, K.; Wang, J.; Shi, T. P.; Ju, X. D.; Lou, S. Q. Tissue
47
48 engineered cartilage from hTGF beta2 transduced human adipose derived stem cells
49
50 seeded in PLGA/alginate compound in vitro and in vivo. J. Biomed. Mater. Res. A.
51
52 86:1077-1087; 2008.
53
54
- 55 26. Johnstone, B.; Hering, T. M.; Caplan, A. I.; Goldberg, V. M.; Yoo, J. U. In vitro
56
57 chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp. Cell.
58
59 Res. 238:265-272; 1998.
60

- 1
2
3 27. Jung, M.; Kaszap, B.; Redohl, A.; Steck, E.; Breusch, S.; Richter, W.; Gotterbarm, T.
4
5 Enhanced early tissue regeneration after matrix-assisted autologous mesenchymal
6
7 stem cell transplantation in full thickness chondral defects in a minipig model. *Cell*
8
9 *Transplant.* 18:923-932; 2009.
10
11
12 28. Koulalis, D.; Schultz, W.; Heyden, M.; Konig, F. Autologous osteochondral grafts in
13
14 the treatment of cartilage defects of the knee joint. *Knee Surg. Sports Traumatol.*
15
16 *Arthrosc.* 12:329-334; 2004.
17
18
19 29. Lee, Y. A.; Kang, S. S.; Baek, S. H.; Jung, J. C.; Jin, E. J.; Tak, E. N.; Sonn, J. K.
20
21 Redifferentiation of Dedifferentiated Chondrocytes on Chitosan Membranes and
22
23 Involvement of PKC α and P38 MAP Kinase. *Mol. Cells.* 24:9-15; 2007.
24
25
26 30. Markway, B. D.; Tan, G. K.; Brooke, G.; Hudson, J. E.; Cooper-White, J. J.; Doran,
27
28 M. R. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived
29
30 mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell*
31
32 *Transplant.* 19:29-42; 2010.
33
34
35 31. Martin, I.; Shastri, V. P.; Padera, R. F.; Yang, J.; Mackay, A. J.; Langer, R.; Vunjak-
36
37 Novakovic, G.; Freed, L. E. Selective differentiation of mammalian bone marrow
38
39 stromal cells cultured on three-dimensional polymer foams. *J. Biomed. Mater. Res.*
40
41 *55:229-235; 2001.*
42
43
44 32. Martin-Hernandez, C.; Cebamanos-Celma, J.; Molina-Ros, A.; Ballester-Jimenez, J. J.;
45
46 Ballester-Soleda, J. Regenerated cartilage produced by autogenous periosteal grafts: a
47
48 histologic and mechanical study in rabbits under the influence of continuous passive
49
50 motion. *Arthroscopy.* 26:76-83.
51
52
53 33. Merceron, C.; Vinatier, C.; Clouet, J.; Collic-Jouault, S.; Weiss, P.; Guicheux, J.
54
55 Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue
56
57 engineering. *Joint Bone Spine.* 75:672-674; 2008.
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
34. 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.
 35. Mueller, M. B.; Tuan, R. S. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* 58:1377-1388; 2008.
 36. O'Driscoll, S. W. The healing and regeneration of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* 80:1795-1812; 1998.
 37. Pelttari, 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.
 38. Pochampally, R. Colony Forming Unit Assays for MSCs. *Methods Mol. Biol.* 449:83-91; 2008.
 39. 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.
 40. 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.

- 1
2
3 41. Sekiya, I.; Vuoristo, J. T.; Larson, B. L.; Prockop, D. J. In vitro cartilage formation by
4
5 human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and
6
7 molecular events during chondrogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:4397-4402;
8
9 2002.
10
11
12 42. Steinert, A. F.; Ghivizzani, S. C.; Rethwilm, A.; Tuan, R. S.; Evans, C. H.; Noth, U.
13
14 Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage.
15
16 *Arthritis Res. Ther.* 9:213-228; 2007.
17
18
19 43. Terraciano, V.; Hwang, N.; Moroni, L.; Park, H. B.; Zhang, Z.; Mizrahi, J.; Seliktar,
20
21 D.; Elisseeff, J. Differential response of adult and embryonic mesenchymal progenitor
22
23 cells to mechanical compression in hydrogels. *Stem Cells.* 25:2730-2738; 2007.
24
25
26 44. Tremolada, C.; Palmieri, G.; Ricordi, C. Adipocyte Transplantation and Stem Cells:
27
28 Plastic Surgery Meets Regenerative Medicine. *Cell Transplant.* 2010.
29
30
31 45. Vinatier, C.; Gauthier, O.; Fatimi, A.; Merceron, C.; Masson, M.; Moreau, A.;
32
33 Moreau, F.; Fellah, B.; Weiss, P.; Guicheux, J. An injectable cellulose-based hydrogel
34
35 for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects.
36
37 *Biotechnol. Bioeng.* 102:1259-1267; 2009.
38
39
40 46. Vinatier, C.; Gauthier, O.; Masson, M.; Malard, O.; Moreau, A.; Fellah, B. H.; Bilban,
41
42 M.; Spaethe, R.; Daculsi, G.; Guicheux, J. Nasal chondrocytes and fibrin sealant for
43
44 cartilage tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 89:176-185; 2009.
45
46
47 47. Vinatier, C.; Magne, D.; Moreau, A.; Gauthier, O.; Malard, O.; Vignes-Colombeix, C.;
48
49 Daculsi, G.; Weiss, P.; Guicheux, J. Engineering cartilage with human nasal
50
51 chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *J. Biomed.*
52
53 *Mater. Res. A.* 80:66-74; 2007.
54
55
56 48. Vinatier, C.; Magne, D.; Weiss, P.; Trojani, C.; Rochet, N.; Carle, G. F.; Vignes-
57
58 Colombeix, C.; Chadjichristos, C.; Galera, P.; Daculsi, G.; Guicheux, J. A silanized
59
60

- 1
2
3 hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of
4 chondrocytes. *Biomaterials*. 26:6643-6651; 2005.
- 5
6
7
8 49. Vinatier, C.; Mrugala, D.; Jorgensen, C.; Guicheux, J.; Noel, D. Cartilage engineering:
9 a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol.* 27:307-
10 314; 2009.
- 11
12
13
14 50. Wei, Y.; Hu, H.; Wang, H.; Wu, Y.; Deng, L.; Qi, J. Cartilage regeneration of adipose-
15 derived stem cells in a hybrid scaffold from fibrin-modified PLGA. *Cell Transplant.*
16 18:159-170; 2009.
- 17
18
19
20 51. Weiss, S.; Hennig, T.; Bock, R.; Steck, E.; Richter, W. Impact of growth factors and
21 PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem
22 cells. *J. Cell Physiol.* 223:84-93; 2010.
- 23
24
25
26 52. Winter, A.; Breit, S.; Parsch, D.; Benz, K.; Steck, E.; Hauner, H.; Weber, R. M.;
27 Ewerbeck, V.; Richter, W. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem
28 cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived
29 stromal cells. *Arthritis Rheum.* 48:418-429; 2003.
- 30
31
32
33 53. Zuk, P. A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; De Ugarte, D. A.; Huang, J. I.; Mizuno, H.; Alfonso,
34 Z. C.; Fraser, J. K.; Benhaim, P.; Hedrick, M. H. Human adipose tissue is a source of
35 multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 13:4279-4295; 2002.
- 36
37
38
39 54. Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J. W.; Katz, A. J.; Benhaim, P.;
40 Lorenz, H. P.; Hedrick, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue:
41 implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7:211-228; 2001.
- 42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure legends

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

Figure 1: Characterization of human adipose tissue-derived stem cells (hATSC). 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.

Figure 2: Histological analysis of the multilineage differentiation capacity of hATSC. Human ATSC 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). Bar: 50 μ m. Osteogenesis was demonstrated by the deposition of a mineralized matrix indicated by Alizarin Red staining (c-d) Bar: 200 μ m. Chondrogenesis was evaluated after 28 days in pellet culture by alcian blue staining (e-f). Bar: 200 μ m.

Figure 3: Analysis of the chondrogenic differentiation of hATSC 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 hATSC 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

1
2
3 section. Results are expressed as relative expression level compared to the control condition
4
5 in the absence of chondrogenic medium. * $p < 0.05$.
6
7

8 B: Histological and immunohistological analysis of hATSC after 21 days of three-
9
10 dimensional chondrogenic differentiation within Si-HPMC hydrogel. The presence of
11
12 sulphated glycosaminoglycans and type II collagen was investigated by alcian blue staining
13
14 (a, b) and type II collagen immunostaining (c, d) respectively. Bar: 20 μm .
15
16
17

18
19
20 Figure 4: Analysis of 2 and 3D differentiation of hATSC
21

22 A: Analysis of the expression levels of transcripts coding for *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9* and
23
24 *COMP* in hATSC after 21 days of chondrogenic differentiation in monolayer or three-
25
26 dimensional pellet culture. Expression of the chondrogenic markers *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9*
27
28 and *COMP* was investigated by real-time PCR. Results are expressed as relative expression
29
30 level compared to the control condition in the absence of chondrogenic medium. * $p < 0.05$
31
32 compared to control medium (-) for the same dimension and # $p < 0.05$ compared to 2D
33
34 dimension for the same medium.
35
36
37

38 B: Histological and immunohistological analysis of hATSC after 21 days of chondrogenic
39
40 differentiation in monolayer culture. The presence of sulphated glycosaminoglycans was
41
42 investigated by alcian blue staining. Bar: 200 μm .
43
44

45 C: Histological and immunohistological analysis of hATSC after 21 days of chondrogenic
46
47 differentiation in three-dimensional pellet culture. The presence of sulphated
48
49 glycosaminoglycans and type II collagen was investigated by alcian blue staining (a, b) and
50
51 type II collagen immunostaining (c, d) respectively. Bar: 200 μm
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Figure 5: Cartilaginous tissue formation of hATSC after subcutaneous implantation into nude
4 mice.
5
6

7
8 A: Histological and immunohistological analysis of hATSC/Si-HPMC subcutaneous
9 implants. hATSC cultured either in monolayers (2D) or in pellets (3D) in the presence of
10 control (CT) or chondrogenic (CH) medium for 21 days were associated with Si-HPMC and
11 implanted subcutaneously into nude mice for 5 weeks. Horse nasal chondrocytes (HoNC)
12 associated with Si-HPMC were used as a positive control. Histological sections were stained
13 with alcian blue (a, c, e, g and i) and immunostained for type II collagen (b, d, f, h and j). Bar:
14
15
16
17
18
19
20
21
22 50 μm .
23

24 B: Histological scoring of hATSC/Si-HPMC subcutaneous implants. Histological sections
25 were evaluated for nodule density (black), alcian blue staining intensity (white) and Type II
26 collagen immunostaining intensity (striped). 3 sections of each condition were randomly and
27 double-blindly scored (score from 0 to 4 for each criterion: 0: absence, 1: low, 2:
28 intermediate, 3: marked, 4 intense). * $P < 0.05$ compared with the respective control medium. #
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
 $P < 0.05$ compared with the respective 2D condition.

Table 1

Gene	Gene Bank Accession Number	Sequence	Base Pairs (bp)
<i>β-ACTIN</i>	NM_001101	Fwd 5' - CCAACCGCGAGAAGATGA -3' Rev 5' - CCAGAGGCGTACAGGGATAG -3'	97
<i>COL2A1</i>	NM_001844	Fwd 5' - TGTCAGGGGCCAGGATGTC -3' Rev 5' - ATCATTATACCTCTGCCCATCC -3'	63
<i>ACAN</i>	NM_001135	Fwd 5' - CCTCCCCTTCACGTGTAAAA -3' Rev 5' - GCTCCGCTTCTGTAGTCTGC -3'	64
<i>SOX9</i>	NM_000346	Fwd 5' - GTACCCGCACTTGCACAAC -3' Rev 5' - TCGTCTCGTTCAGAAGTCTC -3'	72
<i>COMP</i>	NM_000095	Fwd 5' - GCACCGACGTCAACGAGT -3' Rev 5' - TGGTGTTGATACAGCGGACT -3'	63

Figure 1

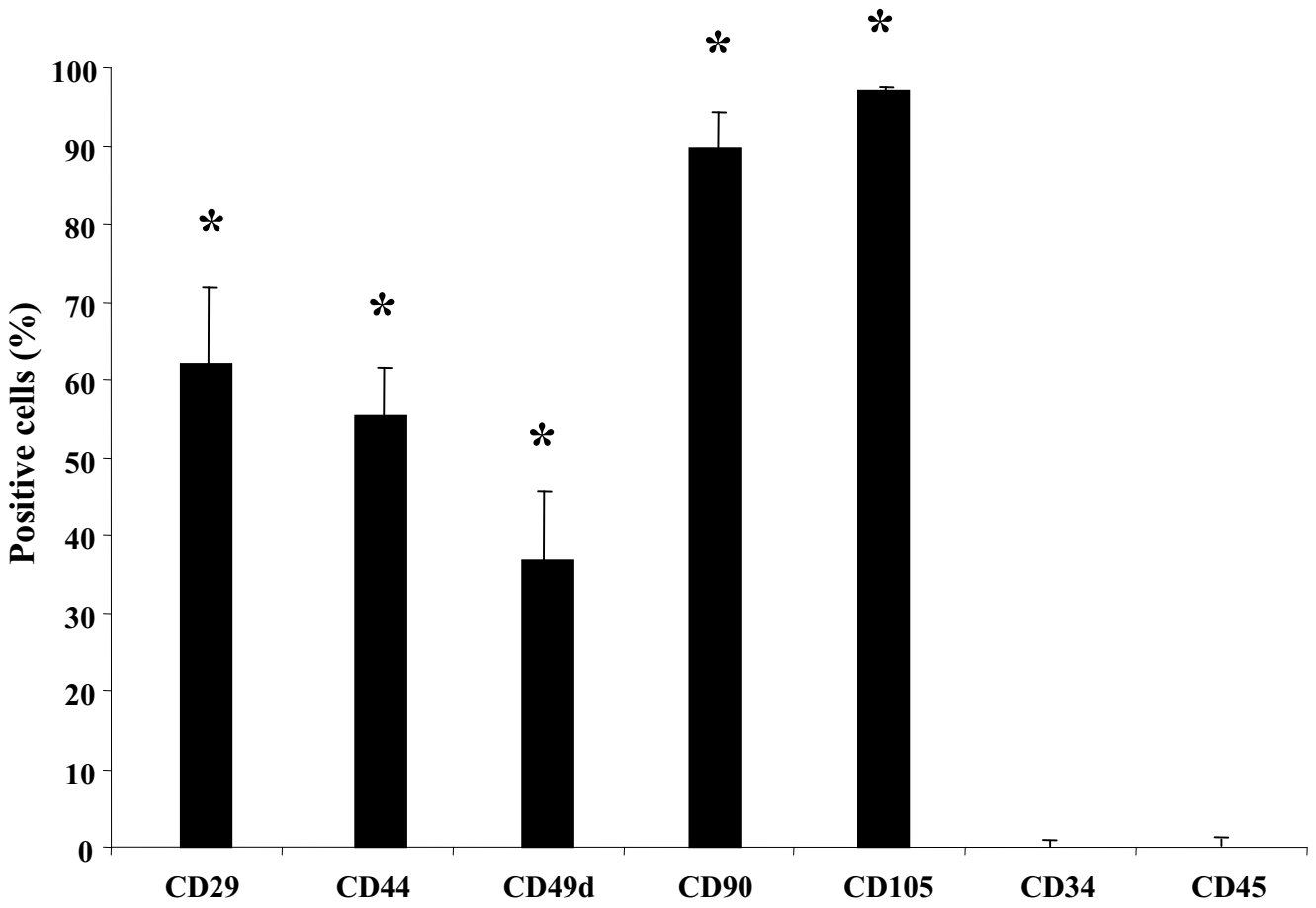


Figure 2

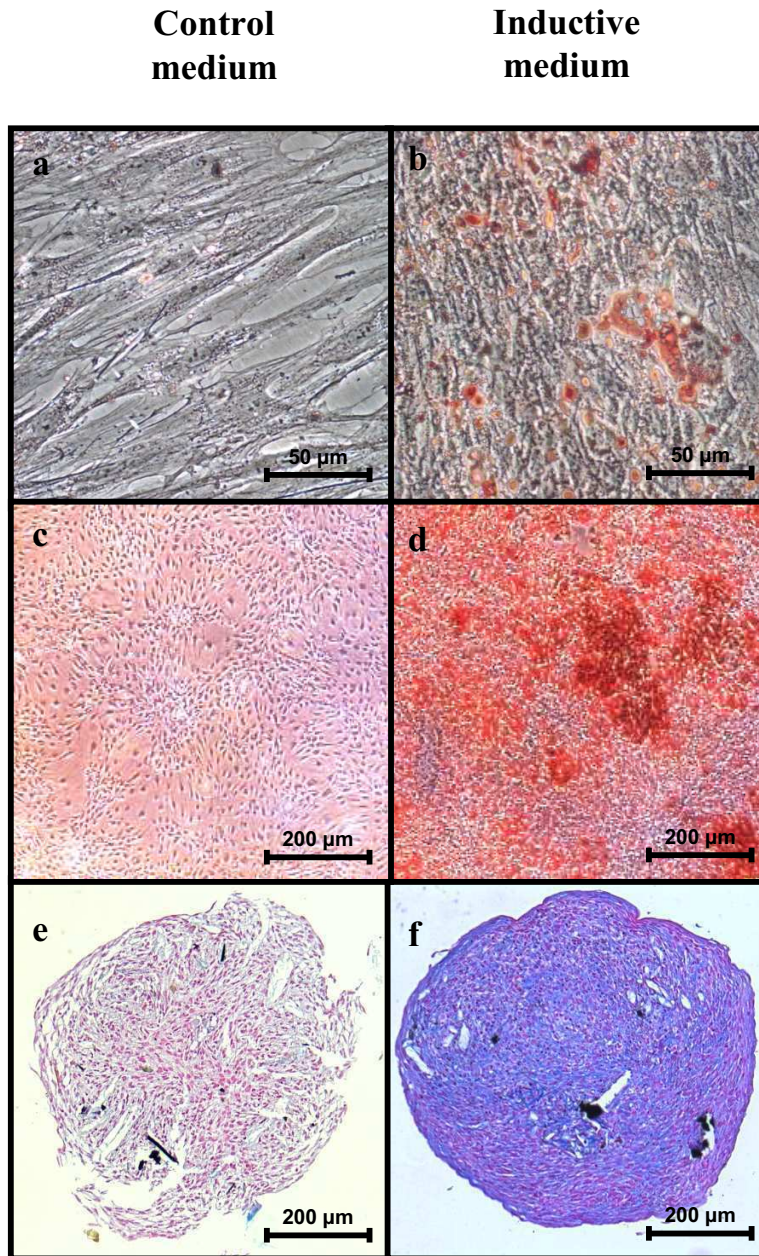
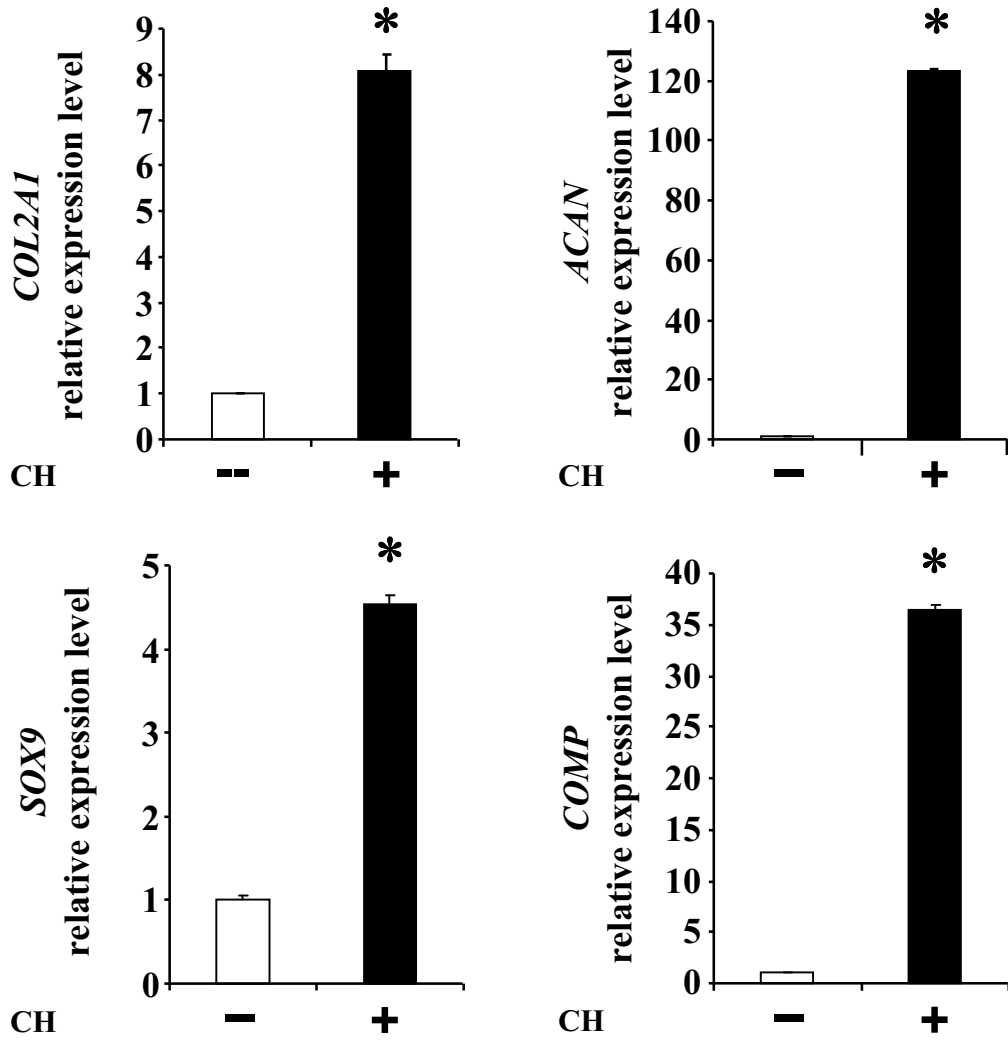


Figure 3

A



B

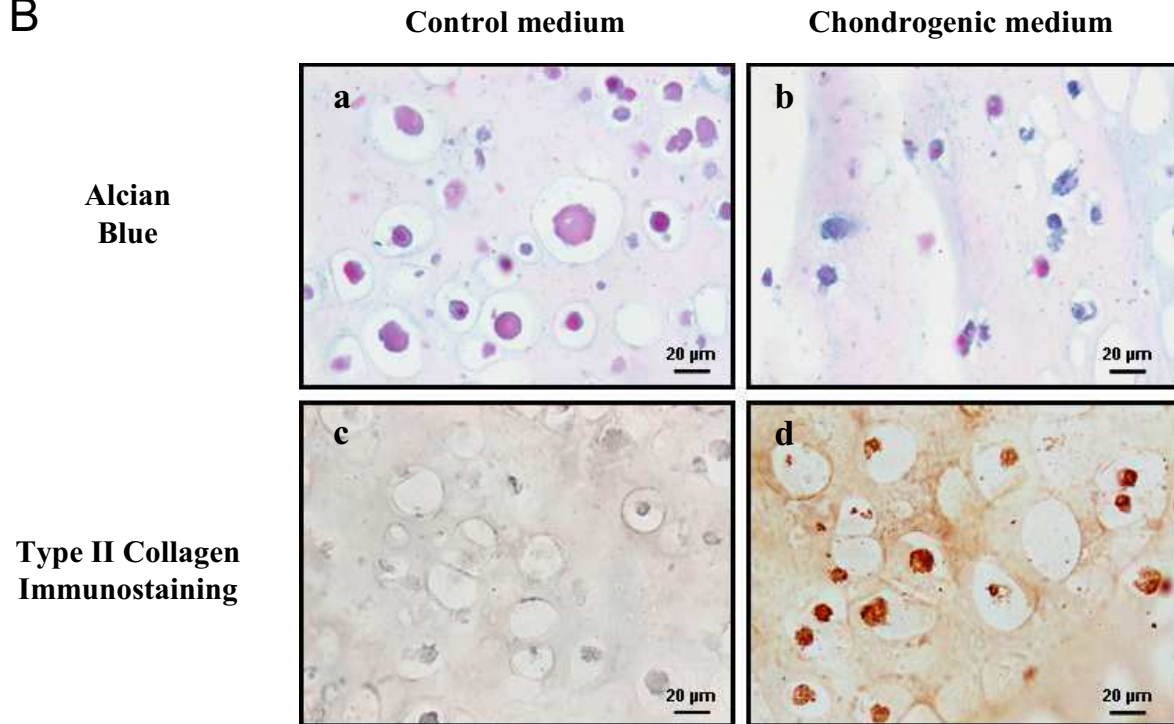


Figure 4

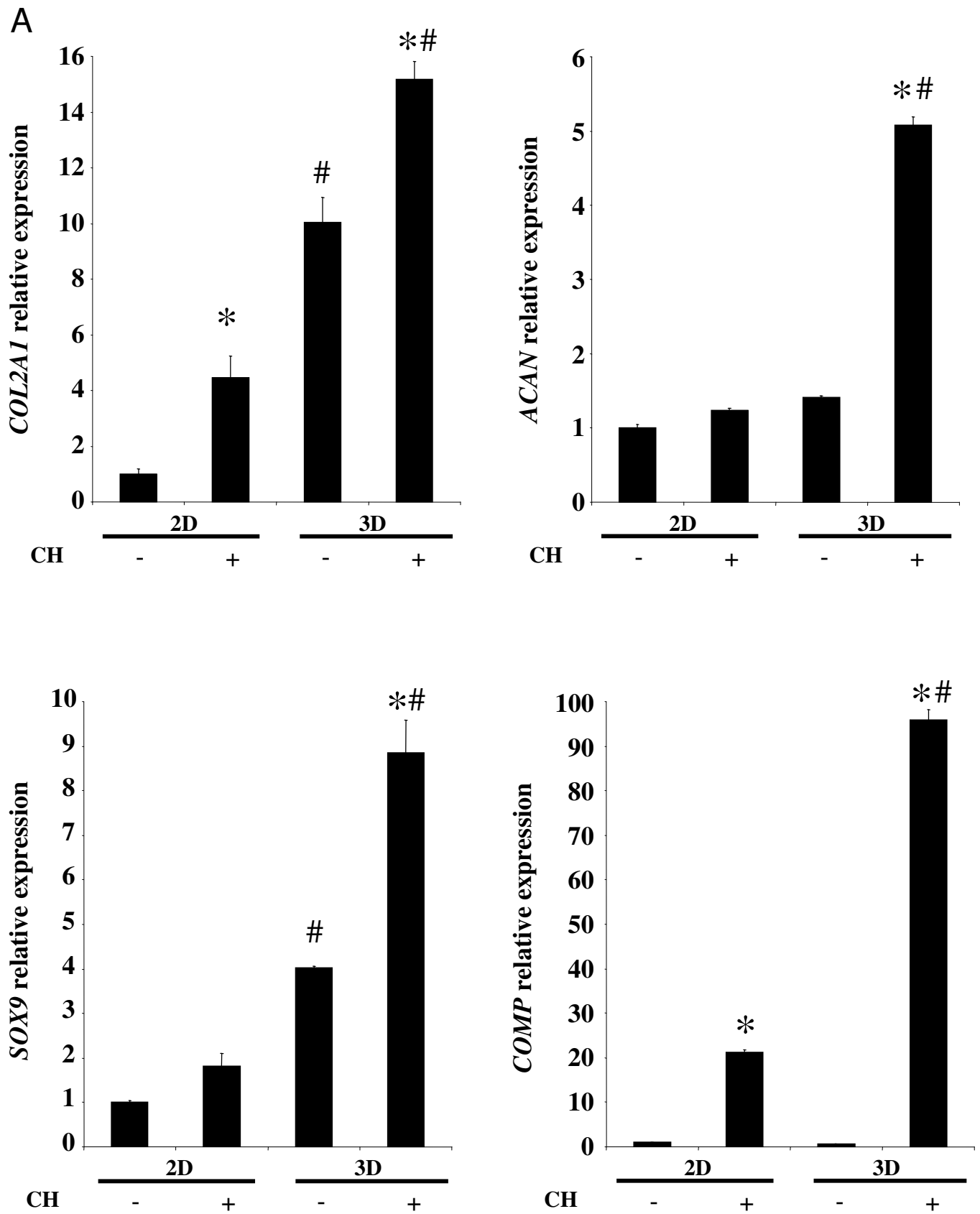
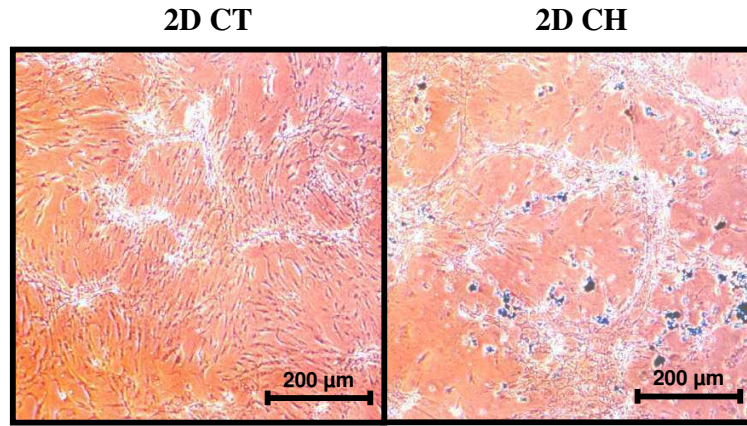


Figure 4

B



C

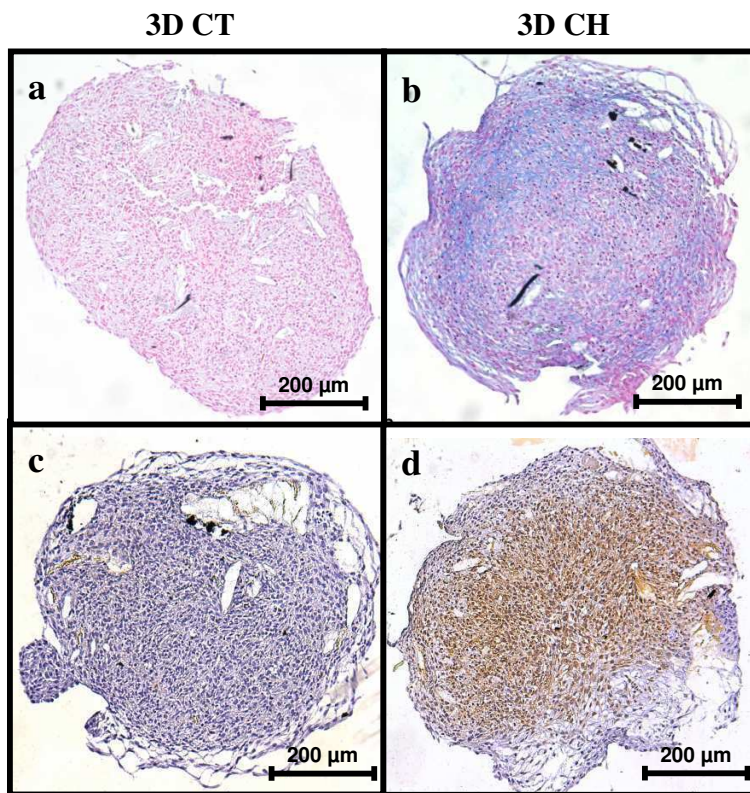


Figure 5

A

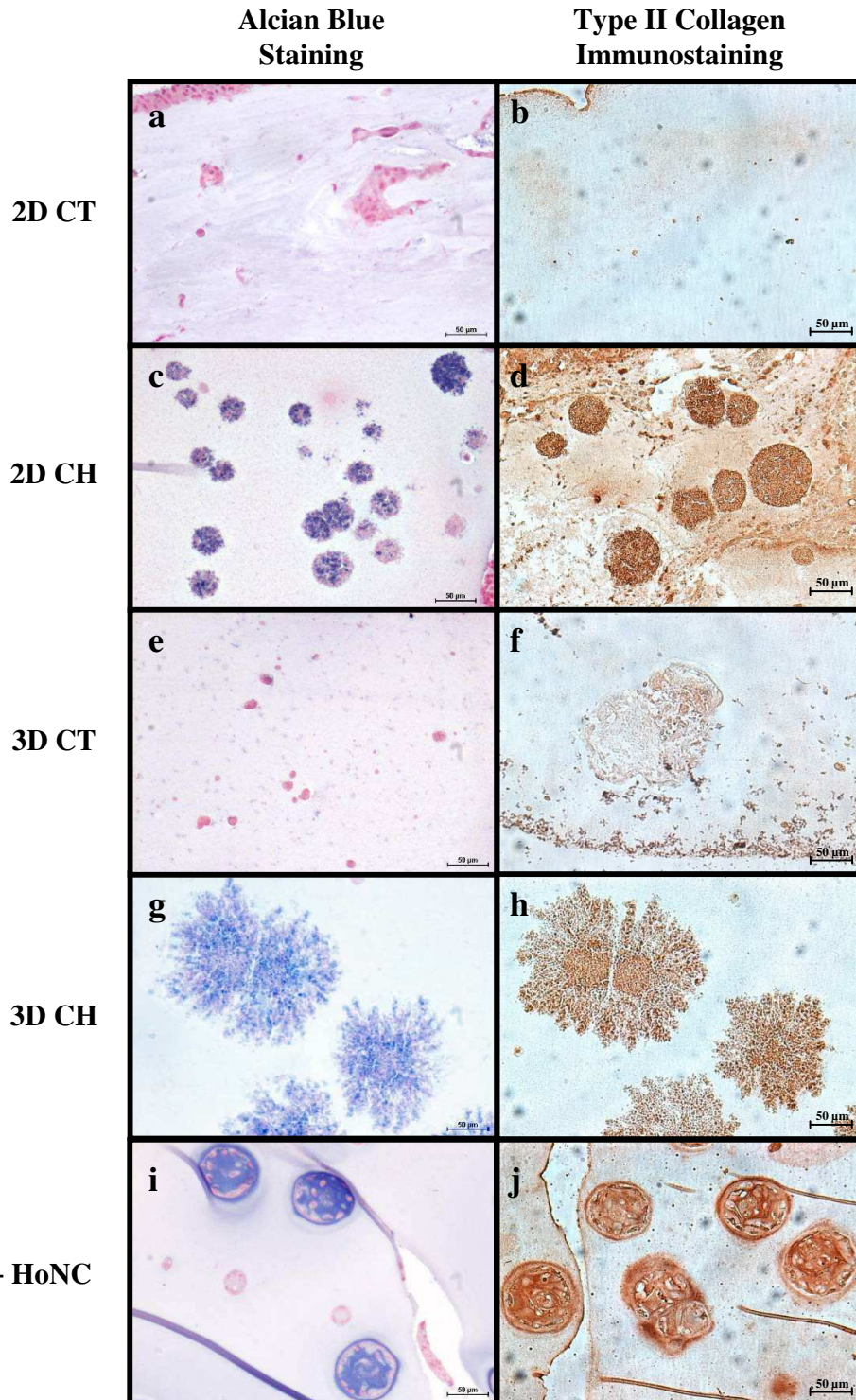
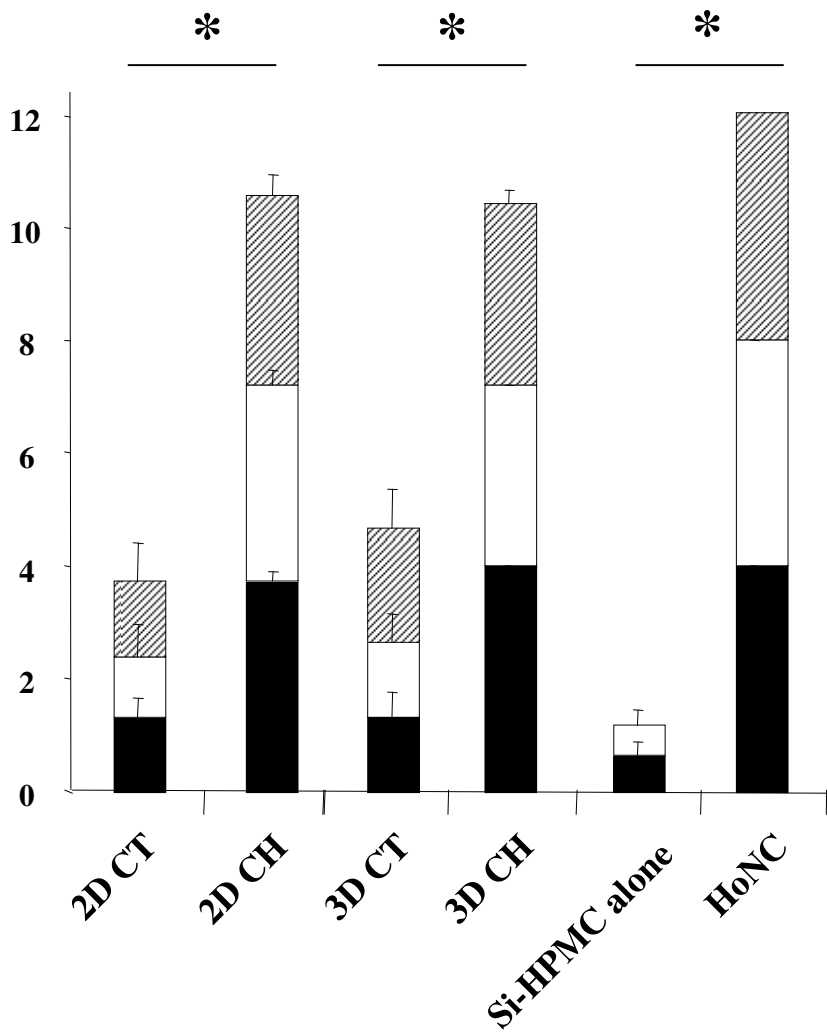


Figure 5

B



1.2 – Discussion

Les résultats de ces travaux (article IV) confirment que le tissu adipeux représente une source de cellules répondant aux critères de CSM communément admis : les hCSTA. Nos données démontrent également pour la première fois qu'un hydrogel d'HPMC-Si représente une matrice tridimensionnelle apte à supporter la différenciation chondrogénique de hCSTA *in vitro* et que cet hydrogel d'HPMC-Si permet l'implantation de hCSTA pré-différenciées *in vitro* ainsi que la formation d'un tissu cartilagineux en site sous-cutané chez la souris nude.

