

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

➤ Contact SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

Mention : "Sciences de la vie et de la santé"

Par **Jessica TRITZ - SCHIAVI**

**Conception d'un hydrogel stratifié :
Application à l'ingénierie du cartilage**

Soutenue le 15 Novembre 2011

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mme Magali CUCCHIARINI	MCU-HDR, Université de Saarland, Homburg, Allemagne
M. Daniel ISABEY	DR CNRS, UMR INSERM 955, IMRB, Créteil

Examineurs :

M. Jean-François STOLTZ	PU-PH, UMR CNRS 7561 - UHP Nancy, directeur de thèse
Mme Céline HUSELSTEIN	MCU-HDR, UMR CNRS 7561 - UHP Nancy, co-encadrante
M. Rachid RAHOUADI	PU, UMR CNRS 7563 - INPL - UHP, Nancy
M. Jean-Jacques LATAILLADE	PU-PH, Hôpital Militaire Percy, Clamart

Membres invités :

Mme Nadia BENKIRANE-JESSEL	DR, UMR INSERM 977-Université de Strasbourg
Mme Danielle BENSOUSSAN	PU-PH, UMR CNRS 7561 - UHP, UTCT, Nancy

UMR 7561-CNRS-UHP, Laboratoire de Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaires

Avant-propos et remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique au sein du laboratoire de Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaires, UMR 7561 CNRS - UHP au sein de la Faculté de Médecine de Nancy.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Jean-François Stoltz, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche, pour son soutien en me permettant notamment d'assister à des congrès afin d'y présenter mon travail, pour ses encouragements pour rédiger les articles, pour sa gentillesse, et pour son aide tout au long de ces 4 années.

Je souhaiterais aussi remercier Monsieur le professeur Jacques Magdalou, directeur de l'UMR 7561, pour m'avoir acceptée dans l'unité de recherche, pour sa gentillesse, pour m'avoir permis d'assister à un atelier Inserm ainsi qu'à l'OARSI et pour son soutien.

Je tiens à remercier Madame le Docteur Céline Huselstein, ma co-encadrante de thèse, pour son implication, son aide, son soutien, et sa patience au cours de ces 4 années. Elle a souvent été plus qu'une encadrante, et m'a permis de devenir autonome. Je retiendrai de ces années sa bonne humeur constante, ainsi que notre séjour à Leipzig.

Je souhaite aussi remercier Monsieur le Professeur Rachid Rahouadj, co-encadrant officiel de la partie mécanique de ce travail, pour son soutien, sa patience, son amitié, et pour m'avoir appris la mécanique.

Je voudrais aussi remercier Monsieur Naceur Charif pour son aide technique tout au long de ces 4 années, mais surtout pour son amitié et pour toutes les discussions que nous avons pu avoir.

Je tiens également à remercier Madame le Docteur Natalia de Isla pour son amitié, son soutien et son aide au cours de ces 4 années.

Je voudrais remercier Loic Reppel pour avoir fait son stage de Master sur ce travail, pour sa contribution et son amitié.

Je souhaite remercier tous ceux qui m'ont apporté leur soutien technique - Joseph Paquet pour l'aide lors des prélèvements sur les rats, Christel Henrionnet pour la qRT-PCR, Astrid Pinzano pour l'histologie, Véronique Décot pour la cytométrie en flux, Brigitte pour l'alginate - et pour le soutien moral (Leticia, Assia, Nicolas S.) au cours de ces années, ou dans les derniers instants de la thèse.

L'ambiance de notre équipe fut réellement bénéfique pour l'ensemble de ce travail et je souhaite remercier tous les doctorants présents et les jeunes docteurs, ainsi que les permanents pour leur bonne humeur, leur disponibilité, leur talent de cuisinier et leur gentillesse.

Enfin, je tiens à remercier mes parents pour m'avoir permis de faire des études universitaires et pour leur compréhension, ma famille pour leur soutien et surtout Cédric pour son aide, son soutien quotidien au cours de ces années qui n'ont pas été toujours de tout repos. Je voudrais aussi remercier mes amis qui m'ont soutenue (Isabelle, Myriam, Marie-Amélie, Natacha et Aurélien) et aidée (Tatiana).

Sommaire

Liste des communications, posters et publications.....	5
Liste des abréviations.....	7
Listes des illustrations et tableaux.....	10
Introduction générale	14
CHAPITRE I : Etat de l'art.....	17
I. Le cartilage articulaire	18
A. Le tissu	18
1. Les différents types de cartilage	18
2. La chondrogenèse	20
3. Organisation du cartilage articulaire.....	21
4. Rôle du cartilage articulaire	23
B. Les composants	23
1. Les chondrocytes.....	23
2. La matrice extracellulaire	24
3. Propriétés mécaniques du cartilage.....	28
II. Pathologies et traitements.....	30
A. Arthrose	30
B. Les lésions cartilagineuses.....	30
C. Traitements des lésions cartilagineuses.....	31
1. Les recommandations d'hygiène de vie.....	31
2. Les traitements pharmacologiques.....	32
3. Les traitements non pharmacologiques	32
III. Ingénierie du cartilage.....	35
A. Les cellules	35
1. Les chondrocytes.....	36
2. Les cellules souches utilisées en ingénierie tissulaire.....	36
B. Le biomatériau.....	38
1. Le cahier des charges	38
2. Les biomatériaux d'origine naturelle	39

3. Les biomatériaux d'origines synthétiques	42
4. Influence du biomatériau sur la synthèse matricielle.....	43
C. Fonctionnalisation du biomatériau	44
1. Facteurs de croissance	44
2. Stimulation mécanique	45
IV. Ingénierie stratifiée du cartilage	45
A. Variation du phénotype cellulaire entre les couches.....	46
B. Variation de la composition ou des propriétés mécaniques de la structure	49
C. Variation de la composition du biomatériau et du phénotype cellulaire	50
D. Construction d'un hydrogel stratifié sans aucune variation	51
Objectifs de la thèse.....	53
CHAPITRE II : Matériel et méthodes	56
I. Extraction et culture primaire de cellules	58
A. Extraction de chondrocytes issus de têtes fémorales de rat	58
B. Isolement de cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse.....	61
II. Construction de biomatériaux tridimensionnels à base d'alginate de sodium	62
A. Moulage d'un gel d'alginate de sodium	64
B. Mise au point de la pulvérisation de gel d'alginate de sodium.....	65
1. Technique originale de pulvérisation	65
2. Adaptation de la technique de pulvérisation.....	65
3. Construction d'un hydrogel d'alginate à une couche	68
4. Construction de biomatériaux multicouches par pulvérisation	69
III. Fonctionnalisation du biomatériau par stimulation mécanique	70
IV. Analyses du comportement biologique des cellules.....	73
A. Etudes analytiques des cellules	73
1. Viabilité cellulaire	73
2. Activité métabolique	77
3. Dosage des nitrites produits par les cellules.....	79
4. Phénotypage des cellules souches mésenchymateuses.....	82
B. Analyse de l'expression génique des cellules par qRT-PCR.....	84

C. Observation de la synthèse matricielle et de la répartition des cellules	89
1. Observation en microscopie confocale à balayage laser	89
2. Observation par histologie	93
V. Exploration des propriétés mécaniques des biomatériaux	96
A. Modes de sollicitation mécanique spécialement mis au point pour caractériser le comportement des biomatériaux	96
B. Le test de bipoinçonnement (Plain strain compressive test)	99
VI. Analyse statistique	103
CHAPITRE III : Résultats et discussion	104
I. Validation du procédé de pulvérisation pour l'ingénierie du cartilage	105
A. Influence du procédé de fabrication sur des chondrocytes de rat	105
1. Répartition des cellules dans l'hydrogel et de l'actine dans les cellules	105
2. Viabilité et synthèse de nitrite	107
3. Synthèse matricielle	108
B. Exploration des propriétés mécaniques du biomatériau	110
C. Discussion	112
II. Construction, par pulvérisation, d'hydrogels stratifiés ensemencés en CSM humaines	115
A. Comportement des CSM pulvérisées dans un système à une couche	115
1. Répartition des cellules dans l'hydrogel	115
2. Viabilité et activité métabolique	116
3. Immununophénotypage des CSM au cours de la culture	117
4. Expression des gènes d'intérêt	119
B. Construction d'hydrogels stratifiés et ensemencés de CSM	120
1. Migration des cellules	121
2. Cohésion des couches et synthèse matricielle	121
C. Exploration des propriétés mécaniques d'hydrogels à base d'alginate	123
D. Discussion	125
III. Fonctionnalisation d'un biomatériau stratifié par apport d'éléments constitutifs et par stimulations mécaniques	130
A. Influence de la composition du biomatériau sur les CSM	131

1. Viabilité – Phénotypage	131
2. Expression des gènes d'intérêt	132
3. Synthèse matricielle	134
B. Influence de la stimulation mécanique sur les CSM dans des hydrogels bistratifiés	136
1. Viabilité et phénotype des CSM	136
2. Expression génique	137
3. Synthèse matricielle	139
C. Discussion	142
CHAPITRE IV : Conclusions et perspectives.....	146
Références bibliographiques.....	154
Publications.....	Erreur ! Signet non défini.

Liste des communications, posters et publications

Publications internationales avec un comité de lecture (PI)

- **PI 01** : **Jessica Tritz**, Rachid Rahouadj, Natalia de Isla, Naceur Charif, Astrid Pinzano, Didier Mainard, Danielle Bensoussan, Patrick Netter, Jean-François Stoltz, Nadia Benkirane-Jessel, Céline Huselstein. Designing a three-dimensional alginate hydrogel by spraying method for cartilage tissue engineering, *Soft Matter* (IF₂₀₁₀ = 4,457), 2010, **6**, 5165-5174.

- **PI 02** : **J. Tritz- Schiavi**, N. Charif, C. Henrionnet, N de Isla, D. Bensoussan, J. Magdalou, N. Benkirane-Jessel, J.F. Stoltz, C. Huselstein. Original approach for cartilage tissue engineering with mesenchymal stem cells, *Bio-Medical Materials and Engineering* (IF₂₀₁₀ = 1,026), 2010, **20**, 167-174.

- **PI 03** : V. Magnenet, **J. Schiavi-Tritz**, C. Huselstein, R. Rahouadj. Constitutive equations for Ca²⁺-alginate gels, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, (IF₂₀₁₀ = 3,297), sous presse.

Communication dans des congrès internationaux avec acte publié (ACT)

- **ACT 01** : **J. Tritz**, R. Rahouadj, N. Charif, N. de Isla, J.C Voegel, N. Benkirane-Jessel, J.F Stoltz, C. Huselstein. Cells comportment and biomaterial mechanical behavior in sprayed alginate hydrogel for cartilage tissue engineering, World Conference on Regenerative Medicine, Allemagne-Leipzig, 29-31 octobre 2009. **Publié** dans *Regenerative Medecine* (IF₂₀₀₉ = 2,929), 2009, **4**, Supl. 2, S199.

- **ACT 02** : **J. Schiavi-Tritz**, N. Charif, N. de Isla, R. Rahouadj, A. Pinzano, D. Bensoussan, N. Benkirane-Jessel, J. Magdalou, J.F. Stoltz, C. Huselstein. Long-term study of stratified alginate construct for cartilage tissue engineering, OARSI 2010, Bruxelles, Belgique, du 23-26 septembre 2011. **Publié** dans *Osteoarthritis & Cartilage* (IF₂₀₁₀ = 3,953), 2010, **18**, Supl.2 S84.

- **ACT 03** : **J. Schiavi-Tritz**, L. Reppel, J. Magdalou, J.F. Stoltz, C. Huselstein. Improving hBM-MSCs differentiation in a stratified scaffold for osteoarticular repairing, OARSI 2011, San Diego, USA, du 15-18 septembre 2011. **Publié** dans *Osteoarthritis & Cartilage* (IF₂₀₁₀ = 3,953) en septembre 2011.

Communication dans des congrès internationaux et nationaux sans acte publiés (COM)

- **COM 01** : **J. Tritz**, R. Rahouadj, N. Charif, N. Jessel, L. Grossin, P. Gillet, J.C Voegel, J.F. Stoltz, C. Huselstein. Influence of spraying alginate hydrogel on cellular activity and mechanical properties, 5th International meeting on Cell therapy, Bioengineering and Regenerative Medicine, France-Nancy, 10-12 septembre 2008.

- **COM 02** : **J. Tritz**, R.Rahouadj, N. de Isla, N. Charif, A. Pinzano, D. Bensoussan, N. Benkirane-Jessel, J.F. Stoltz and C. Huselstein. Original approach for cartilage tissue engineering with mesenchymal stem cells and stratified scaffold, 5^{èmes} journées scientifique du Pôle Lorrain d'Ingénierie du Cartilage, France-Nancy, 4-5 février 2010.

- **COM 03** : J.F Stoltz, C. Huselstein, N. de Isla, **J. Tritz**, D. Bensoussan. Chondrocyte Mechanobiology and Cartilage Engineering, Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, Espagne-Valencia, 24-27 février 2010.

- **COM 04** : C. Huselstein, **J. Tritz**, R. Rahouadj, N. de Isla, N. Charif, N. Benkirane-Jessel, D. Bensoussan, J.F. Stoltz. Cartilage engineering using a sprayed alginate hydrogel method, Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, Espagne-Valencia, 24-27 février 2010.

Publication internationale avec un comité de lecture en cours de soumission :

- **J. Schiavi-Tritz**, N. de Isla, N. Charif, N. Benkirane-Jessel, J.F. Stoltz and C. Huselstein. Highly innovative technology to build a stratified scaffold based on sodium alginate hydrogel: application for cartilage tissue engineering, *Biomaterials*.

Liste des abréviations

3D :	tridimensionnel
δ :	vitesse de déplacement
ϵ_{eq} :	Déformation équivalente
$\dot{\epsilon}$:	Vitesse de déformation
σ_{eq} :	Contrainte équivalente
Ac :	Anticorps
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AINS :	Anti-inflammatoires non-stéroïdiens
Alg :	Alginate
Alg/HA :	Alginate supplémenté avec de l'acide hyaluronique
Alg/Hap :	Alginate supplémenté avec de l'hydroxyapatite
ARN :	Acide Ribonucléique
BMP :	Bone Morphogenic Protein
CD :	Cluster de Différenciation
Chrat :	Chondrocytes de rat
COMP :	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CSM :	Cellules Souches Mésenchymateuses
DMEM :	Dubelcco's Modified Eagle Medium
DMSO :	Diméthyl Sulfoxyde
EDTA :	Acide éthylènedinitrilotétraacétique
FGF :	Fibroblast Growth Factor
FITC :	Fluorescéine IsoThiocyanate
FSC :	Forward Scatter
G :	Acide Guluronique
GAG :	Glycosaminoglycannes
HA :	Acide Hyaluronique (Hyaluronic Acid)
Hap :	Hydroxyapatite
HBSS :	Hank's Balanced Salt Solution
HES :	Hématoxyline - Eosine - Safran

Hz :	Herzt
IF :	Intensité de Fluorescence
IGF :	Insulin Growth Factor
IMF :	Intensité Moyenne de Fluorescence
IP :	Iodure de Propidium
Jx :	x ^{ème} jours de culture
kPa :	KiloPascal
M :	Acide Mannuronique
MEC :	Matrice extracellulaire
MMP :	Métalloprotéinase
MPE :	Multicouches de polyélectrolytes
min :	Minute
mL :	Millilitre
mm :	Millimètre
OARSI :	Osteoarthritis Research Society International
ON :	Ouverture numérique
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PCL :	Poly (ε-caprolactone)
PE :	Phycoérythrine
PEG :	Polyéthylèneglycol
PFA :	Paraformaldéhyde
PG :	Protéoglycannes
PLA :	Acide poly lactique
PLGA :	Acide poly (D,L - lactic - co - glycolic)
PLL :	Poly-L-Lysine
PMT :	Photomultiplicateur
P/S :	Penicilline/Streptomycine
PS :	Phosphatidylsérine
Px :	Passage x (x=nombre de passage)
qRT-PCR :	quantitative Real Time - Polymerase Chain Reaction
RT :	Rétrotranscription
SEM :	Standard Error of the Mean
SSC :	Side Scatter

SVF : Sérum de Veau Foetal
TGF : Transforming Growth Factor
UV : Ultraviolet

Listes des illustrations et tableaux

Figure 1 : Répartition des différents types de cartilages dans le corps humain.....	19
Figure 2 : Coupe transversale d'un genou	20
Figure 3 : Différenciation terminale des cellules mésenchymateuses vers le chondrocyte	21
Figure 4 : Ratio de protéoglycannes et de collagènes dans le cartilage articulaire	23
Figure 5 : Assemblage des chaînes α de collagène en fibrilles	24
Figure 6 : Assemblage des fibres de collagènes de type II, IX et XI	25
Figure 7 : Composition et interaction de l'aggrécanne.....	27
Figure 8 : Composition d'une molécule de versican	27
Figure 9 : Organisation zonale des contraintes subies par le cartilage articulaire	29
Figure 10 : Changement morphologique d'une articulation arthrosique	31
Figure 11 : Technique de Brittberg	34
Figure 12 : Principe de l'ingénierie du cartilage.....	35
Figure 13 : Structure des chaînes d'alginate de sodium	39
Figure 14 : Modèle de liaison ionique en "boîte à œufs"	40
Figure 15 : Construction de structures stratifiées à base de cellules	47
Figure 16 : Construction de différentes formes par superposition de chondrocytes	47
Figure 17 : Hydrogel stratifié à base de fibrine proposé par Klein et al. en 2009	48
Figure 18 : Structure stratifiée à base de collagène ensemencée de CSM de lapin.....	49
Figure 19 : Construction stratifiée imaginée par Heymer et al.	50
Figure 20 : Hydrogel stratifié d'agarose ensemencé de différents phénotypes de chondrocytes ...	51
Figure 21 : Mode de fabrication d'hydrogels stratifiés imaginés par Lee et al.	52
Figure 22 : Paramètres étudiés pour valider la faisabilité du procédé de pulvérisation.....	54
Figure 23 : Paramètres étudiés au cours de la seconde étape de ce travail	55
Figure 24 : Paramètres étudiés au cours de la troisième étape de ce travail	55
Figure 25 : Morphologies des chondrocytes de rat cultivés en monocouche.....	60
Figure 26 : Structure de l'alginate et polymérisation de ses chaînes	63
Figure 27 : Techniques de moulage (A) et de pulvérisation (B) des gels d'alginate	64
Figure 28 : Comparaison des procédés de construction originale et adaptée	66
Figure 29 : Influence de la concentration d'un gel d'alginate sur sa viscosité et sa pulvérisation....	68
Figure 30 : Constructions multicouches (de la présente étude).....	69
Figure 31 : Etapes de mise en place du système de compression.....	71