La caractérisation des cellules isolées de la fraction stromale du tissu adipeux humain a confirmé que ces cellules correspondent aux critères établis pour définir une population de CSM [505]. En effet les hCSTA sont capables de proliférer en culture, ont la propriété de former des colonies avec un taux de $1.13\% \pm 0.13$, expriment un ensemble de marqueurs de surface associé aux CSM (CD29, CD44, CD49d, CD90, CD105). Elles sont également négatives pour CD34 et CD45. En complément, la multipotence des hCSTA a également été mise en évidence en induisant leur différenciation vers les voies adipo-, ostéo- et chondrogénique.

Ayant identifié une population présentant les principales caractéristiques des CSM, notre objectif a donc été de les associer à un hydrogel auto-réculant et injectable breveté au laboratoire (WO2005/044326) et d'évaluer dans quelle mesure cet hydrogel pourrait constituer une matrice apte à promouvoir la différenciation chondrogénique des hCSTA. Les cellules cultivées au sein de cette matrice, en présence de milieu chondrogénique, expriment les transcrits des marqueurs chondrocytaires codant pour les protéines de la matrice : *COL2A1*, *ACAN*, et *COMP* ainsi que pour un facteur de transcription, *SOX9*, intervenant de manière précoce dans la différenciation chondrogénique. En parallèle, une analyse histologique a permis de révéler la production de glycosaminoglycanes sulfatés et de collagène de type II au sein de la matrice. Ces données histologiques renforcent la pertinence scientifique de nos données de biologie moléculaire. Cet effet bénéfique de la culture en 3D au sein de l'HPMC-Si pourrait selon toute vraisemblance être dû à sa capacité de permettre aux cellules d'adopter une morphologie sphérique qui est l'une des caractéristiques majeures du phénotype chondrocytaire [763, 932]. De plus il est reconnu que la culture au sein d'un environnement tridimensionnel implique des interactions cellule/cellule et cellule/matrice nécessaires à la différenciation chondrogénique [759, 932-934]. En ce sens, la culture tridimensionnelle peut représenter un puissant signal d'induction de la différenciation

chondrogénique en association avec un milieu de culture adéquat comme cela a déjà été démontré dans de précédents travaux sur l'adipogenèse et l'ostéogenèse [935-937].

Le biomatériau idéal dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage basée sur l'utilisation de cellules souches ne doit pas uniquement assurer le maintien de leur phénotype chondrocytaire ou promouvoir leur différenciation, mais il doit également permettre leur transfert et leur maintien sur le site lésé par un protocole chirurgical mini-invasif. Afin de déterminer si l'HPMC-Si représente ce biomatériau idéal, nous avons évalué sa capacité à permettre l'injection sous-cutanée de hCSTA et la formation de cartilage *in vivo*. Parmi les différentes conditions de différenciation chondrogénique possibles (culture en monocouche ou en 3D, en présence de milieu inductif ou non), nous avons cherché à déterminer laquelle pourrait le mieux répondre à nos attentes en termes de potentiel à former un tissu cartilagineux et en termes de faisabilité dans le cadre d'une application en ingénierie tissulaire. Sur la base de nos analyses par PCR en temps réel et histologiques, les hCSTA cultivées en 3D et en présence de milieu chondrogénique ont été considérées comme celles les "plus différenciées" par rapport aux cellules cultivées en monocouche ou en 3D mais en l'absence de milieu chondrogénique. Ces observations sont conformes aux nombreuses études menées sur la différenciation chondrogénique des CSM et utilisant comme modèle la culture tridimensionnelle en pellet [938, 939].

De manière intéressante, après 5 semaines d'implantation, les hCSTA cultivée en présence de milieu chondrogénique que ce soit en 2D ou en 3D présentent, de manière comparable, des colorations positives pour la détection de glycosaminoglycanes sulfatés et de collagène de type II. Au contraire, les hCSTA n'ayant pas été cultivées en présence de milieu chondrogénique ne présentent aucun signe de production de GAG ou de collagène de type II. Il apparaît donc que l'emploi d'une matrice synthétique tridimensionnelle seule ne soit pas suffisant pour induire la différenciation chondrogénique de hCSTA *in vivo*, en l'absence de milieu inducteur. *In vitro*, lorsque les hCSTA ont été cultivées en 2D, la présence de milieu chondrogénique n'a pas permis l'obtention d'une différenciation chondrogénique "complète", mais une fois associées à l'HPMC-Si *in vivo*, ces mêmes cellules ont permis la formation d'un tissu cartilagineux dans des proportions comparables aux hCSTA pré-différenciées en 3D.

Le système de culture tridimensionnelle en pellet est largement répandu afin de participer à l'induction de la différenciation chondrogénique *in vitro* [940] bien qu'un certain nombre d'inconvénients soit inhérent 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 caractéristiques des stades de différenciation hypertrophique précoce (collagène de type X ou phosphatase alcaline), de différenciation terminale (MMP13) ou ostéoblastique (ostéopontine et BSP) [941-944]. 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 [941]. 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.

Les scores histologiques assez semblables obtenus pour les hCSTA pré-différenciées en 2D et en 3D suggèrent que le milieu chondrogénique pourrait initier l'engagement des hCSTA dans la différenciation chondrogénique, même en culture monocouche. Ces différences observées entre les résultats *in vitro* et *in vivo* peuvent découler de stades d'engagement plus ou moins avancés dans la différenciation *in vitro* et qui se sont retrouvés compensés après 5 semaines d'implantation au sein d'un environnement favorable en association avec l'HPMC-Si. Il semble donc raisonnable de supposer qu'un simple engagement des hCSTA vers le phénotype chondrocytaire *in vitro* serait suffisant pour permettre aux cellules de s'orienter vers la différenciation chondrocytaire, une fois placées dans des conditions favorables *in vivo*. Le site sous-cutané reste cependant assez éloigné d'une situation de réparation du cartilage en raison de l'absence de contraintes mécaniques qui sont connues pour favoriser l'engagement des CSM vers le lignage chondrogénique [942]. Par conséquent des études complémentaires devront être réalisées afin d'évaluer le potentiel de réparation des hCSTA pré-différenciées ou non associées avec l'HPMC-Si, dans un modèle de défaut cartilagineux.

En résumé, notre étude a démontré que les hCSTA sont capables de se différencier vers la lignée chondrocytaire *in vitro* lorsqu'elles sont cultivées dans un environnement 3D en pellets ou dans un hydrogel, et à former un tissu cartilagineux *in vivo*.

En outre, cette étude suggère que l'engagement des hCSTA *in vitro* en monocouche serait suffisant pour obtenir la formation de tissu cartilagineux *in vivo*, ce qui pourrait constituer un protocole d'utilisation plus simple des hCSTA dans le cadre de stratégies d'ingénierie tissulaire du cartilage. L'objectif à long terme de cette étude est de développer une procédure cliniquement pertinente d'ingénierie tissulaire du cartilage en utilisant les hCSTA comme une source de cellules chondrogéniques autologues et l'HPMC-Si comme véhicule capable de maintenir ces cellules et de favoriser leur chondrogenèse sur le site lésé. Des expériences

supplémentaires, dans des modèles animaux de lésion du cartilage articulaire adaptés (lapin, cheval) seront réalisées.

2 - Modulation environnementale et pharmacologique de la différenciation chondrogénique des hCSTA

2.1 - Problématique

Parallèlement au développement de matrices adaptées à une application en ingénierie tissulaire du cartilage, et afin de surmonter les inconvénients liés à l'utilisation de chondrocytes, les recherches s'orientent vers la découverte de sources alternatives de cellules chondrogéniques. Parmi ces sources alternatives de cellules réparatrices, les cellules souches mésenchymateuses sont probablement celles qui connaissent l'essor le plus important ces dix dernières années. La moelle osseuse représente la source la mieux caractérisée de cellules souches adultes. Mais récemment, de nombreuses autres sources de cellules souches adultes ont été mises en évidence [463]. Parmi celles-ci, les cellules souches dérivées du tissu adipeux représentent une source réellement prometteuse de cellules réparatrices pour le cartilage. Cependant, le défi que représente l'utilisation des CSM pour l'ingénierie tissulaire du cartilage reste entier. Il est en effet nécessaire de pouvoir contrôler de manière précise leur différenciation vers un phénotype chondrocytaire stable et surtout adapté aux contraintes de la réparation du cartilage articulaire.

Dans ce but, il apparaît nécessaire de pouvoir orienter les CSM vers la lignée chondrogénique tout en prévenant leur différenciation terminale hypertrophique conduisant à la minéralisation de la matrice. Il a récemment été suggéré qu'un environnement tridimensionnel associé à des conditions de culture particulières (tension en oxygène, facteurs de croissance, agents pharmacologiques, contraintes mécaniques) pourraient permettre d'orienter les CSM vers un phénotype chondrocytaire tout en les maintenant dans un état de différenciation phénotypique approprié.

D'un point de vue physiologique, le cartilage n'est pas vascularisé, ce qui situe les chondrocytes qui le composent dans des conditions hypoxiques. De plus les chondrocytes sont responsables de la synthèse d'une matrice abondante et riche en GAG dont les implications dans de nombreux processus biologiques sont multiples [125]. En transposant ces observations, dans le contexte de la différenciation de CSM du tissu adipeux humain

(hCSTA), nous nous sommes intéressés aux rôles potentiels que pourraient jouer la tension en oxygène (article V) et l'addition d'un polysaccharide GAG-mimétique (article VI) dans la différenciation chondrogénique des hCSTA.

Dans notre premier travail visant à évaluer les effets de la tension en oxygène sur le potentiel de différenciation ostéochondrogénique des hCSTA (article V), nous nous sommes tout d'abord assurés d'avoir isolé une population cellulaire ayant les propriétés des CSM par l'étude de leur capacité à proliférer, à s'auto-renouveler *in vitro*, à exprimer un ensemble de marqueurs de surfaces décrit comme caractéristique des CSM et à se différencier vers les lignages ostéochondrogéniques.

Les hCSTA ayant fait preuve de leur potentiel ostéochondrogénique, la seconde partie de cette étude a donc eu pour but de déterminer dans quelle mesure une hypoxie à 5% d'oxygène, reflétant les valeurs physiologiques d'oxygénation au sein du cartilage articulaire, pouvait affecter ce potentiel, en ayant pour objectif de promouvoir la différenciation chondrogénique des hCSTA tout en prévenant l'apparition de stades de différenciation terminaux. En effet, il a par ailleurs été décrit que la culture de CSM dans un modèle tridimensionnel de pellet pouvait mimer le processus d'ossification endochondrale et conduire à l'expression d'un phénotype de chondrocyte hypertrophique, voire ostéoblastique. Ceci se traduisant par l'induction *in vivo* d'une invasion vasculaire et d'une minéralisation de ces constructions, les rendant alors incompatibles avec une utilisation en thérapie du cartilage articulaire [941].

Dans une seconde partie (article VI), nous nous sommes intéressés aux potentielles activités biologiques que pouvaient exercer des polysaccharides synthétiques GAG-mimétiques d'origine marine (GY785 DR et DRS) dans le processus de différenciation chondrogénique des hCSTA. 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 [945].

Les polysaccharides GY785 DR et DRS sont obtenus par génie biotechnologique à partir d'une macromolécule d'exopolysaccharide ramifiée GY785 sécrétée par *Alteromonas infernus* [946]. Cette macromolécule est dépolymérisée par un processus radicalaire puis peut être ensuite sur-sulfatée. Le GY785 DR et GY785 DRS ont respectivement des masses moléculaires de 15 et 20kDa et sont sulfatés à 10 et 40% [947]. Ces polysaccharides GAG-mimétiques d'origine marine sont aisément productibles à grande échelle et représentent une source d'actifs biologiques ayant de potentielles applications biomédicales.

L'objectif général de ces deux travaux est d'identifier des facteurs morphogéniques capables de moduler la différenciation chondrogénique des hCSTA afin d'obtenir un phénotype chondrocytaire tout en étant compatibles avec une application en ingénierie tissulaire du cartilage. L'utilisation de facteurs tels que la tension en oxygène ou d'un polysaccharide d'origine marine se révèle être d'un intérêt particulier du fait que ces deux facteurs permettent l'optimisation de la différenciation chondrogénique tout en s'affranchissant de la transmission d'agents pathogènes éventuels.

Article V

Differential effects of hypoxia on the osteo-chondrogenic potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells.

C. Merceron, C. Vinatier, S. Portron, M. Masson, M. Gatius, L. Guigand, J. Amiaud, Y. Chérel, , P. Weiss and J. Guicheux.

American Journal of Physiology-Cell Physiology (2010) 2:355-364.

Article V : Differential effects of hypoxia on the osteo-chondrogenic potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells – American Journal of Physiology-Cell Physiology

RESUME

L'utilisation de cellules souches dérivées du tissu adipeux humain (hCSTA) est envisagée en tant que source de cellules réparatrices dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage. Leur différenciation chondrogénique peut être induite par l'utilisation d'un milieu enrichi et de conditions de culture tridimensionnelles. Étant 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 démontrer dans quelle mesure l'hypoxie pouvait affecter le potentiel ostéochondrogénique des hCSTA. Pour cela, les hCSTA 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 21%. Leur différenciation a été évaluée par PCR en temps réel (collagène de type II, agrécane, Runx2 et ostéocalcine). La différenciation chondrogénique a été examinée plus avant 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 de la matrice minéralisée au rouge alizarine et par mesure de l'activité de la phosphatase alcaline. L'expression des marqueurs chondrogéniques est augmentée lorsque les hCSTA sont exposées à l'hypoxie en présence de milieu chondrogénique. 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 cela malgré une culture en présence de milieu ostéogénique. Nos données suggèrent fortement que l'hypoxie favorise la différenciation chondrogénique des hCSTA comme l'indique l'augmentation de l'expression des marqueurs chondrogéniques, tandis qu'elle semble altérer le potentiel ostéogénique. Nos résultats mettent en évidence le rôle différentiel que joue l'hypoxie dans la régulation des processus de différenciation des hCSTA. Ces données pourraient nous permettre d'exploiter le potentiel des cellules souches en ingénierie tissulaire afin de remplacer ou de restaurer la fonction des tissus ostéo-articulaires.

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 Chérel, Pierre Weiss and Jérôme Guicheux

Am J Physiol Cell Physiol 298:355-364, 2010. First published Nov 25, 2009;
doi:10.1152/ajpcell.00398.2009

You might find this additional information useful...

This article cites 44 articles, 7 of which you can access free at:

<http://ajpcell.physiology.org/cgi/content/full/298/2/C355#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajpcell.physiology.org/cgi/content/full/298/2/C355>

Additional material and information about *AJP - Cell Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpcell>

This information is current as of January 26, 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 (LLOAD), 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, Tuttingen, 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'-TCCTTAATGTCACGCACGATTTCC-3'	600	
Aggrecan	NM_001135	Fwd 5'-TTCCTGGTGTGGCTGCTGTC-3'	900	95
		Rev 5'-TTCTGGCTCGGTGGAACCTC-3'	900	
COL2A1	NM_001844	Fwd 5'-TCTGCCAGCAGACATAATCTGTGAAG-3'	300	99
		Rev 5'-CAGGGCGAGTCACTTGGG-3'	300	

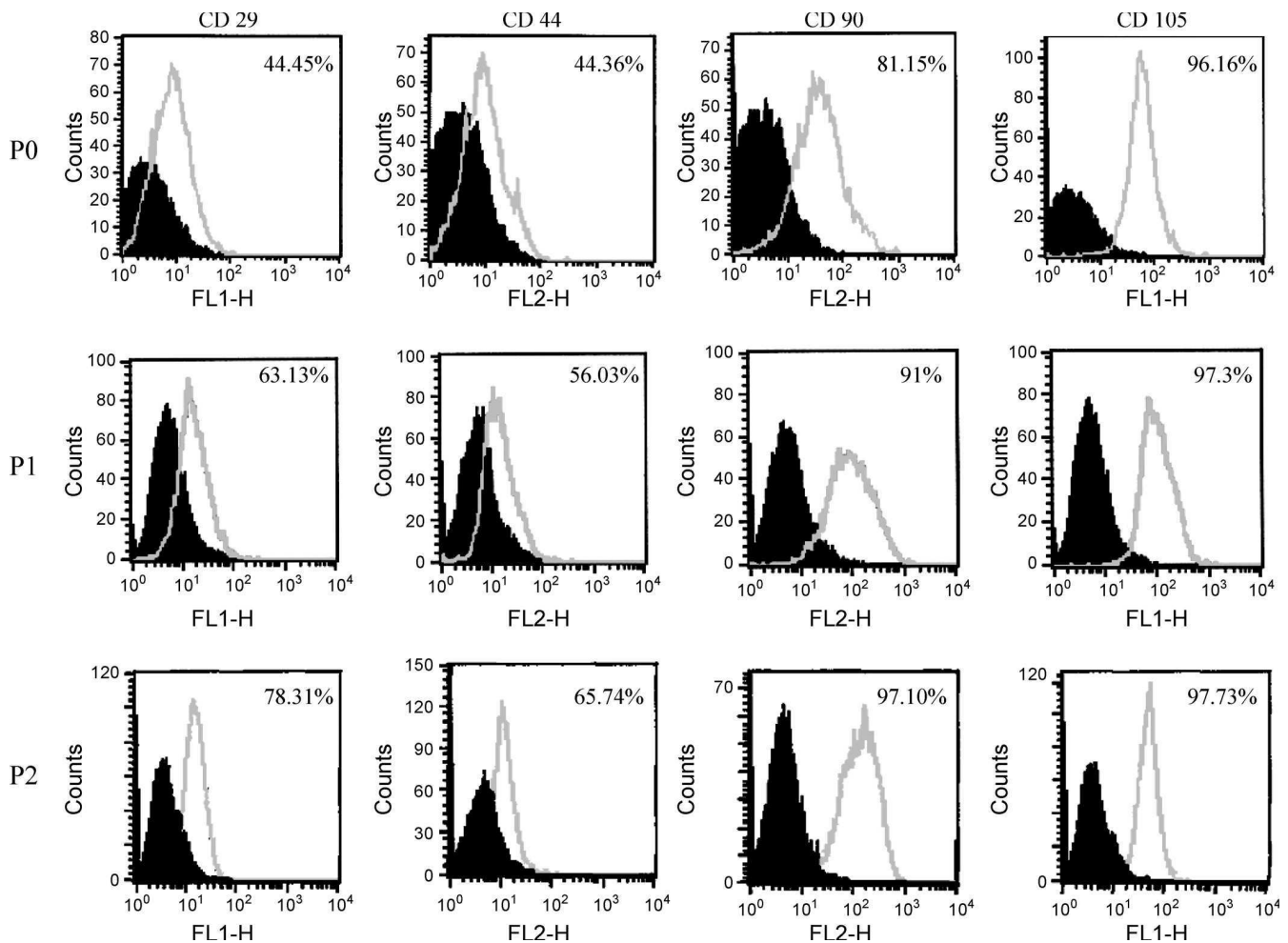


Fig. 1. Characterization of human adipose tissue-derived stem cells (hATSC): flow cytometric analysis of hATSC for CD29, CD44, CD90, and CD105 expression. hATSC were cultured in monolayer, in control medium, and under normoxic conditions until confluence; 10,000 events were scored. Results are expressed 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

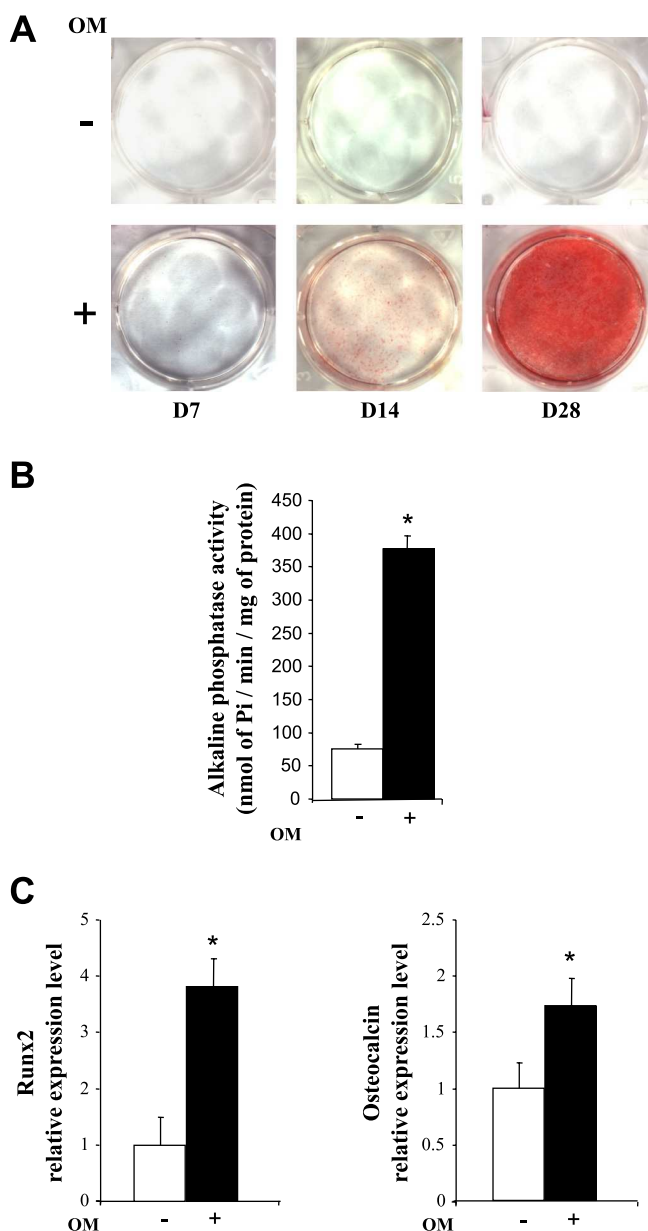


Fig. 2. Osteogenic differentiation of hATSC. *A*: calcium deposition was investigated at day (D)7, D14, and D28 by Alizarin Red staining. hATSC were cultured in the absence (–) or presence (+) of osteogenic medium (OM). *B*: alkaline phosphatase activity was measured at 28 days. Results are expressed 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% O₂) or hypoxic (5% O₂) 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% O₂ 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% O₂ 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% O₂ (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% O₂ 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

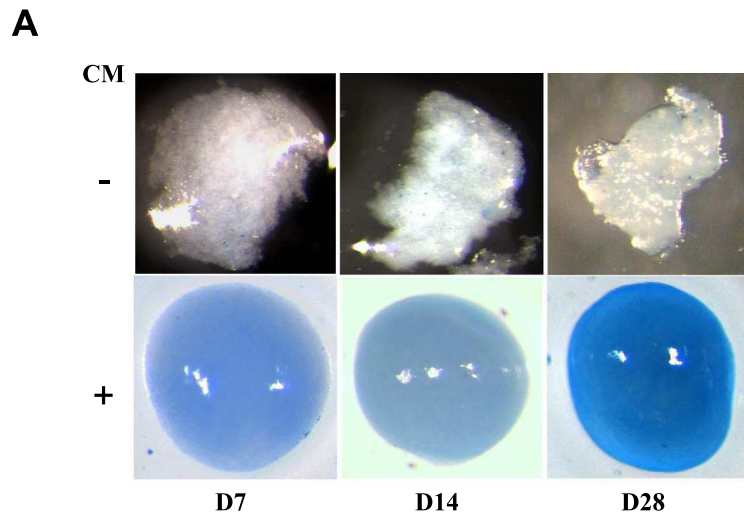
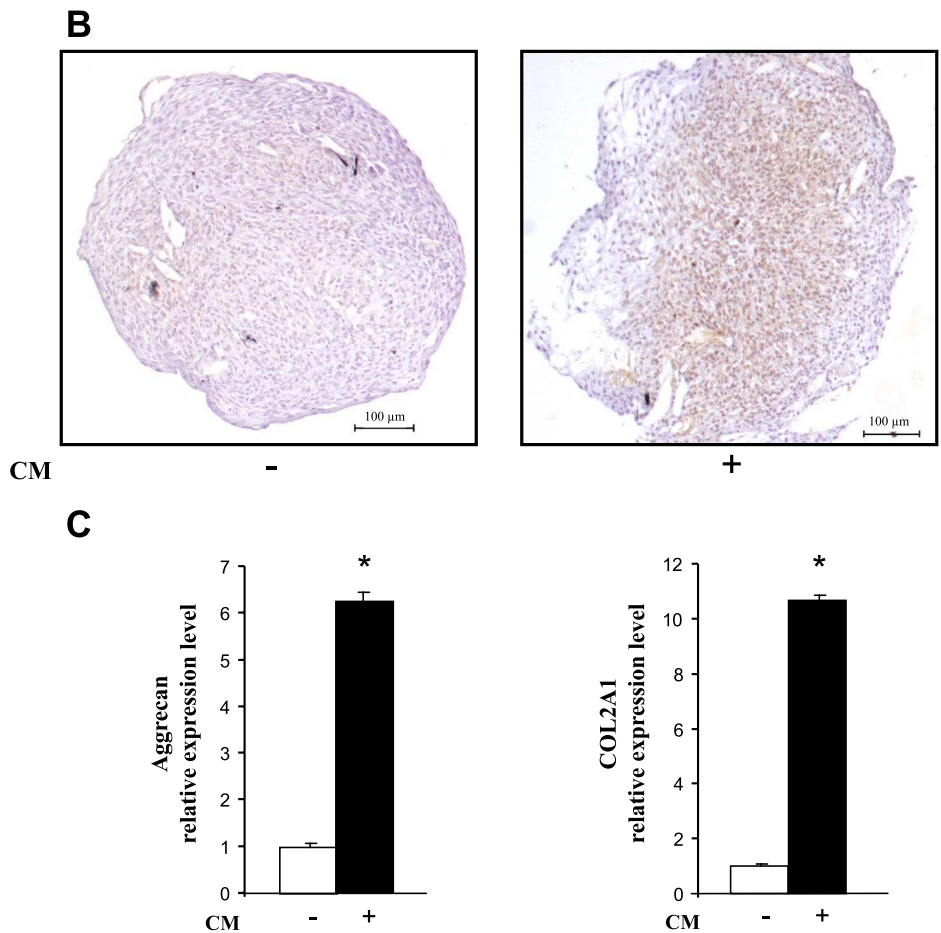


Fig. 3. Chondrogenic differentiation of hATSC: hATSC were cultured in pellets for 7, 14 and 28 days in the absence (-) or presence (+) of chondrogenic medium (CM). A: sulfated glycosaminoglycan (GAG) production. Production of GAGs was investigated at D7, D14 and D28 of chondrogenic differentiation by 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,

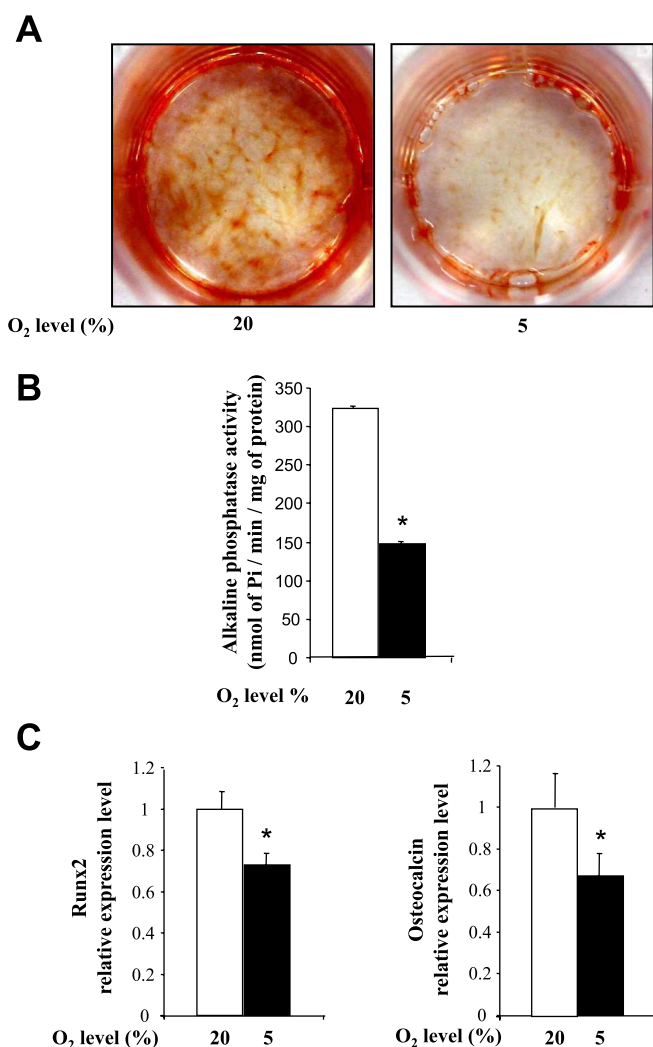


Fig. 4. Effects of 5% O₂ hypoxia on osteogenic differentiation potential of hATSC: hATSC were cultured in monolayer for 28 days in the presence of osteogenic medium under normoxic (20%) or hypoxic (5%) conditions. *A*: calcium deposition was evaluated by Alizarin Red staining. *B*: alkaline phosphatase 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-

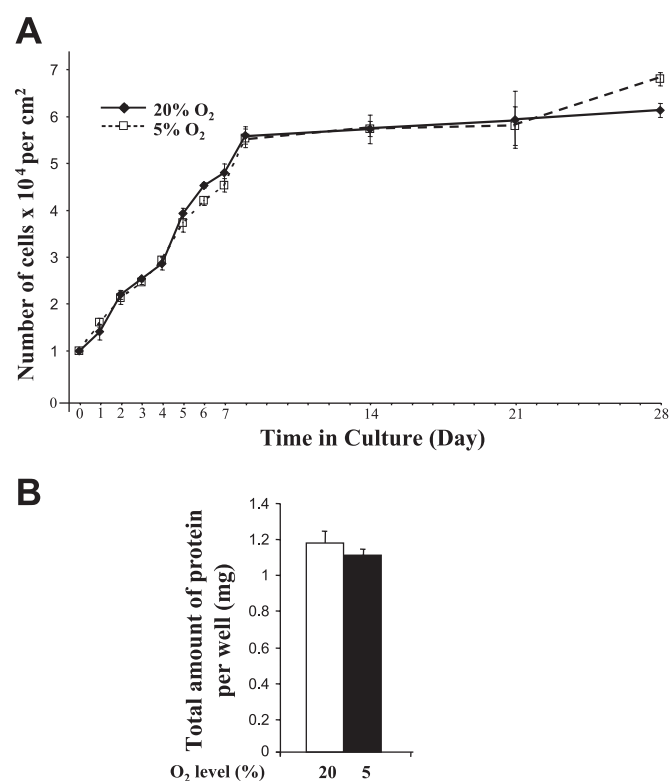


Fig. 5. Effects of 5% O₂ hypoxia on proliferation and protein synthesis of hATSC during osteogenic differentiation. *A*: evolution of hATSC number as a function of time. hATSC were cultured for the indicated times in monolayer culture in osteogenic medium and under normoxic (\blacklozenge) or hypoxic (\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.

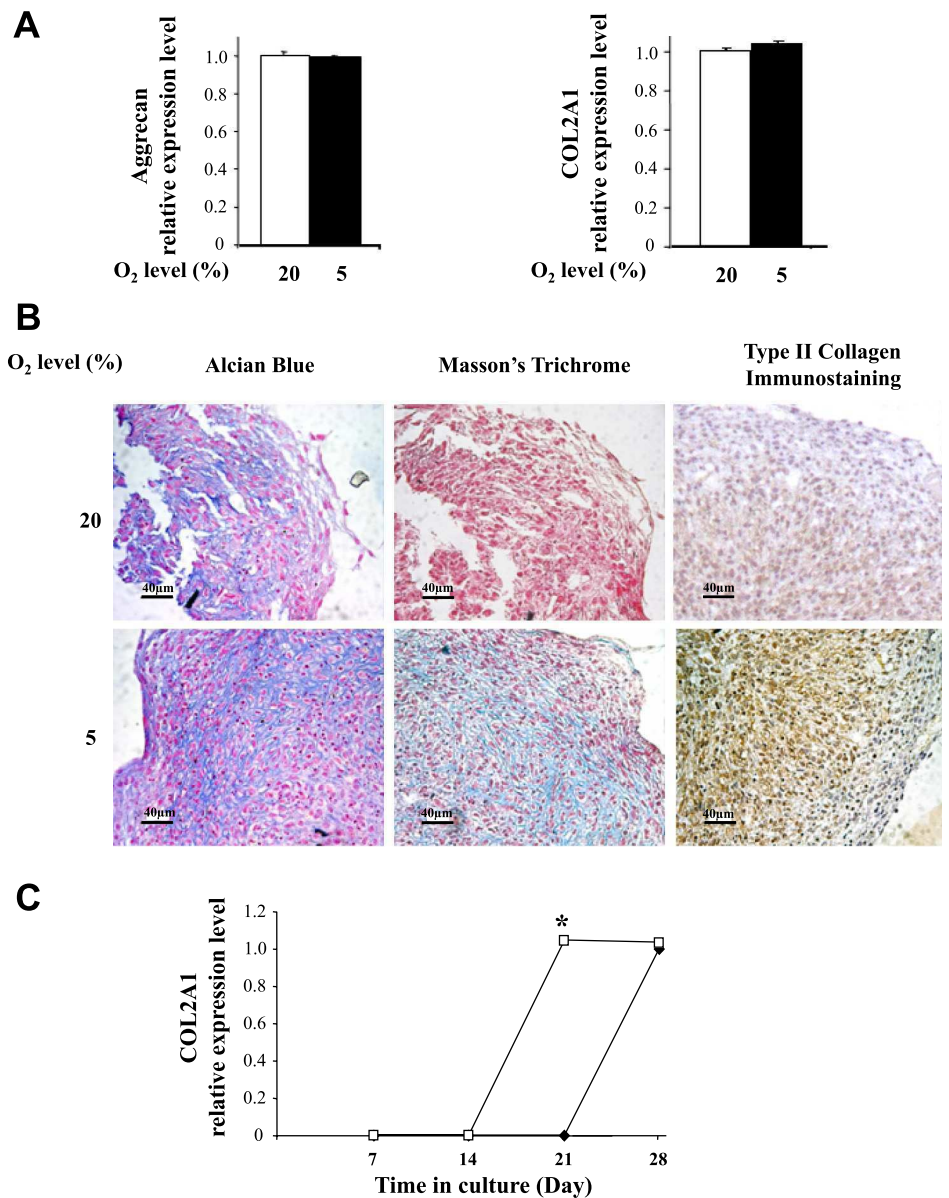


Fig. 6. Effects of 5% O₂ hypoxia on the chondrogenic differentiation potential of hATSC. hATSC were cultured in pellets for 28 days in the presence of chondrogenic medium under normoxic (20%) or hypoxic (5%) condition. **A**: phenotype of hATSC after 28 days of chondrogenic differentiation under normoxia (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 osteoarticular 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, Gimple 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, Gimple 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.
- Gimple 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, Gimple 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, Athanasiou 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, Huttmacher 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 JI, 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.