Figure 32 : Stimulation mécanique intermittente d'un hydrogel stratifié	72
Figure 33 : Marquage des cellules apoptotiques et nécrotiques	73
Figure 34 : Principe de la cytométrie de flux	74
Figure 35 : Procédés de marquages d'une protéine d'intérêt pour la cytométrie en flux	75
Figure 36 : Scattogrammes permettant d'identifier les cellules apoptotiques (A), nécrotiques (B) et vivantes (C).....	77
Figure 37 : Réaction de Griess permettant le dosage du nitrite.....	80
Figure 38 : Courbe étalon pour le dosage du nitrite.....	81
Figure 39 : Principe de la qPCR en temps réel (qRT-PCR)	84
Figure 40 : Etapes d'une qPCR en temps réel (qRT-PCR)	88
Figure 41 : Sollicitations mécaniques usuelles.....	97
Figure 42 : Systèmes de compression.....	98
Figure 43 : Système de bipoinçonnement	99
Figure 44 : Définition des grandeurs géométriques relatives au test de bipoinçonnement.....	100
Figure 45 : Influence du procédé de fabrication des hydrogels sur la répartition des cellules.....	106
Figure 46 : Influence du mode de construction des hydrogels sur la répartition de l'actine dans les cellules.....	106
Figure 47 : Evolution de la proportion de chondrocytes vivants.....	107
Figure 48 : Evolution de la production de nitrite par des chondrocytes de rat ensemencés dans un hydrogel d'alginate	108
Figure 49 : Influence du procédé de fabrication des hydrogels sur la production des collagènes et des GAG.....	109
Figure 50 : Influence du procédé de fabrication des hydrogels sur la synthèse des collagènes de type I et II	110
Figure 51 : Influence du procédé de fabrication des hydrogels sur leur comportement mécanique	111
Figure 52 : Influence de la vitesse de déformation sur la réponse des hydrogels pour différents niveaux de déplacement (écrasement)	112
Figure 53 : Répartition des cellules dans un hydrogel d'Alg/HA.....	116
Figure 54 : Evolution de la viabilité des CSM après leur pulvérisation.....	117
Figure 55 : Evolution de l'activité métabolique des CSM après leur pulvérisation	117
Figure 56 : Expression des marqueurs CD34 (A), CD45 (B) et HLA-DR (C) à la surface des CSM.....	118
Figure 57 : Evolution du phénotype de CSM ensemencées dans un hydrogel d'Alg/HA	119

Figure 58 : Evolution de l'expression génique de facteur de transcription.....	120
Figure 59 : Evolution de l'expression génique de composants de la matrice extracellulaire	120
Figure 60 : Migration des CSM entre 2 couches d'Alg/HA.....	121
Figure 61 : Evolution de la synthèse de matrice extracellulaire par des CSM ensemencées dans un hydrogel d'Alg/HA stratifié	122
Figure 62 : Evolution de la synthèse des collagènes de types I et II.....	123
Figure 63 : Influence de la composition des hydrogels et de la stratification sur leur comportement mécanique.....	124
Figure 64 : Influence de la composition du biomatériau sur la viabilité des CSM.....	131
Figure 65 : Influence du biomatériau sur l'expression génique de facteur de transcription	133
Figure 66 : Influence du biomatériau sur l'expression génique de protéines de la MEC.....	133
Figure 67 : Influence du biomatériau sur la synthèse des collagènes et de GAG par les CSM	134
Figure 68 : Influence du biomatériau sur la synthèse des collagènes de types I, II et X.....	135
Figure 69 : Influence de la contrainte mécanique sur l'expression des marqueurs CD73 (A) et CD166 (B)	136
Figure 70 : Evolution de la viabilité sur les CSM soumises à des stimulations mécaniques.....	137
Figure 71 : Influence de la stimulation mécanique des CSM sur l'expression génique de facteurs de transcription.....	138
Figure 72 : Influence des stimulations mécaniques sur l'expression génique de MMP13.....	138
Figure 73 : Influence des stimulations mécaniques sur l'expression génique de composants de la MEC	139
Figure 74 : Influence des stimulations mécaniques sur la synthèse des collagènes et des GAG	140
Figure 75 : Influence des stimulations mécaniques sur la synthèse des collagènes de type I, II et X	141
Figure 76 : Hydrogel d'Alg/HA tristratifié construit par pulvérisation.....	150
Figure 77 : Influence de la présence des cellules, de la culture <i>in vitro</i> et de la stimulation mécanique des biomatériaux sur leur résistance mécanique à la déformation	152
Figure 78 : Influence de l'âge sur la synthèse de collagène.....	153

Liste des tableaux

Tableau I : Récapitulatif des méthodes utilisées pour chaque étape de l'étude	57
Tableau II : Construction d'une courbe étalon d'ADN	79
Tableau III : Anticorps utilisés pour le phénotypage des CSM.....	83
Tableau IV : Liste des amorces "forward" et "reverse" utilisées pour la qRT-PCR	86
Tableau V : Anticorps pour l'immunomarquage indirect des protéines collagéniques	91
Tableau VI : Protocoles de coloration d'histologie	95
Tableau VII : Bilan des grandeurs permettant d'analyser des données acquises lors des tests de bipoinçonnement.....	101
Tableau VIII : Conditions expérimentales	102
Tableau IX : Phénotypes des CSM ensemencées dans un hydrogel stratifié composé d'Alg/HA ou d'Alg/Hap/Alg/HA	132

Introduction générale

Les pathologies chroniques telles que le diabète, l'arthrose ou les maladies cardiovasculaires touchent une grande partie de la population française et mondiale. Ces maladies sont dues au vieillissement des tissus, à des traumatismes ou à des anomalies génétiques. Actuellement, la majorité des traitements permettent aux patients de vivre avec la pathologie et non d'en guérir. La médecine régénérative (thérapie cellulaire ou ingénierie tissulaire) consiste à utiliser des cellules humaines afin de réparer ou d'améliorer les fonctions des organes endommagés. Le présent travail s'inscrit dans cette thématique et plus spécifiquement dans l'ingénierie du cartilage dont l'objectif est de créer un biomatériau capable de combler des lésions cartilagineuses superficielles et profondes, pour restaurer l'intégrité du tissu.

Le cartilage articulaire est situé au niveau des articulations diarthrosiques. Ce tissu est composé d'un type cellulaire, le chondrocyte, et d'une matrice extracellulaire richement hydratée et contenant essentiellement des collagènes et des protéoglycannes. Ces composants sont organisés de manière stratifiée dans l'épaisseur du tissu afin de résister aux différentes contraintes mécaniques que subit le cartilage. En effet, la partie supérieure du tissu, en contact avec le liquide synovial, est soumise à de fortes forces de frottement. Les cellules y sont orientées parallèlement compte tenu des directions des contraintes, et la matrice est constituée essentiellement de collagènes orientés horizontalement par rapport à la surface cartilagineuse. Dans les zones plus profondes, au contact de l'os sous-chondral, le tissu est essentiellement soumis à des pressions hydrostatiques. La matrice extracellulaire est alors constituée en majorité de protéoglycannes, et les chondrocytes y ont une morphologie quasi-sphérique.

Le cartilage articulaire est un tissu à la fois résistant et fragile. En effet, en compression, le tissu résiste à de fortes contraintes mécaniques qui peuvent aller jusqu'à 20 MPa. Cependant, après une lésion, son avascularisation et sa non-innervation induisent une régénération spontanée peu satisfaisante au niveau des propriétés mécaniques. Lorsque l'homéostasie du tissu est rompue, au profit du catabolisme, le tissu devient pathologique, comme dans le cas de l'arthrose. Cette maladie articulaire est la plus fréquente et la plus répandue des arthropathies dégénératives chroniques. Il s'agit d'une pathologie multifactorielle, qui se présente comme la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent non seulement l'homéostasie du tissu cartilagineux mais aussi, *in fine*, l'ensemble des structures articulaires (synoviale, os sous-chondral, ...). Actuellement, les traitements permettent essentiellement de répondre aux différents symptômes de la maladie sans restaurer définitivement l'intégrité physique et fonctionnelle du

tissu cartilagineux. Le développement de nouvelles thérapeutiques devient alors un enjeu de santé public. L'ingénierie du cartilage s'inscrit dans cette perspective. Elle a pour but de créer des tissus *de novo* à partir de cellules autologues ou de cellules souches pour pallier le manque de disponibilité de la source native et la dédifférenciation des chondrocytes au cours de leur amplification *in vitro*. Les cellules sont, le plus souvent,ensemencées dans un biomatériau biodégradable, biocompatible, poreux et résistant. Ce milieu confère aux cellules un environnement tridimensionnel similaire à celui des cellules natives *in vivo*, ce qui induit une redifférenciation des chondrocytes ou favorise la chondrogenèse de cellules souches. Actuellement, la majorité des études mentionnées, dans la littérature, concerne des structures homogènes en termes de type cellulaire et de biomatériau, ce qui conduit à une synthèse matricielle homogène dans toute l'épaisseur.

L'objectif de ce travail est de réaliser un matériau composite à visée articulaire en adaptant une méthode développée pour construire des films de polyélectrolytes, qui repose sur la pulvérisation, à l'aide d'un stylet aérographe, de gels liquides à base d'alginate de sodium enrichis ou non en cellules. Ce matériau permettra de créer une structure multicouches pouvant mimer l'organisation stratifiée du cartilage articulaire tant au niveau cellulaire que matricielle.

La première partie du travail consistera à valider le concept et la faisabilité d'adapter le procédé de pulvérisation à l'ingénierie du cartilage. Actuellement, ce procédé permet de construire des hydrogels dont l'épaisseur est de quelques centaines de micromètres. Or, pour combler des lésions cartilagineuses profondes ou ostéochondrales, il est nécessaire de construire des structures d'environ 2 mm d'épaisseur. La validation du concept sera réalisée sur des matériaux à une couche, enrichis en chondrocytes de rat. L'influence du procédé de pulvérisation sera analysée sur le comportement général des cellules, d'une part, et sur les propriétés mécaniques du biomatériau obtenu, d'autre part. Afin de garantir une certaine homogénéité dans les résultats biologiques, des chondrocytes de rat seront utilisés dans cette première partie. Les chondrocytes, cellules natives du cartilage, seront inclus dans un gel d'alginate qui sera ensuite soit pulvérisé, soit inclus dans un moule. Cette technique par moulage, largement utilisée en ingénierie tissulaire, nous servira de contrôle.

Dans la seconde partie du travail, la technique de pulvérisation sera étendue à des hydrogels d'alginate enrichis en composant naturel de la matrice cartilagineuse : l'acide hyaluronique. La construction d'un support stratifié ensemencé en cellules souches mésenchymateuses humaines

sera explorée. Ainsi, des hydrogels à une couche puis à deux couches seront fabriqués et cultivés *in vitro* pendant 56 jours de culture. Chaque couche d'hydrogel qui composera le biomatériau sera séparée de multicouches de polyélectrolytes (poly-L-lysine / Hyaluronate ; PLL/HA). Le potentiel de différenciation des CSM dans la voie chondrocytaire sera suivi tout au long de la culture ainsi que la synthèse matricielle.

Enfin, la dernière étape du travail aura pour objectif de fonctionnaliser le biomatériau stratifié contenant toujours des cellules souches mésenchymateuses humaines. Les hydrogels seront construits avec des gels d'alginate enrichis en composants naturels de la matrice cartilagineuse ou osseuse. Les composants matriciels retenus seront : (i) l'acide hyaluronique dans la couche supérieure du biomatériau pour mimer la couche superficielle du cartilage; (ii) l'hydroxyapatite (composant naturel de l'os) dans la couche inférieure du biomatériau pour mimer la couche profonde du cartilage. L'hypothèse émise est que lorsque ces composants seront inclus dans l'alginate avec les cellules, ils pourront guider la différenciation cellulaire vers un phénotype chondrocytaire capable de synthétiser une matrice extracellulaire similaire à la couche superficielle du cartilage, ou vers un phénotype ostéoblastique pour obtenir une matrice similaire à celle de l'os. Chaque biomatériau sera séparé par des films multicouches de polyélectrolytes. Le potentiel de différenciation sera ainsi étudié en présence ou non de stimulations mécaniques cycliques et intermittentes à l'image de ce qui est observé, *in vivo*, au niveau du cartilage.

Les principaux paramètres biologiques étudiés dans les différentes parties de notre travail seront la viabilité, le métabolisme et le phénotype cellulaire, la synthèse matricielle, ainsi que la répartition et la migration des cellules. En parallèle, les propriétés mécaniques des hydrogels obtenus seront explorées.

Cette étude permettra non seulement d'explorer la biocompatibilité de la pulvérisation de cellules vivantes et la différenciation de cellules souches dans ce contexte, mais aussi et surtout de proposer un nouveau procédé de fabrication de structures stratifiées mimant au plus près le cartilage articulaire.

CHAPITRE I : Etat de l'art

I. Le cartilage articulaire

A. Le tissu

1. Les différents types de cartilage

Le cartilage est un tissu composé d'un seul type cellulaire, le chondrocyte, et d'une matrice extracellulaire qui diffère en fonction de sa situation anatomique et de son rôle. Les points communs aux différents types de cartilage sont l'avascolarisation, la non-innervation, et l'échange par diffusion des nutriments et des déchets métaboliques, avec l'environnement. Les différents types de cartilage sont répartis dans tout le corps humain (Coujard *et al.* 1980; Stevens *et al.* 1997; Wheater *et al.* 2004), (figure 1) :

- Le **cartilage hyalin** est un tissu situé à l'extrémité d'os longs, au niveau des articulations mobiles comme le genou. Il est composé essentiellement de collagène de type II et d'une forte proportion de protéoglycannes (PG). La nutrition de ce tissu se fait par diffusion du liquide synovial présent dans la cavité articulaire. Enfin, il permet non seulement le glissement de deux pièces osseuses l'une sur l'autre mais aussi l'absorption de la majorité des contraintes mécaniques régnant dans l'articulation.

- Le **cartilage fibreux** est présent sur les os au niveau de l'insertion des tendons, des jonctions osseuses du petit bassin, et dans les disques intervertébraux. Ce type de cartilage est composé de collagène de type II, mais aussi de type I. Il est entouré d'un périchondre, vascularisé et composé de fibroblastes, qui permet la nutrition du tissu. Les chondrocytes y sont petits et inactifs. Le rôle de ce cartilage est essentiellement d'assurer une fonction de soutien.

- Le **cartilage élastique** est présent au niveau du pavillon de l'oreille et du nez. Il contient du collagène de type II, mais surtout de nombreux faisceaux élastiques anastomosés, et de nombreuses cellules. A l'instar du cartilage fibreux, il est entouré d'un périchondre dont le rôle est aussi d'apporter les nutriments et d'évacuer les déchets par diffusion. Enfin, ce tissu forme des structures dont les fonctions sont d'être rigides et élastiques.

Par la suite, nous nous intéresserons uniquement au cartilage hyalin articulaire.

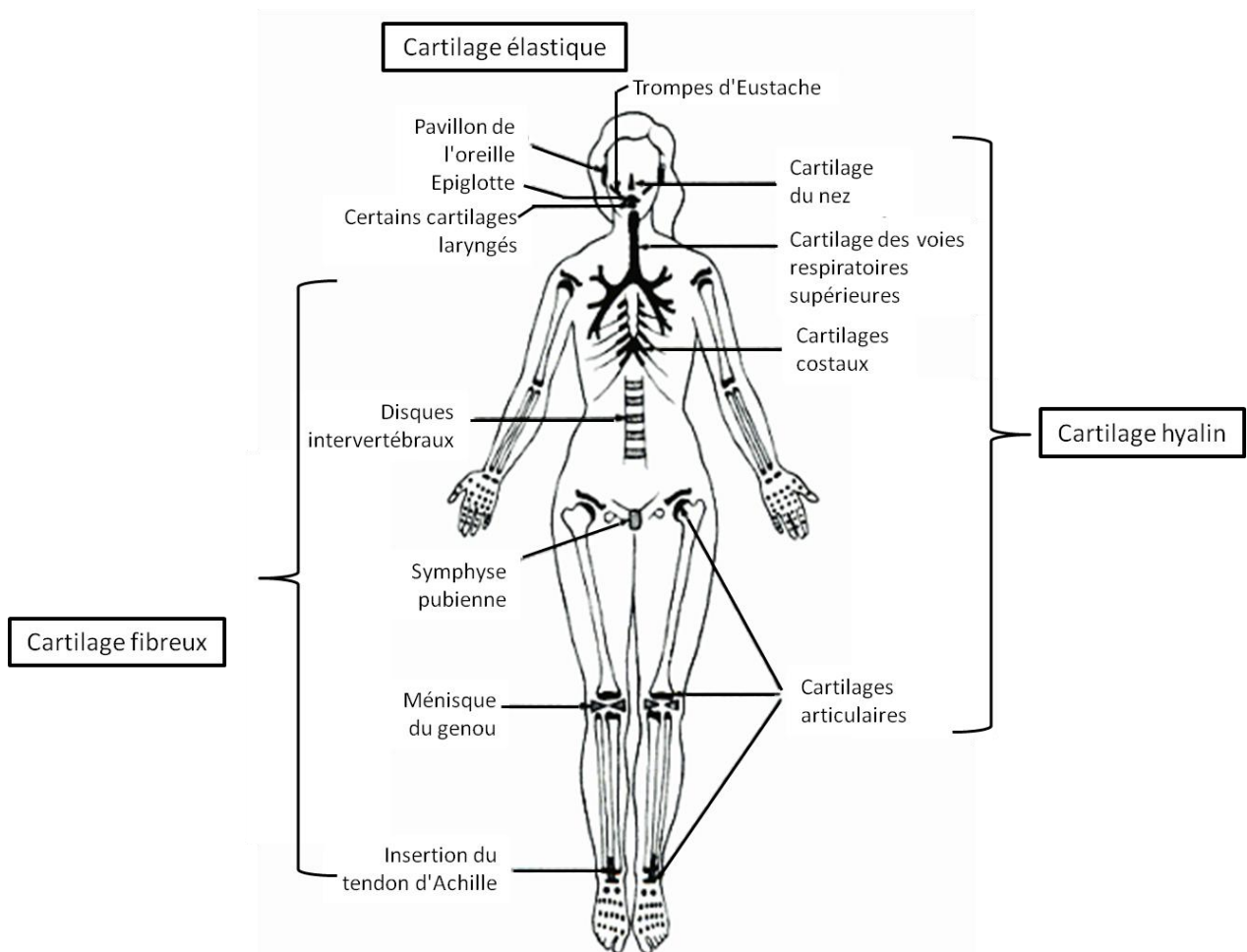


Figure 1 : Répartition des différents types de cartilages dans le corps humain

Le corps est composé de différents types de cartilage - hyalin, fibreux et élastique - dont les rôles et structures sont différents en fonction de leur position anatomique. (Coujard et al. 1980)

Lors de l'embryogénèse, le cartilage hyalin forme l'ébauche des os de l'embryon. Puis, après la naissance, il persiste au niveau des plaques de croissance et à l'extrémité des os longs (Quintana et al. 2009). A l'âge adulte, le cartilage hyalin articulaire recouvre la partie osseuse se trouvant dans la cavité articulaire d'articulation diarthrosique comme le genou (figure 2). Le tissu y est en contact avec le liquide synovial sécrété par la membrane synoviale qui entoure l'articulation. Le liquide synovial assure deux fonctions : il lubrifie l'articulation pour améliorer le glissement des cartilages opposés l'un à l'autre, mais surtout il permet des échanges par diffusion avec le liquide extracellulaire du tissu. Ainsi, les cellules natives du cartilage (chondrocytes) sont alimentées en oxygène et en nutriments, et leurs déchets métaboliques sont évacués à partir de la couche superficielle du tissu.