Article VI

Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cells chondrogenesis by a chemically over-sulphated polysaccharide from marine origin: potential application for cartilage regenerative medicine.

C. Merceron, E. Rederstorff, S. Portron, C. Colombeix, M. Masson, J. Lesoeur, S. Sourice, S. Collic-Jouault, P. Weiss and J. Guicheux.

Stem cells (2011) soumis.

Article VI : Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cells chondrogenesis by a chemically over-sulphated polysaccharide from marine origin: potential application for cartilage regenerative medicine – Stem cells

RESUME

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont considérées comme une source attractive de cellules pour ingénierie tissulaire du cartilage du fait de leur grande biodisponibilité et de leur capacité de prolifération *in vitro*. La différenciation des CSM en chondrocytes est cruciale dans la régénération du cartilage et peut être induite par des agents biologiques. Les glycosaminoglycans (GAG) sont d'importants complexes carbohydratés qui participent à divers processus biologiques par le biais de la régulation de protéines partenaires, comme, par exemple, les facteurs de croissance. Nous avons émis l'hypothèse que la différenciation chondrogénique des cellules souches dérivées du tissu adipeux humain (hCSTA) régie par le TGF- β 1 pourrait être potentialisée par un polysaccharide marin chimiquement sur-sulfaté et présentant des propriétés GAG-mimétiques. Afin de tester cette hypothèse, des hCSTA ont été cultivées en trois dimensions au sein de pellets, en présence de milieu chondrogénique contenant soit la forme sulfatée (GY785 DR), soit la forme sur-sulfatée (GY785 DRS) d'un polysaccharide de bas poids moléculaire. La différenciation chondrogénique a été évaluée par colorations HES et bleu alcian qui ont mis en évidence une augmentation de la production de collagènes totaux et de GAG au sein des pellets cultivées en présence concomitante de milieu chondrogénique et de GY785 DRS. Cette potentialisation de la différenciation chondrogénique s'est trouvée confirmée par une augmentation du niveau d'expression de *COL2A1*, *ACAN*, *COMP* et *SOX9* analysé par PCR en temps réel. De plus, l'analyse par résonance plasmonique de surface a révélé que le TGF- β 1 se liait au GY785 DRS avec une affinité supérieure à celle de la forme non sur-sulfatée du polysaccharide. Finalement nous démontrons que le polysaccharide marin GY785 DRS augmente le niveau de phosphorylation de ERK 1/2 dépendant du TGF- β , indiquant ainsi que le polysaccharide marin hautement sur-sulfaté renforce l'activité de signalisation intracellulaire médiée par le TGF- β . Ces données démontrent la potentialisation de la chondrogenèse des cellules souches médiée par le TGF- β par l'action d'un polysaccharide marin hautement sulfaté par génie chimique. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer comment ces données peuvent nous permettre d'exploiter le potentiel chondrogénique des CSM en médecine régénératrice du cartilage.

Running title: Marine polysaccharide stimulates chondrogenesis

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

Authors and affiliations : Christophe Merceron^{1,2}, Emilie Rederstorff^{1,3}, Sophie Portron^{1,2}, Caroline Colombeix^{1,2}, Martial Masson^{1,2}, Julie Lesoeur^{1,2}, Sophie Sourice^{1,2}, Sylvia Collic-Jouault³, Pierre Weiss^{1,2}, Claire Vinatier^{1,2,4} Jérôme Guicheux^{1,2*}.

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 Physiopathologie”, Faculté de chirurgie dentaire, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France.

² PRES-UNAM, UFR Odontologie, Université de Nantes, France.

³Laboratoire de biotechnologie et molécules marines (BRM/BMM), Ifremer, Rue de l'île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes cedex 3, France.

⁴GRAFTY SA - Eiffel Park - Bâtiment D - 415, rue Claude Nicolas Ledoux, Pôle d'Activités d'Aix en Provence - 13 854 Aix en Provence Cedex 3, France.

*Corresponding author: Prof. Jérôme Guicheux

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

Phone : +33 240412919 ; Fax : +33 240083712 ; e-mail : jerome.guicheux@inserm.fr

keywords : cartilage, adipose-derived mesenchymal stem cells, polysaccharides, TGF-beta

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) are considered an attractive source of cells for cartilage engineering owing to their availability, capacity of 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 factors-induced differentiation of MSC could be up-regulated by chemically over-sulphated marine polysaccharides. To test our hypothesis human adipose-derived MSC (hATSC) were cultured in pellets with TGF- β 1-supplemented chondrogenic medium containing either the polysaccharide GY785 DR or its over-sulphated isoform GY785 DRS. Chondrogenesis was monitored by the measurement of pellet volume and histological staining. Our data revealed an increase in pellet volume, total collagens and glycosaminoglycan production with GY785 DRS and chondrogenic medium. The enhanced chondrogenic differentiation of hATSC was further demonstrated by the increased expression of *COL2A1*, *ACAN*, *COMP* and *SOX9* by real time PCR. In addition, surface plasmon resonance analyses revealed that TGF- β 1, but not insulin, binds GY785 DRS with higher affinity compared to GY785 DR. Furthermore GY785 DRS was found to up-regulate the TGF- β 1-dependent phosphorylation of ERK1/2, indicating that the over-sulphated polysaccharide affects the MAP kinase signaling activity of TGF- β 1. These results demonstrate the up-regulation of the TGF- β 1-dependent stem cell chondrogenesis by a chemically over-sulphated marine polysaccharide. This polysaccharide from marine origin is easily producible and could therefore be considered a promising additive to drive an efficient and reliable MSC chondrogenesis for cartilage tissue engineering.

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 composed of a single 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]. Chondrocytes play a major role in maintaining the integrity of cartilage through the control of anabolic and catabolic processes. Cartilage is however susceptible to damage originating from aging, trauma, and inflammatory or degenerative diseases. These impairments often result in extracellular matrix 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 proved satisfactory effectiveness. In this context, the regeneration of a functional cartilage through the transplantation of mesenchymal stem cells with bioactive synthetic matrices has recently been contemplated [3, 4]. Mesenchymal stem cells (MSC) have initially been identified in bone marrow [5] and since in various other tissues such as adipose tissue, tendon, synovial membrane, muscle, periosteum [6]... MSC 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 sulphated polysaccharides such as glycosaminoglycans (GAGs) have been shown to modulate the biological activities of growth factors including TGF- β [8, 9]. The binding of growth factors to GAGs can raise their local concentration up to levels appropriate for signaling, protect them from degradation by extracellular proteases and act as co-receptors, facilitating their interaction with their receptors [10]. These biologically active polysaccharides derive their action from their

molecular structure, including molecular size and repeating unit features varying in size, osidic residues, linkage and carried substituents.

Natural polysaccharides derived from marine prokaryotes offer a significant structural chimiodiversity with novel striking biological properties [11, 12]. In addition, such natural GAG-mimetic can be chemically customized and produced in large amounts with relatively simple and reproducible processes, making them potential bioactive agents for medical applications. Among the large number of producing prokaryotic species [11], *Alteromonas infernus*, has been shown to produce a branched high molecular weight polysaccharide: GY785 (1.5×10^3 kDa). This polysaccharide is unique with no analogue known [13]. A low molecular weight (GY785 DR) and low molecular weight over-sulphated (GY785 DRS) derivatives from GY785 were produced by chemical modification and described as “heparin-like” compounds exhibiting some anticoagulant and pro-angiogenic properties [13, 14].

With respect to the potential effects of GAG-like polysaccharides on the regulation of growth factors bioavailability, we postulated that low molecular weight marine polysaccharides such as GY785 over-sulphated or not may influence the growth factor-mediated chondrogenic differentiation of MSC.

To address this issue, we sought to determine whether the presence of GY785 over-sulphated or not could influence the chondrogenic differentiation of human adipose tissue stromal cells (hATSC) driven by a TGF- β 1 and insulin supplemented culture medium. We first assess 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 histological characteristics of the pellets. At a transcriptional level, mRNA encoding the major chondrogenic markers (*COL2A1*, *ACAN*, *COMP* and *SOX9*) were analyzed by real-time PCR. Physical interactions between chondrogenic medium constituents (TGF- β 1 and insulin) and polysaccharides were

investigated using surface plasmon resonance approach. To get further insight into the regulation of cell signaling we finally 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 (Schipol-Rijk, The Netherlands). Hank's Balanced Sodium Salt (HBSS), Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (4.5g/L) (DMEM), alpha minimum essential medium (α MEM), phosphate buffered salt (PBS), penicillin/streptomycin, trypsin/EDTA (0.05%/0.53mM), L-glutamine, superscript III kit, NuPAGETM 4%–12% Bis–Tris gel, PVDF (polyvinylidene difluoride) Invitrolon membranes were obtained from Invitrogen Corporation (Paisley, UK). MTS reagents were from Promega (Charbonnières, France). Collagenase crude type I A, red blood cell lysis buffer, trypan blue, sodium L-ascorbate, ITS media supplement, dexamethasone, alcian blue and anisomycin 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). TGF- β 1 was obtained from PeproTech Inc. (London, UK). RNeasy micro kit was purchased from Qiagen and turbo DNase from Ambion Inc. both distributed by Applied Biosystem (Courtaboeuf, France). Protein content was determined using the Pierce Coomassie Plus assay (Pierce, Rockford, IL). The rabbit anti phospho-SMAD 2 (3101), phospho-ERK1/2 (9101), phospho-JNK 1/2 (9251), phospho-p38 (9211), SMAD 2 (3102), ERK1/2 (9102) and goat anti-rabbit IgG HRP-linked (7074) antibodies were purchased from Cell Signaling Inc. (Beverly, MA). The Western blot detection system was obtained from GE

Healthcare (Buckinghamshire, UK). 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 (1.5×10^3 kDa) produced by a bacterium: *Alteromonas infernus*, isolated from a sample of fluid collected in the vicinity of an active hydrothermal vent. The isolation procedure and characterization of the strain *Alteromonas 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 over-sulphated to obtain the GY785 DRS as described elsewhere [16]. GY785 DR and GY785 DRS are homogenous fractions with average molecular mass of 15 kDa and 20 kDa and 10% and 40% sulphate groups respectively, as determined by analytical high performance size-exclusion chromatography (Figure 1) [13].

Cell culture

Human adipose tissue stromal cells (hATSC) were isolated by collagenase digestion of lipoaspirates obtained from 3 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. Washed lipoaspirates were treated with collagenase (0.025%) in HBSS for 1 hour at 37°C with 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 medium). The digested

product was then centrifuged at 250 x g for 5 min to separate adipocytes from stromal cells. The supernatant was removed and cells were re-suspended in the control medium and filtered through a 70µm nylon mesh filter. The filtrate was centrifuged and cells re-suspended in red blood cell lysis buffer. The lysis reaction was stopped by adding control medium. The suspension was centrifuged and cells were finally re-suspended in control medium and plated at 5×10^4 cells/cm² in 75cm² culture flasks. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air and the control medium was replaced 24 hours after seeding to remove non adherent cells. Thereafter, the control medium was renewed every 2-3 days. To prevent spontaneous differentiation, hATSC primary cultures were grown to 90% confluence and then detached from the cell culture flask using trypsin/EDTA and plated at 10^4 cells/cm². For all subsequent experiments hATSC were used at passage 2. Human ATSC isolated using the above described protocol have been extensively characterized in our laboratory (for details see [18, 19]).

Viability and proliferation

Cell viability was evaluated using a MTS assay as previously described [20]. hATSC were plated in 24-well plates at a density of 1×10^4 cells/cm² and cultured in control medium in the absence or presence of 25, 50, 75 and 100 µg/mL of GY785 DR or GY785 DRS for 72h. As a negative control, cells were cultured in the presence of actinomycin D (5µg/mL) a well known cell death inducer [20]. Briefly, culture medium was removed and replaced by fresh medium containing MTS reagents according to the manufacturer's instructions. 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 72h of culture and

counted using trypan blue exclusion dye [18, 20]. Results were expressed as the total number of viable cells/cm² compared with the control condition (cells cultured in the absence of polysaccharide).

Chondrogenic differentiation

For the *in vitro* chondrogenic differentiation of hATSC, 5x10⁵ cells were placed into a 15 mL polypropylene tube containing 1mL of control medium, as previously reported [18]. They were then centrifuged for 5 min at 250 x 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 hours, pellets of hATSC were divided into 6 experimental groups and cultured either in the presence of control (CT) or chondrogenic (CH) medium alone or supplemented with GY785 DR or GY785 DRS. The chondrogenic medium was composed of serum-free control medium supplemented with 6.25µg/mL insulin, 6.25µg/mL transferrin, 6.25ng/mL sodium selenite (ITS), 50nM sodium L-ascorbate, 10⁻⁸M dexamethasone and 10ng/mL TGF-β1 [18, 19]. Culture media were changed every 2-3 days for 28 days. Pellets were maintained at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂ and 95% air).

Human ATSC pellet characterization

For the measurement of the pellet volume, pellets were considered as scalene ellipsoid entities. Their volumes were estimated using the following formula:

$$\text{Scalene ellipsoid volume} = \frac{4}{3} \pi a b c$$

In which a, b and c represent the radius of long axis in each spatial plane.

For pellet gross appearance, the production of sulphated GAGs was investigated on whole 28-day old 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 stereo-microscope (Leica MZ6, Wetzlar, Germany).

For histological analysis, 28 day-old pellets of hATSC were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections (5 μm thick) were de-paraffinized 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 as previously described [18]. Sections were then visualized using a light microscope (Zeiss Axioplan 2, Göttingen, Germany). Alcian blue reveals the presence of a GAG containing cartilaginous matrix and HES stains nucleus in purple, cytoplasm in pink and collagen fibres in yellow.

Transcript analysis

Total RNA from 28 day-old pellets of hATSC 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 (Waldbronn, Germany). 500ng of RNA per sample were reverse transcribed using the superscript III kit in a total volume of 30 μL . Complementary DNA (cDNA) was amplified in a total volume of 25 μL PCR reaction mix containing 12.5 μL of Brilliant[®] SYBR[®] Green Master Mix (1X) and 30nM of SYBR green reference dye. The sequence and concentration of each primer set are provided in Table I. The real-time polymerase chain reaction was carried out in a MX3000P[®] real-time PCR system (Stratagene) under the following conditions: 10min 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 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 compared to the cells cultured in the presence of chondrogenic medium.

Surface plasmon resonance

Experiments were carried out on a Biacore 3000 instrument (Biacore, Uppsala, Sweden). TGF- β 1 and insulin were covalently immobilized to the dextran matrix of a CM5 sensor chip (Biacore) as recommended by the manufacturer at flow rate of 5 μ L/min. Binding assay of GY785 DR (1.5, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 μ g/mL) and GY785 DRS (0.0312, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.50 and 1 μ g/mL) were performed in 10mM HEPES buffer, pH 7.4, containing 0.15M NaCl and 0.005% P2O surfactant (HBS-P buffer, Biacore) and dissociation was monitored for 15 min. Regeneration was achieved with NaOH (4.5 mmol/L) 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: 15,000 g/mol and GY785 DRS: 20,000 g/mol.

Western blotting

Confluent hATSC were cultured in the presence of TGF- β 1 (10ng/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 addition of a RIPA buffer (20mM Tris HCl, pH 7.5, 100mM potassium chloride, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM dithiothreitol, 20mM β -glycerophosphate, 2mM Na₃VO₄, 1mM PMSF and 1mM NaF). The protein concentration of cell lysates was determined with a Pierce Coomassie-Plus-protein assay. 30 μ g of total protein

were resolved by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels, and proteins were transferred to a PVDF membrane following the manufacturer's protocol. Membranes were blocked and probed in 5% non-fat dry milk in PBS/Tween20. Primary antibodies were diluted 1/1000 and were detected using goat anti-rabbit (HRP)-conjugated secondary antibodies diluted 1/2000 in 5% non-fat dry milk in PBS/Tween20. The blots were visualized by Enhanced ChemiLuminescence (ECL) development using a Western blotting detection system.

As a positive control for SMAD and 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 (10ng/mL) or inorganic phosphate (Pi; 10mM) as previously described [21].

Statistical analysis

Each experiment was repeated at least 3 times with similar results. Results are expressed as mean \pm SEM of triplicate determinations. Comparative studies of means were performed by using one-way ANOVA followed by a post hoc test (Fisher's projected least significant difference) with a statistical significance at $p < 0.05$.

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, 75 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 72h. As a negative control, cells were cultured in the presence of actinomycin D (5 μ g/mL). When treated with actinomycin D, the MTS activity and the proliferation of hATSC were significantly reduced by nearly 90%. At the concentration of 50 μ g/mL, GY785 DR induced a slight but significant increase in MTS activity (Figure 2A). GY785 DRS was found to trigger a dose-dependent increase in MTS

activity, with a maximum at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 2B). Regarding hATSC proliferation, GY785 DR did not elicit any beneficial effect (Figure 2C), whereas, the sulphated form of the molecule (GY785 DRS) at 50 and 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ significantly increased hATSC proliferation in comparison to the control condition (Figure 2D).

These results indicate that GY785 DR and GY785 DRS have only a slight but significant effect on the viability and proliferation of hATSC. In all subsequent experiments, GY785 DR and GY785 DRS were used at the dose of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Chondrogenic differentiation of hATSC cultured in the presence of polysaccharides

Since GY785 DR and GY785 DRS are depicted as GAG-like polysaccharides [13, 14], we paid attention to their putative properties in driving MSC chondrogenic differentiation. To this end, hATSC were cultured in three-dimensional pellet in the presence of control (CT) or chondrogenic (CH) medium supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of GY785 DR or GY785 DRS during 28 days. Chondrogenic differentiation was evaluated by a measurement of pellet volume and by the production of a GAG-containing cartilaginous matrix using alcian blue staining (Figure 3 A).

Surprisingly, volume estimation revealed that pellets exposed to GY785 DRS in combination with the chondrogenic medium undergo a massive increase by nearly 8-fold (Figure 3A upper panel). 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 polysaccharides supplementation, GAG production was up-regulated as evidenced by the intense dark blue color (Figure 3A lower panel).

To further characterize hATSC chondrogenesis, cell morphology and matrix composition were then histologically examined by HES and alcian blue staining on pellets sections (Figure

3B). In the presence of control medium (CT), HES staining allows distinguishing cell nuclei (purple) and cytoplasm (pink) but does not evidence a particular organization of the cells (Figure 3B a, c and e). On the contrary, in the presence of chondrogenic medium (CH), supplemented or not with polysaccharide, HES staining evidenced a particular structural organization of the cells within the pellet (Figure 3B g, i and k). In the external zone, cells are tangentially oriented to the surface of the pellet and in the innermost part, cells seem to be arranged radially. Moreover, in the presence of chondrogenic medium, a yellow-orange ring is visible, evidencing the synthesis of collagen fibers within the matrix (Figure 3B g, i and k). Alcian blue staining failed to reveal the presence of sulphated GAG within the matrix of pellets cultured in control medium (Figure 3B b, d and f). Interestingly, in the presence of chondrogenic medium pellet sections were strongly positive for sulphated GAG detection (Figure 3B h, j and l), especially in the presence of chondrogenic medium supplemented with GY785 DRS polysaccharide, where a denser deep blue staining can be observed.

To confirm the cartilage-like appearance of hATSC pellets evidenced by our histological observations, we were then interested in determining the relative expression of *COL2A1*, *ACAN*, *SOX9* and *COMP* transcripts, by real-time PCR (Figure 4). Our data indicate that in the presence of control medium (CT) 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 4 chondrogenic markers when compared to GY785 DR. GY785 DR failed to induce any additive or synergistic effect with the chondrogenic medium.

Taken together, these results show that GY785 DRS potentiates the chondrogenic differentiation of hATSC when used concomitantly with chondrogenic medium.

Interactions between GY785 DR or GY785 DRS polysaccharides with TGF- β 1/insulin of chondrogenic medium.

To further address whether GY785 DRS may stimulate hATSC chondrogenesis, we then embarked on a set of surface plasmon resonance experiments. Chondrogenic medium contains 2 major constituents: TGF- β 1 [22, 23] and insulin [24, 25], which are known to drive the chondrogenic differentiation of MSC. To investigate whether TGF- β 1 and insulin can specifically interact with GY785 DR or GY785 DRS, quantitative measurements of their potential physical interaction were performed by Biacore analysis. TGF- β and insulin were immobilized on the chip and increasing concentrations of GY785 DR and GY785 DRS polysaccharides were injected over the chip surface. The results expressed in response units were recorded for each analyte concentration in the form of sensorgram and dissociation constant (K_d) was calculated. GY785 DR and GY785 DRS polysaccharides were both able to bind immobilized TGF- β (Figure 5). Binding affinity of GY785 DR for TGF- β is about one-hundred-fold lower than that of GY785 DRS polysaccharide with respective K_d of $3,45 \cdot 10^{-8}$ and $5,5 \cdot 10^{-10}$ M. No modification of the kinetic parameters of the interaction between GY785 DR or GY785 DRS in the binding of immobilized insulin was observed (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 none of them interacts with insulin.

Effects of GY785 DRS on TGF- β 1 signalling pathway.

TGF- β 1 is known to activate several signalling pathways including SMAD 2 [26]. Therefore, to address whether GY785 DRS/ TGF- β 1 interaction evidenced by surface plasmon resonance may lead to specific activation of cellular events in hATSC, we were interested in determining the potential up-regulation of TGF- β dependent activation of SMAD 2 in hATSC (Figure 6). To this end hATSC were exposed to 10ng/mL of TGF- β 1 and 50 μ g/mL of GY785 DRS alone or concomitantly for 1, 4, 8 and 24h. Immunoblots of cell lysates indicated that TGF- β 1 alone or in association with GY785 DRS polysaccharide induced the phosphorylation of SMAD 2 in as early as 1h and until 24h. The presence of the sulphated polysaccharide alone is 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 signalling 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 ERK 1/2 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 up-regulation of the phosphorylation of ERK 1/2 as early as 4h. This stimulation was maintained up to 24h. 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.

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 were 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] (Figure 6 right pannel). The phosphorylation of the various SMAD and MAPK was not associated with changes in their basal levels, suggesting that their phosphorylation resulted from the stimulation of regulatory upstream kinases.

These data suggest that TGF- β 1 and GY785 DRS may act concomitantly in a synergic manner to stimulate the MAP Kinase ERK 1/2 activation in hATSC.

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 on tissue engineering combining chondrogenic cells, scaffolding materials and morphogenic factors. MSC, especially those from adipose tissue, represent an attractive source of cells for cartilage engineering due to their easy harvesting, their high capacity of *in vitro* expansion and their chondrogenic potential [30]. However, exploitation of the MSC chondrogenic potential can not be done without considerable breakthrough in the use of adapted differentiation conditions, combining tri-dimensional culture and appropriate morphogens.

In this context, with a view to optimize 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 adhesion, migration, proliferation and differentiation of cells [31], likely via the presence of sulphate groups on their carbohydrate structure. In the light of the particular biological properties and chemical structure of over-sulphated GAG-like polysaccharides from marine origin, we logically questioned whether GY785 DR and its over-sulphated analogue may affect MSC behavior.

It has been long described that sulphated GAGs, such as dermatan, chondroitin and heparan sulphate are able to stimulate the proliferation of fibroblasts [32], but the effects of marine sulphated polysaccharides on the proliferation of mesenchymal stem cells have not yet been characterized. Accordingly, in a first set of experiments we were interested in demonstrating that the over-sulphated GY785 DRS, and in a lesser extent its non over-sulphated 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 pellet with GY785 DRS (and not GY785 DR) and a growth factor-rich chondrogenic medium induces a dramatic increase in volume and GAGs contents of chondrogenic pellets. Since the effects of GY785 DR and DRS on the cell proliferation were quite modest, it is unlikely that the increase in pellet volume might be due to an increase in cell proliferation. It seems therefore reasonable to speculate that our data rather suggest that the over-sulphated 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 they are only distinguishable by the degree of sulphation, our data clearly shed the light on the role of the sulphate groups of polysaccharides in controlling their biological properties. Previous studies have reported that heparan sulphate and structurally related GAG (dermatan sulphate, dextran sulphate) were involved in the regulation of chondrogenesis specifically in nodule growth. They have also observed that the non sulphated forms of their polysaccharides were 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, concomitantly with our chondrogenic medium, was able to stimulate the expression levels of several chondrogenic genes. We focused our efforts on three extracellular 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 towards the chondrogenic lineage, SOX9. Our real-time PCR highlighted the up-regulation of the 4 chondrogenic markers thereby confirming our histological observation.

Sulphated GAGs are able to bind and regulate a number of proteins such as cytokines, chimiokines, growth factors, morphogens, enzymes and adhesion molecules. Some growth factors such as VEGF or 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 to 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 over-sulphated 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 over-sulphated GY785 DRS may act synergistically with TGF- β 1 through a physical interaction as evidenced 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 osteo-chondrogenic differentiation of MSC by up-regulating the SMAD and MAP kinases signalling pathways [27, 28]. Whether the *in silico* physical interaction evidenced by Biacore, may therefore lead to the activation of specific cellular responses *in vitro* was then investigated by deciphering the SMAD and MAP kinase pathway activation in response to

concomitant treatment of hATSC with GY785 DRS and TGF- β 1. Whilst SMAD 2 pathway was not up-regulated by this bi-treatment, our experiments evidenced that the GY785 DRS and TGF- β 1 may act concomitantly to induce a sustained activation of the ERK 1/2 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 ERK 1/2 activation. Whether the induced ERK 1/2 activation by the concomitant treatment of hATSC with a TGF- β 1 containing chondrogenic medium and GY785 DRS may lead to increased chondrogenesis should be paid further attention using specific chemical inhibitors or small interfering RNA approach directed against ERK 1/2.

Conclusion

As a conclusion, we have demonstrated that GY785 DRS stimulates hATSC chondrogenic differentiation likely through interaction with TGF- β 1. This GAG-like polysaccharide from marine origin is easily producible and could therefore be considered a promising additive to drive an efficient and reliable MSC chondrogenesis.

Whereas the underlying mechanisms of the interaction between GY785 DRS and TGF- β 1 remain poorly deciphered, it could be of major relevance to further dissect these molecular mechanisms and its biological consequences particularly 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”. The authors also gratefully acknowledge Dr F. Lejeune (clinique Brétéché Nantes) for harvesting human lipoaspirates; M. Maillason and Y. Jacques (Plateforme IMPACT biogenouest - CRCNA-INSERM U892) for their assistance in surface plasmon resonance experiments, C. Sinquin and J Ratiskol (IFREMER) for the GY785 DR and GY785 DRS polysaccharides production and analysis and M. Gatius-Perré for helpful discussions. Authors also thank J. Ashton-Chess for critical reading of the manuscript.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

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. 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.
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. *Carbohydrates Polymers*. 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 J, Jouault S, Chevlot 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. Raguenes 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. *Carbohydrate Polymers*. 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 transplantation in press*. 2010.

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.

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.

Tables

Gene	Gene Bank Accession Number	Sequence	Base Pairs (bp)
<i>β-ACTIN</i>	NM_001101	Fwd 5'- CCAACCGCGAGAAGATGA -3' Rev 5'- CCAGAGGCGTACAGGGATAG -3'	97
<i>Type II collagen - α1 chain (COL2A1)</i>	NM_001844	Fwd 5'- TGTCAGGGCCAGGATGTC -3' Rev 5'- ATCATTATACCTCTGCCCATCC -3'	63
<i>Aggrecan (ACAN)</i>	NM_001135	Fwd 5'- CCTCCCCTTCACGTGTAAAA -3' Rev 5'- GCTCCGCTTCTGTAGTCTGC -3'	64
<i>Sex determining region Y-box 9 (SOX9)</i>	NM_000346	Fwd 5'- GTACCCGCACTTGCACAAC -3' Rev 5'- TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC -3'	72
<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)</i>	NM_000095	Fwd 5'- GCACCGACGTCAACGAGT -3' Rev 5'- TGGTGTTGATACAGCGGACT -3'	63

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

Figures and figure legends

Figure 1: Structure of the nonasaccharidic repeating unit of GY785 DR. GY785 DR is naturally sulphated on the position C2 of the galacturonic acid residue in blue. GY785 DRS is a chemically over-sulphated form of GY785 DR. Putative positions for additional sulphate groups (SO₃Na) are indicated in red by arrows.

Figure 2: Human ATSC viability and proliferation. Human ATSC were cultured in the presence of either GY785 DR (A and C), GY785 DRS (B and D) at the indicated concentrations or actinomycin D (5µg/mL) for 72h. 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. * $P < 0.05$ compared to the control condition (0µg/mL of polysaccharide).

Figure 3: Histological characterization of hATSC pellets. Human ATSC were cultured in pellets in the presence of control (CT) or chondrogenic (CH) medium supplemented or not with 50µg/mL of GY785 DR or GY785 DRS during 28 days. The pellet volumes were calculated by equating these entities to ellipsoids. * $P < 0.05$ compared to the control condition (0µg/mL of polysaccharide). GAG production was evaluated at a gross level after alcian blue staining of the whole pellets. Bar: 500µm (A). 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 the materials and methods section. Bar: 50µm (B).

Figure 4: Analysis of the expression levels of chondrogenic markers. Human ATSC pellets were cultured in the presence of control (CT) or chondrogenic (CH) medium supplemented or

not with 50µg/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 PCR. Results are expressed as relative expression level compared to the chondrogenic medium in the absence of polysaccharide. * $p < 0.05$ compared to chondrogenic medium (CH). # $p < 0.05$ compared to chondrogenic medium supplemented with GY785 DR.

Figure 5: Determination of GY785 DR and GY785 DRS binding to TGF-β1. The binding of GY785 DR (A) and GY785 DRS 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 regions used in determining equilibrium dissociation constants (K_d (M)) are only shown. The resulting sensorgrams were fitted using BiaEval 4.1 software (Biacore).

Figure 6: Effect of GY785 DRS on TGF-β1-dependent activation of SMAD 2 and MAP kinase pathways. Human ATSC were treated with 10ng/mL of TGF-β1 in the presence or the absence of 50µg/mL of GY785 DRS for the indicated times. MC3T3-E1 were used as positive controls. Cells were rapidly frozen in liquid nitrogen before lysis at 4°C. 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.

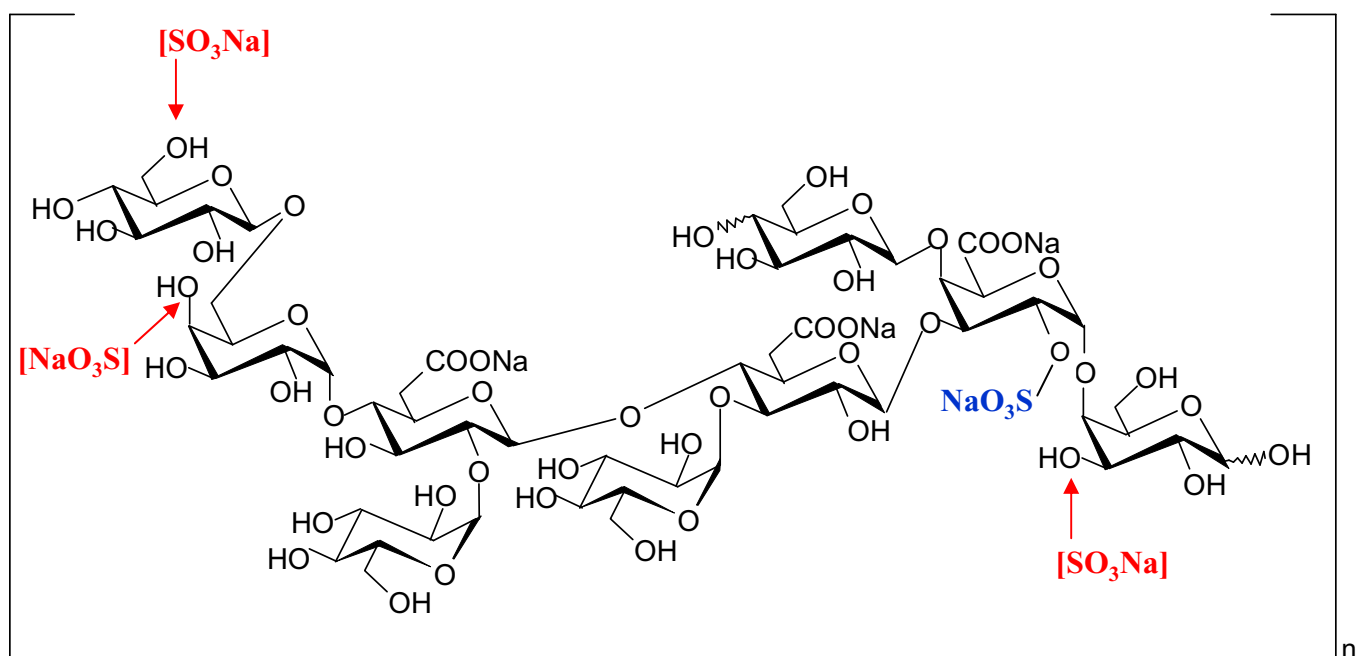


Figure 2

TOP

J. Guicheux

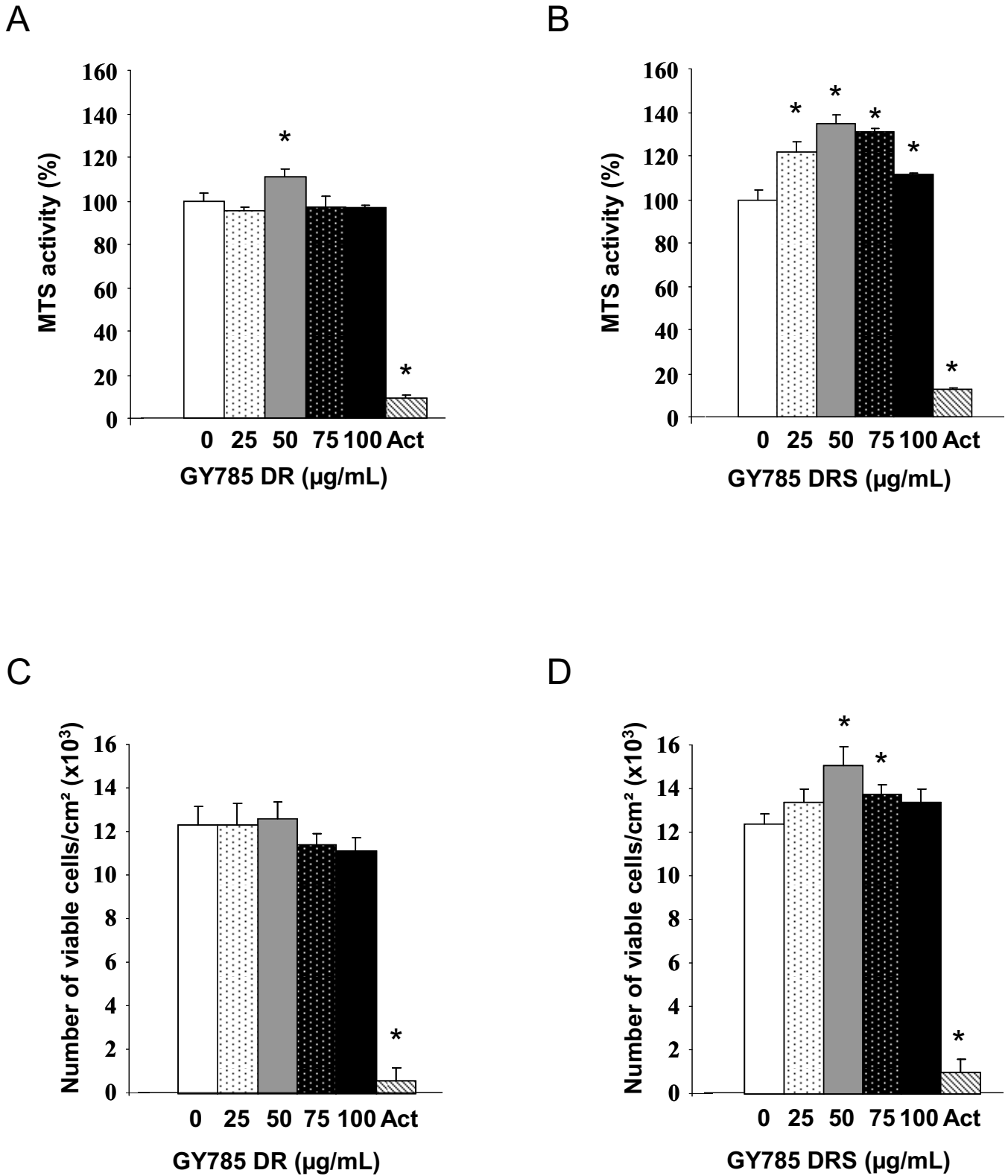


Figure 3

TOP

B

HES

BA

J. Guicheux

A

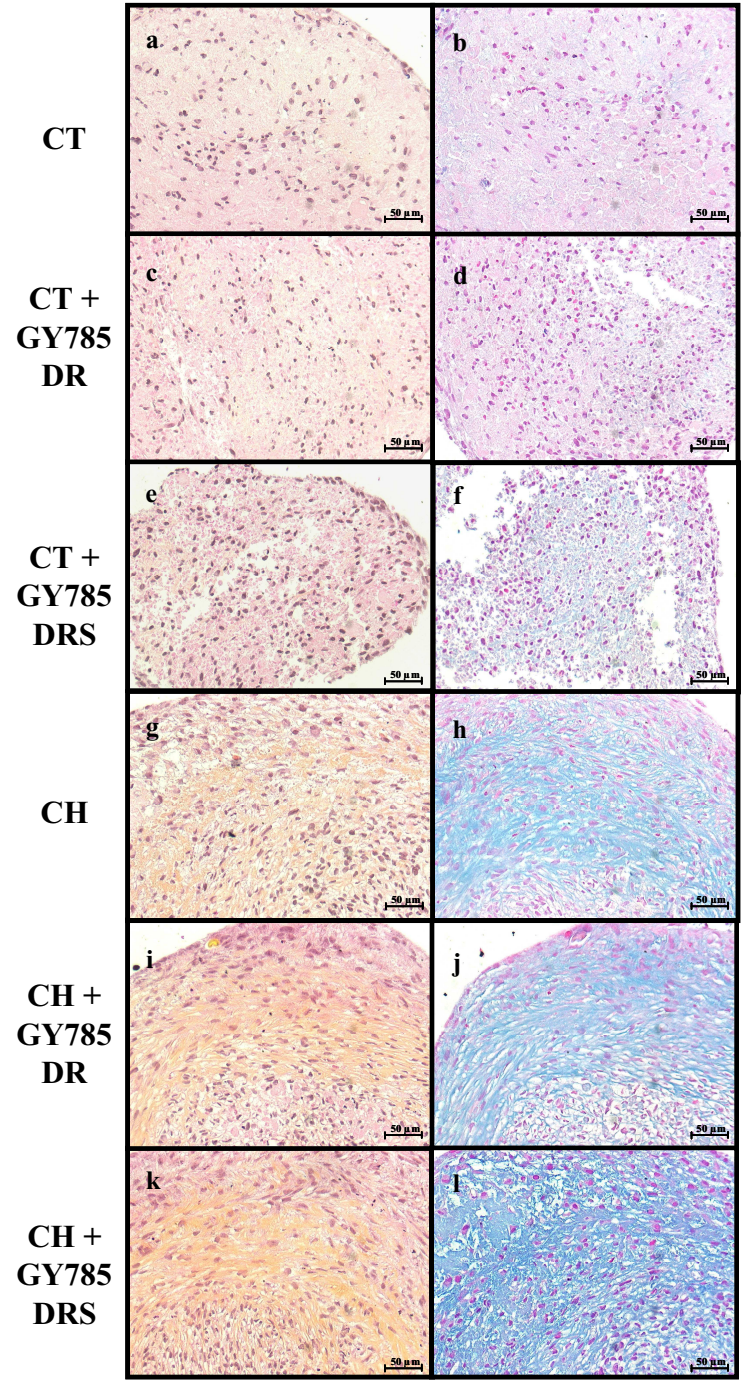
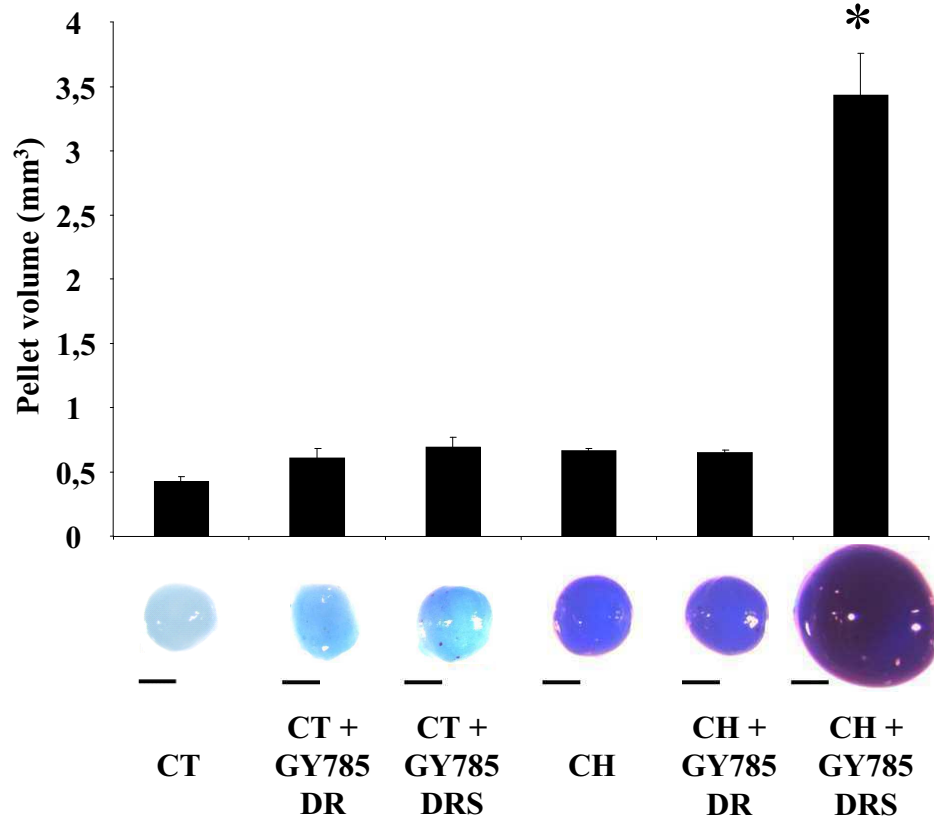
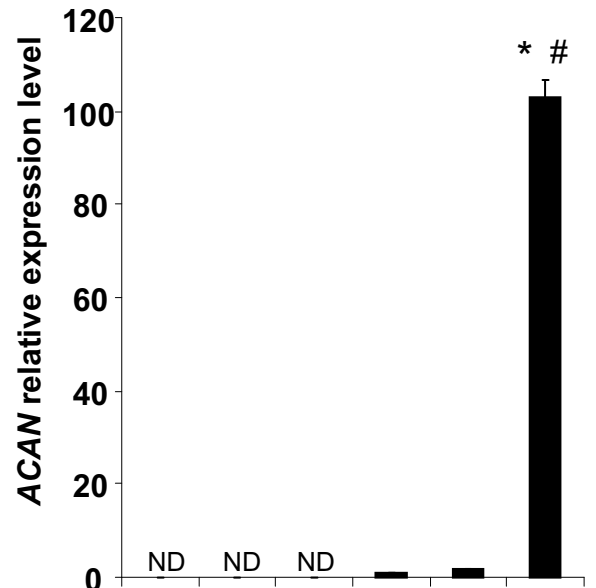
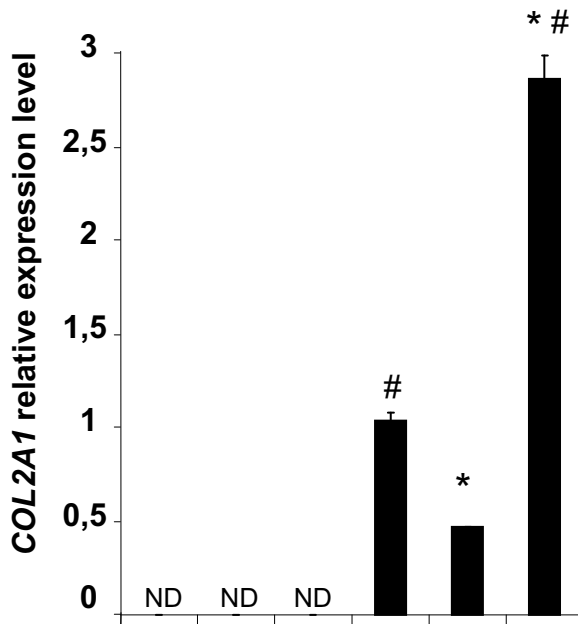


Figure 4

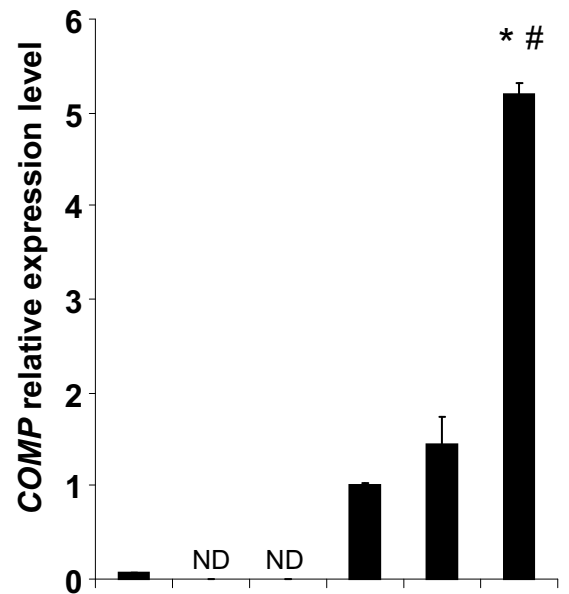
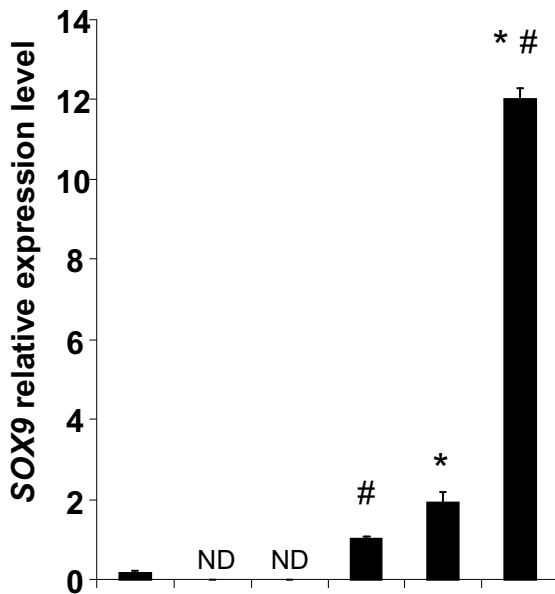
TOP

J. Guicheux



CT	+	+	+	-	-	-
CH	-	-	-	+	+	+
GY785 DR	-	+	-	-	+	-
GY785 DRS	-	-	+	-	-	+

CT	+	+	+	-	-	-
CH	-	-	-	+	+	+
GY 785 DR	-	+	-	-	+	-
GY785 DRS	-	-	+	-	-	+



CT	+	+	+	-	-	-
CH	-	-	-	+	+	+
GY785 DR	-	+	-	-	+	-
GY785 DRS	-	-	+	-	-	+

CT	+	+	+	-	-	-
CH	-	-	-	+	+	+
GY785 DR	-	+	-	-	+	-
GY785 DRS	-	-	+	-	-	+

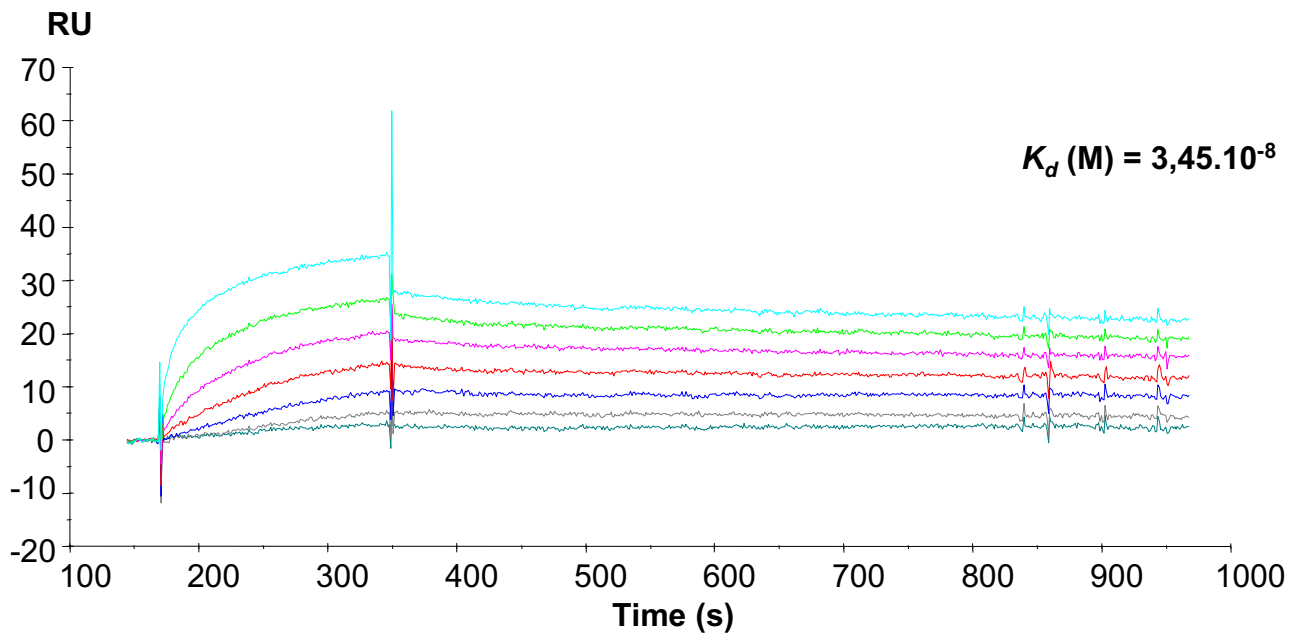
Figure 5

TOP

J. Guicheux

A

GY785 DR



B

GY785 DRS

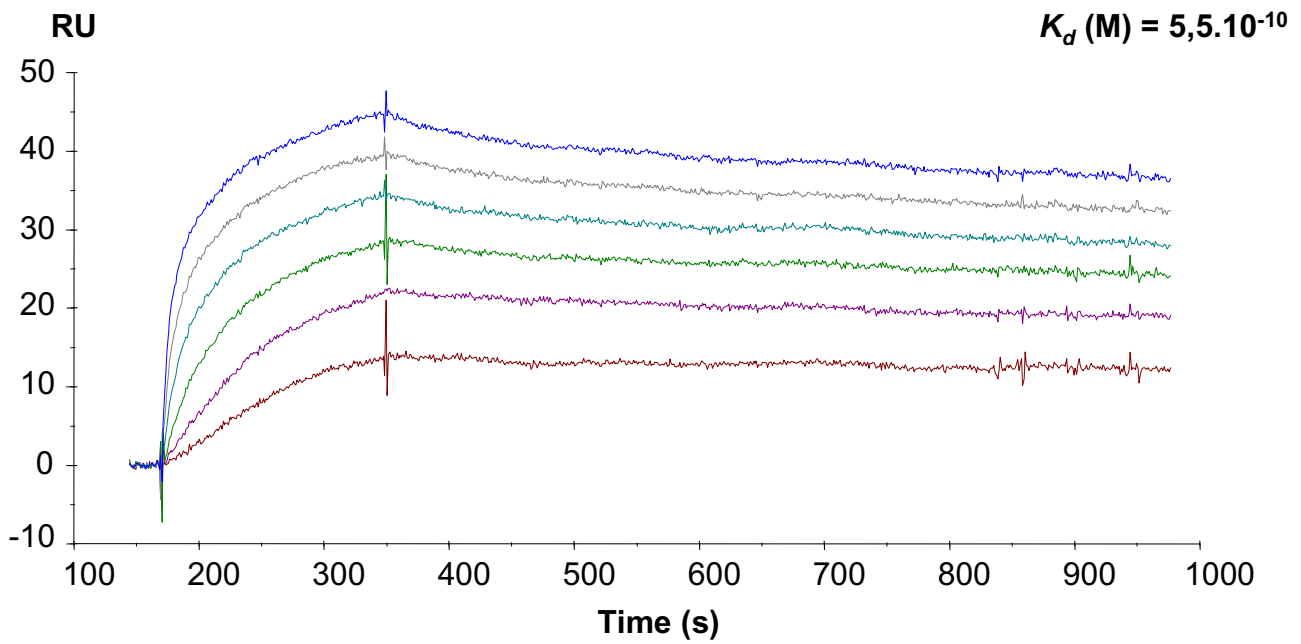
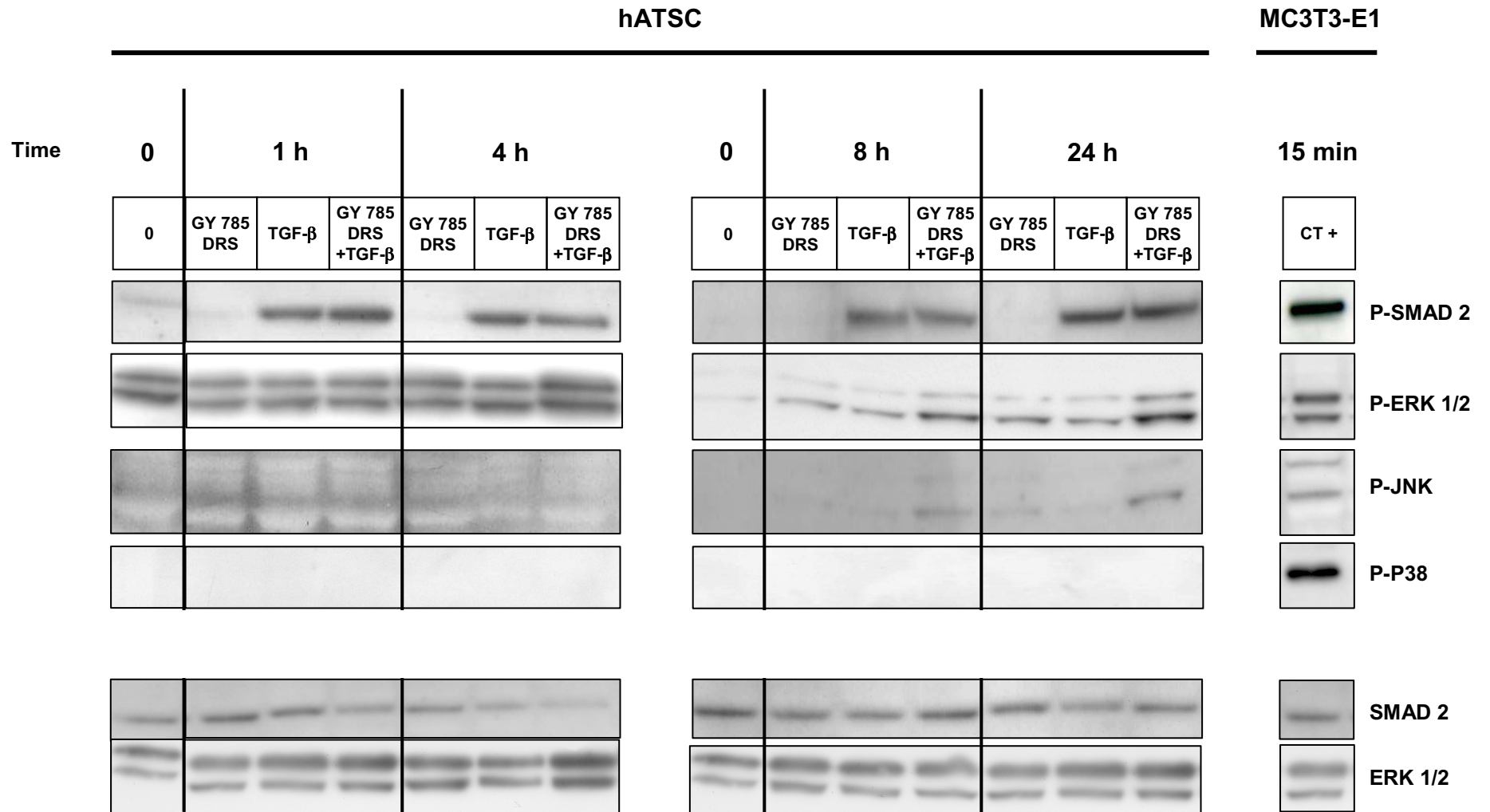


Figure 6

TOP

J. Guicheux



2.2 - Discussion

Les stratégies d'ingénierie tissulaire du cartilage s'orientent vers l'identification de sources cellulaires chondrogéniques ainsi que vers l'optimisation des conditions permettant leur différenciation. Les CSM représentent en effet une source cellulaire alternative aux chondrocytes. Les CSM ont été isolées pour la première fois à partir de la moelle osseuse [485, 486]. Depuis, leur existence a été démontrée au sein de différents tissus tels que le périoste [667], le périchondre [659] ou le tissu adipeux [536]. Les CSM ont pour caractéristiques communes, quelle que soit leur origine, de proliférer en culture, d'être multipotentes et d'exprimer un ensemble de marqueurs de surface typique. Nos travaux (article V) ont démontrés que les hCSTA répondent en tous points à ces critères, d'une part, par la mise en évidence de leur potentiel ostéo- et chondrogénique sur la base de colorations histologiques et d'autre part, par l'expression des marqueurs de surface CD29, CD44, CD49d, CD90, CD105 et l'absence des CD34 et 45.

L'objectif de ces deux études a été de déterminer des conditions de différenciation optimales, afin d'orienter ces CSM vers un phénotype chondrocytaire. Notre approche s'est basée, d'une part sur l'utilisation d'une faible tension en oxygène afin de reproduire les conditions d'oxygénation physiologiques du cartilage articulaire (article V) et d'autre part d'enrichir le milieu de différenciation par la présence de polysaccharides d'origine marine GAG mimétiques (GY785 DR et DRS), car les GAG sont présents en grandes proportions au sein de la MEC du cartilage et sont impliqués dans la régulation de multiples processus biologiques [945] (article VI).

Dans la première partie de ce travail expérimental (article V), notre objectif a été de définir le potentiel ostéo-chondrogénique des hCSTA. Nos travaux ont démontré que les hCSTA, en présence d'un milieu ostéogénique, expriment les marqueurs du phénotype ostéoblastique tels que le facteur de transcription *RUNX2* et l'ostéocalcine au niveau transcriptionnel, voient leur activité ALP augmentée et produisent une matrice minéralisée. En parallèle, les hCSTA mises en présence de milieu chondrogénique expriment les ARN codant *COL2A1* et *ACAN* ceci étant corrélé, au niveau histologique, par la présence des protéines correspondantes au sein de la matrice mises en évidence par immunomarquage et coloration au bleu alcian.

Suite à la mise en évidence du potentiel ostéo-chondrogénique des hCSTA, notre second objectif a été de déterminer dans quelles mesures l'hypoxie peut affecter leurs capacités de différenciation. Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux effets de l'hypoxie sur le potentiel de différenciation ostéogénique des hCSTA et avons démontré qu'une hypoxie à 5% d'O₂ induisait une diminution du niveau d'expression de *RUNX2* et de l'ostéocalcine tout en

réduisant l'activité ALP et le dépôt d'une matrice minéralisée, sans toutefois altérer la viabilité des cellules ou leur niveau de synthèse protéique. Contrairement à la différenciation ostéogénique, la différenciation chondrogénique ne semble pas être affectée en termes de niveau d'expression des ARN *COL2A1* et *ACAN*. Mais, de manière intéressante, au niveau histologique, les hCSTA cultivées en pellet sous hypoxie présentent une quantité importante de collagène de type II au sein de leur matrice en comparaison aux cellules cultivées en normoxie. Ces données suggèrent que l'hypoxie favorise la production de collagène de type II. L'analyse par PCR en temps réel à différents temps indique clairement que l'hypoxie favorise une induction précoce de l'expression de *COL2A1*.

L'ensemble de ces données permet de considérer l'hypoxie comme un facteur affectant de manière différentielle le potentiel ostéogénique et le potentiel chondrogénique des hCSTA. Les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets observés restent à être mis en évidence mais impliquent vraisemblablement la famille de facteur de transcription HIF. En effet, le rôle de HIF dans le maintien du phénotype chondrocytaire est largement décrit [853].

Nos données paraissent pertinentes dans le développement de stratégies d'ingénierie des tissus ostéo-articulaires. En effet, l'oxygénation, est un élément essentiel à prendre en compte dans l'ingénierie tissulaire osseuse, c'est pourquoi à l'heure actuelle, des stratégies de vascularisation de greffons osseux sont en cours de développement. La nature avasculaire du cartilage en fait un tissu de choix dans le contexte de la médecine régénératrice utilisant des biomatériaux. Les résultats de ces travaux supportent l'hypothèse qu'une faible tension en oxygène, comparable à celle à laquelle les CSM sont soumises lors de leur ensemencement au sein de biomatériaux, favoriserait leur différenciation chondrogénique.

Dans la deuxième partie de ce travail expérimental, nous nous sommes intéressés à l'optimisation des conditions de culture afin de promouvoir la différenciation chondrogénique des CSM. Nous avons focalisé notre attention sur l'identification d'un agent chondrogénique efficace, facilement disponible et d'utilisation aisée.

De nombreux éléments indiquent que les polysaccharides tels que les GAG sont impliqués dans la régulation de multiples processus biologiques incluant l'adhésion, la migration, la prolifération ou la différenciation cellulaire et ce probablement via la présence de groupements sulfates sur leur structure [125]. Connaissant la structure particulière de polysaccharides marins sulfatés mimétiques des GAG (GY785 DR) et son homologue sur-sulfaté (GY7875 DRS), nous nous sommes logiquement intéressés à leur rôle potentiel dans la différenciation chondrogénique des hCSTA.

Les effets des GAG physiologiquement présents au sein de l'organisme (dermatane, héparane, kératane et chondroïtine sulfates) sur le comportement des CSM ont largement été décrits. Mais les effets des polysaccharides marins, dont la spécificité réside dans leur structure ramifiée, restent encore méconnus. En conséquence, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, aux effets du GY785 DR et de son homologue sur-sulfaté, le GY785 DRS sur la prolifération et la viabilité des hCSTA. Le GY785 DRS et, dans une moindre mesure, le GY785 DR exercent un léger effet sur la prolifération. Nous nous sommes ensuite focalisés sur les effets de ces polysaccharides après avoir constaté une augmentation importante du volume des pellets et de leur contenu en GAG après 28 jours de culture en présence de milieu chondrogénique supplémenté en GY785 DRS. D'après les effets modestes des GY785 DR et DRS constatés sur la prolifération, cette augmentation de volume des pellets ne semble probablement pas due à une prolifération cellulaire. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle le GY785 DRS serait capable de promouvoir la production et l'accumulation d'une matrice chondrogénique. Le GY785 DR et le GY785 DRS étant des polysaccharides ramifiés homologues de structure et 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 concordance avec les données de la littérature. En effet, de précédentes études ont démontré que les GAG sulfatés naturellement présents dans la MEC du cartilage étaient impliqués dans la régulation de la chondrogenèse [948, 949]. Afin de confirmer nos observations histologiques, nous avons analysé, au niveau transcriptionnel, comment le GY785 DRS additionné au milieu chondrogénique était capable de stimuler l'expression de marqueurs chondrogéniques. Nous avons donc pour cela évalué les niveaux d'expression de 3 protéines de la matrice extracellulaire : (*COL2A1*, *ACAN* et *COMP*) ainsi que celui du facteur de transcription *SOX9*. Nos analyses par PCR en temps réel ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de ces 4 marqueurs, confirmant ainsi nos observations histologiques. Par ailleurs, les GAG sulfatés ont été décrits comme capables de lier et de réguler la biodisponibilité de nombreuses protéines (phénomène de crinopexie) [950], intervenant de cette manière dans le stockage, la protection vis-à-vis de la dégradation, la stabilisation d'interactions ligand-récepteur [117, 951]... Afin de déterminer comment l'insuline ou le TGF- β 1, les deux composants majeurs de notre milieu de différenciation chondrogénique, pouvaient physiquement interagir avec les GY785 DR et DRS, 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- β 1 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- β 1 en formant un complexe stable. Le TGF- β 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 dans notre modèle de hCSTA traitées par l'association du GY785 DRS au TGF- β 1. Nos expériences de western-blot ont permis de mettre en évidence l'induction prolongée de la voie de signalisation ERK 1/2 par l'action complémentaire du GY785 DRS associé au TGF- β 1.

L'ensemble de nos données suggère fortement que l'interaction physique existante entre le GY785 DRS et le TGF- β 1 soit à l'origine de l'activation de la voie ERK 1/2. Bien que l'activation de la voie ERK 1/2, médiée par le milieu de différenciation contenant du TGF- β 1 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 cette partie des travaux expérimentaux a démontré que le GY785 DRS stimule la différenciation chondrogénique des hCSTA probablement en interagissant avec le TGF- β 1. Ce polysaccharide GAG-mimétique d'origine marine est aisément productible et représente un actif biologique prometteur dans l'engagement d'une différenciation chondrogénique efficace. Les mécanismes des interactions entre le GY785 DRS et le TGF- β 1 restent encore méconnus, il serait particulièrement intéressant de les élucider ainsi que leurs conséquences biologiques afin d'exploiter de manière optimale le potentiel des cellules souche dans la réparation du cartilage.

Cet axe de nos travaux est essentiellement orienté vers le développement de l'utilisation de cellules souches issues du tissu adipeux et l'optimisation de leurs conditions de différenciation chondrogénique dans le contexte de l'ingénierie tissulaire. Il nous permet de démontrer que les hCSTA représentent une source cellulaire chondrogénique de premier plan et que leur différenciation peut être modulée par la maîtrise de facteurs environnementaux et l'identification d'agents pharmacologiques innovants. Dans l'optique d'une application en ingénierie tissulaire, il est nécessaire de réussir à promouvoir la différenciation chondrocytaire des CSM, il est cependant tout aussi essentiel de permettre l'obtention d'un phénotype chondrocytaire stable. En effet, un processus de différenciation conduisant à un phénotype hypertrophique s'accompagnant d'une vascularisation et d'une minéralisation du tissu néoformé serait incompatible avec une application en médecine régénératrice du cartilage. Il semblerait que l'hypoxie soit un facteur permettant de prévenir l'hypertrophie notamment en

diminuant l'expression du collagène de type X. Nos données préliminaires, concernant les effets de l'hypoxie sur l'hypertrophie tendent à confirmer ces observations. En effet dans un modèle de lignée de chondrocytes murins (ATDC5), nous avons pu observer la diminution de l'expression ou de l'activité d'un panel de marqueurs du phénotype hypertrophique. De plus, il est également suggéré par de récentes publications qu'il existe des effets différentiels exercés par HIF-1 α et HIF-2 α sur l'induction du phénotype hypertrophique. Il semble donc primordial de déterminer par quels mécanismes leur activité est modulée (hypoxie aigüe, ou chronique, degré d'oxygénation.) Il sera également intéressant de déterminer l'influence que peut exercer le GY785 DRS sur ce processus.

IV - CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

Article VII :

Cartilage tissue engineering: from hydrogel to mesenchymal stem cells.

C. Merceron, S. Portron, M. Masson, B. H. Fellah, O. Gauthier, J. Lesoeur, Y. Chérel, P. Weiss, J. Guicheux, C. Vinatier.

Biomedical Materials and Engineering, (2010); 20 (3):159-166.

Article VIII :

The intervertebral disc: from pathophysiology to tissue engineering.

J. Clouet, C. Vinatier, C. Merceron, M. Pot-Vaucel, O. Hamel, P. Weiss, G. Grimandi, J. Guicheux.

Joint Bone Spine (2009), 76(6):614-8.

Le cartilage articulaire, par la complexité de sa structure et la spécificité de sa composition, est un tissu dont les capacités de réparation spontanée sont très limitées. Les lésions cartilagineuses, traumatiques ou dégénératives, sont par conséquent irréversibles. Les répercussions de plus en plus importantes sur les coûts de santé, et l'invalidité associée à ces pathologies ont contribué au développement de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des lésions du cartilage articulaire, au premier rang desquelles se situe l'ingénierie tissulaire. L'ingénierie tissulaire a pour objectif de réparer les lésions du cartilage articulaire à l'aide de cellules chondrogéniques autologues transplantées et maintenues sur le site lésionnel via une matrice tridimensionnelle.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail a été de développer un nouveau concept d'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire par l'association d'un hydrogel injectable auto-réticulant (HPMC-Si) développé au sein du laboratoire avec des cellules souches du tissu adipeux. L'utilisation de CSM dans le contexte de l'ingénierie tissulaire du cartilage nécessite la différenciation de celles-ci vers un phénotype chondrocytaire stable. Le défi réside alors dans la maîtrise des paramètres pouvant influencer la différenciation (culture tridimensionnelle, facteurs de croissance, tension en oxygène, contraintes mécaniques...)

Dans une première partie, nous avons isolé et caractérisé une population de cellules issue du tissu adipeux humain et démontré qu'elles répondaient aux critères définissant les CSM. Nous avons également démontré que leur association avec l'HPMC-Si permettait leur différenciation vers un phénotype chondrocytaire *in vitro* ainsi que la formation d'un tissu cartilagineux *in vivo* dans le modèle de la poche sous-cutanée chez la souris nude.

Dans une deuxième partie, nous avons porté notre attention sur l'optimisation des conditions de différenciation chondrogénique des hCSTA. Après s'être assuré d'avoir isolé une population de CSM, nous nous sommes attachés, dans un premier temps, à démontrer leur potentiel ostéo-chondrogénique et à évaluer comment ce potentiel pouvait être modulé par la tension en oxygène. Nous avons également mis en évidence que des conditions hypoxiques (5% d'O₂), mimant les conditions physiologiques au sein du cartilage, influençaient de manière bénéfique l'émergence d'un phénotype chondrocytaire chez les CSTA tout en inhibant leur potentiel ostéogénique. Dans un deuxième temps, notre collaboration avec le laboratoire de Biotechnologie et Molécules Marines de l'Ifremer, 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 hCSTA. Nous avons mis en évidence, *in vitro*, la capacité du dérivé GY785 DRS à promouvoir l'orientation des hCSTA vers un

phénotype chondrocytaire. Ceci probablement via un mécanisme de potentialisation des effets du facteur de croissance TGF- β 1 permettant l'activation prolongée de la voie de signalisation ERK 1/2 (dépôt d'un brevet réf : EB11027 – GUICHEUX). Les mécanismes par lesquels le dérivé GY785 DRS exerce ses effets ne sont actuellement que partiellement élucidés. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de comprendre ce mode d'action, dans la perspective de développer une approche *in vivo*.

Afin de déterminer les effets combinés des différentes composantes intervenant dans le développement d'une stratégie d'ingénierie tissulaire (cellules, matrices, morphogènes), une étude associant la culture des hCSTA au sein de l'HPMC-Si en conditions hypoxiques a été menée. Ces données font actuellement l'objet d'un article en cours de rédaction.

Dans le but de discerner les implications respectives des différents facteurs pouvant moduler la différenciation chondrogénique des hCSTA (dimensionnalité, composition du milieu de culture, tension en oxygène, durée de la différenciation) des études transcriptomiques par puce à ADN et protéomiques par CHIP-on-chip sont en cours de réalisation, dans le cadre de la thèse de Sophie Portron. 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 hCSTA afin d'exploiter de manière optimale leur potentiel en ingénierie du cartilage.