L'articulation est stabilisée grâce à la présence des ligaments qui relient les différentes pièces osseuses entre elles, et des tendons qui permettent la transmission des mouvements des muscles vers les os.

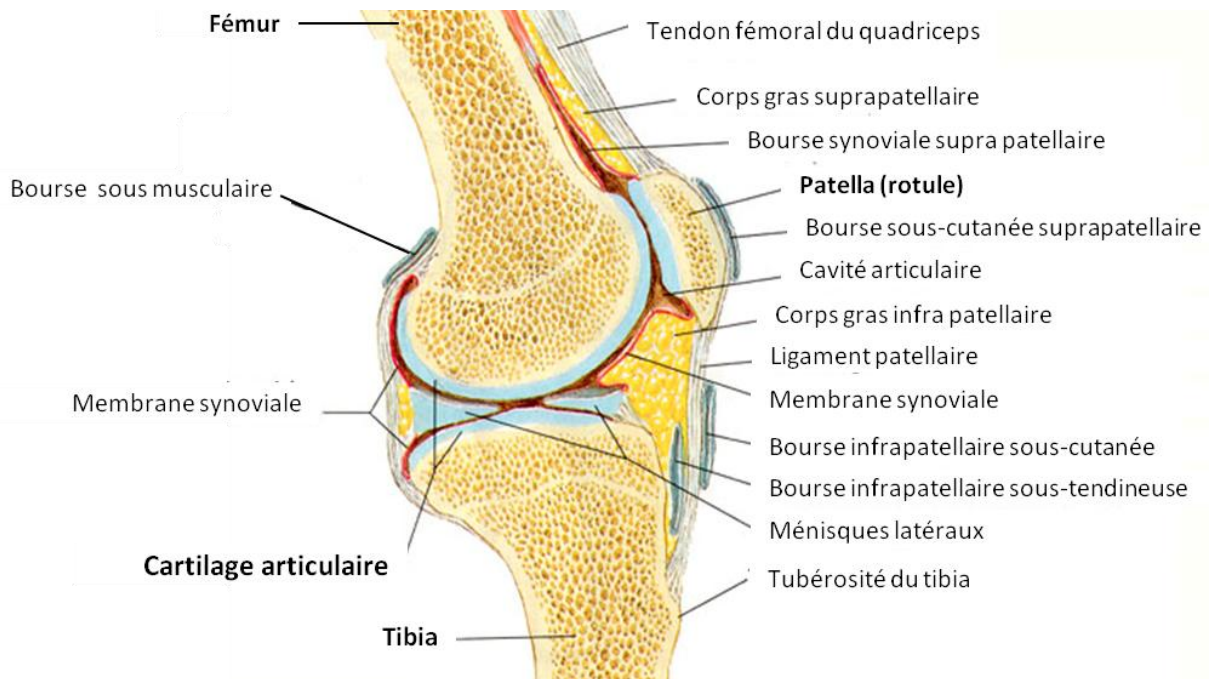


Figure 2 : Coupe transversale d'un genou

L'articulation du genou est entourée d'une membrane synoviale qui entoure les cartilages articulaires situés sur les extrémités du tibia et du fémur. Le tendon fémoral termine la course du muscle quadriceps sur la patella et se poursuit par le ligament patellaire sur la tubérosité du tibia. L'articulation est composée aussi d'un tissu graisseux, de bourses séreuses, et des ménisques qui sont situés entre les cartilages. (D'après <http://www.arthrosedugenou.com>)

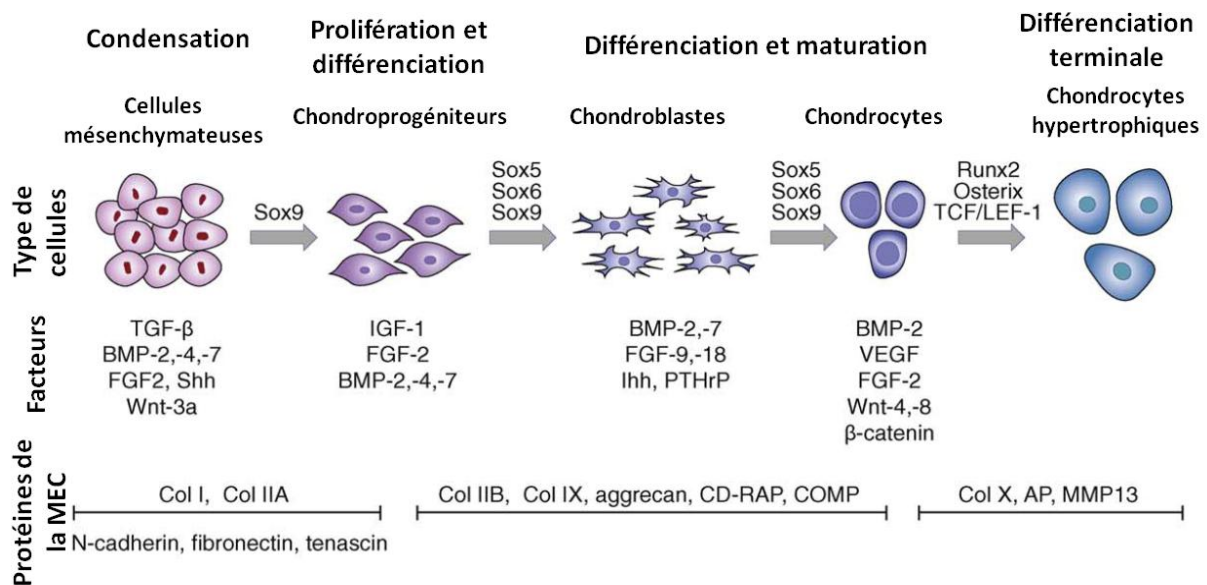
2. La chondrogenèse

Le cartilage articulaire est issu du feuillet mésodermique de l'embryon (DeLise *et al.* 2000; Quintana *et al.* 2009). La chondrogenèse débute par la condensation de cellules mésenchymateuses grâce à des facteurs paracrines tels que le FGF (Fibroblast Growth Factor), (figure 3). A ce stade, les cellules synthétisent du collagène de type I, de la fibronectine et des protéoglycannes. Par la suite, les cellules mésenchymateuses deviennent des chondroblastes, puis des chondrocytes. Le facteur de transcription Sox9 tient un rôle important dans le développement de ce tissu, il stimule l'expression des collagènes de type II, IX et XI qui sont spécifiques du cartilage hyalin. Dès l'expression de Sox9, les cellules permutent leur production de collagène de type I pour le collagène de type II. Par la suite, les chondrocytes se multiplient rapidement et synthétisent de la matrice extracellulaire (MEC) spécifique du cartilage. Dans les zones destinées à devenir de l'os, les cellules cessent de proliférer, leur taille augmente et elles synthétisent du collagène de type X et de la fibronectine, ce sont des chondrocytes hypertrophiques. Le facteur de transcription Runx2 contribue à initier la minéralisation du tissu avec le dépôt de cristaux de calcium, comme l'hydroxyapatite. En parallèle, des métalloprotéinases (MMP) sont sécrétées pour modifier la composition de la fraction collagénique du tissu comme MMP13 qui dégrade

spécifiquement le collagène de type II. Puis, les chondrocytes hypertrophiques entrent en apoptose. Ainsi, l'espace est libre pour la formation de vaisseaux sanguins qui apportent des progéniteurs ostéoblastiques. Ces derniers vont se différencier en ostéoblastes et synthétiseront une MEC spécifique à l'os dont le collagène de type I.

Ce processus fait partie de l'ossification endochondrale qui est différente de l'ossification directe obtenue pour certains os plats.

Cependant, pour la formation du cartilage articulaire, les chondrocytes s'arrêtent à ce stade de maturité dans le processus de différenciation. Seuls quelques chondrocytes hypertrophiques persistent au niveau de la jonction entre le cartilage articulaire et l'os sous-chondral.



TRENDS in Biotechnology

Figure 3 : Différenciation terminale des cellules mésenchymateuses vers le chondrocyte

Après la condensation de cellules mésenchymateuses, des chondroprogéniteurs se différencient en chondroblastes, puis en chondrocytes qui vont synthétiser une MEC spécifique à chaque étape (collagène, aggrecan), sous l'influence de facteurs de croissance (FGF, BMP,...). Différents facteurs de transcriptions de la famille Sox et d'autres sont impliqués à chaque étape. Puis, les chondrocytes deviennent hypertrophiques et meurent par apoptose pour laisser la place aux vaisseaux sanguins qui vont apporter des progéniteurs ostéoblastiques pour former de l'os. (Vinatier et al. 2009)

3. Organisation du cartilage articulaire

Le tissu cartilagineux est constitué principalement d'eau (70 à 75%), de collagènes (20%), de chondrocytes (10%), de protéoglycannes (5 à 7%), et d'électrolytes. L'organisation de ces différents éléments matriciels varie en fonction de l'épaisseur du tissu (Poole et al. 2001; An et al. 2003; Meyer et al. 2006), et permet de résister spécifiquement aux différentes contraintes mécaniques subies par l'articulation (cf. I-A-2). Selon Wong et al., les stimulations mécaniques que subissent les chondrocytes du cartilage articulaire réguleraient l'histo-morphologie stratifiée du tissu (Wong et al. 2003). En effet, Hunziker et al. ont montré que l'organisation du cartilage

articulaire d'un lapin se forme au cours des premiers mois de vie de l'animal : après un mois, la couche superficielle était formée alors que les couches inférieures n'avaient pas encore leur organisation définitive ; puis, 3 mois après la naissance, le cartilage articulaire avait une organisation similaire à celle du cartilage adulte, mais les plaques de croissance persistaient ; enfin à 8 mois le squelette du lapin était mature et le cartilage articulaire avait une organisation stratifiée avec des chondrons alignés dans les couches moyennes et inférieures (Hunziker *et al.* 2007). Ainsi, 4 couches peuvent être distinguées, de la surface du cartilage articulaire jusqu'à l'os sous-chondral (An *et al.* 2003; Wong *et al.* 2003) :

- La couche superficielle (5 à 10% de l'épaisseur du cartilage) est en contact avec le liquide synovial. La matrice extracellulaire y est riche en fibres de collagène de type II qui sont tangentes à la surface articulaire et parallèles aux contraintes mécaniques. Les chondrocytes y sont denses, aplatis et orientés parallèlement au sens de frottement de l'articulation. La surface est fortement composée d'acide hyaluronique, ce qui permet de faciliter le glissement relatif des deux pièces osseuses.

- La couche moyenne ou transitionnelle (5 à 40% de l'épaisseur du cartilage) est composée de fibres de collagène de type II qui tendent à s'orienter perpendiculairement à la surface articulaire, et d'une proportion de PG qui augmente vers les couches profondes (figure 4). Les cellules y ont une forme quasi-sphérique et une activité de synthèse plus intense que dans la couche superficielle.

- La couche profonde ou radiale (40 à 90% de l'épaisseur du cartilage) est constituée de fibres de collagène et de cellules alignées perpendiculairement à la surface du cartilage. Les cellules y sont sphériques et montrent une activité anabolique plus importante que dans les deux couches supérieures. Les chondrocytes deviennent hypertrophiques et forment des chondrons (logettes regroupant 2 ou 3 chondrocytes).

- La couche calcifiée ou basale (2 à 3% de l'épaisseur du cartilage) se situe à la jonction du cartilage et de l'os sous-chondral et permet la solidarisation de ces deux tissus. Elle est composée de collagène de type X, mais sans PG. Les cellules y ont la même disposition que dans la couche profonde. De plus, cette zone est imperméable et empêche les échanges de fluides entre le cartilage et l'os.

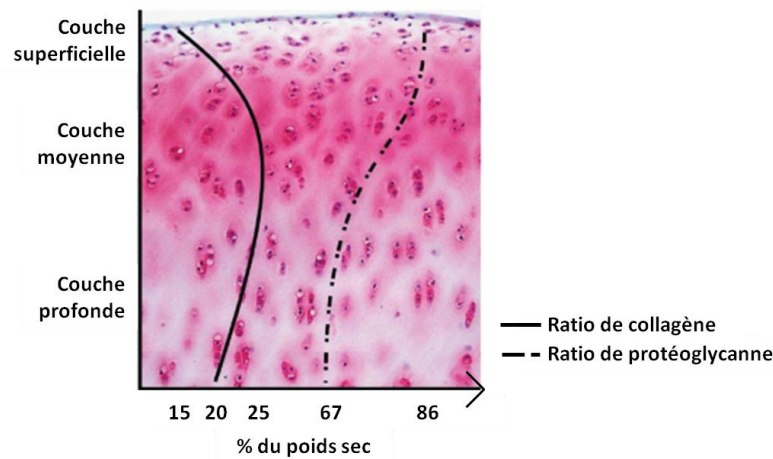


Figure 4 : Ratio de protéoglycannes et de collagènes dans le cartilage articulaire

L'évolution des ratios de protéoglycannes (trait plein) et de collagènes (trait en pointillé) est représentée sur une coupe histologique d'un explant de cartilage. Les proportions des composants de la matrice extracellulaire varient en fonction de la zone du tissu. (Hardingham et al. 2006)

4. Rôle du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire sert à absorber les contraintes mécaniques liées aux mouvements et au poids du corps. Sa surface facilite le glissement des deux pièces osseuses d'une articulation diarthrosique, et sa composition stratifiée permet de résister spécifiquement aux contraintes mécaniques auxquelles il est soumis. Cependant, les fréquentes sollicitations que subit le cartilage en font un tissu fragile qui une fois altéré par une lésion ou une pathologie, ne retrouve jamais sa fonctionnalité initiale. L'avascularisation du cartilage permet de produire seulement un tissu fibro-cartilagineux, dont les propriétés mécaniques sont faibles par rapport à celles du tissu natif.

B. Les composants

1. Les chondrocytes

Les chondrocytes représentent environ 10% de la masse totale du tissu et sont l'unique type cellulaire du cartilage. Compte tenu du mode d'oxygénation et de nutrition du tissu, le métabolisme énergétique des cellules est lié à la glycolyse anaérobie (Seibel et al. 2006).

Le rôle principal des chondrocytes est d'assurer l'homéostasie du tissu, c'est-à-dire de réguler l'équilibre entre le catabolisme et l'anabolisme de la MEC (Goldring et al. 2009). Ils assurent donc le maintien structurel et fonctionnel du tissu. Cependant, ces cellules ne prolifèrent plus quand le tissu est mature, mais elles recommencent à se multiplier après une lésion tissulaire. Or, les chondrocytes ne sont plus capables de reformer un néotissu fonctionnel après l'embryogenèse. En se remultipliant, ils perdent leur phénotype et seul un tissu fibro-cartilagineux composé de collagène de type I est synthétisé (Brodin et al. 2004).

2. La matrice extracellulaire

a. Le collagène

Le collagène est une protéine située dans l'espace extracellulaire des tissus. Il est constitué de chaînes alpha (α) composées d'une répétition de trois acides aminés (Glycine-X-Y), qui s'assemblent en procollagène. Ce dernier est un trimère de forme hélicoïdale (Gelse *et al.* 2003). Les acides aminés en position X et Y sont souvent des prolines et des hydroxyprolines. Après la troncature des extrémités du procollagène, on obtient du tropocollagène qui s'assemble en fibrilles, puis en fibres (figure 5). La fonction de cette famille de protéine est de résister aux tractions et de maintenir la forme des tissus.

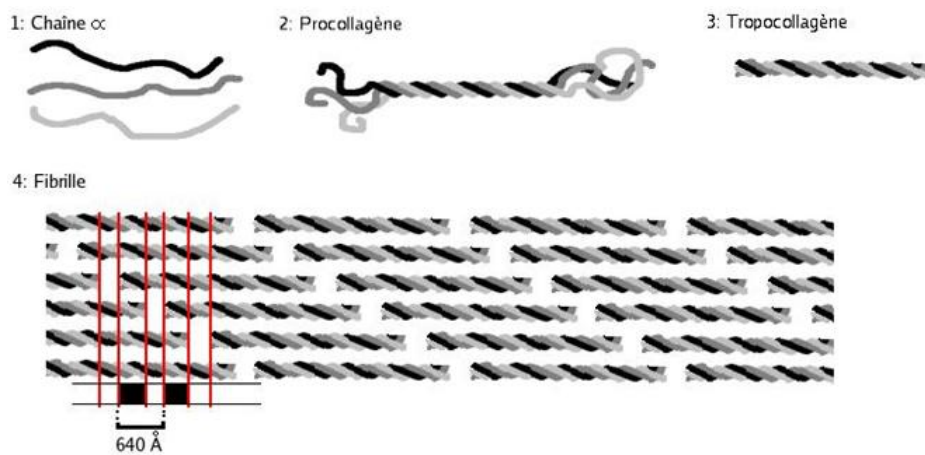


Figure 5 : Assemblage des chaînes α de collagène en fibrilles

Le collagène est formé à partir de trois chaînes α qui s'assemblent en triples hélices de procollagène. Puis, les extrémités du procollagène sont coupées pour former du tropocollagène qui s'assemblera en fibrille, avec une répétition du motif tous les 64 nm. (D'après <http://commons.wikimedia.org>)

- Les collagènes spécifiques du cartilage (Gelse *et al.* 2003; Seibel *et al.* 2006)

- Type II : Il représente 80% du collagène présent dans ce tissu. Ses chaînes polypeptidiques contiennent beaucoup d'hydroxylysine et de résidus glucosyl et galactosyl qui permettent des interactions avec les PG. Il est formé d'homotrimères qui s'assemblent en fibrilles pour donner au cartilage sa capacité de résistance aux frottements et permet de confiner les glycoaminoglycannes (GAG) et PG dans le tissu. Deux isoformes existent : le collagène de type IIA qui est synthétisé par les chondroprogéniteurs, et le collagène de type IIB qui est synthétisé par les chondrocytes matures (Vinatier *et al.* 2009).

- Type IX : Il est distribué le long des fibrilles de collagène de type II. Ce type de collagène est un hétérotrimère qui forme une triple hélice flanquée de quatre domaines globulaires. Une molécule de chondroïtine sulfate peut être liée de manière covalente à un domaine globulaire de la protéine et favorise l'interaction avec d'autres fibres de collagène.

○ **Type X** : il est composé d'un homotrimère à chaîne courte et est présent dans le cartilage hypertrophique, c'est à dire dans les plaques de croissances foétales et les os long, ainsi que dans la zone profonde du cartilage articulaire. Il peut être présent dans d'autres tissus, mais aussi dans des conditions pathologiques.

○ **Type XI** : ce collagène est un hétérotrimère dont une chaîne est codée par le même gène que les chaînes α du collagène de type II. Cependant, les protéines diffèrent de par leur glycosylation et hydroxylation. Ce collagène entre dans la formation des fibrilles avec le collagène de type II (figure 6).

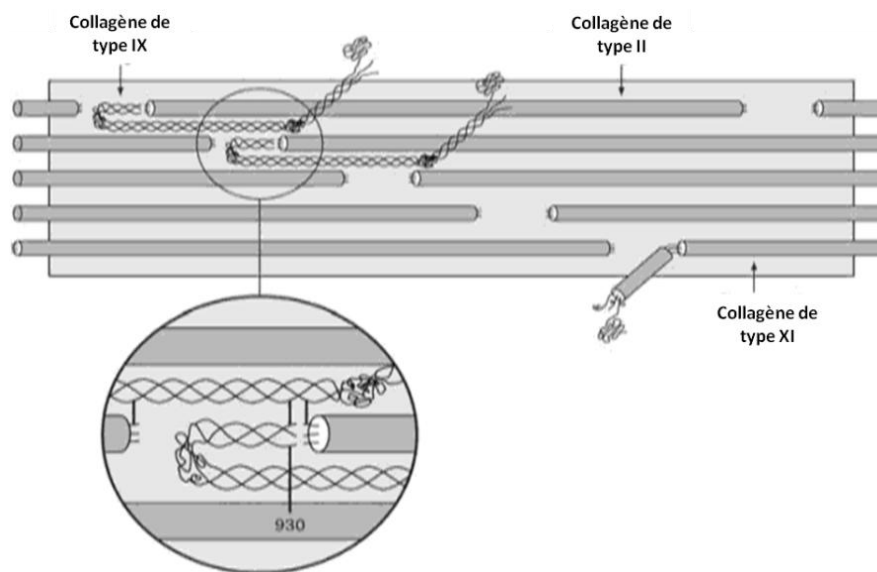


Figure 6 : Assemblage des fibres de collagènes de type II, IX et XI

Dans le cartilage, les types II, IX et XI de collagène s'assemblent pour former des hétérofibrilles grâce notamment à des liaisons entre les domaines globulaires du collagène de type IX et le collagène de type II. (Seibel et al. 2006)

- **Les collagènes non spécifiques du cartilage mature** (Gelse et al. 2003)

○ **Type I** : il est présent dans de nombreux tissus et représente plus de 90% du collagène total du corps humain. Il est formé d'un hétérotrimère et est souvent colocalisé avec les collagènes de type III et V. Il procure aux tissus, comme l'os, une grande résistance aux tractions.

○ **Type III** : il appartient aux composants des MEC de tissu élastique. Ce collagène est un homotrimère formant des fibres réticulées souvent en présence de collagène de type I. Il fait partie des collagènes majoritaires dans l'os, mais minoritaires dans le cartilage. Il apparaît surtout après une lésion de ce tissu (Eyre 2002).

b. Les protéoglycannes et les glycoaminoglycannes

Les protéoglycannes sont composés d'une protéine core formant un axe central où se fixent des glycoaminoglycannes. Les GAG sont composés d'unités disaccharidiques qui s'enchainent. Les principaux PG du cartilage sont l'aggrécanne et le versican.

L'aggrécanne est le protéoglycanne le plus abondant dans le tissu cartilagineux articulaire. Il est composé d'une protéine core d'environ 250 kDa qui est codée par un gène unique. La protéine core est composée de 3 domaines globulaires (G1, G2, G3) et de deux domaines d'attachement pour les GAG sur lesquels se fixent environ 100 chaînes de chondroïtine sulfate et 60 chaînes de kératane sulfate (Kiani *et al.* 2002; Lodish *et al.* 2005; Seibel *et al.* 2006), (figure 7). Le premier GAG est composé d'une répétition d'acide D-glucuronique $\beta(1-3)$ D-N-Acétylgalactosamine lié avec une liaison $\beta(1-4)$. Le second est composé d'une répétition de D-galactose $\beta(1-4)$ D-N-Acétylglucosamine lié avec une liaison $\beta(1-3)$ (Pollard *et al.* 2004). Ces GAG contiennent des groupements sulfates et carboxyles sur les cycles des sucres ce qui rend la molécule chargée négativement. Ainsi, des cations y sont attirés, ce qui permet de retenir l'eau dans le tissu. De plus, la protéine core peut être reliée à une molécule d'acide hyaluronique via le domaine G1 (figure 7).

L'acide hyaluronique (HA, hyaluronic acid) est un GAG linéaire, non sulfaté dont l'unité disaccharide de base est un D-N-acétylglucosamine $\beta(1-4)$ D-glucuronate dont la liaison entre unité est $\beta(1-3)$ (Seibel *et al.* 2006). L'acide hyaluronique représente 10% des GAG du cartilage adulte. La HAS-2 (Hyaluronic Acid Synthetase 2) est la synthétase la plus active au sein du cartilage. Ses principales fonctions sont de permettre le branchement des protéines core des aggrécannes sur les chaînes d'HA dont la liaison est stabilisée par une protéine de liaison (figure 7), et de lier ces amas à la cellule en se fixant à un récepteur membranaire CD44 (Cluster de Différenciation). Au final, cet amas de protéines et de GAG forment un ensemble qui peut avoir un volume supérieur à celui d'une bactérie (Lodish *et al.* 2005). Les charges négatives de l'ensemble attirent des cations, puis l'eau va s'y fixer. Ainsi, ces complexes de glycoprotéines confèrent au cartilage sa grande capacité de rétention d'eau et sa résistance aux compressions mécaniques.

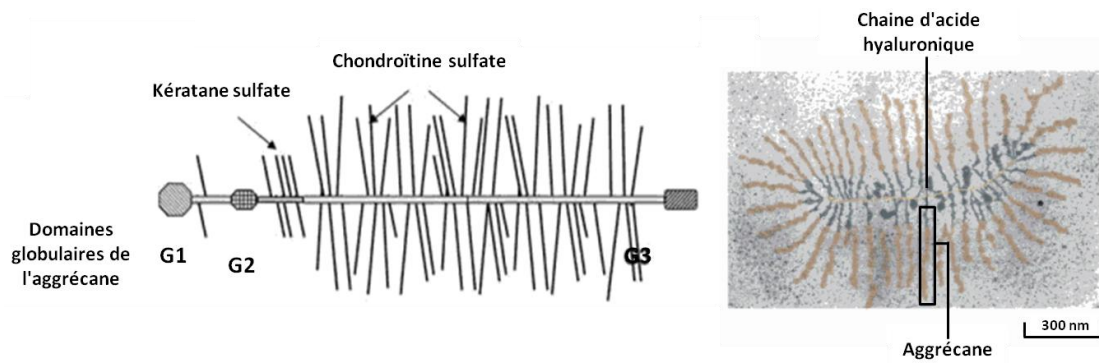


Figure 7 : Composition et interaction de l'aggrécane

L'aggrécane est composé d'une protéine core qui est constituée de 3 domaines globulaires (G1, G2 et G3) entre lesquels s'attachent des chondroïtines sulfate et des kératanes sulfate (GAG). Cette molécule est très hydrophile et de grande taille. Les protéines cores peuvent se fixer à une chaîne d'HA et former une ensemble dont le volume peut être celui d'une bactérie. (Lodish et al. 2005; Seibel et al. 2006)

Le **versican** est composé d'une protéine core d'environ 360 kDa à 2 domaines globulaires similaires à ceux de l'aggrécane (G1 et G3), (figure 8). Les GAG présents sont des chondroïtines sulfate (12 à 15 chaînes) et des chaînes O- et N-oligosaccharidique (Pollard et al. 2004; Marcus et al. 2008). De même que l'aggrécane, la composition en GAG du versican confère au cartilage articulaire sa grande capacité de rétention d'eau. D'autre part, le versican a également la capacité de se fixer via le domaine G1 à une chaîne d'acide hyaluronique. Selon Shi et al., cette liaison est stabilisée par une protéine de liaison dont l'affinité est plus forte avec le versican qu'avec l'aggrécane (Shi et al. 2004). Cette liaison permettrait de faire le lien entre la MEC et le chondrocyte grâce à la liaison entre l'HA et son récepteur membranaire CD44. Le versican est aussi impliqué dans l'ostéogenèse (Marcus et al. 2008).

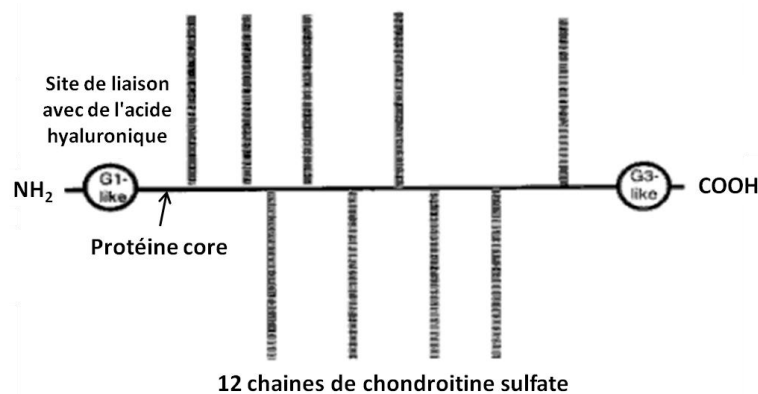


Figure 8 : Composition d'une molécule de versican

Une molécule de versican est composée d'une protéine core et de 12 à 15 chaînes de chondroïtine sulfate qui se fixent entre les deux domaines globulaires G1 et G3-like. D'autre part, le domaine G1-like permet au versican d'être lié à une chaîne d'acide hyaluronique. (Marcus et al. 2008)

La **décorine** est un PG composé d'une protéine core sur laquelle se fixe une seule chaîne de chondroïtine sulfate ou de dermatane sulfate. Elle permet de lier des chaînes de collagène entres elles.

D'autres PG, comme le biglycane, l'épiphycane, la fibromoduline et le lumican, participent à la formation de la matrice extracellulaire du cartilage (An *et al.* 2003; Seibel *et al.* 2006). L'ensemble de ces PG permettent au cartilage d'être très hydratés de par leur composition en GAG, ce qui conduit ce tissu à résister aux compressions.

c. Les autres composants

Les protéines non collagéniques et les glycoprotéines sont présentes en moins grande quantité dans le tissu cartilagineux articulaire.

La **COMP** (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) est une protéine de la matrice extracellulaire du cartilage qui stabilise le réseau collagénique et promeut l'assemblage des fibrilles de collagènes. D'autres protéines, comme la protéine de liaison, ont un rôle important pour stabiliser les liaisons entre les chaînes d'HA et d'aggrécanne.

Dans le cartilage articulaire, des glycoprotéines comme la fibronectine, la vitronectine, la chondroadhérine, la prolargine, la thrombospondine sont présentes (Meyer *et al.* 2006).

3. Propriétés mécaniques du cartilage

La couche superficielle du cartilage est en contact direct avec le liquide synovial et le cartilage opposé de l'articulation (Wong *et al.* 2003), (figure 9). Lors des mouvements des membres, cette couche subit de fortes forces de frottement, des mouvements de liquide interstitiel et des compressions qui induisent une grande déformation de la couche et la sortie du liquide interstitiel vers la cavité articulaire, ce qui rend imperméable les couches inférieures. Cette couche est la plus déformée du tissu. Dans les couches plus inférieures, les forces de frottement sont nulles et la compression tend à devenir absente. Dans la couche moyenne, l'imperméabilisation de la couche superficielle et la forte contenance en eau du tissu y provoquent une forte pression hydrostatique. En s'éloignant de la surface articulaire, la pression hydrostatique diminue progressivement puis devient faible près de l'os sous-chondral. Les propriétés mécaniques du tissu sont non linéaires et anisotropiques dues à sa composition variable dans l'épaisseur du tissu. Elles sont directement liées à la composition de la matrice extracellulaire mais aussi aux électrolytes présents dans le liquide interstitiel. En effet, comme l'ont montré Jin *et al.*, les interactions électrostatiques entre les GAG et les ions sont fortement impliquées dans l'élasticité du cartilage (Jin *et al.* 2001).

Les contraintes subies par le cartilage sont considérables. En effet, Mündermann *et al.* ont montré qu'une prothèse de genou subit systématiquement des forces deux fois supérieures à

celles du poids du corps lors d'activités quotidiennes, et qu'il existe une relation entre la contrainte subie et l'angle de flexion de l'articulation (Mündermann *et al.* 2008). Au cours d'activités physiques intenses, les forces seraient beaucoup plus importantes et pourraient atteindre 20 MPa. Malgré ces fortes contraintes, il est reconnu que les déformations du cartilage articulaire du genou n'excèdent pas 10-15% de l'épaisseur totale du tissu, même après 6 heures de station debout (Hosseini *et al.*). De même, Eckstein *et al.* ont montré une déformation du cartilage patellaire de seulement de $-2,8 \pm 0,8\%$ après une marche de 5 minutes, de $-5 \pm 1,3\%$ après une course de 200 mètres, et de $-7,2 \pm 4,2\%$ sur la partie latérale du tibia après un saut de 40 cm de haut (Eckstein *et al.* 2005). D'autre part, pour ces types d'exercices, ils ont démontré que les différences entre sportifs et non sportifs étaient faibles.

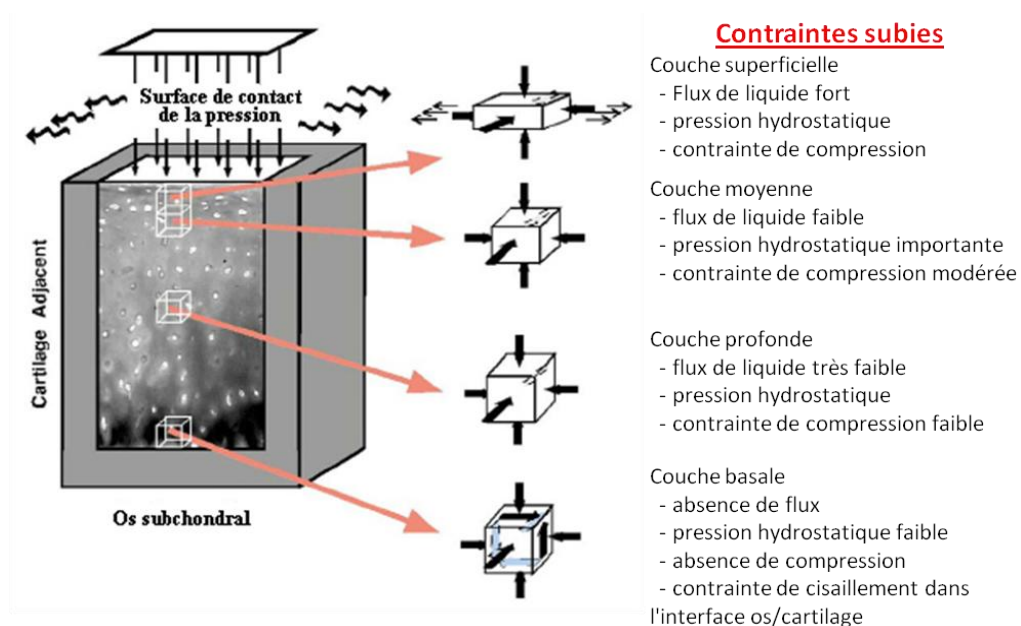


Figure 9 : Organisation zonale des contraintes subies par le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est organisé en 4 couches qui sont soumises chacune à des contraintes mécaniques différentes en fonction de leur position dans le tissu. Dans la couche supérieure, de fortes forces de frottement et de compression sont appliquées sur les cellules. Puis, vers les couches plus inférieures, la compression ainsi que la pression hydrostatique, qui est initialement forte dans la couche moyenne, diminuent. (Wong *et al.* 2003)

Dans les différentes couches du tissu, les contraintes mécaniques sont ressenties par les cellules et activent des voies de mécano-transduction qui induisent la synthèse d'une MEC adaptée pour résister spécifiquement aux différentes contraintes auxquelles elles sont soumises (Wong *et al.* 2003; Stoltz *et al.* 2006). En effet, la couche superficielle est composée en majorité de collagène qui permet de résister aux étirements ; et les couches moyennes et profondes contiennent plus de GAG qui retiennent l'eau et permettent ainsi de résister à la compression.

Cependant les fréquentes sollicitations, auxquelles est soumis le tissu, le rendent fragile et induisent un vieillissement du tissu ou des pathologies de type arthrose.

II. Pathologies et traitements

A. Arthrose

L'arthrose est une pathologie articulaire assimilée au vieillissement mais qui résulte d'un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation matricielle du cartilage suite à une succession de stimuli parvenant jusqu'aux chondrocytes (Goldring *et al.* 2009). Ces stimuli peuvent être des stress mécaniques répétitifs, des traumatismes provoqués par un accident, des stress oxydatifs, des interactions cellules-matrice, et un changement de réponses des cellules vis-à-vis des facteurs de croissance et du changement de la matrice pendant le vieillissement (Goldring *et al.* 2009). Dans les premières étapes de la pathologie, les chondrocytes réamorcent leur prolifération et augmentent leur activité métabolique. Cependant, une perte de PG et un clivage du collagène de type II sont observés (Roach *et al.* 2007). Les chondrocytes synthétisent également plus d'enzymes protéolytiques (MMP) qui vont dégrader la MEC. Progressivement, la pathologie atteint l'os sous-chondral, et la membrane synoviale souffre d'inflammation (figure 10). L'arthrose n'atteint pas symétriquement les articulations. Selon l'association de rhumatologie, la prévalence de l'arthrose est estimée à environ 17%, et le nombre de personnes qui en souffrent en France est évalué entre 9 et 10 millions. La présence d'arthrose est fortement corrélée à l'âge : 68% des arthroses apparaissent chez des patients de plus de 50 ans. Du fait du vieillissement de la population, il est probable que le nombre de personnes atteintes augmente dans les années à venir.

Certains facteurs auraient une influence sur la pathologie : les traumatismes articulaires, le vieillissement (ostéoporose, affaiblissement des muscles), la génétique et l'obésité (Arden *et al.* 2006; Louboutin *et al.* 2009). Les premiers symptômes sont essentiellement de la douleur et une raideur de l'articulation le matin qui induit une perte progressive de la mobilité. Selon Quatman *et al.*, il est possible à l'aide d'un IRM de rechercher des anomalies du tissu cartilagineux avec une bonne efficacité, sensibilité et spécificité. Cependant, l'hétérogénéité des séquences d'IRM ne permet pas d'appliquer cette méthode en clinique (Quatman *et al.* 2011).

Actuellement, les traitements préventifs et curatifs sont inexistantes, seules des recommandations d'hygiène de vie, des traitements symptomatiques et le remplacement de l'articulation sont proposés pour améliorer la mobilité des personnes et atténuer la douleur.