L'utilisation de CSM, dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage, nécessite certes d'orienter les cellules vers un phénotype chondrocytaire, mais également d'assurer la stabilité de ce phénotype, c'est-à-dire de prévenir leur différenciation hypertrophique. En effet, la différenciation terminale des CSM conduit à la minéralisation de la matrice rendant son utilisation incompatible en ingénierie tissulaire du cartilage. La stabilité phénotypique à long terme et la fonctionnalité *in vivo* sont donc les conditions indispensables à une réparation du cartilage efficace et durable. Il a récemment été suggéré qu'un environnement hypoxique pourrait prévenir l'apparition d'un phénotype hypertrophique, de plus de récentes données obtenues dans le cadre de la thèse de Sophie Portron semblent aller dans ce sens. Ces considérations ont fait l'objet d'un article publié dans la revue *Biomedical Materials and Engineering* (Article VII).

Par ailleurs, afin de parfaire la preuve de notre concept, des essais pré-cliniques seront prochainement réalisés au sein de défauts articulaires dans des modèles animaux adaptés. Une étude est actuellement en cours dans un modèle de défaut fémoral inter-condylien chez le lapin dans le cadre de la thèse de Sophie Portron. En parallèle, un modèle de gros animal,

chez le cheval, est développé par Claire Vinatier en collaboration avec le service de chirurgie équine (Dr O. Geffroy) de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes-Oniris. Le modèle cheval présente, en effet, l'avantage de se rapprocher de l'homme en termes de physiologie du cartilage. L'épaisseur du cartilage chez le cheval (1,5 à 2 mm) est proche de celle observée chez l'humain (2,2 à 2,5 mm) avec des propriétés de réparation comparables. Les chevaux sont, par ailleurs, sujets aux lésions cartilagineuses, ce qui confère à notre concept un intérêt en médecine vétérinaire. De plus, les techniques d'abord sont les mêmes que celles mises en œuvre en médecine humaine (arthroscopie gazeuse), ceci nous permet également d'adapter notre concept à un transfert en clinique humaine. Parallèlement, des progrès récents en chimie des polymères permettent d'envisager le développement de matrices innovantes. En effet, la fonctionnalisation de biomatériaux, par l'association au sein de la matrice de nouvelles molécules d'origine marine ou de séquences peptidiques ou encore de principes actifs, permet de renforcer les propriétés mécaniques, de moduler l'adhésion cellulaire, de favoriser la biodégradabilité de ces matrices ou encore de développer des systèmes à libération prolongée d'anti-inflammatoires, de facteurs de croissance, d'antimitotiques... Cette nouvelle génération de matrices ouvre un large champ d'applications allant au-delà de l'ingénierie tissulaire du cartilage tel que la greffe de CSM au niveau cardiaque ou la thérapie du disque intervertébral (DIV).

En effet, parmi les tissus squelettiques, le DIV revêt un intérêt tout particulier. Cette entité anatomique, longtemps assimilée à un cartilage se révèle être complexe. Certes, le DIV partage avec le cartilage le fait d'être avasculaire et isolé du système immunitaire. Mais, au-delà de ces similitudes, le DIV est constitué d'un anneau fibreux englobant un noyau pulpeux. La structure particulière du DIV et les contraintes auxquelles il est soumis peuvent conduire à l'apparition de processus dégénératifs. En effet, au cours du vieillissement, le DIV peut présenter des signes de dégénérescence, s'accompagnant de douleurs chroniques. Ceci représente un problème épidémiologique majeur, car 80% de la population est susceptible d'être touchée à moment ou un autre au cours de la vie. La prise en charge des patients lombalgiques par des approches chirurgicales (arthrodèse, arthroplastie) vise à pallier les symptômes sans pour autant cibler les origines réelles de la maladie. Ainsi, sur la base de nos connaissances en ingénierie tissulaire du cartilage, la thématique de l'ingénierie tissulaire du DIV a émergé au sein du laboratoire, faisant l'objet de la thèse de Johann Clouet et de la parution d'un article dans la revue *Joint Bone Spine* (Article VIII). Cette publication décrit les aspects spécifiques du DIV aux niveaux histologiques, métaboliques et physiopathogéniques,

ainsi que les approches actuelles et innovantes dans la prévention de la dégénérescence discale.

Article VII

Cartilage tissue engineering: from hydrogel to mesenchymal stem cells.

C. Merceron, S. Portron, M. Masson, B. H. Fella, O. Gauthier, J. Lesoeur, Y. Chérel, P. Weiss, J. Guicheux, C. Vinatier.

Biomedical Materials and Engineering, (2010); 20 (3):159-166.

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

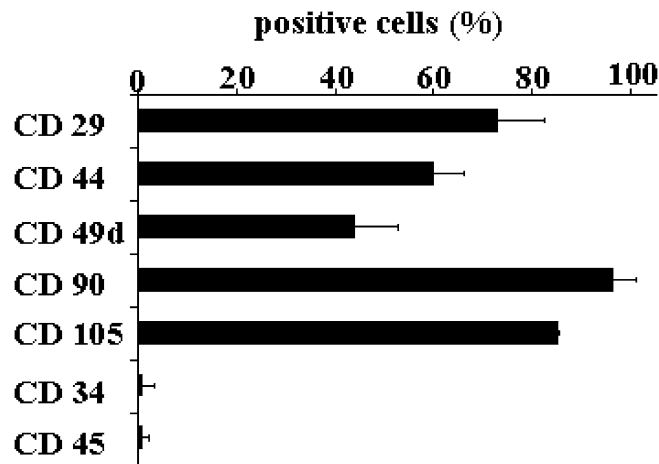


Fig. 1. Cytometric characterization of ATSC (passage 2). ATSC (5000 cells/cm^2) were cultured in monolayer, in control medium and under normoxic condition until confluence. Cells were trypsinized and cytometric analysis was performed using specific antibodies directed against CD 29, 44, 90, 105, 34 and 45. 10,000 events were scored. Results are expressed as the percentage of positive cells in the whole population. A representative experiment is shown.

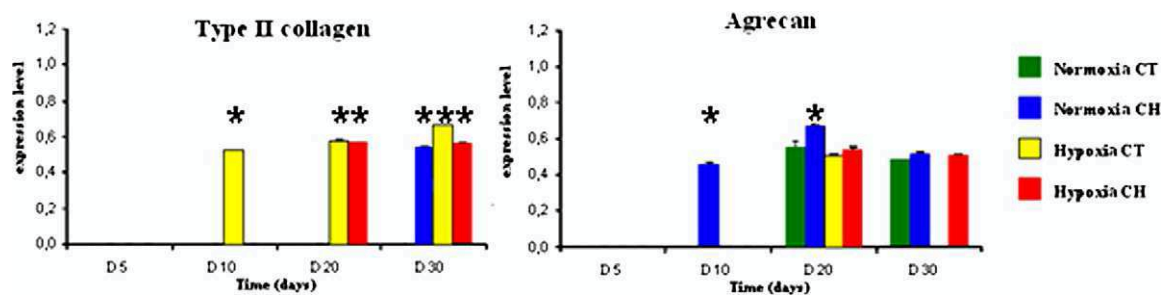


Fig. 2. Effects of culture medium and oxygen tension on the expression levels of type II collagen and aggrecan in ATSC cultured in pellets for 5, 10, 20 and 30 days in the presence of chondrogenic medium (CH) or control medium (CT) and in normoxia (20% O₂) or hypoxia (5% O₂). RNAs were analysed by real-time 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>.)

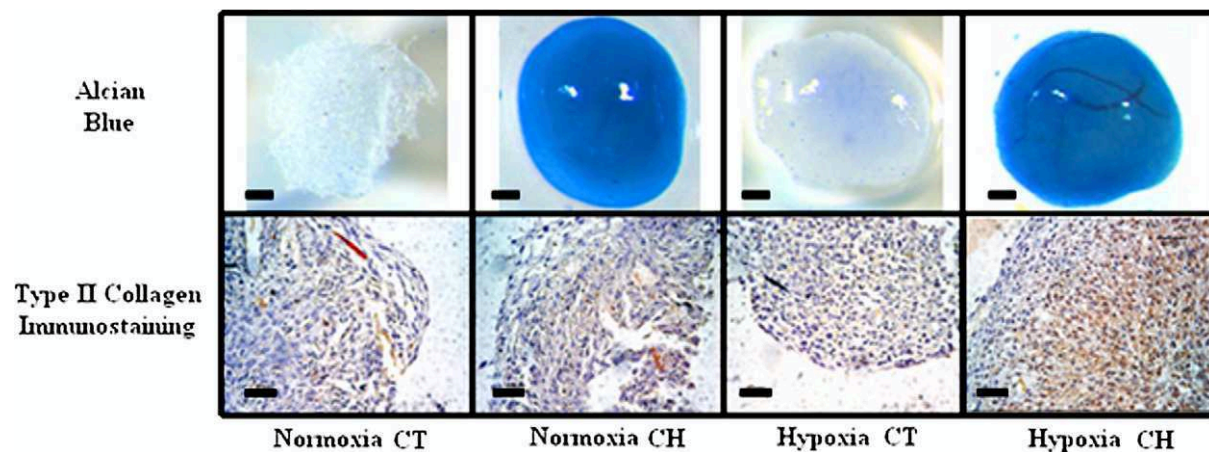


Fig. 3. Gross appearance (upper panel) and histological sections (lower panel) of ATSC pellets after 30 days in culture in the presence of variable oxygen tensions and of control (CT) or chondrogenic medium (CH). Glycosaminoglycans were revealed by Alcian Blue staining and type II collagen by immunohistological detection using a specific antibody. Upper panel, bar: 200 μ m; lower panel, bar: 40 μ m. (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

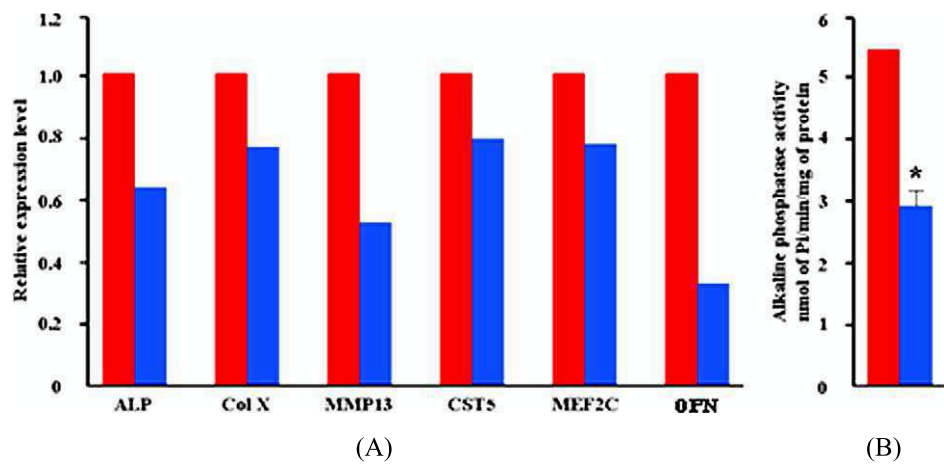


Fig. 4. Effects of oxygen tension on ATSC terminal differentiation. ATSC have been cultured in pellets for 28 days in normoxic or hypoxic condition in the presence of chondrogenic medium. (A) Expression levels of hypertrophic markers were evaluated by TLDA. (B) ALP activity was measured and corrected 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

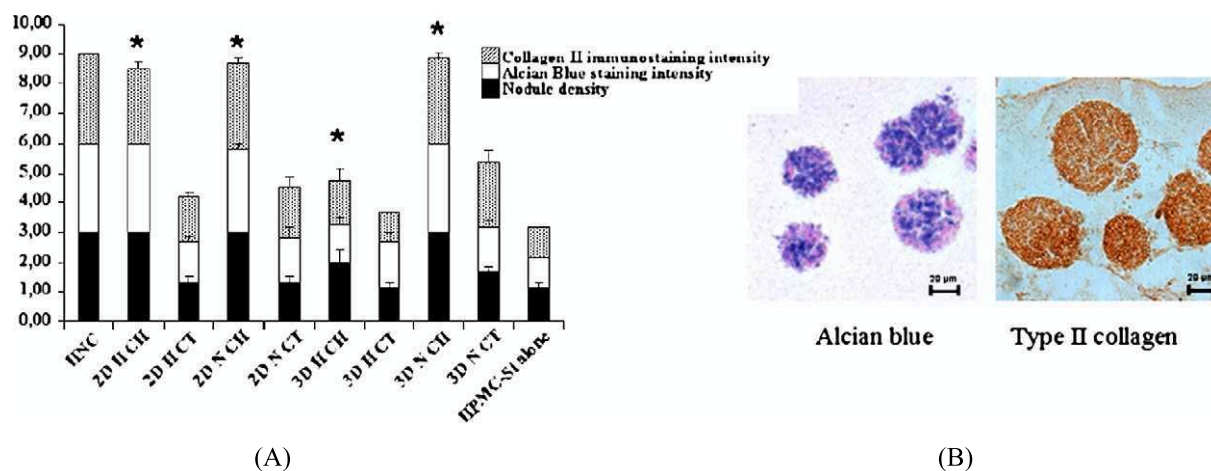


Fig. 5. Histological analysis of the samples after alcian blue and type II collagen immunostaining staining. (A) Histogram representative of staining intensity and nodule density. Score ranging from 1 to 3 were attributed blindly for each parameter. (B) Cartilaginous nodules formed by ATSC implanted 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.

Article VIII

The intervertebral disc: from pathophysiology to tissue engineering.

J. Clouet, C. Vinatier, C. Merceron, M. Pot-Vaucel, O. Hamel, P. Weiss, G. Grimandi, J. Guicheux.

Joint Bone Spine (2009), 76(6):614-8.

Notre travail s'intègre donc dans un programme de recherche pluridisciplinaire, qui vise à proposer une nouvelle approche thérapeutique des atteintes cartilagineuses par thérapie cellulaire à l'aide de cellules autologues et de biomatériaux injectables.

Nous pensons que nos études permettront la réalisation d'essais cliniques chez l'homme dans un avenir proche. Nos résultats pourraient donc ouvrir de nouvelles fenêtres thérapeutiques en médecine régénératrice et particulièrement dans le traitement des atteintes ostéoarticulaires traumatiques ou liées à l'âge. La poursuite de notre travail pourrait également fournir d'importantes données sur les mécanismes moléculaires fondamentaux qui régissent la différenciation chondrogénique des cellules souches. Ces données pourraient être utiles à la thérapie cellulaire du cartilage mais aussi à la compréhension de la physiopathogénie des maladies cartilagineuses dégénératives.

V - BIBLIOGRAPHIE

1. Hunziker, E.B., Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. 10(6): p. 432-63.
2. Shapiro, F., et al., Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 1993. 75(4): p. 532-53.
3. Brittberg, M., et al., Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 1994. 331(14): p. 889-95.
4. Schnabel, M., et al., Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. 10(1): p. 62-70.
5. Kafienah, W., et al., Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Eng*, 2002. 8(5): p. 817-26.
6. Isogai, N., et al., Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng*, 2006. 12(4): p. 691-703.
7. Naumann, A., et al., Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem*, 2002. 50(8): p. 1049-58.
8. Freemont, A.J., et al., Lineage plasticity and cell biology of fibrocartilage and hyaline cartilage: its significance in cartilage repair and replacement. *Eur J Radiol*, 2006. 57(1): p. 32-6.
9. Mobasher, A., et al., Facilitative glucose transporters in articular chondrocytes. Expression, distribution and functional regulation of GLUT isoforms by hypoxia, hypoxia mimetics, growth factors and pro-inflammatory cytokines. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2008. 200: p. 1 p following vi, 1-84.
10. Williams, R.M., et al., Solute transport in growth plate cartilage: in vitro and in vivo. *Biophys J*, 2007. 93(3): p. 1039-50.
11. Leddy, H.A., et al., Site-specific effects of compression on macromolecular diffusion in articular cartilage. *Biophys J*, 2008. 95(10): p. 4890-5.
12. Aigner, T., et al., Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003. 55(12): p. 1569-93.
13. Archer, C.W., et al., The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. 35(4): p. 401-4.
14. Muir, H., The intracellular matrix in the environment of connective tissue cells. *Clin Sci*, 1970. 38(2): p. 8P.
15. Muir, H., The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules*. *Bioessays*, 1995. 17(12): p. 1039-48.
16. Bromme, D., et al., Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design. *Curr Pharm Des*, 2002. 8(18): p. 1639-58.
17. Shlopov, B.V., et al., Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum*, 1997. 40(11): p. 2065-74.
18. Inada, M., et al., Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(49): p. 17192-7.
19. Bramono, D.S., et al., Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopaedics. *Clin Orthop Relat Res*, 2004(428): p. 272-85.
20. Jones, G.C., et al., ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2005. 7(4): p. 160-9.

21. Maroudas, A., et al., Racemization of aspartic acid in human articular cartilage. *Connect Tissue Res*, 1992. 28(3): p. 161-9.
22. Bank, R.A., et al., Ageing and zonal variation in post-translational modification of collagen in normal human articular cartilage. The age-related increase in non-enzymatic glycation affects biomechanical properties of cartilage. *Biochem J*, 1998. 330 (Pt 1): p. 345-51.
23. Verzijl, N., et al., Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem*, 2000. 275(50): p. 39027-31.
24. Maroudas, A., et al., Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age. *Arch Biochem Biophys*, 1998. 350(1): p. 61-71.
25. Verzijl, N., et al., Age-related accumulation of the advanced glycation endproduct pentosidine in human articular cartilage aggrecan: the use of pentosidine levels as a quantitative measure of protein turnover. *Matrix Biol*, 2001. 20(7): p. 409-17.
26. Sommarin, Y., et al., Chondrocyte-matrix interactions. Attachment to proteins isolated from cartilage. *Exp Cell Res*, 1989. 184(1): p. 181-92.
27. Kato, Y., et al., Effects of interleukin-1 on syntheses of alkaline phosphatase, type X collagen, and 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor, and matrix calcification in rabbit chondrocyte cultures. *J Clin Invest*, 1993. 92(5): p. 2323-30.
28. Heinegard, D., Proteoglycans and more--from molecules to biology. *Int J Exp Pathol*, 2009. 90(6): p. 575-86.
29. Canty, E.G., et al., Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 7): p. 1341-53.
30. Veit, G., et al., Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J Biol Chem*, 2006. 281(6): p. 3494-504.
31. Soderhall, C., et al., Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS Biol*, 2007. 5(9): p. e242.
32. van der Rest, M., et al., Collagen family of proteins. *Faseb J*, 1991. 5(13): p. 2814-23.
33. Engel, J., et al., Structure, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix. *Topics in Current Chemistry* 2005. 247: p. 7-33.
34. Schulz, R.M., et al., Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur Biophys J*, 2007. 36(4-5): p. 539-68.
35. Mercer, D.K., et al., Identification, expression, and tissue distribution of the three rat lysyl hydroxylase isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 307(4): p. 803-9.
36. Wang, C., et al., The third activity for lysyl hydroxylase 3: galactosylation of hydroxylysyl residues in collagens in vitro. *Matrix Biol*, 2002. 21(7): p. 559-66.
37. Bonfanti, L., et al., Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell*, 1998. 95(7): p. 993-1003.
38. Chessler, S.D., et al., BiP binds type I procollagen pro alpha chains with mutations in the carboxyl-terminal propeptide synthesized by cells from patients with osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem*, 1993. 268(24): p. 18226-33.
39. Lamande, S.R., et al., Endoplasmic reticulum-mediated quality control of type I collagen production by cells from osteogenesis imperfecta patients with mutations in the pro alpha 1 (I) chain carboxyl-terminal propeptide which impair subunit assembly. *J Biol Chem*, 1995. 270(15): p. 8642-9.
40. Helenius, A., et al., Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 2001. 291(5512): p. 2364-9.
41. Wilson, R., et al., Protein disulfide isomerase acts as a molecular chaperone during the assembly of procollagen. *J Biol Chem*, 1998. 273(16): p. 9637-43.

42. Bottomley, M.J., et al., Quality control in the endoplasmic reticulum: PDI mediates the ER retention of unassembled procollagen C-propeptides. *Curr Biol*, 2001. 11(14): p. 1114-8.
43. McLaughlin, S.H., et al., Thiol-independent interaction of protein disulphide isomerase with type X collagen during intra-cellular folding and assembly. *Biochem J*, 1998. 331 (Pt 3): p. 793-800.
44. Steinmann, B., et al., Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation in vivo: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase. *J Biol Chem*, 1991. 266(2): p. 1299-303.
45. Dafforn, T.R., et al., The molecular interactions of heat shock protein 47 (Hsp47) and their implications for collagen biosynthesis. *J Biol Chem*, 2001. 276(52): p. 49310-9.
46. Nakai, A., et al., Involvement of the stress protein HSP47 in procollagen processing in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 1992. 117(4): p. 903-14.
47. McLaughlin, S.H., et al., Molecular recognition in procollagen chain assembly. *Matrix Biol*, 1998. 16(7): p. 369-77.
48. Walmsley, A.R., et al., Intracellular retention of procollagen within the endoplasmic reticulum is mediated by prolyl 4-hydroxylase. *J Biol Chem*, 1999. 274(21): p. 14884-92.
49. Koide, T., et al., Collagen Biosynthesis. *Topics in Current Chemistry*, 2005. 247: p. 85-114.
50. Eyre, D.R., et al., Collagen polymorphisms of the intervertebral disc. *Biochem Soc Trans*, 2002. 30(Pt 6): p. 844-8.
51. Cheah, K.S., et al., Expression of the mouse alpha 1(II) collagen gene is not restricted to cartilage during development. *Development*, 1991. 111(4): p. 945-53.
52. Ng, L.J., et al., 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*, 1993. 159(2): p. 403-17.
53. Lui, V.C., et al., Tissue-specific and differential expression of alternatively spliced alpha 1(II) collagen mRNAs in early human embryos. *Dev Dyn*, 1995. 203(2): p. 198-211.
54. Sandell, L.J., et al., Alternative splice form of type II procollagen mRNA (IIA) is predominant in skeletal precursors and non-cartilaginous tissues during early mouse development. *Dev Dyn*, 1994. 199(2): p. 129-40.
55. Sandell, L.J., et al., Alternatively spliced type II procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development: differential expression of the amino-propeptide. *J Cell Biol*, 1991. 114(6): p. 1307-19.
56. McAlinden, A., et al., Expression of two novel alternatively spliced COL2A1 isoforms during chondrocyte differentiation. *Matrix Biol*, 2008. 27(3): p. 254-66.
57. Li, S.W., et al., Transgenic mice with targeted inactivation of the Col2 alpha 1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and periosteal bone but no endochondral bone. *Genes Dev*, 1995. 9(22): p. 2821-30.
58. Keene, D.R., et al., Type III collagen can be present on banded collagen fibrils regardless of fibril diameter. *J Cell Biol*, 1987. 105(5): p. 2393-402.
59. Keene, D.R., et al., Human bone contains type III collagen, type VI collagen, and fibrillin: type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of tendons, ligaments, and periosteum to calcified bone cortex. *J Histochem Cytochem*, 1991. 39(1): p. 59-69.

60. Miller, E.J., et al., Identification of three genetically distinct collagens by cyanogen bromide cleavage of insoluble human skin and cartilage collagen. *Biochem Biophys Res Commun*, 1971. 42(6): p. 1024-9.
61. Bland, Y.S., et al., The hip joint: the fibrillar collagens associated with development and ageing in the rabbit. *J Anat*, 2001. 198(Pt 1): p. 17-27.
62. Young, R.D., et al., Immunolocalization of type III collagen in human articular cartilage prepared by high-pressure cryofixation, freeze-substitution, and low-temperature embedding. *J Histochem Cytochem*, 1995. 43(4): p. 421-7.
63. Young, R.D., et al., Immunolocalization of collagen types II and III in single fibrils of human articular cartilage. *J Histochem Cytochem*, 2000. 48(3): p. 423-32.
64. Mao, J.R., et al., The Ehlers-Danlos syndrome: on beyond collagens. *J Clin Invest*, 2001. 107(9): p. 1063-9.
65. Sherwin, A.F., et al., The distribution of type VI collagen in the developing tissues of the bovine femoral head. *Histochem J*, 1999. 31(9): p. 623-32.
66. Wu, J.J., et al., Type VI collagen of the intervertebral disc. Biochemical and electron-microscopic characterization of the native protein. *Biochem J*, 1987. 248(2): p. 373-81.
67. Spissinger, T., et al., Type VI collagen beaded microfibrils from bovine cornea depolymerize at acidic pH, and depolymerization and polymerization are not influenced by hyaluronan. *Matrix Biol*, 1995. 14(6): p. 499-505.
68. Horikawa, O., et al., Distribution of type VI collagen in chondrocyte microenvironment: study of chondrons isolated from human normal and degenerative articular cartilage and cultured chondrocytes. *J Orthop Sci*, 2004. 9(1): p. 29-36.
69. Chang, J., et al., Structural colocalisation of type VI collagen and fibronectin in agarose cultured chondrocytes and isolated chondrons extracted from adult canine tibial cartilage. *J Anat*, 1997. 190 (Pt 4): p. 523-32.
70. Bidanset, D.J., et al., Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *J Biol Chem*, 1992. 267(8): p. 5250-6.
71. Wiberg, C., et al., Biglycan organizes collagen VI into hexagonal-like networks resembling tissue structures. *J Biol Chem*, 2002. 277(51): p. 49120-6.
72. Kielty, C.M., et al., Type VI collagen microfibrils: evidence for a structural association with hyaluronan. *J Cell Biol*, 1992. 118(4): p. 979-90.
73. Poole, C.A., Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat*, 1997. 191 (Pt 1): p. 1-13.
74. Lamande, S.R., et al., Bethlem myopathy and engineered collagen VI triple helical deletions prevent intracellular multimer assembly and protein secretion. *J Biol Chem*, 1999. 274(31): p. 21817-22.
75. Lampe, A.K., et al., Automated genomic sequence analysis of the three collagen VI genes: applications to Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *J Med Genet*, 2005. 42(2): p. 108-20.
76. Bonaldo, P., et al., Collagen VI deficiency induces early onset myopathy in the mouse: an animal model for Bethlem myopathy. *Hum Mol Genet*, 1998. 7(13): p. 2135-40.
77. Swoboda, B., et al., Increased content of type-VI collagen epitopes in human osteoarthritic cartilage: quantitation by inhibition ELISA. *J Orthop Res*, 1998. 16(1): p. 96-9.
78. McCormick, D., et al., Structure of the glycosaminoglycan domain in the type IX collagen-proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(12): p. 4044-8.
79. van der Rest, M., et al., The structure of type IX collagen. *J Biol Chem*, 1985. 260(1): p. 220-5.

80. Muragaki, Y., et al., The complete primary structure of two distinct forms of human alpha 1 (IX) collagen chains. *Eur J Biochem*, 1990. 192(3): p. 703-8.
81. Huber, S., et al., Identification of the type IX collagen polypeptide chains. The alpha 2(IX) polypeptide carries the chondroitin sulfate chain(s). *J Biol Chem*, 1986. 261(13): p. 5965-8.
82. Bruckner, P., et al., Type IX collagen from sternal cartilage of chicken embryo contains covalently bound glycosaminoglycans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(9): p. 2608-12.
83. Shimokomaki, M., et al., The structure and macromolecular organization of type IX collagen in cartilage. *Ann N Y Acad Sci*, 1990. 580: p. 1-7.
84. Vaughan, L., et al., D-periodic distribution of collagen type IX along cartilage fibrils. *J Cell Biol*, 1988. 106(3): p. 991-7.
85. Vasios, G., et al., Cartilage type IX collagen-proteoglycan contains a large amino-terminal globular domain encoded by multiple exons. *J Biol Chem*, 1988. 263(5): p. 2324-9.
86. Holden, P., et al., Cartilage oligomeric matrix protein interacts with type IX collagen, and disruptions to these interactions identify a pathogenetic mechanism in a bone dysplasia family. *J Biol Chem*, 2001. 276(8): p. 6046-55.
87. Budde, B., et al., Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(23): p. 10465-78.
88. Fassler, R., et al., Mice lacking alpha 1 (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(11): p. 5070-4.
89. Hagg, R., et al., Absence of the alpha1(IX) chain leads to a functional knock-out of the entire collagen IX protein in mice. *J Biol Chem*, 1997. 272(33): p. 20650-4.
90. Briggs, M.D., et al., Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: mutation review, molecular interactions, and genotype to phenotype correlations. *Hum Mutat*, 2002. 19(5): p. 465-78.
91. Van Camp, G., et al., A new autosomal recessive form of Stickler syndrome is caused by a mutation in the COL9A1 gene. *Am J Hum Genet*, 2006. 79(3): p. 449-57.
92. Thomas, J.T., et al., The human collagen X gene: complete primary sequence and re-expression in osteoarthritis. *Biochem Soc Trans*, 1991. 19(4): p. 804-8.
93. Thomas, J.T., et al., The human collagen X gene. Complete primary translated sequence and chromosomal localization. *Biochem J*, 1991. 280 (Pt 3): p. 617-23.
94. Grant, W.T., et al., Type X collagen synthesis during endochondral ossification in fracture repair. *J Biol Chem*, 1987. 262(20): p. 9844-9.
95. Lyons, T.J., et al., The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint. *J Mol Histol*, 2005. 36(3): p. 207-15.
96. Rucklidge, G.J., et al., Collagen type X: a component of the surface of normal human, pig, and rat articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. 224(2): p. 297-302.
97. Kwan, A.P., et al., Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro. *J Cell Biol*, 1991. 114(3): p. 597-604.
98. Girkontaite, I., et al., Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies. *Matrix Biol*, 1996. 15(4): p. 231-8.
99. Bateman, J.F., et al., Mutations of COL10A1 in Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Hum Mutat*, 2005. 25(6): p. 525-34.
100. Kwan, K.M., et al., Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: implications for function. *J Cell Biol*, 1997. 136(2): p. 459-71.

101. Gress, C.J., et al., Growth plate compressions and altered hematopoiesis in collagen X null mice. *J Cell Biol*, 2000. 149(4): p. 983-93.
102. Sweeney, E., et al., Altered endochondral ossification in collagen X mouse models leads to impaired immune responses. *Dev Dyn*, 2008. 237(10): p. 2693-704.
103. Eyre, D., Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*, 2002. 4(1): p. 30-5.
104. Warner, L.R., et al., Expression, purification, and refolding of recombinant collagen alpha1(XI) amino terminal domain splice variants. *Protein Expr Purif*, 2007. 52(2): p. 403-9.
105. Li, Y., et al., A fibrillar collagen gene, *Col11a1*, is essential for skeletal morphogenesis. *Cell*, 1995. 80(3): p. 423-30.
106. Vaughan-Thomas, A., et al., Characterization of type XI collagen-glycosaminoglycan interactions. *J Biol Chem*, 2001. 276(7): p. 5303-9.
107. Warner, L.R., et al., Isoform-specific heparan sulfate binding within the amino-terminal noncollagenous domain of collagen alpha1(XI). *J Biol Chem*, 2006. 281(51): p. 39507-16.
108. Spranger, J., The type XI collagenopathies. *Pediatr Radiol*, 1998. 28(10): p. 745-50.
109. Sirko-Osadsa, D.A., et al., Stickler syndrome without eye involvement is caused by mutations in *COL11A2*, the gene encoding the alpha2(XI) chain of type XI collagen. *J Pediatr*, 1998. 132(2): p. 368-71.
110. Griffith, A.J., et al., Marshall syndrome associated with a splicing defect at the *COL11A1* locus. *Am J Hum Genet*, 1998. 62(4): p. 816-23.
111. Hardingham, T.E., et al., Proteoglycans: many forms and many functions. *Faseb J*, 1992. 6(3): p. 861-70.
112. Dudhia, J., Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell Mol Life Sci*, 2005. 62(19-20): p. 2241-56.
113. Lamoureux, F., et al., Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *Bioessays*, 2007. 29(8): p. 758-71.
114. Gotting, C., et al., Proteoglycan biosynthesis during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal*, 2007. 7: p. 1207-10.
115. Seo, N.S., et al., The role of glycosylation in the secretion of proteoglycans. *ScientificWorldJournal*, 2006. 6: p. 491-3.
116. Gotting, C., et al., Human xylosyltransferases in health and disease. *Cell Mol Life Sci*, 2007. 64(12): p. 1498-517.
117. Jackson, R.L., et al., Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev*, 1991. 71(2): p. 481-539.
118. Wight, T.N., et al., The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr Opin Cell Biol*, 1992. 4(5): p. 793-801.
119. Sasisekharan, R., et al., Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. *Annu Rev Biomed Eng*, 2006. 8: p. 181-231.
120. Zhang, L., Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2010. 93: p. 1-17.
121. Ramirez, F., et al., Cell signaling events: a view from the matrix. *Matrix Biol*, 2003. 22(2): p. 101-7.
122. Rogers, B.A., et al., Topographical variation in glycosaminoglycan content in human articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br*, 2006. 88(12): p. 1670-4.
123. Roughley, P.J., The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater*, 2006. 12: p. 92-101.
124. Ruoslahti, E., et al., Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*, 1991. 64(5): p. 867-9.

125. Gandhi, N.S., et al., The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des*, 2008. 72(6): p. 455-82.
126. Iozzo, R.V., Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*, 1998. 67: p. 609-52.
127. Heinegard, D., et al., Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *Faseb J*, 1989. 3(9): p. 2042-51.
128. Kiani, C., et al., Roles of aggrecan domains in biosynthesis, modification by glycosaminoglycans and product secretion. *Biochem J*, 2001. 354(Pt 1): p. 199-207.
129. Hedlund, H., et al., Association of the aggrecan keratan sulfate-rich region with collagen in bovine articular cartilage. *J Biol Chem*, 1999. 274(9): p. 5777-81.
130. Redini, F., [Structure and regulation of articular cartilage proteoglycan expression]. *Pathol Biol (Paris)*, 2001. 49(4): p. 364-75.
131. Bode-Lesniewska, B., et al., Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. *J Histochem Cytochem*, 1996. 44(4): p. 303-12.
132. Choocheep, K., et al., Versican facilitates chondrocyte differentiation and regulates joint morphogenesis. *J Biol Chem*, 2010. 285(27): p. 21114-25.
133. Williams, D.R., Jr., et al., Limb chondrogenesis is compromised in the versican deficient hdf mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 334(3): p. 960-6.
134. Melrose, J., et al., Perlecan, the "jack of all trades" proteoglycan of cartilaginous weight-bearing connective tissues. *Bioessays*, 2008. 30(5): p. 457-69.
135. SundarRaj, N., et al., Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment. *J Cell Sci*, 1995. 108 (Pt 7): p. 2663-72.
136. Yang, W., et al., Chondrogenic differentiation on perlecan domain I, collagen II, and bone morphogenetic protein-2-based matrices. *Tissue Eng*, 2006. 12(7): p. 2009-24.
137. Farach-Carson, M.C., et al., Perlecan--a multifunctional extracellular proteoglycan scaffold. *Glycobiology*, 2007. 17(9): p. 897-905.
138. Gomes, R.R., Jr., et al., Spatiotemporal distribution of heparan sulfate epitopes during murine cartilage growth plate development. *Histochem Cell Biol*, 2006. 126(6): p. 713-22.
139. Brown, A.J., et al., Heparanase expression and activity influences chondrogenic and osteogenic processes during endochondral bone formation. *Bone*, 2008. 43(4): p. 689-99.
140. Manton, K.J., et al., Disruption of heparan and chondroitin sulfate signaling enhances mesenchymal stem cell-derived osteogenic differentiation via bone morphogenetic protein signaling pathways. *Stem Cells*, 2007. 25(11): p. 2845-54.
141. Arikawa-Hirasawa, E., et al., Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of the perlecan gene. *Nat Genet*, 2001. 27(4): p. 431-4.
142. Nicole, S., et al., Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). *Nat Genet*, 2000. 26(4): p. 480-3.
143. Iozzo, R.V., The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem*, 1999. 274(27): p. 18843-6.
144. Schaefer, L., et al., Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem*, 2008. 283(31): p. 21305-9.
145. Roughley, P.J., et al., Non-proteoglycan forms of biglycan increase with age in human articular cartilage. *Biochem J*, 1993. 295 (Pt 2): p. 421-6.
146. Sjoberg, A.P., et al., Short leucine-rich glycoproteins of the extracellular matrix display diverse patterns of complement interaction and activation. *Mol Immunol*, 2009. 46(5): p. 830-9.