B. Les lésions cartilagineuses

Les lésions cartilagineuses sont provoquées lors d'accidents violents où les contraintes mécaniques ont été telles que le tissu a atteint sa contrainte limite à la rupture. Lorsque seules les couches superficielles du cartilage sont atteintes, on parle de lésions superficielles ; alors que les

lésions ostéocondrales désignent des atteintes profondes, jusqu'à l'os sous-chondral. Le cartilage articulaire étant avasculaire, les lésions superficielles ne s'auto-régénèrent pas correctement, seul un tissu fibrocartilagineux est produit. Quant aux lésions ostéocondrales, elles provoquent une dégénération progressive de toute l'articulation et pourrait initier l'arthrose dans cette articulation (Gomoll *et al.* 2010).

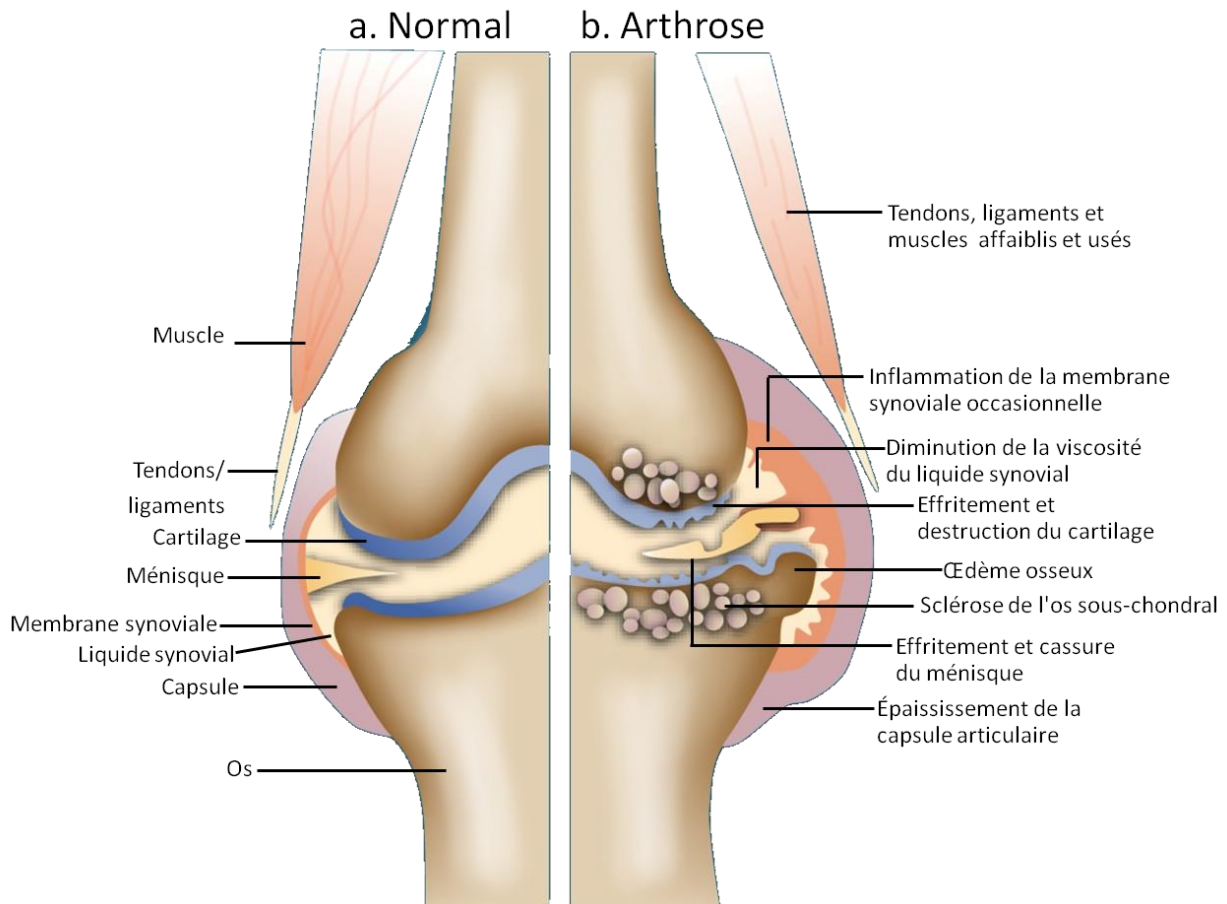


Figure 10 : Changement morphologique d'une articulation arthrosique

*Lorsqu'une articulation est atteinte d'arthrose, tous les tissus de cette articulation sont atteints progressivement et perdent de leur efficacité (le cartilage, l'os, la membrane synoviale et le ménisque), ainsi que des tissus environnants (les muscles, les tendons et les ligaments). (Wieland *et al.* 2005)*

C. Traitements des lésions cartilagineuses

Les traitements des lésions accidentelles et pathologiques du cartilage peuvent se faire soit par des traitements pharmacologiques, soit avec des interventions chirurgicales. Cependant, la prise en charge de l'arthrose se fait aussi par des recommandations d'hygiène de vie qui permettent de modérer la progression de la pathologie.

1. Les recommandations d'hygiène de vie

Actuellement, plusieurs recommandations sont prodiguées par l'OARSI (Osteoarthritis

Research Society International) et d'autres organismes de lutte contre l'arthrose (Zhang *et al.* 2008; Rannou *et al.* 2010) :

- La pratique d'une **activité physique** semble importante pour améliorer la mobilité articulaire, la capacité musculaire, l'élasticité des tendons, et la proprioception des patients. Par ailleurs, ces activités peuvent induire une perte de poids ce qui diminuerait les contraintes appliquées sur le tissu malade.

- **L'adaptation d'un poste de travail** par un professionnel de la santé permet d'ajuster les mouvements et l'environnement d'un salarié à sa pathologie.

- La **perte de poids** est un élément important lorsque l'arthrose est associée à l'obésité : d'une part, pour diminuer les contraintes mécaniques sur le cartilage articulaire, d'autre part pour diminuer le taux d'adipokine sécrétée. En effet, certaines adipokines sécrétées par le tissu adipeux sembleraient influencer le remodelage osseux et cartilagineux lors d'arthrose (Berry *et al.* 2011).

2. Les traitements pharmacologiques

Actuellement, les traitements pharmacologiques sont essentiellement prescrits pour traiter les symptômes de l'arthrose comme la douleur et l'inflammation. L'OARSI recommande de prescrire progressivement les différentes familles de molécules en fonction de l'évolution de la pathologie (Zhang *et al.* 2008).

- Le paracétamol est un analgésique périphérique qui permet de soulager la douleur et peut être pris quotidiennement.

- Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), comme l'acide acétylsalicylique, ne permettent pas de soigner les pathologies mais diminuent la douleur, et ont une action anti-inflammatoire. Il est recommandé de les prescrire à faible dose et pour une durée limitée.

- Des corticostéroïdes peuvent être injectés directement dans l'articulation lorsque les analgésiques et les AINS n'ont plus d'effet.

- Des composants de la matrice extracellulaire, comme la chondroïtine sulfate et la glucosamine, sont utilisés comme des anti-arthrosiques d'action lente peuvent être administrés par voie orale comme un complément. Cependant, si aucun effet n'est observé après 6 mois, il est déconseillé de poursuivre le traitement.

3. Les traitements non pharmacologiques

Les traitements non pharmacologiques sont essentiellement des interventions chirurgicales qui tentent d'initier la réparation du tissu (microfracture, la technique de Brittberg), de restaurer

l'intégrité du cartilage (mosaïcoplastie), ou qui remplacent l'ensemble du cartilage articulaire de l'articulation (pose de prothèse). Plusieurs techniques existent dont :

- Les microfractures ou forage de Pridie: Dans des cas de lésions cartilagineuses, des fractures de l'os sous-chondral vont être faites sous arthroscopie pour créer une fuite de moelle osseuse, qui contient des cellules souches mésenchymateuses, vers la zone lésée. Ainsi, un caillot de sang se forme et les cellules souches se différencient pour reconstituer un néotissu cartilagineux. Selon Steadman et al. les résultats, en termes de douleur et de mobilité, sont bons 7 à 17 ans après la réalisation de cette technique sur des patients de moins de 45 ans et qui ne présentaient aucune atteinte ligamentaire ou du ménisque (Steadman *et al.* 2003). Cependant, selon Von Keudell et al., cette technique permet d'obtenir seulement un fibrocartilage. De plus, ils ont montré qu'une majorité des patients n'avaient pas une restauration efficace du cartilage articulaire, mais que la lésion s'agrandissait (Von Keudell *et al.* 2011).

- La technique de Brittberg ou implantation de chondrocytes autologues (Brittberg *et al.* 1994) : La thérapie cellulaire appliquée au cartilage a débuté avec cette méthode. Des chondrocytes sains sont prélevés sur une zone non portante de l'articulation, et sont amplifiés *in vitro* (figure 11). Puis, les cellules sont greffées sous une membrane de périoste qui a été suturée au-dessus de la lésion. Les limites de cette technique reposent sur la dédifférenciation des chondrocytes au cours de leur amplification (cf. I-B-1), et sur la dégradation du cartilage environnant la zone de prélèvement. De plus, Roberts et al. ont montré que cette technique permettait de restaurer différentes qualités de cartilage (fibreux, fibrocartilage, hyalin, mixte) et que le rapport de collagène de type II/celui IIA augmente au cours du temps, ce qui montre que le tissu met du temps pour être mature (Roberts *et al.* 2009).

- La mosaïcoplastie (Hangody *et al.* 1997) : La première technique mise au point, pour éviter la pose de prothèse, est la mosaïcoplastie. La méthode consiste à prélever des cylindres de cartilage sain sur les zones non portantes d'une articulation, et de les réimplanter au niveau de la partie lésée pour restaurer l'intégrité fonctionnelle du tissu. Hangody et al. ont observé par arthroscopie une bonne intégration des explants et un recouvrement de la zone de prélèvement avec un fibrocartilage (Hangody *et al.* 2008). Il semblerait que cette technique soit intéressante pour réparer des lésions focales et moyennes. Cependant, Solheim et al. ont montré que la douleur diminuait après l'intervention, mais que 5 à 9 ans après, elle était plus forte (Solheim *et al.* 2010).

- L'arthroplastie : En dernier recours, lorsque le cartilage est trop usé et que la qualité de vie des patients est fortement diminuée, ou après un accident, des prothèses unilatérales ou totales de hanche ou de genou (les plus courantes) sont posées après avoir retiré le tissu lésé. Ce type d'intervention donne de bon résultats dans différentes pathologies 2 ans après l'intervention (Merle-Vincent *et al.* 2011). Peu d'études à long terme existent, 50% des patients mourant dans les 15 années suivant la pose de prothèse. Cependant, Newman *et al.* ont montré qu'environ 10% des prothèses unilatérales ou totales étaient détériorées 15 ans après leur pose, mais que la majorité des patients conservaient les améliorations en terme de douleur et de mobilité de leur articulation, observées après l'intervention (Newman *et al.* 2009).

- Le Cartipatch® : des biomatériaux à base d'alginate et d'agarose sontensemencés de chondrocytes autologues qui ont préalablement été amplifiés *in vitro*, puis ils sont implantés dans des lésions ostéocondrales. Neyret *et al.* ont montré que la majorité des patients traités ont une restauration d'un cartilage hyalin 24 mois après l'intervention (Neyret *et al.* 2007; Selmi *et al.* 2008). Cependant cette technique nécessite deux interventions : une première sous arthroscopie pour prélever du cartilage sain sur des zones non portantes, et une seconde 3-4 semaines après, pour l'implantation du biomatériau.

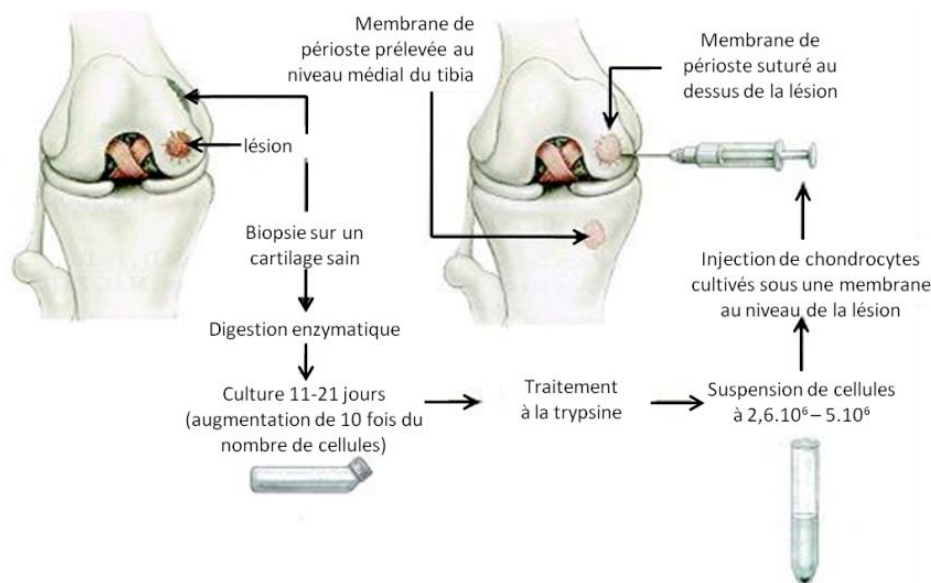


Figure 11 : Technique de Brittberg

Après leur prélèvement, puis leur amplification, des chondrocytes autologues sont injectés sous une membrane de périoste greffée au niveau de la lésion afin d'induire une régénération du cartilage lésé. (Brittberg *et al.* 1994)

Les limites de ces techniques, citées précédemment, encouragent le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, comme l'ingénierie tissulaire, qui permettraient de restaurer l'intégrité du tissu et la mobilité des articulations sur le long terme, et de manière plus précoce que l'arthroplastie.

III. Ingénierie du cartilage

L'ingénierie du cartilage vise à réparer le cartilage articulaire dont les capacités d'auto-régénération sont peu satisfaisantes (cf. I-A-1). Cet axe de recherche repose sur trois éléments : le biomatériau, les cellules et la fonctionnalisation (figure 12). En effet, les cellules (souches ou natives) sont amplifiées *in vitro* en monocouche, puisensemencées dans un biomatériau pour les mettre dans une configuration tridimensionnelle similaire à celle des chondrocytes *in vivo*. Ces structures peuvent être fonctionnalisées en apportant ou modifiant différents facteurs : en appliquant des stimulations mécaniques (Gigant-Huselstein *et al.* 2004; Appelman *et al.* 2011), en ajoutant des facteurs biochimiques (Heymer *et al.* 2009; Grayson *et al.* 2010), en modifiant génétiquement les cellules (Madry *et al.* 2010; Cao *et al.* 2011) et en modifiant des facteurs environnementaux (culture en hypoxie ou normoxie), (Merceron *et al.* 2010).

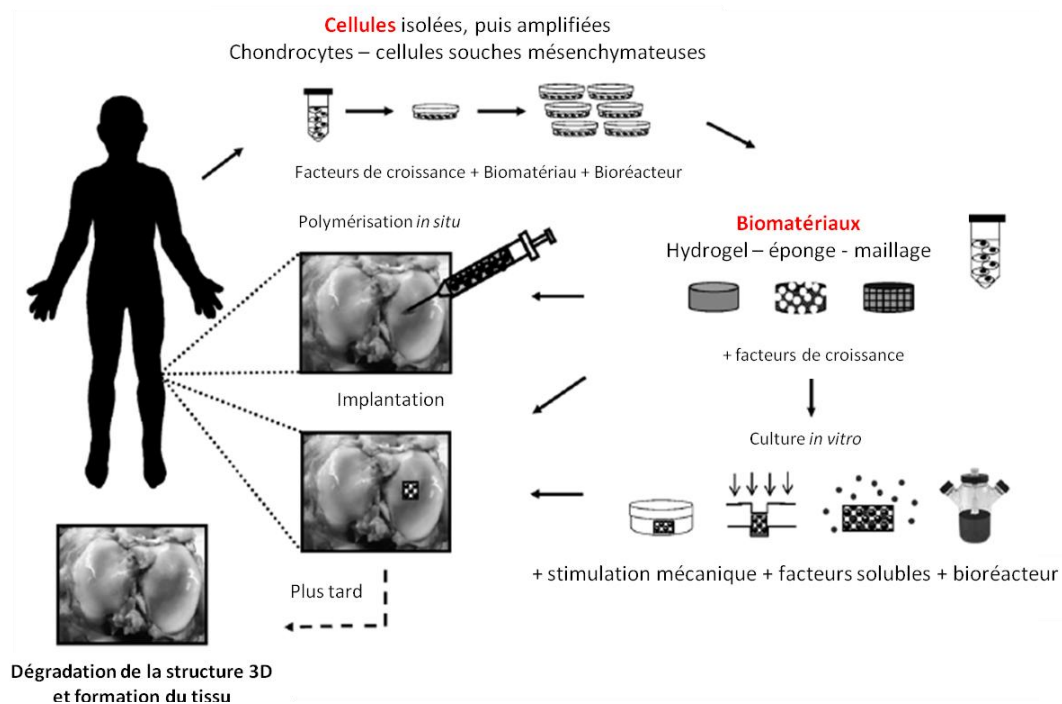


Figure 12 : Principe de l'ingénierie du cartilage

L'ingénierie du cartilage s'articule en trois étapes :

- le prélèvement et l'amplification des cellules en monocouches (chondrocytes ou cellules souches),
- l'ensemencement des cellules dans un biomatériau tuteur,
- la fonctionnalisation du système cellules/matrice par des stimulations mécaniques, biochimiques et par des facteurs environnementaux (bioréacteur, variation du taux d'oxygène). (Chung *et al.* 2008)

A. Les cellules

Les chondrocytes étant le seul type cellulaire du tissu natif, rapidement, ils ont été utilisés pour l'ingénierie tissulaire (Wong *et al.* 2001). Cependant, les limites de ce type de cellule ont initié l'utilisation de cellules souches de différentes origines (moelle osseuse, tissu adipeux, gelée de Wharton).

1. Les chondrocytes

Les chondrocytes sont extraits de tissus d'animaux fraîchement euthanasiés ou de tissus humains provenant d'actes chirurgicaux (poses de prothèse). Ils sont ensuite cultivés en monocouche pour être amplifiés. Ce mode d'approvisionnement en fait une source facile d'accès et permettrait de faire des greffes autologues (en prélevant des explants du cartilage sain du patient).

Cependant, ce sont les seuls points en faveur de l'utilisation de ce type de cellules. En effet, la méthode de prélèvement des chondrocytes est invasive et peut induire une détérioration de la zone (Chung *et al.* 2008). L'amplification de ces cellules a un faible rendement (Chung *et al.* 2008), et induit leur dédifférenciation en cellules fibroblastes-like qui produisent du collagène de type I (Brodkin *et al.* 2004). Cependant, il est reconnu qu'un environnement tridimensionnel permet de redifférencier des chondrocytes (Kino-Oka *et al.* 2005; Wang *et al.* 2008).