147. Moreno, M., et al., Biglycan is a new extracellular component of the Chordin-BMP4 signaling pathway. *Embo J*, 2005. 24(7): p. 1397-405.
148. Hildebrand, A., et al., Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J*, 1994. 302 (Pt 2): p. 527-34.
149. Corsi, A., et al., Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res*, 2002. 17(7): p. 1180-9.
150. Ruhland, C., et al., The glycosaminoglycan chain of decorin plays an important role in collagen fibril formation at the early stages of fibrillogenesis. *Febs J*, 2007. 274(16): p. 4246-55.
151. Schonherr, E., et al., Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system. *J Biol Chem*, 2005. 280(16): p. 15767-72.
152. Vynios, D.H., et al., The interactions of cartilage proteoglycans with collagens are determined by their structures. *Biochimie*, 2001. 83(9): p. 899-906.
153. Chen, X.D., et al., The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation. *Faseb J*, 2004. 18(9): p. 948-58.
154. Young, M.F., et al., Biglycan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases. *Glycoconj J*, 2002. 19(4-5): p. 257-62.
155. Xu, T., et al., Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet*, 1998. 20(1): p. 78-82.
156. Kalamajski, S., et al., Asporin competes with decorin for collagen binding, binds calcium and promotes osteoblast collagen mineralization. *Biochem J*, 2009. 423(1): p. 53-9.
157. Knudson, C.B., et al., Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol*, 2001. 12(2): p. 69-78.
158. Melching, L.I., et al., The synthesis of dermatan sulphate proteoglycans by fetal and adult human articular cartilage. *Biochem J*, 1989. 261(2): p. 501-8.
159. Nakajima, M., et al., Mechanisms for asporin function and regulation in articular cartilage. *J Biol Chem*, 2007. 288(44): p. 32185-92.
160. Lorenzo, P., et al., Identification and characterization of asporin. a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. *J Biol Chem*, 2001. 276(15): p. 12201-11.
161. Gruber, H.E., et al., Asporin, a susceptibility gene in osteoarthritis, is expressed at higher levels in the more degenerate human intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*, 2009. 11(2): p. R47.
162. Rees, S.G., et al., Immunolocalisation and expression of keratocan in tendon. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009. 17(2): p. 276-9.
163. Wendel, M., et al., Bone matrix proteins: isolation and characterization of a novel cell-binding keratan sulfate proteoglycan (osteadherin) from bovine bone. *J Cell Biol*, 1998. 141(3): p. 839-47.
164. Hedbom, E., et al., Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. *J Biol Chem*, 1989. 264(12): p. 6898-905.
165. Kalamajski, S., et al., Homologous sequence in lumican and fibromodulin leucine-rich repeat 5-7 competes for collagen binding. *J Biol Chem*, 2009. 284(1): p. 534-9.
166. Bi, Y., et al., Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med*, 2007. 13(10): p. 1219-27.
167. Chakravarti, S., Functions of lumican and fibromodulin: lessons from knockout mice. *Glycoconj J*, 2002. 19(4-5): p. 287-93.

168. Chakravarti, S., et al., Primary structure of human lumican (keratan sulfate proteoglycan) and localization of the gene (LUM) to chromosome 12q21.3-q22. *Genomics*, 1995. 27(3): p. 481-8.
169. Grover, J., et al., The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage. *J Biol Chem*, 1995. 270(37): p. 21942-9.
170. Melching, L.I., et al., Modulation of keratan sulfate synthesis on lumican by the action of cytokines on human articular chondrocytes. *Matrix Biol*, 1999. 18(4): p. 381-90.
171. Heinegard, D., et al., Two novel matrix proteins isolated from articular cartilage show wide distributions among connective tissues. *J Biol Chem*, 1986. 261(29): p. 13866-72.
172. Bengtsson, E., et al., The leucine-rich repeat protein PRELP binds perlecan and collagens and may function as a basement membrane anchor. *J Biol Chem*, 2002. 277(17): p. 15061-8.
173. Lewis, M., PRELP, collagen, and a theory of Hutchinson-Gilford progeria. *Ageing Res Rev*, 2003. 2(1): p. 95-105.
174. Johnson, J., et al., Expression and localization of PG-Lb/epiphygan during mouse development. *Dev Dyn*, 1999. 216(4-5): p. 499-510.
175. Shinomura, T., et al., Appearance of distinct types of proteoglycan in a well-defined temporal and spatial pattern during early cartilage formation in the chick limb. *Dev Biol*, 1984. 103(1): p. 211-20.
176. Bentz, H., et al., Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J Biol Chem*, 1989. 264(34): p. 20805-10.
177. Funderburgh, J.L., et al., Mimecan, the 25-kDa corneal keratan sulfate proteoglycan, is a product of the gene producing osteoglycin. *J Biol Chem*, 1997. 272(44): p. 28089-95.
178. Hu, S.M., et al., The mimecan gene expressed in human pituitary and regulated by pituitary transcription factor-1 as a marker for diagnosing pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(12): p. 6657-64.
179. Dasch, J.R., et al., Characterization of monoclonal antibodies recognizing bovine bone osteoglycin. *Connect Tissue Res*, 1993. 30(1): p. 11-21.
180. Fernandez, B., et al., Osteoglycin expression and localization in rabbit tissues and atherosclerotic plaques. *Mol Cell Biochem*, 2003. 246(1-2): p. 3-11.
181. Kampmann, A., et al., The proteoglycan osteoglycin/mimecan is correlated with arteriogenesis. *Mol Cell Biochem*, 2009. 322(1-2): p. 15-23.
182. Petretto, E., et al., Integrated genomic approaches implicate osteoglycin (Ogn) in the regulation of left ventricular mass. *Nat Genet*, 2008. 40(5): p. 546-52.
183. Pellegrini, B., et al., Cloning and characterization of opticin cDNA: evaluation as a candidate for canine oculo-skeletal dysplasia. *Gene*, 2002. 282(1-2): p. 121-31.
184. Ohta, K., et al., Tsukushi functions as an organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin. *Dev Cell*, 2004. 7(3): p. 347-58.
185. Wang, W., et al., Synleurin, a novel leucine-rich repeat protein that increases the intensity of pleiotropic cytokine responses. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 305(4): p. 981-8.
186. Mansson, B., et al., Association of chondroadherin with collagen type II. *J Biol Chem*, 2001. 276(35): p. 32883-8.
187. Camper, L., et al., Integrin alpha2beta1 is a receptor for the cartilage matrix protein chondroadherin. *J Cell Biol*, 1997. 138(5): p. 1159-67.
188. Bertram, H., et al., Accelerated intervertebral disc degeneration in scoliosis versus physiological ageing develops against a background of enhanced anabolic gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 342(3): p. 963-72.

189. Haglund, L., et al., Variation in chondroadherin abundance and fragmentation in the human scoliotic disc. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2009. 34(14): p. 1513-8.
190. Shimizu-Hirota, R., et al., Functional characterization of podocan, a member of a new class in the small leucine-rich repeat protein family. *FEBS Lett*, 2004. 563(1-3): p. 69-74.
191. Schlessinger, J., et al., Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell*, 1995. 83(3): p. 357-60.
192. Bernfield, M., et al., Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*, 1999. 68: p. 729-77.
193. Lopes, C.C., et al., Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz J Med Biol Res*, 2006. 39(2): p. 157-67.
194. Barre, P.E., et al., Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of syndecan-1 and -4 messages in cartilage and cultured chondrocytes from osteoarthritic joints. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000. 8(1): p. 34-43.
195. Grover, J., et al., Expression of cell-surface proteoglycan mRNA by human articular chondrocytes. *Biochem J*, 1995. 309 (Pt 3): p. 963-8.
196. Echtermeyer, F., et al., Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat Med*, 2009. 15(9): p. 1072-6.
197. Gao, G., et al., ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane type 4-matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulfate and heparan sulfate on syndecan-1. *J Biol Chem*, 2004. 279(11): p. 10042-51.
198. De Cat, B., et al., Developmental roles of the glypicans. *Semin Cell Dev Biol*, 2001. 12(2): p. 117-25.
199. Takahashi, N., et al., Induction of CD44 cleavage in articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2010. 62(5): p. 1338-48.
200. Aguiar, D.J., et al., Internalization of the hyaluronan receptor CD44 by chondrocytes. *Exp Cell Res*, 1999. 252(2): p. 292-302.
201. Wiesner, S., et al., Integrin-actin interactions. *Cell Mol Life Sci*, 2005. 62(10): p. 1081-99.
202. Nykvist, P., et al., The cell adhesion domain of type XVII collagen promotes integrin-mediated cell spreading by a novel mechanism. *J Biol Chem*, 2001. 276(42): p. 38673-9.
203. Loeser, R.F., et al., Integrin expression by primary and immortalized human chondrocytes: evidence of a differential role for alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins in mediating chondrocyte adhesion to types II and VI collagen. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000. 8(2): p. 96-105.
204. Kramer, R.H., et al., Identification of integrin collagen receptors on human melanoma cells. *J Biol Chem*, 1989. 264(8): p. 4684-8.
205. Kern, A., et al., Interaction of type IV collagen with the isolated integrins alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1. *Eur J Biochem*, 1993. 215(1): p. 151-9.
206. Kern, A., et al., Role of the I-domain in collagen binding specificity and activation of the integrins alpha1beta1 and alpha2beta1. *J Cell Physiol*, 1998. 176(3): p. 634-41.
207. Tuckwell, D.S., et al., Conformation dependence of integrin-type II collagen binding. Inability of collagen peptides to support alpha 2 beta 1 binding, and mediation of adhesion to denatured collagen by a novel alpha 5 beta 1-fibronectin bridge. *J Cell Sci*, 1994. 107 (Pt 4): p. 993-1005.
208. Shakibaei, M., et al., Integrin expression and collagen type II implicated in maintenance of chondrocyte shape in monolayer culture: an immunomorphological study. *Cell Biol Int*, 1997. 21(2): p. 115-25.

209. DiPersio, C.M., et al., alpha 3A beta 1 integrin localizes to focal contacts in response to diverse extracellular matrix proteins. *J Cell Sci*, 1995. 108 (Pt 6): p. 2321-36.
210. Durr, J., et al., Localization of beta 1-integrins in human cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin. *Exp Cell Res*, 1993. 207(2): p. 235-44.
211. Enomoto, M., et al., Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin. *Exp Cell Res*, 1993. 205(2): p. 276-85.
212. Pankov, R., et al., Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*, 2002. 115(Pt 20): p. 3861-3.
213. Camper, L., et al., Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit alpha10, a beta1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. *J Biol Chem*, 1998. 273(32): p. 20383-9.
214. Camper, L., et al., Distribution of the collagen-binding integrin alpha10beta1 during mouse development. *Cell Tissue Res*, 2001. 306(1): p. 107-16.
215. Velling, T., et al., cDNA cloning and chromosomal localization of human alpha(11) integrin. A collagen-binding, I domain-containing, beta(1)-associated integrin alpha-chain present in muscle tissues. *J Biol Chem*, 1999. 274(36): p. 25735-42.
216. Woods, V.L., Jr., et al., Integrin expression by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 1994. 37(4): p. 537-44.
217. Pedchenko, V., et al., Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrins bind both the proximal RGD site and non-RGD motifs within noncollagenous (NC1) domain of the alpha3 chain of type IV collagen: implication for the mechanism of endothelial cell adhesion. *J Biol Chem*, 2004. 279(4): p. 2772-80.
218. Wang, W., et al., Annexin V/beta5 integrin interactions regulate apoptosis of growth plate chondrocytes. *J Biol Chem*, 2006. 281(41): p. 30848-56.
219. Shakibaei, M., et al., Diverse roles of integrin receptors in articular cartilage. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2008. 197: p. 1-60.
220. Gendelman, R., et al., The cartilage-specific fibronectin isoform has a high affinity binding site for the small proteoglycan decorin. *J Biol Chem*, 2003. 278(13): p. 11175-81.
221. Burton-Wurster, N., et al., Cartilage fibronectin isoforms: in search of functions for a special population of matrix glycoproteins. *Matrix Biol*, 1997. 15(7): p. 441-54.
222. Aota, Y., et al., Differential effects of fibronectin fragment on proteoglycan metabolism by intervertebral disc cells: a comparison with articular chondrocytes. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005. 30(7): p. 722-8.
223. Dang, Y., et al., Comparison of the catabolic effects of fibronectin fragments in human knee and ankle cartilages. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003. 11(7): p. 538-47.
224. Armstrong, L.C., et al., Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol*, 2003. 22(1): p. 63-71.
225. Tucker, R.P., The in situ localization of tenascin splice variants and thrombospondin 2 mRNA in the avian embryo. *Development*, 1993. 117(1): p. 347-58.
226. Pfander, D., et al., Expression of thrombospondin-1 and its receptor CD36 in human osteoarthritic cartilage. *Ann Rheum Dis*, 2000. 59(6): p. 448-54.
227. Simantov, R., et al., CD36: a critical anti-angiogenic receptor. *Front Biosci*, 2003. 8: p. s874-82.
228. Bein, K., et al., Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J Biol Chem*, 2000. 275(41): p. 32167-73.
229. Hirose, Y., et al., A functional polymorphism in THBS2 that affects alternative splicing and MMP binding is associated with lumbar-disc herniation. *Am J Hum Genet*, 2008. 82(5): p. 1122-9.

230. Adolph, K.W., Relative abundance of thrombospondin 2 and thrombospondin 3 mRNAs in human tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 258(3): p. 792-6.
231. Qabar, A.N., et al., Thrombospondin 3 is a developmentally regulated heparin binding protein. *J Biol Chem*, 1994. 269(2): p. 1262-9.
232. Tucker, R.P., et al., Thrombospondin-4 is expressed by early osteogenic tissues in the chick embryo. *Dev Dyn*, 1995. 203(4): p. 477-90.
233. Blumbach, K., et al., Combined role of type IX collagen and cartilage oligomeric matrix protein in cartilage matrix assembly: cartilage oligomeric matrix protein counteracts type IX collagen-induced limitation of cartilage collagen fibril growth in mouse chondrocyte cultures. *Arthritis Rheum*, 2009. 60(12): p. 3676-85.
234. Di Cesare, P.E., et al., Matrix-matrix interaction of cartilage oligomeric matrix protein and fibronectin. *Matrix Biol*, 2002. 21(5): p. 461-70.
235. Chen, F.H., et al., Interaction of cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 with aggrecan. *J Biol Chem*, 2007. 282(34): p. 24591-8.
236. Garvican, E.R., et al., Biomarkers of cartilage turnover. Part 2: Non-collagenous markers. *Vet J*. 185(1): p. 43-49.
237. Andereya, S., et al., Comparison of modern marker proteins in serum and synovial fluid in patients with advanced osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 2006. 26(5): p. 432-8.
238. Momohara, S., et al., Cartilage oligomeric matrix protein in serum and synovial fluid of rheumatoid arthritis: potential use as a marker for joint cartilage damage. *Mod Rheumatol*, 2004. 14(5): p. 356-60.
239. Schmitz, M., et al., Disruption of extracellular matrix structure may cause pseudoachondroplasia phenotypes in the absence of impaired cartilage oligomeric matrix protein secretion. *J Biol Chem*, 2006. 281(43): p. 32587-95.
240. Song, H.R., et al., Identification of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) gene mutations in patients with pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *J Hum Genet*, 2003. 48(5): p. 222-5.
241. Hecht, J.T., et al., COMP mutations, chondrocyte function and cartilage matrix. *Matrix Biol*, 2005. 23(8): p. 525-33.
242. Posey, K.L., et al., An inducible cartilage oligomeric matrix protein mouse model recapitulates human pseudoachondroplasia phenotype. *Am J Pathol*, 2009. 175(4): p. 1555-63.
243. Lee, S.Y., et al., Superficial zone protein (lubricin) in the different tissue compartments of the knee joint: modulation by transforming growth factor beta 1 and interleukin-1 beta. *Tissue Eng Part A*, 2008. 14(11): p. 1799-808.
244. Jones, A.R., et al., Modulation of lubricin biosynthesis and tissue surface properties following cartilage mechanical injury. *Arthritis Rheum*, 2009. 60(1): p. 133-42.
245. Elsaid, K.A., et al., Reduced expression and proteolytic susceptibility of lubricin/superficial zone protein may explain early elevation in the coefficient of friction in the joints of rats with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 2007. 56(1): p. 108-16.
246. Neu, C.P., et al., Increased friction coefficient and superficial zone protein expression in patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2010. 62(9): p. 2680-7.
247. Estrella, R.P., et al., The glycosylation of human synovial lubricin: implications for its role in inflammation. *Biochem J*, 2010. 429(2): p. 359-67.
248. Rhee, D.K., et al., The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest*, 2005. 115(3): p. 622-31.
249. Shayan, K., et al., Synovial pathology in camptodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis syndrome. *Pediatr Dev Pathol*, 2005. 8(1): p. 26-33.

250. Liemann, S., et al., Three-dimensional structure of annexins. *Cell Mol Life Sci*, 1997. 53(6): p. 516-21.
251. Kim, H.J., et al., Collagen/annexin V interactions regulate chondrocyte mineralization. *J Biol Chem*, 2008. 283(16): p. 10310-7.
252. Ea, H.K., et al., Annexin 5 overexpression increased articular chondrocyte apoptosis induced by basic calcium phosphate crystals. *Ann Rheum Dis*, 2008. 67(11): p. 1617-25.
253. Haut Donahue, T.L., et al., Annexin V disruption impairs mechanically induced calcium signaling in osteoblastic cells. *Bone*, 2004. 35(3): p. 656-63.
254. von der Mark, K., et al., Annexin V interactions with collagen. *Cell Mol Life Sci*, 1997. 53(6): p. 539-45.
255. Viegas, C.S., et al., Gla-rich protein is a novel vitamin K-dependent protein present in serum that accumulates at sites of pathological calcifications. *Am J Pathol*, 2009. 175(6): p. 2288-98.
256. Le Jeune, M., et al., Identification of four alternatively spliced transcripts of the *Ucma/GRP* gene, encoding a new Gla-containing protein. *Exp Cell Res*, 2010. 316(2): p. 203-15.
257. Tagariello, A., et al., *Ucma--A* novel secreted factor represents a highly specific marker for distal chondrocytes. *Matrix Biol*, 2008. 27(1): p. 3-11.
258. Surmann-Schmitt, C., et al., UCMA, a novel secreted cartilage-specific protein with implications in osteogenesis. *J Biol Chem*, 2007. 283(11): p. 7082-93.
259. Lorenzo, P., et al., Cloning and deduced amino acid sequence of a novel cartilage protein (CILP) identifies a proform including a nucleotide pyrophosphohydrolase. *J Biol Chem*, 1998. 273(36): p. 23469-75.
260. Johnson, K., et al., One of two chondrocyte-expressed isoforms of cartilage intermediate-layer protein functions as an insulin-like growth factor 1 antagonist. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(5): p. 1302-14.
261. Lorenzo, P., et al., A novel cartilage protein (CILP) present in the mid-zone of human articular cartilage increases with age. *J Biol Chem*, 1998. 273(36): p. 23463-8.
262. Seki, S., et al., A functional SNP in CILP, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease. *Nat Genet*, 2005. 37(6): p. 607-12.
263. Mori, M., et al., Transcriptional regulation of the cartilage intermediate layer protein (CILP) gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 341(1): p. 121-7.
264. Hirose, J., et al., Expression of cartilage intermediate layer protein/nucleotide pyrophosphohydrolase parallels the production of extracellular inorganic pyrophosphate in response to growth factors and with aging. *Arthritis Rheum*, 2000. 43(12): p. 2703-11.
265. Olmez, U., et al., Insulin-like growth factor-1 suppresses pyrophosphate elaboration by transforming growth factor beta1-stimulated chondrocytes and cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 1994. 2(3): p. 149-54.
266. Lorenzo, P., et al., Altered patterns and synthesis of extracellular matrix macromolecules in early osteoarthritis. *Matrix Biol*, 2004. 23(6): p. 381-91.
267. Tsuruha, J., et al., Implication of cartilage intermediate layer protein in cartilage destruction in subsets of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2001. 44(4): p. 838-45.
268. Kalichman, L., et al., The genetics of intervertebral disc degeneration. Associated genes. *Joint Bone Spine*, 2008. 75(4): p. 388-96.
269. Virtanen, I.M., et al., Phenotypic and population differences in the association between CILP and lumbar disc disease. *J Med Genet*, 2007. 44(4): p. 285-8.

270. Hirose, J., et al., Up-regulated expression of cartilage intermediate-layer protein and ANK in articular hyaline cartilage from patients with calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(12): p. 3218-29.
271. Carney, S.L., et al., The structure and function of cartilage proteoglycans. *Physiol Rev*, 1988. 68(3): p. 858-910.
272. Quinn, T.M., et al., Microstructural modeling of collagen network mechanics and interactions with the proteoglycan gel in articular cartilage. *Biomech Model Mechanobiol*, 2007. 6(1-2): p. 73-82.
273. Wong, M., et al., Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone*, 2003. 33(1): p. 1-13.
274. Federico, S., et al., On the anisotropy and inhomogeneity of permeability in articular cartilage. *Biomech Model Mechanobiol*, 2008. 7(5): p. 367-78.
275. Cohen, N.P., et al., Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state. *J Orthop Sports Phys Ther*, 1998. 28(4): p. 203-15.
276. Burgin, L.V., et al., Impact testing to determine the mechanical properties of articular cartilage in isolation and on bone. *J Mater Sci Mater Med*, 2008. 19(2): p. 703-11.
277. Pujol, J.P., et al., Interleukin-1 and transforming growth factor-beta 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism. *Connect Tissue Res*, 2008. 49(3): p. 293-7.
278. Liacini, A., et al., Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res*, 2003. 288(1): p. 208-17.
279. Martel-Pelletier, J., et al., Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci*, 1999. 4: p. D694-703.
280. Schmidt, M.B., et al., A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. 14(5): p. 403-12.
281. Ornitz, D.M., et al., FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev*, 2002. 16(12): p. 1446-65.
282. Seifarth, C., et al., Anabolic actions of IGF-I and TGF-beta1 on Interleukin-1beta-treated human articular chondrocytes: evaluation in two and three dimensional cultures. *Histol Histopathol*, 2009. 24(10): p. 1245-62.
283. Verdier, M.P., et al., Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta isoforms and their receptors in human cartilage from normal and osteoarthritic femoral heads. *Rheumatol Int*, 2005. 25(2): p. 118-24.
284. Pogue, R., et al., BMP signaling in the cartilage growth plate. *Curr Top Dev Biol*, 2006. 76: p. 1-48.
285. Phornphutkul, C., et al., The role of insulin in chondrogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 2006. 249(1-2): p. 107-15.
286. Nilsson, O., et al., Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res*, 2005. 64(4): p. 157-65.
287. Gaissmaier, C., et al., Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. *Injury*, 2008. 39 Suppl 1: p. S88-96.
288. Gardner, D.L., Problems and paradigms in joint pathology. *J Anat*, 1994. 184 (Pt 3): p. 465-76.
289. Min, B.H., et al., Characterization of subpopulated articular chondrocytes separated by Percoll density gradient. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2002. 38(1): p. 35-40.
290. Clouet, J., et al., From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug Discov Today*, 2009. 14(19-20): p. 913-25.

291. Kumar, P., et al., Role of uppermost superficial surface layer of articular cartilage in the lubrication mechanism of joints. *J Anat*, 2001. 199(Pt 3): p. 241-50.
292. Asari, A., et al., Localization of hyaluronic acid in human articular cartilage. *J Histochem Cytochem*, 1994. 42(4): p. 513-22.
293. Hughes, L.C., et al., The ultrastructure of mouse articular cartilage: collagen orientation and implications for tissue functionality. A polarised light and scanning electron microscope study and review. *Eur Cell Mater*, 2005. 9: p. 68-84.
294. Lefebvre, V., et al., Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2005. 75(3): p. 200-12.
295. Quintana, L., et al., Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009. 15(1): p. 29-41.
296. Wuelling, M., et al., Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. *Pediatr Nephrol*, 2010. 25(4): p. 625-31.
297. Hall, B.K., et al., All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays*, 2000. 22(2): p. 138-47.
298. Knudson, C.B., et al., Hyaluronate-cell interactions during differentiation of chick embryo limb mesoderm. *Dev Biol*, 1987. 124(1): p. 82-90.
299. Toole, B.P., et al., Hyaluronate in morphogenesis: inhibition of chondrogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1972. 69(6): p. 1384-6.
300. Goldring, M.B., et al., The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem*, 2006. 97(1): p. 33-44.
301. Leonard, C.M., et al., 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*, 1991. 145(1): p. 99-109.
302. Ng, L.J., et al., SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol*, 1997. 183(1): p. 108-21.
303. Akiyama, H., Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod Rheumatol*, 2008. 18(3): p. 213-9.
304. Akiyama, H., et al., 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*, 2002. 16(21): p. 2813-28.
305. DeLise, A.M., et al., Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000. 8(5): p. 309-34.
306. Tickle, C., Molecular basis of vertebrate limb patterning. *Am J Med Genet*, 2002. 112(3): p. 250-5.
307. Bi, W., et al., Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet*, 1999. 22(1): p. 85-9.
308. Lefebvre, V., et al., SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol*, 1997. 17(4): p. 2336-46.
309. Zhang, P., et al., Regulation of human COL9A1 gene expression. Activation of the proximal promoter region by SOX9. *J Biol Chem*, 2003. 278(1): p. 117-23.
310. de Crombrughe, B., et al., Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol*, 2000. 19(5): p. 389-94.
311. Liu, C., Transcriptional mechanism of COMP gene expression and chondrogenesis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2005. 5(4): p. 340-1.
312. Han, Y., et al., 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*, 2008. 28(16): p. 4999-5013.

313. Smits, P., et al., The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell*, 2001. 1(2): p. 277-90.
314. Zhang, G., et al., evolution of vertebrate cartilage development. *Curr Top Dev Biol*, 2009. 86: p. 15-42.
315. Amano, K., et al., Sox9 family members negatively regulate maturation and calcification of chondrocytes through up-regulation of parathyroid hormone-related protein. *Mol Biol Cell*, 2009. 20(21): p. 4541-51.
316. Hattori, T., et al., SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development*, 2010. 137(6): p. 901-11.
317. Smits, P., et al., Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *J Cell Biol*, 2004. 164(5): p. 747-58.
318. Lui, J.C., et al., Spatial and temporal regulation of gene expression in the mammalian growth plate. *Bone*, 2010. 46(5): p. 1380-90.
319. Vortkamp, A., et al., Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*, 1996. 273(5275): p. 613-22.
320. St-Jacques, B., et al., Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev*, 1999. 13(16): p. 2072-86.
321. Minina, E., et al., Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell*, 2002. 3(3): p. 439-49.
322. Minina, E., et al., Expression of Fgf and Tgfbeta signaling related genes during embryonic endochondral ossification. *Gene Expr Patterns*, 2005. 6(1): p. 102-9.
323. Yoon, B.S., et al., BMPs regulate multiple aspects of growth-plate chondrogenesis through opposing actions on FGF pathways. *Development*, 2006. 133(23): p. 4667-78.
324. Sahni, M., et al., STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2. *Development*, 2001. 128(11): p. 2119-29.
325. Ornitz, D.M., FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005. 16(2): p. 205-13.
326. Sahni, M., et al., FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev*, 1999. 13(11): p. 1361-6.
327. Legeai-Mallet, L., et al., Overexpression of FGFR3, Stat1, Stat5 and p21Cip1 correlates with phenotypic severity and defective chondrocyte differentiation in FGFR3-related chondrodysplasias. *Bone*, 2004. 34(1): p. 26-36.
328. Su, N., et al., Generation of Fgfr3 conditional knockout mice. *Int J Biol Sci*, 2010. 6(4): p. 327-32.
329. Horton, W.A., et al., Achondroplasia. *Lancet*, 2007. 370(9582): p. 162-72.
330. Dy, P., et al., Synovial joint morphogenesis requires the chondrogenic action of Sox5 and Sox6 in growth plate and articular cartilage. *Dev Biol*, 2010. 341(2): p. 346-59.
331. Akiyama, H., et al., Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev*, 2004. 18(9): p. 1072-87.
332. Inada, M., et al., Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev Dyn*, 1999. 214(4): p. 279-90.
333. Pan, Y., et al., Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development. *Dev Biol*, 2009. 326(1): p. 177-89.
334. Pan, Y., et al., Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(9): p. 3365-77.

335. Koziel, L., et al., Gli3 acts as a repressor downstream of Ihh in regulating two distinct steps of chondrocyte differentiation. *Development*, 2005. 132(23): p. 5249-60.
336. Bush, P.G., et al., The osmotic sensitivity of rat growth plate chondrocytes in situ; clarifying the mechanisms of hypertrophy. *J Cell Physiol*, 2008. 214(3): p. 621-9.
337. Bush, P.G., et al., A key role for membrane transporter NKCC1 in mediating chondrocyte volume increase in the mammalian growth plate. *J Bone Miner Res*, 2010. 25(7): p. 1594-1603.
338. Bluteau, G., et al., VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes. *Bone*, 2007. 40(3): p. 568-76.
339. Kronenberg, H.M., Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 2003. 423(6937): p. 332-6.
340. Provot, S., et al., Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 328(3): p. 658-65.
341. Hecht, J., et al., Detection of novel skeletogenesis target genes by comprehensive analysis of a Runx2(-/-) mouse model. *Gene Expr Patterns*, 2007. 7(1-2): p. 102-12.
342. Zheng, Q., et al., Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J Cell Biol*, 2003. 162(5): p. 833-42.
343. Yoshida, C.A., et al., Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev*, 2004. 18(8): p. 952-63.
344. Li, T.F., et al., Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) inhibits Runx2 expression through the PKA signaling pathway. *Exp Cell Res*, 2004. 299(1): p. 128-36.
345. Zhang, M., et al., PTHrP prevents chondrocyte premature hypertrophy by inducing cyclin-D1-dependent Runx2 and Runx3 phosphorylation, ubiquitylation and proteasomal degradation. *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 9): p. 1382-9.
346. Vega, R.B., et al., Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell*, 2004. 119(4): p. 555-66.
347. Oca, P., et al., Phosphate and calcium are required for TGFbeta-mediated stimulation of ANK expression and function during chondrogenesis. *J Cell Physiol*, 2010. 224(2): p. 540-8.
348. Wang, W., et al., Role of the progressive ankylosis gene (ank) in cartilage mineralization. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(1): p. 312-23.
349. Kim, H.J., et al., The role of pyrophosphate/phosphate homeostasis in terminal differentiation and apoptosis of growth plate chondrocytes. *Bone*, 2010. 47(3): p. 657-65.
350. Haeusler, G., et al., Localization of matrix metalloproteinases, (MMPs) their tissue inhibitors, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in growth plates of children and adolescents indicates a role for MMPs in human postnatal growth and skeletal maturation. *Calcif Tissue Int*, 2005. 76(5): p. 326-35.
351. Ortega, N., et al., Complementary interplay between matrix metalloproteinase-9, vascular endothelial growth factor and osteoclast function drives endochondral bone formation. *Dis Model Mech*, 2010. 3(3-4): p. 224-35.
352. Rodgers, U.R., et al., Expression and function of matrix metalloproteinase (MMP)-28. *Matrix Biol*, 2009. 28(5): p. 263-72.
353. Stickens, D., et al., Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development*, 2004. 131(23): p. 5883-95.

354. Lee, E.R., et al., Neopeptides 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*, 2009. 238(6): p. 1547-63.
355. Holmbeck, K., et al., MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*, 1999. 99(1): p. 81-92.
356. Holmbeck, K., et al., MT1-MMP-dependent, apoptotic remodeling of unmineralized cartilage: a critical process in skeletal growth. *J Cell Biol*, 2003. 163(3): p. 661-71.
357. Holmbeck, K., et al., MT1-MMP: a tethered collagenase. *J Cell Physiol*, 2004. 200(1): p. 11-9.
358. Jimenez, M.J., et al., A regulatory cascade involving retinoic acid, Cbfa1, and matrix metalloproteinases is coupled to the development of a process of perichondrial invasion and osteogenic differentiation during bone formation. *J Cell Biol*, 2001. 155(7): p. 1333-44.
359. Bai, X.H., et al., Regulation of chondrocyte differentiation by ADAMTS-12 metalloproteinase depends on its enzymatic activity. *Cell Mol Life Sci*, 2009. 66(4): p. 667-80.
360. Allerstorfer, D., et al., VEGF and its role in the early development of the long bone epiphysis. *J Anat*, 2010. 216(5): p. 611-24.
361. Ferrara, N., et al., The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 669-76.
362. Shapiro, I.M., et al., Fate of the hypertrophic chondrocyte: microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2005. 75(4): p. 330-9.
363. Vinatier, C., et al., Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol*, 2009. 27(5): p. 307-14.
364. Shimizu, H., et al., Growth and differentiation of the developing limb bud from the perspective of chondrogenesis. *Dev Growth Differ*, 2007. 49(6): p. 449-54.
365. Samee, N., et al., Role of DLX regulatory proteins in osteogenesis and chondrogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2007. 17(3): p. 173-86.
366. Buckwalter, J.A., et al., Osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006. 58(2): p. 150-67.
367. Christoforakis, J., et al., Is there an association between articular cartilage changes and degenerative meniscus tears? *Arthroscopy*, 2005. 21(11): p. 1366-9.
368. Volpi, P., et al., Frequency and strategy of treatment of chondral lesions in cases of anterior instability: a summary of 500 ACL reconstructions. *J Orthop Traumatol.*, 2004. 5(3): p. 147-150.
369. Curl, W.W., et al., Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy*, 1997. 13(4): p. 456-60.
370. Widuchowski, W., et al., Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee*, 2007. 14(3): p. 177-82.
371. Bouffi, C., et al., IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One*, 2010. 5(12): p. e14247.
372. Ghannam, S., et al., Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther*, 2010. 1(1): p. 2.
373. Spahn, G., et al., Whole-Organ Arthroscopic Knee Score (WOAKS). *BMC Musculoskelet Disord*, 2008. 9: p. 155.
374. Niemeyer, P., et al., Comparison of arthroscopic and open assessment of size and grade of cartilage defects of the knee. *Arthroscopy*, 2011. 27(1): p. 46-51.
375. Redman, S.N., et al., Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater*, 2005. 9: p. 23-32.

376. Hunziker, E.B., Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable? *Osteoarthritis Cartilage*, 1999. 7(1): p. 15-28.
377. Buckwalter, J.A., et al., Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum*, 1998. 41(8): p. 1331-42.
378. Mankin, H.J., The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am*, 1982. 64(3): p. 460-6.
379. Beris, A.E., et al., Advances in articular cartilage repair. *Injury*, 2005. 36 Suppl 4: p. S14-23.
380. Ding, L., et al., Mechanical impact induces cartilage degradation via mitogen activated protein kinases. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010. 18(11): p. 1509-17.
381. Petersen, J.P., et al., Present and Future Therapies of Articular Cartilage Defects. *Eur J Trauma*, 2003. 29: p. 1-10.
382. Hughston, J.C., et al., Osteochondritis dissecans of the femoral condyles. *J Bone Joint Surg Am*, 1984. 66(9): p. 1340-8.
383. Aurich, M., et al., Histological and cell biological characterization of dissected cartilage fragments in human osteochondritis dissecans of the femoral condyle. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2006. 126(9): p. 606-14.
384. Koch, S., et al., Cartilage and bone morphology in osteochondritis dissecans. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 1997. 5(1): p. 42-5.
385. Skagen, P.S., et al., Osteochondritis dissecans (OCD), an endoplasmic reticulum storage disease?: a morphological and molecular study of OCD fragments. *Scand J Med Sci Sports*, 2010.
386. Stattin, E.L., et al., A missense mutation in the aggrecan C-type lectin domain disrupts extracellular matrix interactions and causes dominant familial osteochondritis dissecans. *Am J Hum Genet*, 2010. 86(2): p. 126-37.
387. Federico, D.J., et al., Osteochondritis dissecans of the knee: a historical review of etiology and treatment. *Arthroscopy*, 1990. 6(3): p. 190-7.
388. Robertson, W., et al., Osteochondritis dissecans of the knee in children. *Curr Opin Pediatr*, 2003. 15(1): p. 38-44.
389. Garrido, C.P., et al., Surgical Treatment Options for Osteochondritis Dissecans of the Knee. *Sport Health*, 2009. 1(4): p. 326-334.
390. Kocher, M.S., et al., Functional and radiographic outcome of juvenile osteochondritis dissecans of the knee treated with transarticular arthroscopic drilling. *Am J Sports Med*, 2001. 29(5): p. 562-6.
391. Linden, B., Osteochondritis dissecans of the femoral condyles: a long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg Am*, 1977. 59(6): p. 769-76.
392. Schindler, O.S., Osteochondritis dissecans of the knee. *Current Orthopaedics*, 2007. 21: p. 47-58.
393. Marlovits, S., et al., Osteochondritis dissecans of the knee. *Eur Surg*, 2004. 36(1): p. 25-32.
394. Schenck, R.C., Jr., et al., Osteochondritis dissecans. *J Bone Joint Surg Am*, 1996. 78(3): p. 439-56.
395. Dettlerline, A.J., et al., Evaluation and treatment of osteochondritis dissecans lesions of the knee. *J Knee Surg*, 2008. 21(2): p. 106-15.
396. Cahill, B.R., et al., The results of conservative management of juvenile osteochondritis dissecans using joint scintigraphy. A prospective study. *Am J Sports Med*, 1989. 17(5): p. 601-5.
397. Crawford, E.J., et al., Stable osteochondritis dissecans--does the lesion unite? *J Bone Joint Surg Br*, 1990. 72(2): p. 320.