Actuellement, l'origine des cellules utilisées est souvent d'origine animale (cochon, bœuf, chèvre) ou de lignée pour leur faciliter d'obtention, la reproductibilité des résultats et pour réaliser des tests d'implantation de biomatériau sur des animaux (Chawla *et al.* 2007; Yang *et al.* 2008). Cependant, pour pouvoir passer à une application clinique, les chercheurs se concentrent de plus en plus sur des cellules d'origine humaine et souches (Grayson *et al.* 2010; Liu *et al.* 2010).

2. Les cellules souches utilisées en ingénierie tissulaire

Les cellules souches peuvent être d'origines différentes et extraites à différents stades de maturation d'un organisme. En effet, du stade embryonnaire à adulte, en passant par le stade fœtal, des cellules souches ont été extraites de différents tissus, étudiées, et différenciées en plusieurs phénotypes cellulaires : ostéocytes, chondrocytes, adipocytes, cellules endothéliales, neurones ou cellules musculaires. Dans le cadre de l'ingénierie du cartilage, des cellules embryonnaires (Hwang *et al.* 2006), et fœtales (Wang *et al.* 2009), sont utilisées en minorité par rapport aux cellules souches mésenchymateuses adultes (Derfoul *et al.* 2006).

a. Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires sont issues de blastocyste et sont pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se différencier vers des phénotypes de cellules des trois feuillets embryonnaires. Ces cellules sont utilisées de manière mineure dans le cadre de l'ingénierie du cartilage. Hwang *et al.* ont montré que des cellules embryonnaires murines expriment Sox9 et Agg plus fortement après leur encapsulation dans un biomatériau qu'en monocouche (Hwang *et al.*

2006). Cependant, en France, les lois de bioéthique de 2004 et 2011 interdisent les activités de recherche sur l'embryon humain à des fins commerciales ou industrielles, et la création d'embryon à des fins de recherche. Toutefois, des dérogations peuvent être données pour faire de la recherche sur des cellules souches d'embryons surnuméraires issus de fécondation *in vitro* sous réserve de plusieurs conditions dont la pertinence du projet scientifique qui permettrait des progrès médicaux majeurs.

b. Les cellules souches fœtales

Les cellules souches d'origine fœtale peuvent être extraites de la gelée de Wharton qui compose le cordon ombilical, ou du sang ombilical. En effet, ces tissus sont facilement accessibles et disponibles en grande quantité pour la recherche. Depuis quelques années, quelques équipes ont montré le caractère multipotent de ces cellules (Wang *et al.* 2004; Baksh *et al.* 2007). Elles sont peu utilisées dans le cadre de l'ingénierie du cartilage (Mara *et al.* 2010), car elles nécessitent d'être mieux caractérisées. En effet, Wang *et al.* ont comparé la différenciation de ces cellules avec des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse dans un environnement tridimensionnel. Ils ont ainsi montré une expression de collagène de type II supérieure avec des cellules de moelle osseuse par rapport à celles issues de la gelée de Wharton (Wang *et al.* 2009).

c. Les cellules souches mésenchymateuses adultes

Des cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont été trouvées dans différents tissus humains (moelle osseuse, tissu adipeux, ...). L'absence d'immunogénicité (absence de marqueur HLA-DR), leur capacité d'autorenouvellement et leur multipotence permettent de les utiliser facilement pour faire des greffes autologues ou allogéniques (Freyria *et al.* 2008). Plusieurs études ont analysé leur phénotype et ont montré que ce ne sont pas des cellules souches hématopoïétiques, de par l'absence des clusters de différenciation (CD) CD34 et CD45 à la surface des cellules. La présence d'autres marqueurs permet de vérifier le phénotype des cellules (Wagner *et al.* 2005; Uccelli *et al.* 2008) : CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 et CD271. D'autre part, les CSM peuvent se différencier en plusieurs phénotypes cellulaires des tissus mésenchymateux comme les chondrocytes, les ostéocytes, les adipocytes ou les myocytes (Pittenger *et al.* 1999), et de tissus provenant d'un autre feuillet embryonnaire comme les neurones (Prabhakaran *et al.* 2009). Les CSM peuvent être obtenues à partir de différents tissus (Sakaguchi *et al.* 2005) :

- de la **moelle osseuse** : ces cellules ont été largement étudiées et caractérisées depuis les années 1990. Les CSM adhèrent au plastique des boîtes de culture, ce qui permet de les isoler

facilement des autres types de cellules contenues dans la moelle osseuse. Cette source est facile d'accès et d'utilisation et permet d'obtenir un grand nombre de cellules. Ces CSM sont largement utilisées en ingénierie du cartilage (Chung *et al.* 2008; Kemppainen *et al.* 2009; Nguyen *et al.* 2011). Ces cellules sont cultivées soit en pellet (Derfoul *et al.* 2006), soitensemencées dans un biomatériau pour leur apporter une configuration tridimensionnelle similaire à celle des chondrocytes *in vivo*, afin d'améliorer leur différenciation (Chung *et al.* 2009; Chen *et al.* 2011).

- du **tissu adipeux** qui dérive des déchets opératoires issus de liposuccion. Merceron *et al.* ont montré que des pellets de CSM issues de tissus adipeux contiennent du collagène de type II et des GAG après 28 jours de culture dans un milieu chondrogénique (contenant des facteurs de croissance) (Merceron *et al.* 2011). Cependant, leur amplification semble plus limitée en quantité par rapport aux autres sources de cellules et leur différenciation en chondrocytes moins efficace que d'autres sources de cellules (Sakaguchi *et al.* 2005).

- d'**autres tissus** comme le muscle, le périoste, ou la membrane synoviale contiennent des CSM. Ces cellules ont une utilisation plus minoritaire. En effet, la différenciation chondrocytaire semble meilleure avec des cellules issues de la membrane synoviale (Sakaguchi *et al.* 2005), cependant, leur nombre est limité ainsi que les zones de prélèvement. D'autre part, ce tissu est rapidement atteint dans les pathologies de types arthrosiques, ce qui limite son utilisation.

B. Le biomatériau

Le biomatériau est un élément important. Sa composition permet non seulement d'orienter la différenciation des cellules (Nguyen *et al.* 2011), mais aussi de donner un environnement tridimensionnel aux cellules qui favorise la redifférenciation des chondrocytes ou la chondrogenèse de cellules souches. Pour leur utilisation en clinique, les biomatériaux doivent répondre à un cahier des charges strict quelle que soit leur origine (naturelle ou synthétique).

1. Le cahier des charges

Le biomatériau est une substance d'origine "étrangère" qui sera greffée dans le corps humain. Ainsi, ce composant doit suivre un cahier des charges strict pour permettre l'ensemencement des cellules, leur survie et l'implantation de la construction dans un corps humain (Chung *et al.* 2008).

La **biocompatibilité** du biomatériau est indispensable pour éviter sa destruction par le système immunitaire, ainsi que la production de molécules cytotoxiques qui peuvent être disséminées dans le corps après l'implantation et être toxiques pour d'autres tissus. D'autre part,

les cellules doivent pouvoir rester actives grâce à la diffusion des éléments nutritifs et des déchets métaboliques aux travers d'un biomatériau **poreux** (Lutolf *et al.* 2009). Les cellules actives vont pouvoir synthétiser de la matrice extracellulaire pour remplacer le biomatériau. Ainsi, il doit être aussi **biodégradable** pour laisser place à la néomatrice mais assez **résistant** aux contraintes mécaniques étant donné la situation où il sera greffé dans le cadre de l'ingénierie du cartilage.

D'autre part, la méthode de construction de la structure doit permettre un **ensemencement homogène** des cellules au sein du biomatériau (Bonzani *et al.* 2006).

Enfin, pour conserver le phénotype chondrocytaire, les biomatériaux doivent être très **hydrophiles** afin d'être proches des conditions physiologiques trouvées dans le tissu natif.

Plusieurs biomatériaux de différentes origines et types répondent à ces critères.

2. Les biomatériaux d'origine naturelle

Les biomatériaux d'origine naturelle utilisés pour l'ingénierie du cartilage sont souvent des hydrogels composés de polysaccharides (acide hyaluronique, agarose, alginate) ou de chaînes polypeptidiques (collagène, fibres de soie).

a. L'alginate

L'alginate est un polysaccharide linéaire d'origine végétale composé d'acide mannuronique (M) et guluronique (G) en différentes proportions en fonction de son origine (figure 13). Par exemple, l'alginate de sodium issu de *Macrocystis pyrifera* a une plus grande proportion d'acide mannuronique (65%) contrairement à celui issu de *Laminaria hyperborea* (37%) (Mancini *et al.* 1999).

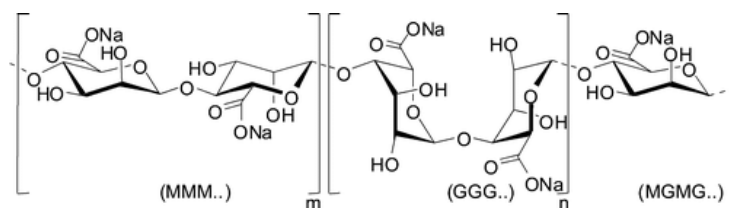


Figure 13 : Structure des chaînes d'alginate de sodium

L'alginate de sodium est composé d'acide mannuronique (M) et d'acide guluronique (G) en différentes proportions en fonction de son origine. (Robitzer *et al.* 2008)

D'autre part, il existe au sein d'une même origine des alginates dit de basse, moyenne et haute viscosité. Ces variations sont dues à la longueur des chaînes du polysaccharide. En effet, plus la chaîne est courte (faible poids moléculaire), plus la viscosité est faible. Pour former un gel, la poudre d'alginate est mélangée à une solution aqueuse, puis le gel est solidifié par polymérisation et devient un hydrogel. Il existe différentes techniques de solidification d'un gel

d'alginate : la photopolymérisation et la polymérisation avec des ions bivalents. La photopolymérisation consiste à exposer un gel d'alginate modifié chimiquement à des UV pour créer des photo-initiateurs qui génèrent des radicaux libres pour initier la polymérisation du gel (Jeon *et al.* 2009). Des liaisons covalentes sont créées entre les chaînes d'alginate à ces radicaux. Cette exposition semble avoir peu d'effets délétères sur les cellules et les molécules bioactives.

La polymérisation d'un gel d'alginate se fait par la formation de liaisons ioniques entre les résidus G des chaînes polysaccharidiques et des ions bivalents pour former des structures appelées "boîtes à œuf" (figure 14). Ainsi, les liaisons ioniques permettent de solidifier le gel et de créer différentes formes comme des billes, des hydrogels cylindriques ou d'autres formes (Sharma *et al.* 2007; Chung *et al.* 2008). Il existe plusieurs sources d'ions bivalents, le calcium est la plus utilisée de par sa présence naturelle dans l'organisme. Lorsque le calcium est couplé au chlorure, cela permet une polymérisation rapide du gel. La vitesse de polymérisation est directement liée à la concentration de la solution de CaCl_2 et aux temps d'exposition (Kuo *et al.* 2001). Le calcium peut aussi être couplé à des ions sulfate (CaSO_4), ce qui permet une polymérisation plus lente du gel car les ions SO_4^- ont une affinité plus forte pour les ions calciums (Ca^{2+}) que les ions chlorure (Cl^-) (Lewandowski 2002).

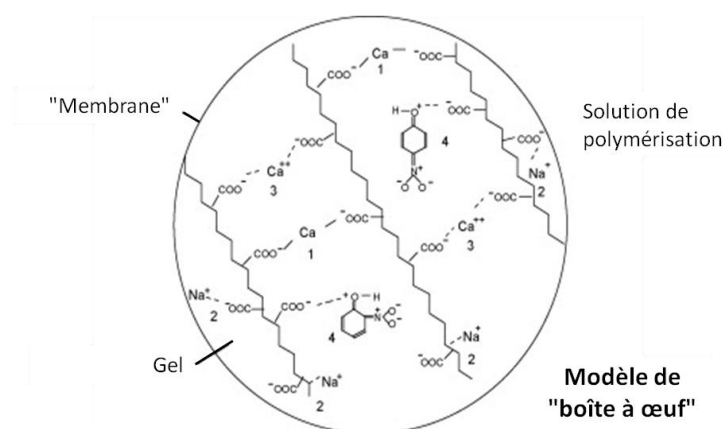


Figure 14 : Modèle de liaison ionique en "boîte à œufs"

Lorsqu'un gel d'alginate est mis en contact avec une solution contenant des ions bivalents comme le calcium, une "membrane" se crée immédiatement à la surface du gel. Puis, des liaisons ioniques dites "boîte à œuf" se créent progressivement, à l'intérieur du gel, entre les chaînes d'alginate et les ions calcium. (Peretz *et al.* 2008)

Les propriétés de l'alginate de sodium - sa forte contenance en eau (entre 97 et 99%), sa biocompatibilité, sa capacité de dégradation - en font un bon biomatériau pour l'ingénierie tissulaire (Fragonas *et al.* 2000; Gigant-Huselstein *et al.* 2004; Chung *et al.* 2008; Jeon *et al.* 2009). En effet, Jeon *et al.* ont montré que les propriétés mécaniques d'un hydrogel d'alginate, construit par photopolymérisation, diminuent au cours du temps (Jeon *et al.* 2009). Cependant, aucune étude ne donne de référence temporelle pour la dégradation complète du biomatériau. Des

études ont montré qu'il peut être utilisé notamment dans le cadre de comblement d'anévrisme (Soga *et al.* 2004) et d'embolisation d'artère pendant plusieurs semaines (Forster *et al.* 2010).

Il est utilisé dans le domaine de la recherche biomédicale, mais aussi dans l'industrie alimentaire. Les propriétés mécaniques de ce biomatériau ont été explorées pour évaluer sa résistance mécanique en fonction de sa composition et/ou de sa concentration (Moresi *et al.* 2001; Moresi *et al.* 2007). D'autres études ont analysé l'évolution des propriétés mécaniques d'hydrogel d'alginate ensemencé de cellules et les ont comparées à celles d'autres biomatériaux (Awad *et al.* 2004). Ainsi, Awad *et al.* ont montré que l'alginate a des propriétés mécaniques plus faibles que l'agarose ou la gelatine après l'ensemencement des cellules. Cependant, après 28 jours de culture, les CSM ont produit des quantités de GAG et de collagènes similaires dans tous les biomatériaux testés, ainsi, les modules de Young en compression ne sont pas significativement différents.

Plusieurs types de cellules ont été inclus dans l'alginate, à différents stades de maturité (souches, différenciées ou natives), pour leur donner une conformation tridimensionnelle, ou pour éviter la dégradation des cellules par le système immunitaire (Mallett *et al.* 2009).

b. L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (HA) est un polysaccharide linéaire composé de D-N-acétylglucosamine $\beta(1-4)$ D-glucuronate $\beta(1-3)$. Il est un des composants naturels du cartilage hyalin articulaire (cf. I-A-3), et y joue un rôle important dans la résistance à la compression du cartilage en permettant la fixation de PG. D'autre part, certaines cellules comme les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse ont des récepteurs membranaires CD44 qui sont spécifiques de l'acide hyaluronique, tout comme les chondrocytes (Knudson *et al.* 2002). Ainsi, ce biomatériau est pressenti comme un inducteur de la chondrogenèse des cellules souches mésenchymateuses (Burdick *et al.* 2005; Chung *et al.* 2009). Il est rarement utilisé seul, comme biomatériau, mais souvent comme un adjuvant à un autre biomatériau.

c. L'agarose

L'agarose est un polymère non ramifié, non sulfaté d'origine naturelle. A 40°C, il est sous forme liquide et les cellules peuvent y être ensemencées, puis il se solidifie à température ambiante. Quelques études l'utilisent pour sa forte teneur en eau, sa biocompatibilité, sa facilité d'utilisation. Il permet aussi aux chondrocytes de conserver leur phénotype (Awad *et al.* 2004; Ng *et al.* 2005).

d. Le collagène

Le collagène est un des composants naturels du cartilage. Il est utilisé sous forme d'hydrogel ou d'éponge. Plusieurs types de collagènes et dérivés sont utilisés en ingénierie tissulaire : les collagènes de type I, II et III et la gélatine (Awad *et al.* 2004; Heymer *et al.* 2009). Ce biomatériau pourrait posséder la meilleure configuration pour les cellules de par sa présence *in vivo*. Cependant, sa dégradation est plus longue (quelques années). En effet, les cellules doivent le détruire avec des MMP avant de le remplacer par du collagène néosynthétisé.

e. Les autres biomatériaux d'origines naturelles

- La **chondroïtine sulfate** est un GAG et un composant de la MEC du tissu cartilagineux (cf. I-A-3-b). Ce polysaccharide peut être sulfaté ou carboxylé et est ainsi fortement chargé négativement et donc très hydrophile. Ce biomatériau est très visqueux et utilisé comme adjuvant pour que le biomatériau contiennent un composant du tissu natif et explorer la chondrogenèse des cellules dans cet environnement (Hwang *et al.* 2007; Nguyen *et al.* 2011). En effet, il semblerait, selon Nguyen *et al.*, que seul, il permette de produire rapidement des protéoglycannes et du collagène de type X, ce qui ressemble à la composition de la couche profonde du cartilage. Cependant, en combinaison avec d'autres biomatériaux, la production de collagène de type X est moins importante et le collagène de type II est présent plus longtemps (Nguyen *et al.* 2011).

- La **poly-L-lysine** (PLL) est un polymère composé de lysine. Cette molécule est chargée positivement, ce qui permet l'adhésion de cellules sur sa surface (Lu *et al.* 2009). Ainsi, certaines études l'utilisent pour faire des multicouches de polyélectrolytes en alternant une couche de PLL et une d'un polyanion. Ce type de construction permet de former un réservoir de molécules qui pourrait contenir des facteurs de croissance (Jessel *et al.* 2003; Benkirane-Jessel *et al.* 2005; Garza *et al.* 2005; Gangloff *et al.* 2006; Mjahed *et al.* 2008).

3. Les biomatériaux d'origines synthétiques

Les biomatériaux d'origines synthétiques peuvent être des réseaux de polymères ou de peptides. Les principaux biomatériaux synthétiques utilisés pour l'ingénierie du cartilage sont :

- Le **polyéthylèneglycol** (PEG) est un polyether synthétique et hydrophile qui permet de former un hydrogel. Cette molécule est non-toxique et utilisée comme transporteur de molécules pharmaceutiques pour des applications médicales. Ainsi, sa biocompatibilité et sa facilité d'élimination ont induit son utilisation en ingénierie tissulaire (Hwang *et al.* 2007).

- Le **poly (ϵ -caprolactone)** (PCL) est un matériau dont la porosité peut être contrôlée lors de la construction du biomatériau. Selon Kemppainen et al. la porosité de ce biomatériau aurait un lien avec la synthèse matricielle des chondrocytes et la chondrogenèse de cellules souches mésenchymateuses (Kemppainen *et al.* 2009). En effet, une perméabilité plus faible permettrait aux chondrocytes de synthétiser plus d'aggrécanne et de collagène de type II par rapport à des perméabilités plus fortes. En revanche, la synthèse d'aggrécanne par des CSM semble identique avec les biomatériaux testés dont les porosités sont différentes, mais l'expression génique du collagène de type II semble améliorer lorsque la porosité est plus forte.