398. De Smet, A.A., et al., Reassessment of the MR criteria for stability of osteochondritis dissecans in the knee and ankle. *Skeletal Radiol*, 1996. 25(2): p. 159-63.
399. De Smet, A.A., et al., Untreated osteochondritis dissecans of the femoral condyles: prediction of patient outcome using radiographic and MR findings. *Skeletal Radiol*, 1997. 26(8): p. 463-7.
400. Mizuta, H., et al., Osteochondritis dissecans of the lateral femoral condyle following total resection of the discoid lateral meniscus. *Arthroscopy*, 2001. 17(6): p. 608-12.
401. Smillie, I.S., Treatment of osteochondritis dissecans. *J Bone Joint Surg Br*, 1957. 39-B(2): p. 248-60.
402. Sales de Gauzy, J., et al., Natural course of osteochondritis dissecans in children. *J Pediatr Orthop B*, 1999. 8(1): p. 26-8.
403. Miniaci, A., et al., Fixation of unstable osteochondritis dissecans lesions of the knee using arthroscopic autogenous osteochondral grafting (mosaicplasty). *Arthroscopy*, 2007. 23(8): p. 845-51.
404. Fonseca, F., et al., Fixation with autogenous osteochondral grafts for the treatment of osteochondritis dissecans (stages III and IV). *Int Orthop*, 2009. 33(1): p. 139-44.
405. Steadman, J.R., et al., Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res*, 2001(391 Suppl): p. S362-9.
406. Knutsen, G., et al., A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am*, 2007. 89(10): p. 2105-12.
407. Steadman, J.R., et al., Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation, and outcomes. *J Knee Surg*, 2002. 15(3): p. 170-6.
408. Steadman, J.R., et al., Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy*, 2003. 19(5): p. 477-84.
409. Brittberg, M., Autologous chondrocyte implantation--technique and long-term follow-up. *Injury*, 2008. 39 Suppl 1: p. S40-9.
410. Peterson, L., et al., Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am*, 2003. 85-A Suppl 2: p. 17-24.
411. Peterson, L., et al., Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med*, 2010. 38(6): p. 1117-24.
412. Tyyni, A., et al., Biological treatment of joint cartilage damage. *Scand J Med Sci Sports*, 2000. 10(5): p. 249-65.
413. Hangody, L., et al., Autologous osteochondral grafting--technique and long-term results. *Injury*, 2008. 39 Suppl 1: p. S32-9.
414. Hangody, L., et al., Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics*, 1998. 21(7): p. 751-6.
415. Hangody, L., et al., Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am*, 2003. 85-A Suppl 2: p. 25-32.
416. Marcacci, M., et al., Use of autologous grafts for reconstruction of osteochondral defects of the knee. *Orthopedics*, 1999. 22(6): p. 595-600.
417. McCulloch, P.C., et al., Osteochondral Allografts for Large Defects in the Knee. *Techniques in Knee Surgery* 2006. 5(3): p. 165-173.
418. LaPrade, R.F., et al., Refrigerated osteoarticular allografts to treat articular cartilage defects of the femoral condyles. A prospective outcomes study. *J Bone Joint Surg Am*, 2009. 91(4): p. 805-11.

419. McCulloch, P.C., et al., Prospective evaluation of prolonged fresh osteochondral allograft transplantation of the femoral condyle: minimum 2-year follow-up. *Am J Sports Med*, 2007. 35(3): p. 411-20.
420. Jomha, N.M., et al., Storage of porcine articular cartilage at high subzero temperatures. *Cell Tissue Bank*, 2006. 7(1): p. 55-60.
421. Marco, F., et al., Osteochondral allografts for osteochondritis dissecans and osteonecrosis of the femoral condyles. *Int Orthop*, 1993. 17(2): p. 104-8.
422. Rozen, B., et al., The effects of prolonged deep freezing on the biomechanical properties of osteochondral allografts. *Cell Tissue Bank*, 2009. 10(1): p. 27-31.
423. Csonge, L., et al., Banking of osteochondral allografts, Part II. Preservation of Chondrocyte Viability During Long-Term Storage. *Cell Tissue Bank*, 2002. 3(3): p. 161-8.
424. Teng, M.S., et al., Enhancing osteochondral allograft viability: effects of storage media composition. *Clin Orthop Relat Res*, 2008. 466(8): p. 1804-9.
425. Alford, J.W., et al., Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med*, 2005. 33(2): p. 295-306.
426. Alford, J.W., et al., Cartilage restoration, part 2: techniques, outcomes, and future directions. *Am J Sports Med*, 2005. 33(3): p. 443-60.
427. Friedlaender, G.E., Bone allografts: the biological consequences of immunological events. *J Bone Joint Surg Am*, 1991. 73(8): p. 1119-22.
428. Phipatanakul, W.P., et al., Immune response in patients receiving fresh osteochondral allografts. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, 2004. 33(7): p. 345-8.
429. Revell, C.M., et al., Success rates and immunologic responses of autogenic, allogenic, and xenogenic treatments to repair articular cartilage defects. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009. 15(1): p. 1-15.
430. Hickey, M.J., et al., Vascularized heterotopic osteochondral allografts in a rat model following long-term immunosuppression. *J Reconstr Microsurg*, 1994. 10(4): p. 255-60.
431. Shigetomi, M., et al., Orthotopic vascularized osteochondral allografts in an immunosuppressed rat model. *J Reconstr Microsurg*, 1996. 12(2): p. 113-9.
432. Stevenson, S., et al., The fate of cancellous and cortical bone after transplantation of fresh and frozen tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am*, 1991. 73(8): p. 1143-56.
433. Meyers, M.H., et al., Resurfacing of the knee with fresh osteochondral allograft. *J Bone Joint Surg Am*, 1989. 71(5): p. 704-13.
434. Convery, F.R., et al., Fresh osteochondral allografting of the femoral condyle. *Clin Orthop Relat Res*, 1991(273): p. 139-45.
435. Beaver, R.J., et al., Fresh osteochondral allografts for post-traumatic defects in the knee. A survivorship analysis. *J Bone Joint Surg Br*, 1992. 74(1): p. 105-10.
436. Garrett, J.C., Fresh osteochondral allografts for treatment of articular defects in osteochondritis dissecans of the lateral femoral condyle in adults. *Clin Orthop Relat Res*, 1994(303): p. 33-7.
437. Flynn, J.M., et al., Osteoarticular allografts to treat distal femoral osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*, 1994(303): p. 38-43.
438. Ghazavi, M.T., et al., Fresh osteochondral allografts for post-traumatic osteochondral defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br*, 1997. 79(6): p. 1008-13.
439. Bakay, A., et al., Osteochondral resurfacing of the knee joint with allograft. Clinical analysis of 33 cases. *Int Orthop*, 1998. 22(5): p. 277-81.
440. Chu, C.R., et al., Articular cartilage transplantation. Clinical results in the knee. *Clin Orthop Relat Res*, 1999(360): p. 159-68.

441. Friedlaender, G.E., et al., Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *Orthop Clin North Am*, 1999. 30(4): p. 583-8.
442. Bugbee, W.D., Fresh Osteochondral Allografting. *Oper Tech Sports Med.*, 2000. 8(2): p. 158-162.
443. Aubin, P.P., et al., Long-term followup of fresh femoral osteochondral allografts for posttraumatic knee defects. *Clin Orthop Relat Res*, 2001(391 Suppl): p. S318-27.
444. Shasha, N., et al., Long-term follow-up of fresh tibial osteochondral allografts for failed tibial plateau fractures. *J Bone Joint Surg Am*, 2003. 85-A Suppl 2: p. 33-9.
445. Gross, A.E., et al., Long-term followup of the use of fresh osteochondral allografts for posttraumatic knee defects. *Clin Orthop Relat Res*, 2005(435): p. 79-87.
446. Jamali, A.A., et al., Fresh osteochondral allografts: results in the patellofemoral joint. *Clin Orthop Relat Res*, 2005(437): p. 176-85.
447. Emmerson, B.C., et al., Fresh osteochondral allografting in the treatment of osteochondritis dissecans of the femoral condyle. *Am J Sports Med*, 2007. 35(6): p. 907-14.
448. Traitement local de l'arthrose. *Lettre de l'Observatoire du Mouvement*, 2006. 18: p. 1-14.
449. Felson, D.T., Developments in the clinical understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 2009. 11(1): p. 203.
450. Felson, D.T., et al., An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum*, 1998. 41(8): p. 1343-55.
451. Ge, Z., et al., Osteoarthritis and therapy. *Arthritis Rheum*, 2006. 55(3): p. 493-500.
452. Felson, D.T., Identifying different osteoarthritis phenotypes through epidemiology. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010. 18(5): p. 601-4.
453. Felson, D.T., et al., The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum*, 1995. 38(10): p. 1500-5.
454. Oliveria, S.A., et al., Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum*, 1995. 38(8): p. 1134-41.
455. Samuels, J., et al., Osteoarthritis: a tale of three tissues. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 2008. 66(3): p. 244-50.
456. Elisseeff, J., Injectable cartilage tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*, 2004. 4(12): p. 1849-59.
457. Langer, R., et al., Tissue engineering. *Science*, 1993. 260(5110): p. 920-6.
458. Tuli, R., et al., 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*, 2003. 278(42): p. 41227-36.
459. de Isla, N., et al., Introduction to tissue engineering and application for cartilage engineering. *Biomed Mater Eng*, 2010. 20(3): p. 127-33.
460. Chen, F.H., et al., Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006. 2(7): p. 373-82.
461. Ateshian, G.A., Artificial cartilage: weaving in three dimensions. *Nat Mater*, 2007. 6(2): p. 89-90.
462. Guo, X., et al., Repair of full-thickness articular cartilage defects by cultured mesenchymal stem cells transfected with the transforming growth factor beta1 gene. *Biomed Mater*, 2006. 1(4): p. 206-15.
463. Vinatier, C., et al., Cartilage Tissue Engineering: Towards a Biomaterial-assisted Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2009.

464. Darling, E.M., et al., Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res*, 2005. 23(2): p. 425-32.
465. Domm, C., et al., Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. 10(1): p. 13-22.
466. Lee, Y.A., et al., Redifferentiation of Dedifferentiated Chondrocytes on Chitosan Membranes and Involvement of PKC α and P38 MAP Kinase. *Mol Cells*, 2007. 24(1): p. 9-15.
467. Vinatier, C., et al., Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *J Biomed Mater Res A*, 2007. 80(1): p. 66-74.
468. Verfaillie, C.M., et al., Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2002: p. 369-91.
469. Gonczy, P., Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(5): p. 355-66.
470. Roegiers, F., et al., Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. 16(2): p. 195-205.
471. Das, S., et al., Generation of embryonic stem cells: limitations of and alternatives to inner cell mass harvest. *Neurosurg Focus*, 2008. 24(3-4): p. E4.
472. Kiatpongsan, S., From embryonic stem cells to functioning germ cells: science, clinical and ethical perspectives. *J Med Assoc Thai*, 2007. 90(10): p. 2233-7.
473. Ulloa-Montoya, F., et al., Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng*, 2005. 100(1): p. 12-27.
474. Evans, M.J., et al., Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981. 292(5819): p. 154-6.
475. Martin, G.R., Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 78(12): p. 7634-8.
476. Turnpenny, L., et al., Evaluating human embryonic germ cells: concord and conflict as pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 2006. 24(2): p. 212-20.
477. Pittenger, M.F., et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999. 284(5411): p. 143-7.
478. Takahashi, K., et al., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007. 131(5): p. 861-72.
479. Takahashi, K., et al., Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006. 126(4): p. 663-76.
480. Wang, Y., et al., A transcriptional roadmap to the induction of pluripotency in somatic cells. *Stem Cell Rev*, 2010. 6(2): p. 282-96.
481. Wagers, A.J., et al., Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 2004. 116(5): p. 639-48.
482. Kondo, M., et al., Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*, 2003. 21: p. 759-806.
483. Friedenstein, A.J., et al., The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 1970. 3(4): p. 393-403.
484. Friedenstein, A.J., et al., Thymus cells are inducible to osteogenesis. *Eur J Immunol*, 1972. 2(6): p. 602-3.
485. Friedenstein, A.J., et al., Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 1968. 6(2): p. 230-47.
486. Friedenstein, A.J., et al., Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 1966. 16(3): p. 381-90.
487. Gage, F.H., Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000. 287(5457): p. 1433-8.

488. Morrison, S.J., et al., Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell*, 1999. 96(5): p. 737-49.
489. Uchida, N., et al., Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(26): p. 14720-5.
490. Boldrin, L., et al., Are Human and Mouse Satellite Cells Really the Same? *J Histochem Cytochem*, 2010. 58(11): p. 941-955.
491. Collins, C.A., et al., Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*, 2005. 122(2): p. 289-301.
492. Morgan, J.E., et al., Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. 35(8): p. 1151-6.
493. Oshima, H., et al., Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*, 2001. 104(2): p. 233-45.
494. Tanimura, S., et al., Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011. 8(2): p. 177-87.
495. Marshman, E., et al., The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays*, 2002. 24(1): p. 91-8.
496. Sell, S., Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology*, 2001. 33(3): p. 738-50.
497. Alsalameh, S., et al., Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(5): p. 1522-32.
498. Dowthwaite, G.P., et al., The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 6): p. 889-97.
499. Scadden, D.T., The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 2006. 441(7097): p. 1075-9.
500. Li, L., et al., Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005. 21: p. 605-31.
501. Ohlstein, B., et al., The stem cell niche: theme and variations. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. 16(6): p. 693-9.
502. Spradling, A., et al., Stem cells find their niche. *Nature*, 2001. 414(6859): p. 98-104.
503. Oreffo, R.O., et al., Skeletal progenitor cells and ageing human populations. *Clin Sci (Lond)*, 1998. 94(5): p. 549-55.
504. Friedenstein, A.J., et al., Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 1976. 4(5): p. 267-74.
505. Dominici, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. 8(4): p. 315-7.
506. Wickham, M.Q., et al., Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res*, 2003(412): p. 196-212.
507. Aerts, F., et al., Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells, ed. J.A. Nolte. 2006: Springer. 1-44.
508. Grassel, S., et al., Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation. *Front Biosci*, 2007. 12: p. 4946-56.
509. Karystinou, A., et al., Distinct mesenchymal progenitor cell subsets in the adult human synovium. *Rheumatology (Oxford)*, 2009. 48(9): p. 1057-64.
510. Wei, Y., et al., Adipose-derived stem cells and chondrogenesis. *Cytotherapy*, 2007. 9(8): p. 712-6.
511. Mochizuki, T., et al., 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*, 2006. 54(3): p. 843-53.
512. Wagner, W., et al., Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev*, 2007. 3(4): p. 239-48.
513. Bobis, S., et al., Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*, 2006. 44(4): p. 215-30.
514. Gregoire, F.M., et al., Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*, 1998. 78(3): p. 783-809.
515. Tang, Q.Q., et al., Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(26): p. 9607-11.
516. Lilla, J., et al., Metalloproteases and adipogenesis: a weighty subject. *Am J Pathol*, 2002. 160(5): p. 1551-4.
517. Farmer, S.R., Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis. *Int J Obes (Lond)*, 2005. 29 Suppl 1: p. S13-6.
518. White, U.A., et al., Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 2010. 318(1-2): p. 10-4.
519. Valet, P., et al., Understanding adipose tissue development from transgenic animal models. *J Lipid Res*, 2002. 43(6): p. 835-60.
520. Rosen, E.D., et al., Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(12): p. 885-96.
521. Otto, T.C., et al., Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2005. 40(4): p. 229-42.
522. Fonseca-Alaniz, M.H., et al., Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)*, 2007. 83(5 Suppl): p. S192-203.
523. Marie, P.J., Role of N-cadherin in bone formation. *J Cell Physiol*, 2002. 190(3): p. 297-305.
524. Hay, E., et al., N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Physiol*, 2000. 183(1): p. 117-28.
525. Yamaguchi, A., et al., Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. 220(2): p. 366-71.
526. Cheng, H., et al., Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am*, 2003. 85-A(8): p. 1544-52.
527. Yoshida, C.A., et al., Role of Runx proteins in chondrogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2005. 15(3): p. 243-54.
528. Drissi, H., et al., Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene. *J Cell Physiol*, 2000. 184(3): p. 341-50.
529. Marie, P.J., Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene*, 2003. 316: p. 23-32.
530. Nakashima, K., et al., The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 2002. 108(1): p. 17-29.
531. Gehron Robey, P., The biochemistry of bone. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1989. 18(4): p. 858-902.
532. Suzuki, A., et al., Enhanced expression of the inorganic phosphate transporter Pit-1 is involved in BMP-2-induced matrix mineralization in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res*, 2006. 21(5): p. 674-83.
533. Khoshniat, S., et al., The emergence of phosphate as a specific signaling molecule in bone and other cell types in mammals. *Cell Mol Life Sci*, 2010. 68(2): p. 205-18.

534. Marie, P., Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *médecine/sciences*, 2001. 17: p. 1252-1259.
535. Marie, P.J., Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys*, 2008. 473(2): p. 98-105.
536. Zuk, P.A., et al., Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(12): p. 4279-95.
537. De Ugarte, D.A., et al., Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett*, 2003. 89(2-3): p. 267-70.
538. Minguell, J.J., et al., Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001. 226(6): p. 507-20.
539. Jiang, Y., et al., Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002. 418(6893): p. 41-9.
540. Safford, K.M., et al., Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 294(2): p. 371-9.
541. Vindigni, V., et al., Isolation method for a stem cell population with neural potential from skin and adipose tissue. *Neurol Res*, 2009.
542. Reyes, M., et al., Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 2001. 98(9): p. 2615-25.
543. Ross, J.J., et al., Cytokine-induced differentiation of multipotent adult progenitor cells into functional smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 2006. 116(12): p. 3139-49.
544. Luyckx, A., et al., Mouse MAPC-mediated immunomodulation: Cell-line dependent variation. *Exp Hematol*, 2010. 38(1): p. 1-2.
545. Jiang, Y., et al., Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*, 2002. 30(8): p. 896-904.
546. D'Ippolito, G., et al., Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 14): p. 2971-81.
547. D'Ippolito, G., et al., Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone*, 2006. 39(3): p. 513-22.
548. Song, L., et al., Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Faseb J*, 2004. 18(9): p. 980-2.
549. Eglitis, M.A., et al., Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(8): p. 4080-5.
550. Kopen, G.C., et al., Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(19): p. 10711-6.
551. Woodbury, D., et al., Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 2000. 61(4): p. 364-70.
552. Schwartz, R.E., et al., Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*, 2002. 109(10): p. 1291-302.
553. Krause, D.S., et al., Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 2001. 105(3): p. 369-77.
554. Mezey, E., et al., Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*, 2000. 290(5497): p. 1779-82.
555. Mezey, E., et al., Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(3): p. 1364-9.

556. Brazelton, T.R., et al., From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 2000. 290(5497): p. 1775-9.
557. Petersen, B.E., et al., Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 1999. 284(5417): p. 1168-70.
558. Lakshmipathy, U., et al., Stem cell plasticity. *Blood Rev*, 2005. 19(1): p. 29-38.
559. McKinney-Freeman, S.L., et al., Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(3): p. 1341-6.
560. Mitaka, T., Hepatic stem cells: from bone marrow cells to hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 281(1): p. 1-5.
561. Sarig, R., et al., Cloned myogenic cells can transdifferentiate in vivo into neuron-like cells. *PLoS One*, 2010. 5(1): p. e8814.
562. Chen, E.H., et al., Cell-cell fusion. *FEBS Lett*, 2007. 581(11): p. 2181-93.
563. Terada, N., et al., Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 2002. 416(6880): p. 542-5.
564. Ying, Q.L., et al., Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 2002. 416(6880): p. 545-8.
565. Ambrosi, D.J., et al., Reprogramming mediated by stem cell fusion. *J Cell Mol Med*, 2005. 9(2): p. 320-30.
566. Aranda, P., et al., Epigenetic signatures associated with different levels of differentiation potential in human stem cells. *PLoS One*, 2009. 4(11): p. e7809.
567. Collas, P., Programming differentiation potential in mesenchymal stem cells. *Epigenetics*, 2010. 5(6).
568. Bobick, B.E., et al., Regulation of the chondrogenic phenotype in culture. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2009. 87(4): p. 351-71.
569. Haberland, M., et al., The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet*, 2009. 10(1): p. 32-42.
570. Frisen, J., Stem cell plasticity? *Neuron*, 2002. 35(3): p. 415-8.
571. Kuci, S., et al., Adult stem cells as an alternative source of multipotential (pluripotential) cells in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2009. 4(2): p. 107-17.
572. Pomerantz, J., et al., Nuclear reprogramming: a key to stem cell function in regenerative medicine. *Nat Cell Biol*, 2004. 6(9): p. 810-6.
573. Okura, H., et al., Transdifferentiation of human adipose tissue-derived stromal cells into insulin-producing clusters. *J Artif Organs*, 2009. 12(2): p. 123-30.
574. Tsonis, P.A., Regeneration in vertebrates. *Dev Biol*, 2000. 221(2): p. 273-84.
575. Tsonis, P.A., Stem cells from differentiated cells. *Mol Interv*, 2004. 4(2): p. 81-3.
576. Blau, H.M., A twist of fate. *Nature*, 2002. 419(6906): p. 437.
577. Blau, H.M., et al., The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, 2001. 105(7): p. 829-41.
578. Gnecci, M., et al., Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*, 2008. 103(11): p. 1204-19.
579. Kode, J.A., et al., Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*, 2009. 11(4): p. 377-91.
580. Tse, W.T., et al., Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 2003. 75(3): p. 389-97.
581. Di Nicola, M., et al., Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 2002. 99(10): p. 3838-43.

582. Glennie, S., et al., Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 2005. 105(7): p. 2821-7.
583. Corcione, A., et al., Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 2006. 107(1): p. 367-72.
584. Spaggiari, G.M., et al., 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*, 2006. 107(4): p. 1484-90.
585. Ramasamy, R., et al., Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*, 2007. 83(1): p. 71-6.
586. Uccelli, A., et al., Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*, 2006. 36(10): p. 2566-73.
587. Bartholomew, A., et al., Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*, 2002. 30(1): p. 42-8.
588. Krampera, M., et al., Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 2003. 101(9): p. 3722-9.
589. Zappia, E., et al., Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, 2005. 106(5): p. 1755-61.
590. Nasef, A., et al., Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation*, 2007. 84(2): p. 231-7.
591. Beyth, S., et al., Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*, 2005. 105(5): p. 2214-9.
592. Djouad, F., et al., Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*, 2007. 25(8): p. 2025-32.
593. Rasmusson, I., Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*, 2006. 312(12): p. 2169-79.
594. Aggarwal, S., et al., Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 2005. 105(4): p. 1815-22.
595. Najar, M., et al., Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol*, 2010. 264(2): p. 171-9.
596. Meisel, R., et al., Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*, 2004. 103(12): p. 4619-21.
597. Frumento, G., et al., Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med*, 2002. 196(4): p. 459-68.
598. Grohmann, U., et al., Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol*, 2003. 24(5): p. 242-8.
599. Gieseke, F., et al., Human multipotent mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of PBMCs independently of IFN γ R1 signaling and IDO expression. *Blood*, 2007. 110(6): p. 2197-200.
600. Ren, G., et al., Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*, 2009. 27(8): p. 1954-62.
601. Ren, G., et al., Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*, 2008. 2(2): p. 141-50.
602. Murn, J., et al., Prostaglandin E2 regulates B cell proliferation through a candidate tumor suppressor, Ptger4. *J Exp Med*, 2008. 205(13): p. 3091-103.

603. Tabera, S., et al., The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*, 2008. 93(9): p. 1301-9.
604. Asari, S., et al., Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp Hematol*, 2009. 37(5): p. 604-15.
605. Schena, F., et al., IFN-gamma dependent inhibition of B cell activation by bone marrow derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2010. 62(9): p. 2776-2786.
606. Sotiropoulou, P.A., et al., Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 2006. 24(1): p. 74-85.
607. Maccario, R., et al., Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*, 2005. 90(4): p. 516-25.
608. Rasmusson, I., et al., Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*, 2003. 76(8): p. 1208-13.
609. Krampera, M., et al., Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2006. 24(2): p. 386-98.
610. Le Blanc, K., Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 2003. 5(6): p. 485-9.
611. Jiang, X.X., et al., Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 2005. 105(10): p. 4120-6.
612. Zhang, W., et al., Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev*, 2004. 13(3): p. 263-71.
613. Nauta, A.J., et al., Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 2006. 177(4): p. 2080-7.
614. Nauta, A.J., et al., Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, 2007. 110(10): p. 3499-506.
615. Gurevitch, O., et al., Transplantation of allogeneic or xenogeneic bone marrow within the donor stromal microenvironment. *Transplantation*, 1999. 68(9): p. 1362-8.
616. Yanez, R., et al., Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*, 2006. 24(11): p. 2582-91.
617. Anklesaria, P., et al., Engraftment of a clonal bone marrow stromal cell line in vivo stimulates hematopoietic recovery from total body irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(21): p. 7681-5.
618. Bensidhoum, M., et al., Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood*, 2004. 103(9): p. 3313-9.
619. Almeida-Porada, G., et al., Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood*, 2000. 95(11): p. 3620-7.
620. Devine, S.M., et al., Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol*, 2001. 29(2): p. 244-55.

621. Chapel, A., et al., Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med*, 2003. 5(12): p. 1028-38.
622. Uccelli, A., et al., Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol*, 2007. 28(5): p. 219-26.
623. Djouad, F., et al., Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(5): p. 1595-603.
624. Augello, A., et al., Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*, 2005. 35(5): p. 1482-90.
625. Gerdoni, E., et al., Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*, 2007. 61(3): p. 219-27.
626. Kushida, T., et al., Crucial role of donor-derived stromal cells in successful treatment for intractable autoimmune diseases in mrl/lpr mice by bmt via portal vein. *Stem Cells*, 2001. 19(3): p. 226-35.
627. Deng, W., et al., Effects of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells on T and B lymphocytes from BXSB mice. *DNA Cell Biol*, 2005. 24(7): p. 458-63.
628. Lee, R.H., et al., Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(46): p. 17438-43.
629. Koppula, P.R., et al., Histocompatibility testing of cultivated human bone marrow stromal cells - a promising step towards pre-clinical screening for allogeneic stem cell therapy. *Cell Immunol*, 2009. 259(1): p. 61-5.
630. Karlin, L., et al., *Hématologie*, ed. E. Masson. 2009. 339.
631. Zuk, P.A., Tissue engineering craniofacial defects with adult stem cells? Are we ready yet? *Pediatr Res*, 2008. 63(5): p. 478-86.
632. Gimble, J.M., et al., The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone*, 1996. 19(5): p. 421-8.
633. Duque, G., Bone and fat connection in aging bone. *Curr Opin Rheumatol*, 2008. 20(4): p. 429-34.
634. Moerman, E.J., et al., Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell*, 2004. 3(6): p. 379-89.
635. Young, N.S., et al., The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med*, 1997. 336(19): p. 1365-72.
636. Rozman, C., et al., Age-related variations of fat tissue fraction in normal human bone marrow depend both on size and number of adipocytes: a stereological study. *Exp Hematol*, 1989. 17(1): p. 34-7.
637. Muruganandan, S., et al., Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci*, 2009. 66(2): p. 236-53.
638. Casteilla, L., et al., Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. *Diabetes Metab*, 2006. 32(5 Pt 1): p. 393-401.
639. Gesta, S., et al., Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, 2007. 131(2): p. 242-56.
640. Enerback, S., The origins of brown adipose tissue. *N Engl J Med*, 2009. 360(19): p. 2021-3.

641. Celi, F.S., Brown adipose tissue--when it pays to be inefficient. *N Engl J Med*, 2009. 360(15): p. 1553-6.
642. Nicholls, D.G., et al., The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl*, 1978. 32: p. 89-93.
643. Nedergaard, J., et al., Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. 293(2): p. E444-52.
644. Cypess, A.M., et al., Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*, 2009. 360(15): p. 1509-17.
645. Virtanen, K.A., et al., Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*, 2009. 360(15): p. 1518-25.
646. Virtanen, K.A., et al., Brown adipose tissue in humans. *Curr Opin Lipidol*, 2011. 22(1): p. 49-54.
647. Poulos, S.P., et al., The development and endocrine functions of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 2010. 323(1): p. 20-34.
648. Trujillo, M.E., et al., Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev*, 2006. 27(7): p. 762-78.
649. Lee, J.H., et al., Resistin is elevated following traumatic joint injury and causes matrix degradation and release of inflammatory cytokines from articular cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009. 17(5): p. 613-20.
650. Zhang, Z., et al., Resistin induces expression of proinflammatory cytokines and chemokines in human articular chondrocytes via transcription and messenger RNA stabilization. *Arthritis Rheum*, 2010. 62(7): p. 1993-2003.
651. Bao, J.P., et al., Visfatin: a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. *J Int Med Res*, 2009. 37(6): p. 1655-61.
652. Gosset, M., et al., Crucial role of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in matrix degradation and prostaglandin E2 synthesis in chondrocytes: possible influence on osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2008. 58(5): p. 1399-409.
653. Hu, P.F., et al., Apelin plays a catabolic role on articular cartilage: in vivo and in vitro studies. *Int J Mol Med*, 2010. 26(3): p. 357-63.
654. da Silva Meirelles, L., et al., Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 11): p. 2204-13.
655. Grogan, S.P., et al., Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 2009. 11(3): p. R85.
656. Hiraoka, K., et al., Mesenchymal progenitor cells in adult human articular cartilage. *Biorheology*, 2006. 43(3-4): p. 447-54.
657. Williams, R., et al., Identification and clonal characterisation of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage. *PLoS One*, 2010. 5(10): p. e13246.
658. Arai, F., et al., Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J Exp Med*, 2002. 195(12): p. 1549-63.
659. Bulstra, S.K., et al., The potential of adult human perichondrium to form hyalin cartilage in vitro. *J Orthop Res*, 1990. 8(3): p. 328-35.
660. Hinton, R.J., et al., Differential gene expression in the perichondrium and cartilage of the neonatal mouse temporomandibular joint. *Orthod Craniofac Res*, 2009. 12(3): p. 168-77.
661. Togo, T., et al., Identification of cartilage progenitor cells in the adult ear perichondrium: utilization for cartilage reconstruction. *Lab Invest*, 2006. 86(5): p. 445-57.

662. Van Osch, G.J., et al., Chondrogenic potential of in vitro multiplied rabbit perichondrium cells cultured in alginate beads in defined medium. *Tissue Eng*, 2000. 6(4): p. 321-30.
663. Yoo, W.J., et al., Implantation of perichondrium-derived chondrocytes in physal defects of rabbit tibiae. *Acta Orthop*, 2005. 76(5): p. 628-36.
664. Choi, Y.S., et al., Chondrogenesis of human periosteum-derived progenitor cells in atelocollagen. *Biotechnol Lett*, 2007. 29(2): p. 323-9.
665. Choi, Y.S., et al., Multipotency and growth characteristic of periosteum-derived progenitor cells for chondrogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Biotechnol Lett*, 2007. 30(4): p. 593-601.
666. Yoshimura, H., et al., Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*, 2007. 327(3): p. 449-62.
667. De Bari, C., et al., Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(4): p. 1209-21.
668. De Bari, C., et al., Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum*, 2001. 44(1): p. 85-95.
669. Arufe, M.C., et al., Differentiation of synovial CD-105(+) human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation. *J Cell Biochem*, 2009. 108(1): p. 145-155.
670. Nagase, T., et al., Analysis of the chondrogenic potential of human synovial stem cells according to harvest site and culture parameters in knees with medial compartment osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2008. 58(5): p. 1389-98.
671. Pei, M., et al., Enhancing and maintaining chondrogenesis of synovial fibroblasts by cartilage extracellular matrix protein matrilins. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. 16(9): p. 1110-7.
672. Shimaya, M., et al., Magnesium enhances adherence and cartilage formation of synovial mesenchymal stem cells through integrins. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010. 18(10): p. 1300-9.
673. Koga, H., et al., Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. *Stem Cells*, 2007. 25(3): p. 689-96.
674. Koga, H., et al., Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res*, 2008. 333(2): p. 207-15.
675. Sakao, K., et al., Induction of chondrogenic phenotype in synovium-derived progenitor cells by intermittent hydrostatic pressure. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. 16(7): p. 805-14.
676. Sakaguchi, Y., et al., Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(8): p. 2521-9.
677. De Bari, C., et al., Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*, 2001. 44(8): p. 1928-42.
678. Jones, E.A., et al., Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level. *Arthritis Rheum*, 2008. 58(6): p. 1731-40.

679. Jones, E.A., et al., Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(3): p. 817-27.
680. Kurose, R., et al., Characterization of human synovial fluid cells of 26 patients with osteoarthritis knee for cartilage repair therapy. *Int J Rheum Dis*, 2010. 13(1): p. 68-74.
681. Morito, T., et al., Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford)*, 2008. 47(8): p. 1137-43.
682. Funakoshi, T., et al., Chondrogenic differentiation and lubricin expression of caprine infraspinatus tendon cells. *J Orthop Res*, 2010. 28(6): p. 716-25.
683. Zhang, J., et al., Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010. 11: p. 10.
684. Rui, Y.F., et al., Isolation and characterization of multipotent rat tendon-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*, 2010. 16(5): p. 1549-58.
685. Salingcarnboriboon, R., et al., Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res*, 2003. 287(2): p. 289-300.
686. Kubo, S., et al., Blocking vascular endothelial growth factor with soluble Flt-1 improves the chondrogenic potential of mouse skeletal muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum*, 2009. 60(1): p. 155-65.
687. Matsumoto, T., et al., The influence of sex on the chondrogenic potential of muscle-derived stem cells: implications for cartilage regeneration and repair. *Arthritis Rheum*, 2008. 58(12): p. 3809-19.
688. Nesti, L.J., et al., Differentiation potential of multipotent progenitor cells derived from war-traumatized muscle tissue. *J Bone Joint Surg Am*, 2008. 90(11): p. 2390-8.
689. Young, H.E., et al., Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*, 2001. 264(1): p. 51-62.
690. Cheng, P.H., et al., Postnatal stem/progenitor cells derived from the dental pulp of adult chimpanzee. *BMC Cell Biol*, 2008. 9: p. 20.
691. Huang, A.H., et al., Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. *J Endod*, 2009. 35(5): p. 673-81.
692. Karaoz, E., et al., Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol*, 2010. 133(1): p. 95-112.
693. Koyama, N., et al., Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg*, 2009. 67(3): p. 501-6.
694. Miura, M., et al., SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(10): p. 5807-12.
695. Gay, I.C., et al., Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res*, 2007. 10(3): p. 149-60.
696. Inoue, T., et al., Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix in vivo and in vitro. *J Dent Res*, 1986. 65(1): p. 12-22.
697. Singhatanadgit, W., et al., Isolation and characterization of stem cell clones from adult human ligament. *Tissue Eng Part A*, 2009. 15(9): p. 2625-36.
698. English, A., et al., A comparative assessment of cartilage and joint fat pad as a potential source of cells for autologous therapy development in knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2007. 46(11): p. 1676-83.