4. Influence du biomatériau sur la synthèse matricielle

La composition des biomatériaux influence la synthèse matricielle des cellules différenciées comme le chondrocyte et peut orienter la différenciation de cellules souches. En effet, les cellules seraient capables de sentir leur environnement du point de vue de la composition (Hwang *et al.* 2007; Nguyen *et al.* 2011), et des propriétés mécaniques (Discher *et al.* 2005; Engler *et al.* 2006). Ainsi, le comportement des cellules serait influencé au niveau de leur morphologie dans le biomatériau et de leur phénotype.

Comme l'ont montré Hwang et al., les chondrocytes peuvent synthétiser une matrice différente en composition ou quantité en fonction de la composition du biomatériau (Hwang *et al.* 2007). En effet, du PEG a été supplémenté avec différents composants (collagène de type I, chondroïtine sulfate et acide hyaluronique). Il semble que le biomatériau supplémenté avec de la chondroïtine sulfate soit la meilleure combinaison, pour augmenter l'expression génique et protéique du collagène de type II et de l'aggrécanne.

D'autre part, Mouw et al. ont comparé différents biomatériaux (alginate, agarose, collagène de type I, etc.), couramment utilisés en ingénierie du cartilage et y ontensemencé des chondrocytes bovins (Mouw *et al.* 2005). Ils ont montré que l'agarose semble, dans cette configuration, être un support permettant aux cellules de produire le plus de GAG.

Quand à Nguyen et al., ils ont étudié l'influence de la composition du biomatériau sur la différenciation de CSM en conservant comme base la chondroïtine sulfate (Nguyen *et al.* 2011). Les constructions ont été cultivées en présence de TGF β 1, facteur de croissance pour induire la chondrogenèse des CSM. Ainsi, ils ont montré une évolution au cours du temps de la synthèse matricielle, mais surtout une grande disparité des résultats entre les différentes compositions de biomatériaux.

D'autre part, Engler et al. ont démontré que l'élasticité du biomatériau influençait la

différenciation des CSM vers le phénotype cellulaire d'un tissu dont les propriétés mécaniques sont les mêmes. Ainsi, des CSM ensemencées dans un biomatériau rigide à base de collagène montrent une morphologie et une expression spécifique des ostéoblastes (Engler *et al.* 2006).

Ces différents exemples montrent la complexité qu'il y a à comparer les différentes études existantes étant donné les nombreuses combinaisons existantes entre les types de cellules - biomatériaux et stimulations. En effet, ce dernier paramètre permet d'accélérer la différenciation des cellules ou d'améliorer la synthèse d'une néomatrice.

C. Fonctionnalisation du biomatériau

1. Facteurs de croissance

Des facteurs de croissance différents interviennent à des stades précis de la chondrogenèse pour stimuler différentes voies de signalisation (cf. I-A-1-2). Ainsi, des facteurs de croissance comme le TGF β (Transforming Growth Factor) et la BMP (Bone Morphogenic Protein) sont utilisés pour induire la différenciation chondrocytaire voir ostéocytaire de cellules souches, ou pour conserver le phénotype des cellules natives et amplifier la synthèse matricielle. Ces deux facteurs de croissance appartiennent à la même super-famille des TGF dont plusieurs isoformes ont montré leur effet chondro-inductifs. BMP 2 est l'isotype le plus utilisé et semble être important pour l'expression du collagène de type II du cartilage mature (Freyria *et al.* 2008). Mais, selon Puetzer *et al.*, les facteurs de croissance les plus efficaces pour induire la chondrogenèse des CSM, sont TGF β 3 et BMP 6 (Puetzer *et al.* 2010). L'Insulin Growth Factor (IGF) et le FGF sont également utilisés pour induire la chondrogenèse des CSM (Indrawattana *et al.* 2004).

Ces facteurs de croissance peuvent être délivrés de plusieurs manières aux cellules : classiquement, ils sont présents dans le milieu de culture à des concentrations d'environ 10 ng/mL pour les TGF β et de 10 à 500 ng/mL pour les BMP (Indrawattana *et al.* 2004; Puetzer *et al.* 2010), mais ils peuvent aussi être adsorbés dans des films de polyélectrolytes pour être délivrés progressivement et induire la différenciation des cellules environnantes (Dierich *et al.* 2007), ou inclus dans des microsphères pour être aussi relargués progressivement dans des pellets pour que toutes les cellules soient stimulées de la même manière (Solorio *et al.* 2009). En effet, la présence des facteurs de croissance dans le milieu ne permet pas de stimuler les cellules au centre du biomatériau quand celui-ci est dense.

Plusieurs paramètres peuvent être contrôlés : la concentration des facteurs de croissance et la manière de stimuler les cellules. En effet, les facteurs de croissance peuvent être apportés de manière simultanée ou cyclique dans le milieu de culture. Elder *et al.* ont montré que la

stimulation cyclique de chondrocytes (une semaine sur deux) avec de la BMP 2 ou de l'IGF, n'induit pas une diminution significative de la synthèse matricielle (Elder *et al.* 2009).

2. Stimulation mécanique

Le cartilage articulaire est un tissu qui est soumis à des contraintes mécaniques régulières. Pour la construction de néocartilage *in vitro*, des stimulations mécaniques ont été appliquées sur des cellules souches ou natives pour activer des voies de mécano-transduction et induire une chondrogenèse, ou pour stimuler la synthèse matricielle des cellules natives. Ainsi, différents types de stimulations ont été appliqués sur les biomatériaux : des déformations (Mouw *et al.* 2007; Kisiday *et al.* 2009), et des pressions hydrostatiques (Miyanishi *et al.* 2006). Elles peuvent être appliquées de manière cyclique et intermittente pour mimer ce que les cellules peuvent subir *in vivo*. Les stimulations peuvent être appliquées à l'aide d'appareils spécifiques qui induisent simplement des déformations ou des bioréacteurs qui induisent plutôt des pressions hydrostatiques en même temps qu'ils renouvellent le milieu en continu.

Ainsi, Appelman *et al.* montrent clairement que la déformation des hydrogels, à base de PEG, de 15% à 1 Hz pendant 3 heures et de manière intermittente permet d'améliorer la synthèse matricielle (GAG et collagène de type II) des cellules après 27 jours de stimulation (Appelman *et al.* 2011). De même, Kisiday *et al.* ont montré une augmentation de la production de GAG par des cellules souches mésenchymateuses soumises à des déformations cycliques de 2,5% (après une déformation statique de 7,5%) à 0,3 Hz pendant 12 heures par jours, de manière intermittente, et cultivée sans facteurs de croissance (Kisiday *et al.* 2009).

IV. Ingénierie stratifiée du cartilage

Depuis la fin des années 1990, il est reconnu que des chondrocytes ensemencés dans un biomatériau synthétisent de manière homogène une matrice extracellulaire avec ou sans stimulations externes (Chung *et al.* 2008). Parallèlement à l'étude de la différenciation des cellules souches dans un biomatériau à une couche, les chercheurs se sont attachés à mimer plus précisément la structure du cartilage et de l'os sous-chondral en terme de composition du biomatériau et de synthèse matricielle. Ainsi, depuis 2003, l'ingénierie tissulaire stratifiée du cartilage s'est développée. Le premier objectif a été de construire pas-à-pas des structures stratifiées (Klein *et al.* 2003; Lee *et al.* 2007; Heymer *et al.* 2009). Pour atteindre ce but, plusieurs techniques et biomatériaux ont été testés faisant varier le phénotype cellulaire dans le biomatériau, en superposant différents biomatériaux ou la combinaison des deux ; ou sans

variation (Lee *et al.* 2007). Actuellement, l'objectif est d'obtenir une synthèse matricielle qui varie entre les strates pour réparer des lésions cartilagineuses profondes et ostéo-chondrales.

A. Variation du phénotype cellulaire entre les couches

Pour résoudre le problème de la graduation de la synthèse matricielle dans la structure, des phénotypes cellulaires différents sont ensemencés séparément dans chaque strate (Sharma *et al.* 2007; Han *et al.* 2008; Klein *et al.* 2009; Cheng *et al.* 2010).

Actuellement, les cellules utilisées en ingénierie stratifiée sont majoritairement celles du tissu natif. Des chondrocytes issus des différentes zones du cartilage sont alors extraits, ainsi que des ostéocytes, puis ils sont ensemencés successivement dans les couches du biomatériau. Ainsi, Hwang *et al.* ont pu observer une synthèse matricielle plus abondante par les chondrocytes issus de la couche profonde du cartilage par rapport à ceux de la couche superficielle, alors que le biomatériau utilisé était identique (Hwang *et al.* 2007).

Une autre philosophie de recherche consiste à utiliser des chondrocytes extraits des différentes couches du cartilage pour obtenir au final une structure stratifiée uniquement composée de cellules et de leur matrice, sans biomatériau (Klein *et al.* 2003; Chawla *et al.* 2007; Han *et al.* 2008). Tout d'abord, les cellules sont ensemencées dans un hydrogel d'alginate de sodium pour leur permettre de synthétiser une néomatrice, puis elles sont extraites du biomatériau et sont déposées alternativement pour former des structures stratifiées composées de différents phénotypes cellulaires (figure 15). La préculture des chondrocytes dans l'alginate permet de conserver le phénotype des cellules et d'obtenir une construction stratifiée en terme de cellules et de MEC. Cette équipe a montré une production de GAG plus importante dans la couche inférieure, qui contient des chondrocytes de la zone moyenne du cartilage, par rapport à celle des cellules de la couche superficielle. De même, il semble que les chondrocytes de la couche superficielle synthétisent plus de collagènes. La densité d'ensemencement est de $2,5 \cdot 10^6$ cellules/cm², alors que la construction semble avoir une épaisseur de 0,8 mm (Klein *et al.* 2003). Ces deux paramètres semblent indiquer d'une part qu'une grande quantité de cellules est nécessaire pour obtenir, et d'autre part que l'épaisseur est insuffisante pour combler toute l'épaisseur d'un cartilage qui est d'environ 1,5-2 mm (Shepherd *et al.* 1999).

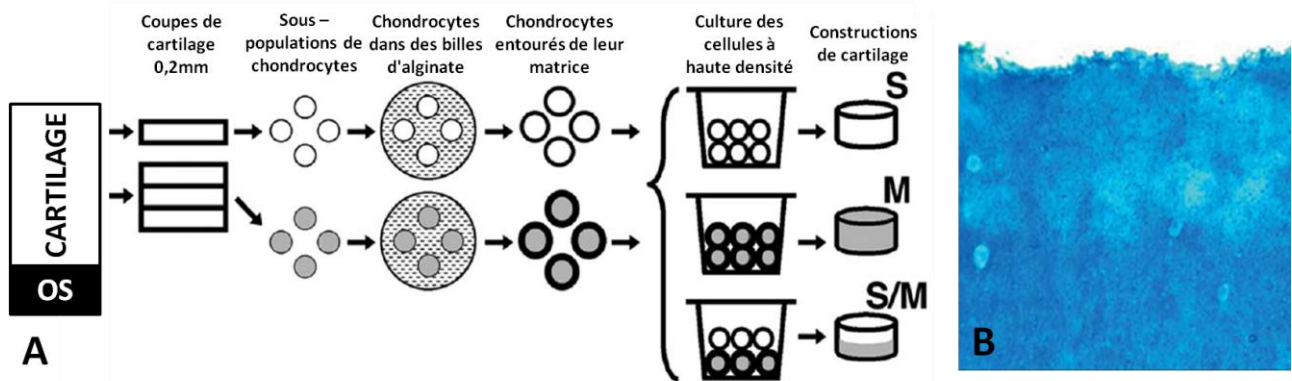


Figure 15 : Construction de structures stratifiées à base de cellules

Des billes d'alginate ensemencées de chondrocytes extraits des zones superficielles ou moyennes du cartilage sont construites (A). Puis, elles sont cultivées séparément pendant 7 jours, avant que les cellules entourées de leur matrice (CM) soient dissociées de l'alginate de sodium, puis déposées séparément pour former des cylindres contenant des cellules de la zone superficielle (S), ou moyenne (M) du cartilage. Des constructions stratifiées (S/M) de ces cylindres ont été formées en déposant successivement les CM des deux origines. Des coupes histologiques colorées au Bleu Alcian ont permis d'observer les GAG (B). On distingue deux zones : une plus claire, supérieure, qui correspond aux chondrocytes superficiels qui synthétisent essentiellement des collagènes, et une zone inférieure plus foncée qui contient des chondrocytes de la zone moyenne qui synthétisent plus de GAG. (Klein et al. 2003)

La même équipe a créé des constructions stratifiées similaires avec des cellules issues de cartilages porcins immatures, puis elles ont été implantées dans le cartilage d'un cochon nain (Chawla et al. 2007). Après une semaine *in vivo*, la structure n'était pas intégrée au cartilage de l'animal. Parallèlement, différentes formes mimant celles de l'articulation fémorale ont été construites et aucune migration de cellules entre les couches n'a été observée (Han et al. 2008), (figure 16).

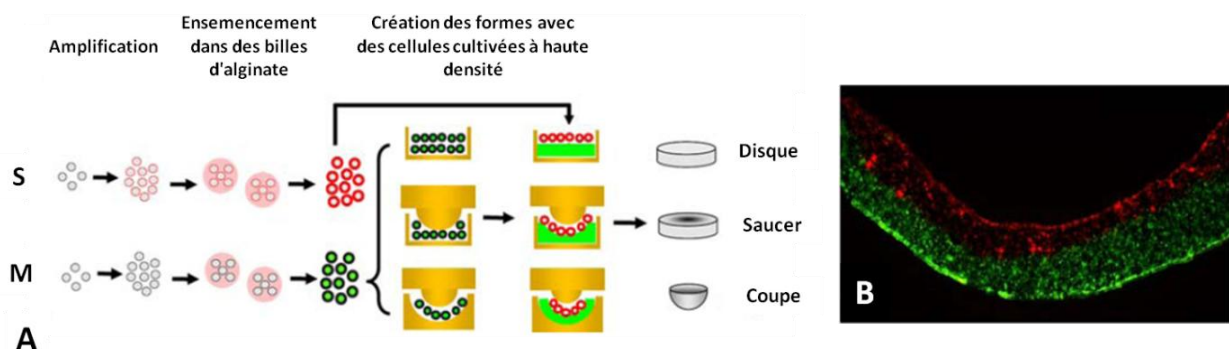


Figure 16 : Construction de différentes formes par superposition de chondrocytes

Après extraction et amplification des chondrocytes, les cellules ont été marquées avec des colorants : PKH 26 (rouge) ou la carboxyfluorescein diacetate succinimidyl estera (CFSE, vert). Puis ils ont été ensemencés dans un alginate de sodium, des billes ont été ensuite formées et cultivées. Après 7 jours de culture, les cellules entourées de leur matrice ont été extraites, puis déposées successivement dans des moules d'agarose pour obtenir des formes de coupe et "saucer". Ainsi, des structures stratifiées sont construites avec des chondrocytes des couches superficielles (S) et moyennes (M). (Han et al. 2008)

Récemment, Klein et al. ont proposé de fabriquer des structures stratifiées avec un biomatériau composite de fibrine et d'alginate qui serait ensemencé de cellules des différentes

zones du cartilage (figure 17). Ainsi, les couches de biomatériau ensemencées de cellules seraient déposées ("printed") alternativement pour mimer les strates du tissu natif (Klein *et al.* 2009). Peu de résultats ont été présentés, mais il semble que les couches ne se mélangent pas et que les cellules restent actives dans ce biomatériau.

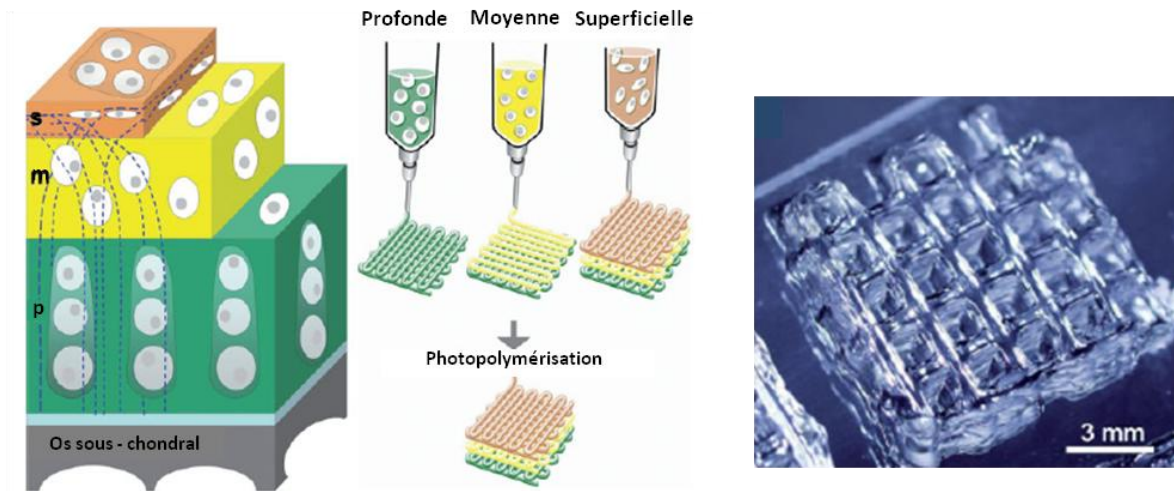


Figure 17 : Hydrogel stratifié à base de fibrine proposé par Klein et al. en 2009

Des chondrocytes issus des couches profondes (vert), moyennes (jaune), et superficielles du cartilage (rouge), sont extraits du tissu natif puis ensemencés dans un biomatériau composite à base de fibrine et d'alginate. Enfin, la structure est construite en chassant progressivement le mélange d'une seringue, et en alternant les origines des chondrocytes pour mimer la structure native du tissu. Puis, l'ensemble est photopolymérisé. (Klein et al. 2009)

Les limites de ces études reposent essentiellement sur l'utilisation des chondrocytes pour créer des néotissus stratifiés. D'autres comme Cheng et al. ont utilisé des CSM de lapin et initié une prédifférenciation des cellules ensemencées dans des microsphères de collagène cultivées dans des milieux chondrogéniques (dexaméthasone, TGF β 1, etc.) ou ostéogéniques (dexaméthasone, β -glycérophosphate, etc.) pendant 21 jours. Par la suite, ils ont développé des structures stratifiées en empilant les différentes microsphères (Cheng *et al.* 2010). Les biomatériaux ont été formés en superposant des microsphères ostéogéniques, des microsphères non différenciées, et enfin, au niveau de la couche superficielle, des microsphères chondrogéniques. Les résultats obtenus montrent que cette configuration tristratifiée des cellules est nécessaire pour obtenir une couche calcifiée entre la zone cartilagineuse et celle sous-chondrale, lorsque l'ensemble est cultivé dans du milieu chondrocytaire. La culture des microsphères indifférenciées avec des microsphères chondrogéniques ou en ostéogéniques ne permettait pas de produire une zone intermédiaire de cartilage calcifié. Ainsi, ils semblent que la co-culture de phénotypes cellulaires différents dans un biomatériau stratifié permette de potentialiser la formation d'un néotissu.