699. Buckley, C.T., et al., Oxygen tension differentially regulates the functional properties of cartilaginous tissues engineered from infrapatellar fat pad derived MSCs and articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010. 18(10): p. 1345-54.
700. Giovannini, S., et al., Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. *Differentiation*, 2008. 76(2): p. 118-29.
701. Kuwana, M., et al., Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J Leukoc Biol*, 2003. 74(5): p. 833-45.
702. Raghunath, J., et al., Chondrogenic potential of blood-acquired mesenchymal progenitor cells. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2010. 63(5): p. 841-7.
703. Seta, N., et al., Derivation of multipotent progenitors from human circulating CD14+ monocytes. *Exp Hematol*, 2010. 38(7): p. 557-63.
704. Farrington-Rock, C., et al., Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation*, 2004. 110(15): p. 2226-32.
705. Shih, Y.R., et al., Isolation and characterization of stem cells from the human parathyroid gland. *Cell Prolif*, 2009. 42(4): p. 461-70.
706. French, M.M., et al., Chondrogenic differentiation of adult dermal fibroblasts. *Ann Biomed Eng*, 2004. 32(1): p. 50-6.
707. Lavoie, J.F., et al., Skin-derived precursors differentiate into skeletogenic cell types and contribute to bone repair. *Stem Cells Dev*, 2009. 18(6): p. 893-906.
708. Yin, S., et al., Chondrogenic transdifferentiation of human dermal fibroblasts stimulated with cartilage-derived morphogenetic protein 1. *Tissue Eng Part A*, 2010. 16(5): p. 1633-43.
709. In 't Anker, P.S., et al., Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*, 2003. 102(4): p. 1548-9.
710. Arufe, M., et al., Analysis of the chondrogenic potential and secretome of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord stroma. *Stem Cells Dev*, 2010.
711. Bailey, M.M., et al., A Comparison of Human Umbilical Cord Matrix Stem Cells and Temporomandibular Joint Condylar Chondrocytes for Tissue Engineering Temporomandibular Joint Condylar Cartilage. *Tissue Eng*, 2007. 13(8): p. 2003-2010.
712. Can, A., et al., Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells*, 2007. 25(11): p. 2886-95.
713. Karahuseyinoglu, S., et al., Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*, 2007. 25(2): p. 319-31.
714. Majore, I., et al., Growth and Differentiation Properties of Mesenchymal Stromal Cell Populations Derived from Whole Human Umbilical Cord. *Stem Cell Rev*, 2010. 7(1): p. 17-31.
715. Wang, H.S., et al., Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 2004. 22(7): p. 1330-7.
716. Sarugaser, R., et al., Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*, 2005. 23(2): p. 220-9.
717. Hoynowski, S.M., et al., Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 362(2): p. 347-53.
718. Lee, M.W., et al., Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 320(1): p. 273-8.
719. Choi, Y.S., et al., Chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood-derived multilineage progenitor cells in atelocollagen. *Cytotherapy*, 2008. 10(2): p. 165-73.
720. Fuchs, J.R., et al., Cartilage engineering from ovine umbilical cord blood mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells*, 2005. 23(7): p. 958-64.

721. Bieback, K., et al., Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 2004. 22(4): p. 625-34.
722. De Coppi, P., et al., Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*, 2007. 25(1): p. 100-6.
723. Kolambkar, Y.M., et al., Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells. *J Mol Histol*, 2007. 38(5): p. 405-13.
724. Diaz-Prado, S., et al., Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J Cell Biochem*, 2010. 111(4): p. 846-57.
725. Hu, Y., et al., Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med*, 2003. 141(5): p. 342-9.
726. Haeck, P.C., et al., Evidence-based patient safety advisory: liposuction. *Plast Reconstr Surg*, 2009. 124(4 Suppl): p. 28S-44S.
727. Lindroos, B., et al., The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev*, 2010.
728. Yoshimura, K., et al., Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*, 2006. 208(1): p. 64-76.
729. Varma, M.J., et al., Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev*, 2007. 16(1): p. 91-104.
730. Fraser, J.K., et al., Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 2006. 24(4): p. 150-4.
731. Jurgens, W.J., et al., Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res*, 2008. 332(3): p. 415-26.
732. Helder, M.N., et al., Stem Cells from Adipose Tissue Allow Challenging New Concepts for Regenerative Medicine. *Tissue Eng*, 2007. 13(8): p. 1799-1808.
733. Suga, H., et al., Rapid expansion of human adipose-derived stromal cells preserving multipotency. *Cytotherapy*, 2007. 9(8): p. 738-45.
734. Guijarro-Martinez, R., et al., Autologous fat transfer to the cranio-maxillofacial region: updates and controversies. *J Craniomaxillofac Surg*, 2010.
735. Coleman, S.R., Facial recontouring with liposuction. *Clin Plast Surg*, 1997. 24(2): p. 347-67.
736. Coleman, S.R., Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg*, 2006. 118(3 Suppl): p. 108S-120S.
737. Duckers, H.J., et al., The Bedside Celution system for isolation of adipose derived regenerative cells. *EuroIntervention*, 2006. 2(3): p. 395-8.
738. Lin, K., et al., Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution system. *Cytotherapy*, 2008. 10(4): p. 417-26.
739. Yamamoto, T., et al., Periurethral injection of autologous adipose-derived stem cells for the treatment of stress urinary incontinence in patients undergoing radical prostatectomy: report of two initial cases. *Int J Urol*, 2010. 17(1): p. 75-82.
740. Daher, S.R., et al., Adipose stromal/stem cells: basic and translational advances: the IFATS collection. *Stem Cells*, 2008. 26(10): p. 2664-5.
741. Gimble, J.M., et al., Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*, 2007. 100(9): p. 1249-60.
742. Oedayrajsingh-Varma, M.J., et al., Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*, 2006. 8(2): p. 166-77.
743. Padoin, A.V., et al., Sources of processed lipoaspirate cells: influence of donor site on cell concentration. *Plast Reconstr Surg*, 2008. 122(2): p. 614-8.

744. Rada, T., et al., Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009. 15(2): p. 113-25.
745. Lei, L., et al., Biological character of human adipose-derived adult stem cells and influence of donor age on cell replication in culture. *Sci China C Life Sci*, 2007. 50(3): p. 320-8.
746. Aust, L., et al., Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*, 2004. 6(1): p. 7-14.
747. Maumus, M., et al., Evidence of in situ proliferation of adult adipose tissue-derived progenitor cells: influence of fat mass microenvironment and growth. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. 93(10): p. 4098-106.
748. van Beek, E.A., et al., Intra- and interindividual variation in gene expression in human adipose tissue. *Pflugers Arch*, 2007. 453(6): p. 851-61.
749. Benya, P.D., et al., Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell*, 1978. 15(4): p. 1313-21.
750. Binette, F., et al., Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *J Orthop Res*, 1998. 16(2): p. 207-16.
751. Lin, Z., et al., Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation. *J Orthop Res*, 2008. 26(9): p. 1230-7.
752. LeBaron, R.G., et al., Ex vivo synthesis of articular cartilage. *Biomaterials*, 2000. 21(24): p. 2575-87.
753. Yang, J.J., et al., Spontaneous redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes on hydrogel surfaces. *Tissue Eng Part A*, 2010. 16(8): p. 2529-40.
754. Kino-Oka, M., et al., Subculture of chondrocytes on a collagen type I-coated substrate with suppressed cellular dedifferentiation. *Tissue Eng*, 2005. 11(3-4): p. 597-608.
755. Mitani, G., et al., The properties of bioengineered chondrocyte sheets for cartilage regeneration. *BMC Biotechnol*, 2009. 9: p. 17.
756. Kaneshiro, N., et al., Cultured articular chondrocytes sheets for partial thickness cartilage defects utilizing temperature-responsive culture dishes. *Eur Cell Mater*, 2007. 13: p. 87-92.
757. Kaneshiro, N., et al., Bioengineered chondrocyte sheets may be potentially useful for the treatment of partial thickness defects of articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 349(2): p. 723-31.
758. Benya, P.D., et al., Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 1982. 30(1): p. 215-24.
759. Bonaventure, J., et al., Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res*, 1994. 212(1): p. 97-104.
760. Malda, J., et al., Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances redifferentiation. *Tissue Eng*, 2003. 9(5): p. 939-48.
761. Albrecht, D.R., et al., Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments. *Nat Methods*, 2006. 3(5): p. 369-75.
762. Vunjak-Novakovic, G., et al., Culture of organized cell communities. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998. 33(1-2): p. 15-30.
763. Awad, H.A., et al., Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 2004. 25(16): p. 3211-22.
764. Erickson, I.E., et al., Macromer density influences mesenchymal stem cell chondrogenesis and maturation in photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009.

765. Ponticiello, M.S., et al., Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J Biomed Mater Res*, 2000. 52(2): p. 246-55.
766. Dare, E.V., et al., Differentiation of a fibrin gel encapsulated chondrogenic cell line. *Int J Artif Organs*, 2007. 30(7): p. 619-27.
767. Martinez, I., et al., Redifferentiation of in vitro expanded adult articular chondrocytes by combining the hanging-drop cultivation method with hypoxic environment. *Cell Transplant*, 2008. 17(8): p. 987-96.
768. Nakahara, H., et al., In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res*, 1991. 195(2): p. 492-503.
769. Handschel, J.G., et al., Prospects of micromass culture technology in tissue engineering. *Head Face Med*, 2007. 3: p. 4.
770. Bosnakovski, D., et al., Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Exp Hematol*, 2004. 32(5): p. 502-9.
771. Zhang, Z., et al., Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *J Anat*, 2004. 205(3): p. 229-37.
772. Bernstein, P., et al., Pellet culture elicits superior chondrogenic redifferentiation than alginate-based systems. *Biotechnol Prog*, 2009. 25(4): p. 1146-52.
773. Gigout, A., et al., Low calcium levels in serum-free media maintain chondrocyte phenotype in monolayer culture and reduce chondrocyte aggregation in suspension culture. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. 13(11): p. 1012-24.
774. Parker, A.M., et al., Low serum and serum-free culture of multipotential human adipose stem cells. *Cytotherapy*, 2007. 9(7): p. 637-46.
775. Dickson, I.R., et al., The influence of vitamin D metabolites on collagen synthesis by chick cartilage in organ culture. *J Endocrinol*, 1985. 105(1): p. 79-85.
776. Temu, T.M., et al., The mechanism of ascorbic acid-induced differentiation of ATDC5 chondrogenic cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. 299(2): p. E325-34.
777. Hering, T.M., et al., Modulation of extracellular matrix gene expression in bovine high-density chondrocyte cultures by ascorbic acid and enzymatic resuspension. *Arch Biochem Biophys*, 1994. 314(1): p. 90-8.
778. Na, K., et al., Enhancement of cell proliferation and differentiation by combination of ascorbate and dexamethasone in thermo-reversible hydrogel constructs embedded with rabbit chondrocytes. *Biotechnol Lett*, 2007. 29(10): p. 1453-7.
779. Torres, E.S., et al., Insulin impairs the maturation of chondrocytes in vitro. *Braz J Med Biol Res*, 2003. 36(9): p. 1185-92.
780. Mathy-Hartert, M., et al., Interleukin-1beta and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. 16(7): p. 756-63.
781. Takano, T., et al., Stimulation by glucocorticoids of the differentiated phenotype of chondrocytes and the proliferation of rabbit costal chondrocytes in culture. *J Biochem*, 1985. 97(4): p. 1093-100.
782. Awad, H.A., 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(6): p. 1301-12.
783. Sekiya, I., et al., Dexamethasone enhances SOX9 expression in chondrocytes. *J Endocrinol*, 2001. 169(3): p. 573-9.
784. Derfoul, A., et al., Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells*, 2006. 24(6): p. 1487-95.

785. Bunn, H.F., et al., Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev*, 1996. 76(3): p. 839-85.
786. Malda, J., et al., The Roles of Hypoxia in the In Vitro Engineering of Tissues. *Tissue Eng*, 2007. 13(9): p. 2153-2162.
787. Bertout, J.A., et al., The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(12): p. 967-75.
788. Ferrell, W.R., et al., Changes in synovial PO₂ and blood flow in the rabbit knee joint due to stimulation of the posterior articular nerve. *J Physiol*, 1992. 449: p. 607-17.
789. Zhou, S., et al., Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modeling study. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(12): p. 3915-24.
790. Kellner, K., et al., Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnol Bioeng*, 2002. 80(1): p. 73-83.
791. Silver, I.A., Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1975. 271(912): p. 261-72.
792. Grimshaw, M.J., et al., Bovine articular chondrocyte function in vitro depends upon oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000. 8(5): p. 386-92.
793. Strobel, S., et al., Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Res Ther*, 2010. 12(2): p. R34.
794. Rajpurohit, R., et al., Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism. *J Cell Physiol*, 1996. 168(2): p. 424-32.
795. Heywood, H.K., et al., Monolayer expansion induces an oxidative metabolism and ROS in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 373(2): p. 224-9.
796. Lee, R.B., et al., Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. *Biochem J*, 1997. 321 (Pt 1): p. 95-102.
797. Provot, S., et al., Hif-1{alpha} regulates differentiation of limb bud mesenchyme and joint development. *J Cell Biol*, 2007. 177(3): p. 451-64.
798. Schipani, E., et al., Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev*, 2001. 15(21): p. 2865-76.
799. Clark, C.C., et al., The effect of oxygen tension on proteoglycan synthesis and aggregation in mammalian growth plate chondrocytes. *J Orthop Res*, 1991. 9(4): p. 477-84.
800. Coimbra, I.B., et al., Hypoxia inducible factor-1 alpha expression in human normal and osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004. 12(4): p. 336-45.
801. Pfander, D., et al., HIF-1alpha controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes. *J Cell Sci*, 2003. 116(Pt 9): p. 1819-26.
802. Takahata, S., et al., Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1a, HLF, and clock. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 248(3): p. 789-94.
803. Hirose, K., et al., 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*, 1996. 16(4): p. 1706-13.
804. Gaber, T., et al., Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O₂! See what HIF can do! *Ann Rheum Dis*, 2005. 64(7): p. 971-80.
805. Crews, S.T., Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev*, 1998. 12(5): p. 607-20.
806. Wang, G.L., et al., Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 1995. 270(3): p. 1230-7.
807. Semenza, G.L., Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999. 15: p. 551-78.

808. Jiang, B.H., et al., Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 1996. 271(30): p. 17771-8.
809. Jiang, B.H., et al., Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem*, 1997. 272(31): p. 19253-60.
810. Huang, L.E., et al., 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*, 1998. 95(14): p. 7987-92.
811. Jewell, U.R., et al., Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *Faseb J*, 2001. 15(7): p. 1312-4.
812. Wang, G.L., et al., Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(12): p. 5510-4.
813. Schofield, C.J., et al., Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. 5(5): p. 343-54.
814. Min, J.H., et al., Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science*, 2002. 296(5574): p. 1886-9.
815. Ivan, M., et al., HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, 2001. 292(5516): p. 464-8.
816. Jaakkola, P., et al., Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 2001. 292(5516): p. 468-72.
817. Kaelin, W.G., Jr., The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 338(1): p. 627-38.
818. Ema, M., et al., 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*, 1999. 18(7): p. 1905-14.
819. Carrero, P., et al., Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(1): p. 402-15.
820. Gray, M.J., et al., HIF-1alpha, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene*, 2005. 24(19): p. 3110-20.
821. Liu, Y.V., et al., RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. *Cell Cycle*, 2007. 6(6): p. 656-9.
822. Semenza, G.L., et al., Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(13): p. 5680-4.
823. Wenger, R.H., Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb J*, 2002. 16(10): p. 1151-62.
824. Rossignol, F., et al., Natural antisense transcripts of HIF-1alpha are conserved in rodents. *Gene*, 2004. 339: p. 121-30.
825. Rossignol, F., et al., Natural antisense transcripts of hypoxia-inducible factor 1alpha are detected in different normal and tumour human tissues. *Gene*, 2002. 299(1-2): p. 135-40.
826. Uchida, T., et al., 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*, 2004. 279(15): p. 14871-8.

827. Masson, N., et al., Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo J*, 2001. 20(18): p. 5197-206.
828. Bruick, R.K., et al., A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, 2001. 294(5545): p. 1337-40.
829. Sutter, C.H., et al., Hypoxia-inducible factor 1 α protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(9): p. 4748-53.
830. Tanimoto, K., et al., Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Embo J*, 2000. 19(16): p. 4298-309.
831. Jeong, J.W., et al., Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, 2002. 111(5): p. 709-20.
832. Arany, Z., et al., An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(23): p. 12969-73.
833. Liu, Y.V., et al., Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1 α expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization. *J Biol Chem*, 2007. 282(51): p. 37064-73.
834. Baek, J.H., et al., 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*, 2007. 282(46): p. 33358-66.
835. Hewitson, K.S., et al., Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem*, 2002. 277(29): p. 26351-5.
836. Lando, D., et al., FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*, 2002. 16(12): p. 1466-71.
837. Lando, D., et al., Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*, 2002. 295(5556): p. 858-61.
838. Lancaster, D.E., et al., Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J*, 2004. 383(Pt. 3): p. 429-37.
839. Lisy, K., et al., Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ*, 2008. 15(4): p. 642-9.
840. Gradin, K., et al., The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem*, 2002. 277(26): p. 23508-14.
841. Seo, H.W., et al., Transcriptional activation of hypoxia-inducible factor-1 α by HDAC4 and HDAC5 involves differential recruitment of p300 and FIH-1. *FEBS Lett*, 2009. 583(1): p. 55-60.
842. Endres, M., et al., Chemokine profile of synovial fluid from normal, osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients: CCL25, CXCL10 and XCL1 recruit human subchondral mesenchymal progenitor cells. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010. 18(11): p. 1458-66.
843. Rosova, I., et al., Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2008. 26(8): p. 2173-82.
844. Ceradini, D.J., et al., Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med*, 2005. 15(2): p. 57-63.
845. Ceradini, D.J., et al., Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*, 2004. 10(8): p. 858-64.

846. Zheng, X., et al., Cell-type-specific regulation of degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha: role of subcellular compartmentalization. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(12): p. 4628-41.
847. Wiener, C.M., et al., In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. 225(2): p. 485-8.
848. Wiesener, M.S., et al., Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood*, 1998. 92(7): p. 2260-8.
849. Maynard, M.A., et al., Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem*, 2003. 278(13): p. 11032-40.
850. Willam, C., et al., The prolyl hydroxylase enzymes that act as oxygen sensors regulating destruction of hypoxia-inducible factor alpha. *Adv Enzyme Regul*, 2004. 44: p. 75-92.
851. Epstein, A.C., et al., *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 2001. 107(1): p. 43-54.
852. Pfander, D., et al., Deletion of Vhlh in chondrocytes reduces cell proliferation and increases matrix deposition during growth plate development. *Development*, 2004. 131(10): p. 2497-508.
853. Murphy, C.L., et al., Control of human articular chondrocyte differentiation by reduced oxygen tension. *J Cell Physiol*, 2004. 199(3): p. 451-9.
854. Schipani, E., Hypoxia and HIF-1 alpha in chondrogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 2005. 16(4-5): p. 539-46.
855. Duval, E., et al., 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*, 2009. 60(10): p. 3038-3048.
856. Lafont, J.E., Lack of oxygen in articular cartilage: consequences for chondrocyte biology. *Int J Exp Pathol*, 2010. 91(2): p. 99-106.
857. Lafont, J.E., et al., Hypoxia promotes the differentiated human articular chondrocyte phenotype through SOX9-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem*, 2008. 283(8): p. 4778-86.
858. Lafont, J.E., et al., Hypoxia-inducible factor 2alpha is essential for hypoxic induction of the human articular chondrocyte phenotype. *Arthritis Rheum*, 2007. 56(10): p. 3297-306.
859. Carroll, V.A., et al., Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha versus HIF-2alpha in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res*, 2006. 66(12): p. 6264-70.
860. Coyle, C.H., et al., Sustained hypoxia enhances chondrocyte matrix synthesis. *J Orthop Res*, 2009. 27(6): p. 793-9.
861. Robins, J.C., et al., Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal cells in association with transcriptional activation of Sox9. *Bone*, 2005. 37(3): p. 313-22.
862. Hirao, M., et al., Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J Biol Chem*, 2006. 281(41): p. 31079-92.
863. Husa, M., et al., Shifting HIFs in osteoarthritis. *Nat Med*, 2010. 16(6): p. 641-4.
864. Yang, S., et al., Hypoxia-inducible factor-2alpha is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction. *Nat Med*, 2010. 16(6): p. 687-93.

865. Saito, T., et al., Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med*, 2010. 16(6): p. 678-86.
866. Stewart, A.J., et al., Elevated expression of hypoxia inducible factor-2alpha in terminally differentiating growth plate chondrocytes. *J Cell Physiol*, 2006. 206(2): p. 435-40.
867. Davidson, T.L., et al., Soluble nickel inhibits HIF-prolyl-hydroxylases creating persistent hypoxic signaling in A549 cells. *Mol Carcinog*, 2006. 45(7): p. 479-89.
868. Davidson, T., et al., Soluble nickel interferes with cellular iron homeostasis. *Mol Cell Biochem*, 2005. 279(1-2): p. 157-62.
869. Ke, Q., et al., Down-regulation of the expression of the FIH-1 and ARD-1 genes at the transcriptional level by nickel and cobalt in the human lung adenocarcinoma A549 cell line. *Int J Environ Res Public Health*, 2005. 2(1): p. 10-3.
870. Salmikow, K., et al., Carcinogenic nickel induces genes involved with hypoxic stress. *Cancer Res*, 2000. 60(1): p. 38-41.
871. Karaczyn, A., et al., Ascorbate depletion mediates up-regulation of hypoxia-associated proteins by cell density and nickel. *J Cell Biochem*, 2006. 97(5): p. 1025-35.
872. Salmikow, K., et al., Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem*, 2004. 279(39): p. 40337-44.
873. Li, J., et al., Nickel compounds act through phosphatidylinositol-3-kinase/Akt-dependent, p70(S6k)-independent pathway to induce hypoxia inducible factor transactivation and Cap43 expression in mouse epidermal Cl41 cells. *Cancer Res*, 2004. 64(1): p. 94-101.
874. Goldberg, M.A., et al., Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*, 1988. 242(4884): p. 1412-5.
875. Yuan, Y., et al., Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem*, 2003. 278(18): p. 15911-6.
876. Gao, N., et al., Arsenite induces HIF-1alpha and VEGF through PI3K, Akt and reactive oxygen species in DU145 human prostate carcinoma cells. *Mol Cell Biochem*, 2004. 255(1-2): p. 33-45.
877. Duyndam, M.C., et al., Evidence for a role of p38 kinase in hypoxia-inducible factor 1-independent induction of vascular endothelial growth factor expression by sodium arsenite. *J Biol Chem*, 2003. 278(9): p. 6885-95.
878. Duyndam, M.C., et al., Induction of vascular endothelial growth factor expression and hypoxia-inducible factor 1alpha protein by the oxidative stressor arsenite. *J Biol Chem*, 2001. 276(51): p. 48066-76.
879. Gao, N., et al., Vanadate-induced expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 2002. 277(35): p. 31963-71.
880. Hwang, J.T., et al., AMP-activated protein kinase activity is required for vanadate-induced hypoxia-inducible factor 1alpha expression in DU145 cells. *Carcinogenesis*, 2004. 25(12): p. 2497-507.
881. Hirsila, M., et al., Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway. *Faseb J*, 2005. 19(10): p. 1308-10.
882. Wang, G.L., et al., Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood*, 1993. 82(12): p. 3610-5.

883. Stiehl, D.P., et al., Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett*, 2002. 512(1-3): p. 157-62.
884. Martin, G., et al., Effect of hypoxia and reoxygenation on gene expression and response to interleukin-1 in cultured articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(11): p. 3549-60.
885. Feldser, D., et al., Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*, 1999. 59(16): p. 3915-8.
886. Richard, D.E., et al., Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 2000. 275(35): p. 26765-71.
887. Gorlach, A., et al., Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res*, 2001. 89(1): p. 47-54.
888. Kasuno, K., et al., Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Biol Chem*, 2004. 279(4): p. 2550-8.
889. Metzen, E., et al., Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell*, 2003. 14(8): p. 3470-81.
890. Haddad, J.J., et al., A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1alpha. *FEBS Lett*, 2001. 505(2): p. 269-74.
891. Hellwig-Burgel, T., et al., Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*, 1999. 94(5): p. 1561-7.
892. Han, J., et al., Manganese (II) induces chemical hypoxia by inhibiting HIF-prolyl hydroxylase: Implication in manganese-induced pulmonary inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009.
893. Ho, V.T., et al., Effects of transition metals on the expression of the erythropoietin gene: further evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. 223(1): p. 175-80.
894. Hagen, T., et al., Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science*, 2003. 302(5652): p. 1975-8.
895. Callapina, M., et al., Nitric oxide reverses desferrioxamine- and hypoxia-evoked HIF-1alpha accumulation--implications for prolyl hydroxylase activity and iron. *Exp Cell Res*, 2005. 306(1): p. 274-84.
896. Chun, Y.S., et al., Cadmium blocks hypoxia-inducible factor (HIF)-1-mediated response to hypoxia by stimulating the proteasome-dependent degradation of HIF-1alpha. *Eur J Biochem*, 2000. 267(13): p. 4198-204.
897. Lee, K., et al., Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(42): p. 17910-5.
898. Lee, K., et al., Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(7): p. 2353-8.
899. Zhang, H., et al., Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(50): p. 19579-86.
900. Mazure, N.M., et al., HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochem Pharmacol*, 2004. 68(6): p. 971-80.
901. Thoms, B.L., et al., Inhibition of hypoxia-inducible factor-targeting prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 (PHD2) enhances matrix synthesis by human chondrocytes. *J Biol Chem*, 2010. 285(27): p. 20472-80.

902. Schultz, K., et al., Prolyl hydroxylase 2 deficiency limits proliferation of vascular smooth muscle cells by hypoxia-inducible factor-1 α -dependent mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009. 296(6): p. L921-7.
903. Stolze, I.P., et al., Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) in regulating hypoxia-inducible factor (HIF) transcriptional target genes [corrected]. *J Biol Chem*, 2004. 279(41): p. 42719-25.
904. Iyer, N.V., et al., Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*, 1998. 12(2): p. 149-62.
905. Carmeliet, P., et al., Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 1998. 394(6692): p. 485-90.
906. Ofek, G., et al., Biomechanics of single chondrocytes under direct shear. *Biomech Model Mechanobiol*, 2010. 9(2): p. 153-62.
907. Quinn, T.M., et al., Physical and biological regulation of proteoglycan turnover around chondrocytes in cartilage explants. Implications for tissue degradation and repair. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. 878: p. 420-41.
908. Shieh, A.C., et al., Principles of cell mechanics for cartilage tissue engineering. *Ann Biomed Eng*, 2003. 31(1): p. 1-11.
909. Kisiday, J., et al., Dynamic compression stimulates proteoglycan synthesis by mesenchymal stem cells in the absence of chondrogenic cytokines. *Tissue Eng Part A*, 2009. 15(10): p. 2817-2824.
910. Nesic, D., et al., Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006. 58(2): p. 300-22.
911. Martin, I., et al., The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol*, 2004. 22(2): p. 80-6.
912. Vunjak-Novakovic, G., et al., Bioreactor studies of native and tissue engineered cartilage. *Biorheology*, 2002. 39(1-2): p. 259-68.
913. Madry, H., et al., Overexpression of human fibroblast growth factor 2 stimulates cell proliferation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *J Gene Med*, 2004. 6(2): p. 238-45.
914. Yoo, J.U., et al., Chondrogenitor cells and gene therapy. *Clin Orthop Relat Res*, 2000(379 Suppl): p. S164-70.
915. Smith, P., et al., Genetic enhancement of matrix synthesis by articular chondrocytes: comparison of different growth factor genes in the presence and absence of interleukin-1. *Arthritis Rheum*, 2000. 43(5): p. 1156-64.
916. Nixon, A.J., et al., Insulinlike growth factor-I gene therapy applications for cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*, 2000(379 Suppl): p. S201-13.
917. Brower-Toland, B.D., et al., Direct adenovirus-mediated insulin-like growth factor I gene transfer enhances transplant chondrocyte function. *Hum Gene Ther*, 2001. 12(2): p. 117-29.
918. Tsuchiya, H., et al., Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 301(2): p. 338-43.
919. Ikeda, T., et al., The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(11): p. 3561-73.
920. Hoffmann, A., et al., The T-box transcription factor Brachyury mediates cartilage development in mesenchymal stem cell line C3H10T1/2. *J Cell Sci*, 2002. 115(Pt 4): p. 769-81.

921. Baragi, V.M., et al., Transplantation of transduced chondrocytes protects articular cartilage from interleukin 1-induced extracellular matrix degradation. *J Clin Invest*, 1995. 96(5): p. 2454-60.
922. Nixon, A.J., et al., Gene-mediated restoration of cartilage matrix by combination insulin-like growth factor-I/interleukin-1 receptor antagonist therapy. *Gene Ther*, 2005. 12(2): p. 177-86.
923. Steinert, A.F., et al., Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury*, 2008. 39 Suppl 1: p. S97-113.
924. Milbrandt, T., et al., Tracing transduced cells in osteochondral defects. *J Pediatr Orthop*, 2003. 23(4): p. 430-6.
925. Adachi, N., et al., Gene therapy and the future of cartilage repair *Operative Techniques in Orthopaedics*, 2001. 11(2): p. 138-144.
926. Brodtkin, K.R., et al., Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials*, 2004. 25(28): p. 5929-38.
927. Vinatier, C., et al., A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials*, 2005. 26(33): p. 6643-51.
928. Vinatier, C., et al., An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnol Bioeng*, 2009. 102(4): p. 1259-67.
929. Bourges, X., et al., General properties of silated hydroxyethylcellulose for potential biomedical applications. *Biopolymers*, 2002. 63(4): p. 232-8.
930. Bourges, X., et al., Synthesis and general properties of silated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci*, 2002. 99(3): p. 215-28.
931. Fatimi, A., et al., The rheological properties of silated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices. *Biomaterials*, 2008. 29(5): p. 533-543.
932. Erickson, G.R., et al., Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 290(2): p. 763-9.
933. Koulalis, D., et al., Autologous osteochondral grafts in the treatment of cartilage defects of the knee joint. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2004. 12(4): p. 329-34.
934. Martin-Hernandez, C., et al., Regenerated cartilage produced by autogenous periosteal grafts: a histologic and mechanical study in rabbits under the influence of continuous passive motion. *Arthroscopy*. 26(1): p. 76-83.
935. Bennett, K.P., et al., Proteomics reveals multiple routes to the osteogenic phenotype in mesenchymal stem cells. *BMC Genomics*, 2007. 8: p. 380-390.
936. Benoit, D.S., et al., Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells. *Nat Mater*, 2008. 7(10): p. 816-23.
937. Discher, D.E., et al., Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*, 2009. 324(5935): p. 1673-7.
938. Sekiya, I., et al., 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 U S A*, 2002. 99(7): p. 4397-402.
939. Steinert, A.F., et al., Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther*, 2007. 9(3): p. 213-228.
940. Jin, X.B., et al., Neocartilage formation from predifferentiated human adipose derived stem cells in vivo. *Acta Pharmacol Sin*, 2007. 28(5): p. 663-71.
941. Pelttari, K., 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*, 2006. 54(10): p. 3254-66.

942. Terraciano, V., et al., Differential response of adult and embryonic mesenchymal progenitor cells to mechanical compression in hydrogels. *Stem Cells*, 2007. 25(11): p. 2730-8.
943. Weiss, S., et al., Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*, 2010. 223(1): p. 84-93.
944. Winter, A., et al., Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(2): p. 418-29.
945. Dreyfuss, J.L., et al., Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An Acad Bras Cienc*, 2009. 81(3): p. 409-29.
946. Raguenes, G.H., et al., *Alteromonas infernus* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *J Appl Microbiol*, 1997. 82(4): p. 422-30.
947. Collic Jouault, S., et al., Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. 1528(2-3): p. 141-51.
948. Park, J.S., et al., Heparin-bound transforming growth factor-beta3 enhances neocartilage formation by rabbit mesenchymal stem cells. *Transplantation*, 2008. 85(4): p. 589-96.
949. San Antonio, J.D., et al., Regulation of chondrogenesis by heparan sulfate and structurally related glycosaminoglycans. *Dev Biol*, 1987. 123(1): p. 17-24.
950. Hadler-Olsen, E., et al., Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *Febs J*, 2011. 278(1): p. 28-45.
951. Vlodaysky, I., et al., The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2006. 35(1-2): p. 116-27.

Christophe Merceron

PhD, university of Nantes, France

Abstract :

Articular cartilage is a highly specialized connective tissue that covers the end of bone and forms the smooth surface of joints. Articular cartilage is an avascular, alymphatic, aneural tissue that has limited self-healing capabilities. Cartilage can be altered by traumatic injuries, inflammatory or degenerative diseases. Current surgical treatments for cartilaginous defects only allow to obtain short-term satisfactory results. Therefore strategies for long-term cartilage repair have been developed. These tissue engineering strategies are based on the use of chondrogenic cells, biomaterials and morphogens. In this context, we investigated the combined use of stem cells from human adipose tissue (hATSC) and a silated cellulose-based injectable self-setting hydrogel (Si-HPMC). First we have shown that hATSC exhibit stem cells features. We have then demonstrated that hATSC cultured within a 3D environment provided by Si-HPMC and in the presence of inductive medium, express a chondrocytic phenotype and are able to form a cartilaginous tissue *in vivo*. In order to optimize the chondrogenic differentiation of hATSC, we were finally interested in deciphering the potential roles of hypoxia and a marine polysaccharide GAG-mimetic (GY785 DRS) to improve chondrogenic differentiation of hATSC. These two factors have emerged as potential tools to optimize the chondrogenic differentiation for use in regenerative medicine of cartilage.

Keywords:

Cartilage, tissue engineering, stem cells, hypoxia, hydrogel, marine polysaccharides

Laboratory :

UMR S/INSERM U 791, LIOAD, Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire;
Groupe STEP "Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology"
1 Place Alexis Ricordeau, 44042 NANTES Cedex 1, France.

Christophe Merceron

Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes (2011)

Résumé :

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif spécialisé recouvrant la surface des articulations. Ce tissu a la particularité d'être aneural, avasculaire et alymphatique et présente des capacités de réparation spontanée limitées. Il peut être le siège de lésions d'origine traumatique, inflammatoire ou liées au vieillissement. Les traitements actuels des pertes de substance cartilagineuse ne permettent l'obtention de résultats satisfaisants qu'à court terme et aboutissent à la formation d'un tissu de réparation fibreux. C'est pourquoi des stratégies d'ingénierie tissulaire, dont le principe réside dans l'association de cellules, de matrices et de morphogènes, ont été développées. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'utilisation combinée de cellules souches du tissu adipeux humain (hCSTA), d'un hydrogel injectable et auto-réticulant (HPMC-Si) et à l'optimisation des conditions de différenciation chondrogénique. Tout d'abord, nous avons montré que les hCSTA présentent les caractéristiques des cellules souches adultes. Nous avons ensuite démontré que les hCSTA cultivées au sein de l'environnement 3D que constitue l'HPMC-Si et en présence de milieu d'induction, expriment un phénotype chondrocytaire et sont capables de former un tissu cartilagineux *in vivo*. Dans l'optique d'optimiser la différenciation chondrogénique des hCSTA, nous nous sommes intéressés à l'hypoxie et à un polysaccharide marin GAG-mimétique (GY785 DRS). Ces deux facteurs nous sont apparus comme de potentiels outils permettant l'optimisation de la différenciation chondrogénique en vue d'une utilisation en médecine régénérative du cartilage.

Mots-clés :

Cartilage, ingénierie tissulaire, cellules souches, hypoxie, hydrogel, polysaccharides marins

Laboratoire :

UMR S/INSERM U 791, LIOAD, Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire.
Groupe STEP "Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology"
1 Place Alexis Ricordeau, 44042 NANTES Cedex 1, France.