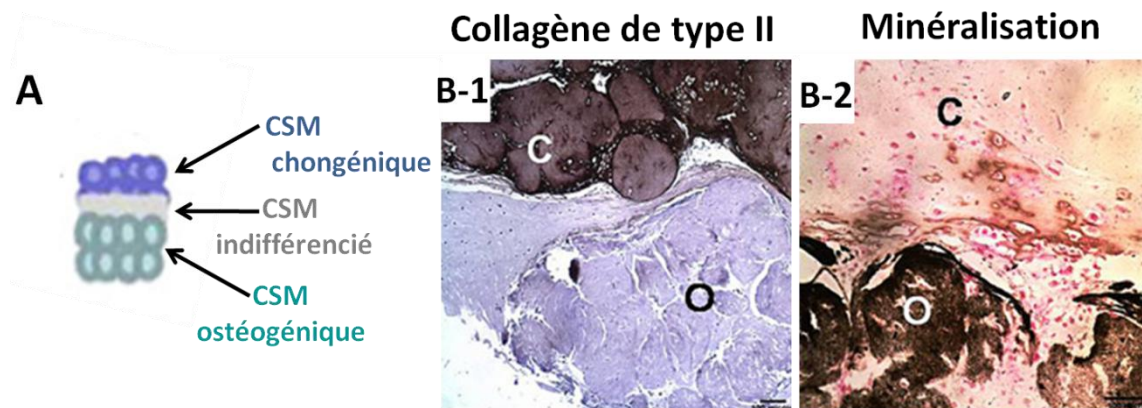


Figure 18 : Structure stratifiée à base de collagène ensemencée de CSM de lapin

Des CSM de lapin ont été ensemencées dans des billes de collagène, puis cultivées dans un milieu chondrogénique, ostéogénique ou normal. Après 21 jours de culture, les billes ont été superposées pour former une structure stratifiée (A) avec les billes ostéogéniques (O), puis des billes indifférenciées et enfin celles chondrogéniques (C). Après 21 jours de culture dans un milieu chondrogénique, les cellules dans la partie supérieure ont synthétisé du collagène de type II (B-1). D'autre part, la coloration Von Kossa met en évidence une minéralisation de la couche inférieure ostéogénique (B-2). (Cheng et al. 2010)

B. Variation de la composition ou des propriétés mécaniques de la structure

Il est reconnu que les propriétés d'un biomatériau influencent la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (Discher et al. 2005; Lutolf et al. 2009). Ainsi, des hydrogels stratifiés ont été créés avec une composition (Heymer et al. 2009) ou des propriétés mécaniques (Ng et al. 2005) différentes entre les couches et ce sans faire varier l'origine, ni le phénotype des cellules. Plusieurs types de biomatériaux sont utilisés : des hydrogels ou des maillages, d'origine naturelle ou synthétique.

Heymer et al. ont construit des structures multicouches permettant de combler des lésions ostéochondrales (Heymer et al. 2009). Elles étaient composées de (figure 19) : une couche mimant le cartilage avec un biomatériau à base de collagène de type I et d'acide hyaluronique ; puis, une interface hydrophobe ; enfin la zone mimant l'os sous-chondral, qui est quant à elle composée de biomatériaux d'origines synthétiques (PLA, Polylactic acid) et naturelles (acide hyaluronique, hydroxyapatite). Des CSM humaines ont été homogénéisées dans un hydrogel de collagène de type I, puis ensemencées dans la partie supérieure destinée à mimer le cartilage. Après 21 jours de culture dans un milieu chondrogénique, une néomatrice cartilagineuse a été synthétisée par les cellules dans la partie supérieure de la structure. Cependant, aucune cellule ne semble avoir colonisé la partie inférieure.

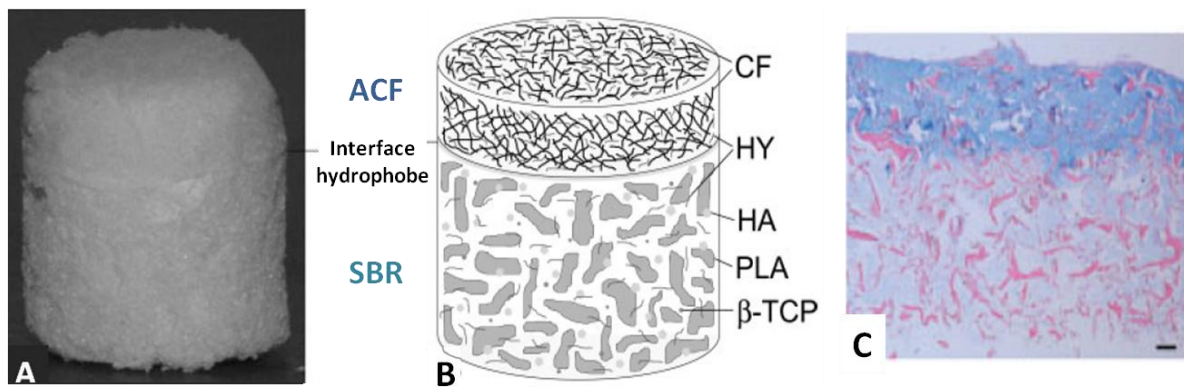


Figure 19 : Construction stratifiée imaginée par Heymer et al.

Des structures bistratifiées ont été construites avec des fibrilles de collagènes de type I (CF = collagen fibre) et de l'acide hyaluronique (HY = hyaluronan) pour produire du cartilage articulaire (ACF = articular cartilage fabric) ; et des polymères synthétiques (PLA), de l'hydroxyapatite (HA) et du phosphate β tricalcique (β -TCP) pour mimer la région sous-chondrale de l'os (SBR = Sub-chondral Bone Region), (A - B). Puis, des cellules souches mésenchymateuses humaines ont étéensemencées dans du collagène de type I etensemencées dans la partie ACF. Après 21 jours dans un milieu chondrogénique, une coloration Bleu Alcian a permis de mettre en évidence une production de GAG par les cellules (C, barre = 200 μ m). (Heymer et al. 2009)

De même, Harley et al. ont construit une structure stratifiée à base de biomatériau d'origine naturelle, sans cellule, et dont la stratification persiste même après des cycles de compression (Harley et al. 2009).

Enfin, Ng et al. ont construit des structures stratifiées à base d'agarose dont les propriétés mécaniques sont différentes entre les couches pour influencer la synthèse matricielle des chondrocytes (Ng et al. 2005). La concentration de l'hydrogel a été modifiée pour chaque couche. Les résultats montrent que les chondrocytesensemencés dans un agarose à 2 ou 3% ont des productions de GAG et de collagènes similaires et qui augmentent au cours du temps. De plus, ces valeurs ne sont pas différentes significativement pour des hydrogels bistratifiés constitués d'une couche d'agarose à 3%, puis d'une couche à 2%. Ce type de construction n'a pas permis d'orienter la synthèse matricielle en faisant varier les propriétés mécaniques de l'hydrogel. Ces résultats les ont encouragés à faire varier la composition du biomatériau et le phénotype des cellules entre les couches (Ng et al. 2009).

C. Variation de la composition du biomatériau et du phénotype cellulaire

Différentes équipes ont combiné les deux stratégies précédentes en ensemencant des cellules de phénotypes différents dans une structure stratifiée composée de différents biomatériaux ou d'un même biomatériau à différentes concentrations (Spalazzi et al. 2008; Ng et al. 2009). L'objectif est de trouver la meilleure combinaison entre le ou les phénotypes cellulaires utilisés et les biomatériaux, et de profiter de l'influence du biomatériau sur les cellules mais aussi de l'influence de la co-culture de deux types cellulaires. En effet, lorsque des chondrocytes de la

zone superficielle du cartilage (S) et ceux de la zone moyenne (M) sont cultivés seuls dans leur biomatériau, les synthèses de GAG et de collagène semblent moins abondantes qu'en co-culture (Ng *et al.* 2009). De plus, l'augmentation de la concentration semble augmenter la synthèse de ces composants de la MEC (figure 20). Quand aux chondrocytes de la zone moyenne, leur synthèse semble être peu influencée par leur co-culture avec ceux de la zone superficielle.

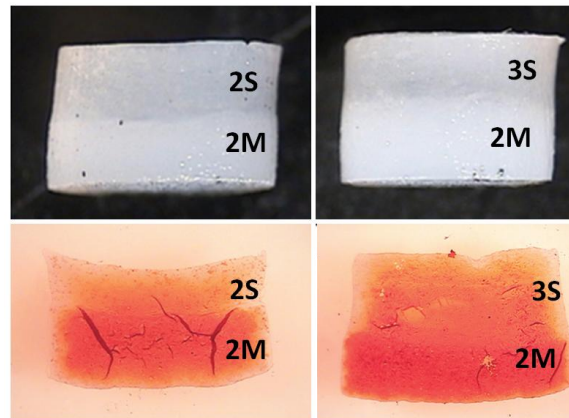


Figure 20 : Hydrogel stratifié d'agarose ensemencé de différents phénotypes de chondrocytes

*Des hydrogels stratifiés d'agarose ont été fabriqués en apposant deux couches d'agarose de la même ou de différentes concentrations. Ainsi, des hydrogels composés uniquement d'agarose à 2% (2) ont été fabriqués avec une couche ensemencée de chondrocytes de la zone superficielle (2S) et dans l'autre des chondrocytes de la zone moyenne du cartilage (2M). Des autres hydrogels ont été construits avec une couche supérieure d'agarose à 3% (3S). Après 42 jours de culture, une coloration Safranin-O a mis en évidence les GAG. Les chondrocytes M les synthétisent plus que les S. Le changement de concentration de l'agarose augmente légèrement la production de GAG dans la couche superficielle. (Ng *et al.* 2009)*

Ainsi, Spalazzi *et al.* ont créé une construction à 3 couches en terme de matériaux synthétiques et de types cellulaires (Spalazzi *et al.* 2008). Ainsi, des fibroblastes ont été ensemencés dans du polyglactin, des chondrocytes ont été suspendus dans de l'agarose qui a été déposé sur la couche d'acide poly (D,L - lactic - co - glycolic) (PLGA) , et enfin la couche inférieure composée de PLGA a été ensemencée d'ostéoblaste. Après 8 semaine *in vivo*, une synthèse matricielle spécifique du cartilage (collagène de type II, GAG) a été observée, mais des collagènes de type I et X qui sont respectivement spécifiques de l'os et du cartilage hypertrophique ont été observés.

D. Construction d'un hydrogel stratifié sans aucune variation

L'alginate de sodium forme un hydrogel après la polymérisation du gel en présence d'ion bivalent, ce qui rend impossible la superposition de deux hydrogels sans manipulation particulière. Cependant, Lee *et al.* ont utilisé un mode de polymérisation lente en présence de sulfate de calcium (CaSO_4) pour construire des structures bistratifiées (Lee *et al.* 2007). Après la construction séparée des deux couches de l'hydrogel contenant des chondrocytes, les surfaces qui seront à

l'interface des deux strates, ont été dépolymérisées en présence de citrate-EDTA, puis apposées. La polymérisation de l'ensemble a été finalisée dans un bain de chlorure de calcium (figure 21). Pour vérifier la solidité de l'ensemble, des tests mécaniques ont montré que les propriétés mécaniques de l'hydrogel stratifié ne sont pas altérées par rapport à celles d'un hydrogel à une couche de la même épaisseur. Il est important de noter qu'à l'interface des deux couches, les cellules peuvent être mélangées.

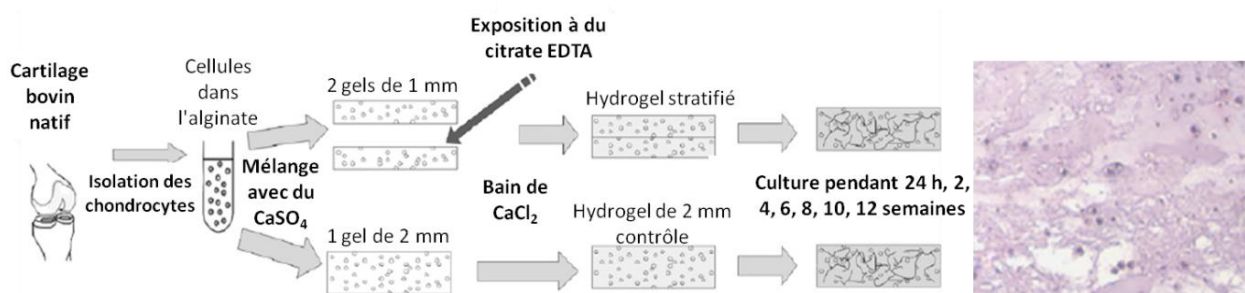


Figure 21 : Mode de fabrication d'hydrogels stratifiés imaginés par Lee et al.

Pour obtenir un hydrogel bistratifié, des gels d'alginate contenant les chondrocytes ont été homogénéisés avec du sulfate de calcium (CaSO_4) qui permet une polymérisation lente. Puis une solution de citrate-EDTA a été déposée sur les surfaces qui seront à l'interface des couches, dans le but de chélater les ions Ca^{2+} des chaînes d'alginate et dissoudre partiellement le gel. Les couches ont ensuite été apposées l'une sur l'autre. Enfin, l'ensemble a été plongé dans une solution de chlorure de calcium pour terminer la polymérisation de l'hydrogel. Au final, une structure bistratifiée a été obtenue. (Lee et al. 2007)

Objectifs de la thèse

Le présent travail s'intègre dans le projet "Preparation of structured cartilageneous biomaterials by controlled cell and matrix spraying" regroupant l'UPR 22 CNRS, l'UMR 595 (Strasbourg) et l'UMR 7561 (Vandoeuvre-lès-Nancy). Ce projet, financé par l'ANR, en 2006, repose sur une démarche **innovante** et **originale** consistant à préparer des biomatériaux fonctionnalisés composites renfermant des cellules, des facteurs de croissance et divers éléments matriciels au sein d'architectures parfaitement contrôlées.

Au sein de ce projet, l'objectif de cette thèse est de créer un hydrogel stratifié fonctionnalisé applicable à l'ingénierie du cartilage. Le cartilage est structuré en 3 couches successives de composition et de structure différentes : (i) superficielle, dédiée au glissement des surfaces, (ii) intermédiaire, servant à l'amortissement, (iii) profonde, consacrée à l'ancrage dans l'os. Peu d'études prennent en compte cette organisation zonale du cartilage lors de la fabrication de biomatériaux. Ceci nous conduit à proposer d'associer des composants matriciels de natures différentes, afin de promouvoir une réparation zonale proche du cartilage natif, donc plus propice à une meilleure bio-intégration d'un implant ostéochondral à visée articulaire. Dans ce travail, nous proposons d'utiliser un nouveau type de biomatériau composite qui vise à reproduire la structure de chaque couche de cartilage (zone profonde d'ancrage, intermédiaire et surface pour le glissement) la plus apte à une recolonisation cellulaire optimale.

Pour cela, nous adapterons le procédé de construction "layer-by-layer" (couche par couche) qui permet d'obtenir des hydrogels stratifiés en pulvérisant alternativement les différents composants (gel d'alginate et multicouches de polyélectrolytes). Jusqu'à présent, cette méthode permettait d'obtenir uniquement des structures de quelques centaines de micromètres, alors qu'une épaisseur de 1 à 2 millimètres est requise pour l'ingénierie du cartilage.

Ainsi, notre travail s'est ordonné autour de 3 axes.

- La validation et la faisabilité du procédé de pulvérisation pour l'ingénierie du cartilage :

Cette première partie du projet a consisté à définir les paramètres de pulvérisation à l'aide d'un styilet aérographe, et d'adapter la technique à la pulvérisation d'hydrogels liquides, à forte viscosité. Pour cela, des hydrogels d'alginate de sodiumensemencés de chondrocytes de rat ont été construits par pulvérisation et par moulage (technique de référence). L'impact de la pulvérisation des cellules ensemencées dans le gel d'alginate a été évalué pour différentes pressions (0,9 et 1,2 bar) en analysant, au cours de la culture la viabilité des cellules, leur

production de nitrite, leur répartition dans le gel et la synthèse matricielle (figure 22). Hormis le comportement des cellules, les propriétés mécaniques des hydrogels pulvérisés et moulés ont été explorées avec des tests de bipoinçonnement qui permettent d'appliquer des contraintes dans toutes les directions similaires à ce que le cartilage subi *in vivo* (figure 22).

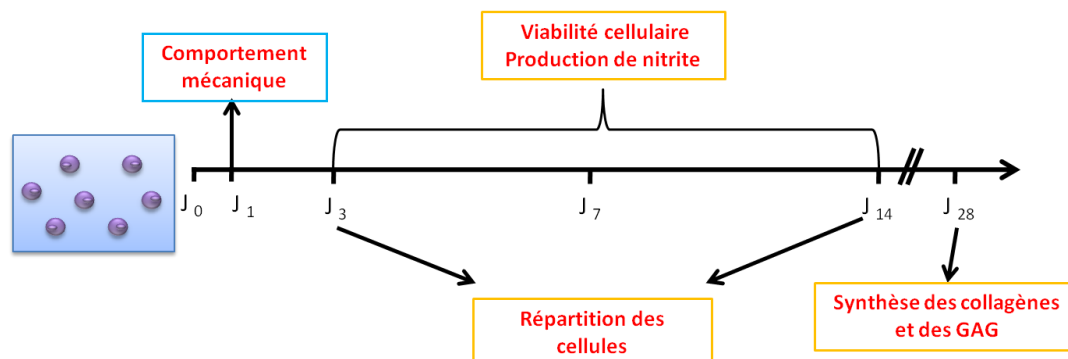


Figure 22 : Paramètres étudiés pour valider la faisabilité du procédé de pulvérisation

- **Construction par pulvérisation d'hydrogels stratifiésensemencés en CSM humaines** : les chondrocytes humains sains étant difficiles à obtenir en grande quantité, des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse ont été utilisées. Dans la continuité des travaux déjà réalisés au sein de l'équipe de recherche (Wang 2007), les cellules ont étéensemencées dans un hydrogel d'alginate de sodium supplémenté en acide hyaluronique (Alg/HA). Après pulvérisation et polymérisation, les hydrogels ont été cultivés dans un milieu chondrogénique et les paramètres biologiques des cellules (répartition des cellules, viabilité cellulaire, activité métabolique, et expression génique) ont été suivis pendant 28 jours (figure 23). Puis, des hydrogels bistratifiés composés de deux couches d'Alg/HA ont été construits. Des multicouches de polyelectrolytes (PLL/HA) ont servi à séparer ces deux couches et à maintenir leur cohésion au cours de la culture. Le maintien de l'intégrité du biomatériau stratifié, la migration des cellules, la synthèse matricielle ont été explorées au cours des 56 jours de culture. Enfin, des tests de bipoinçonnement ont été réalisés sur des hydrogels sans cellule à une ou deux couche(s) pour évaluer l'influence de la composition et de la stratification sur leurs propriétés mécaniques.

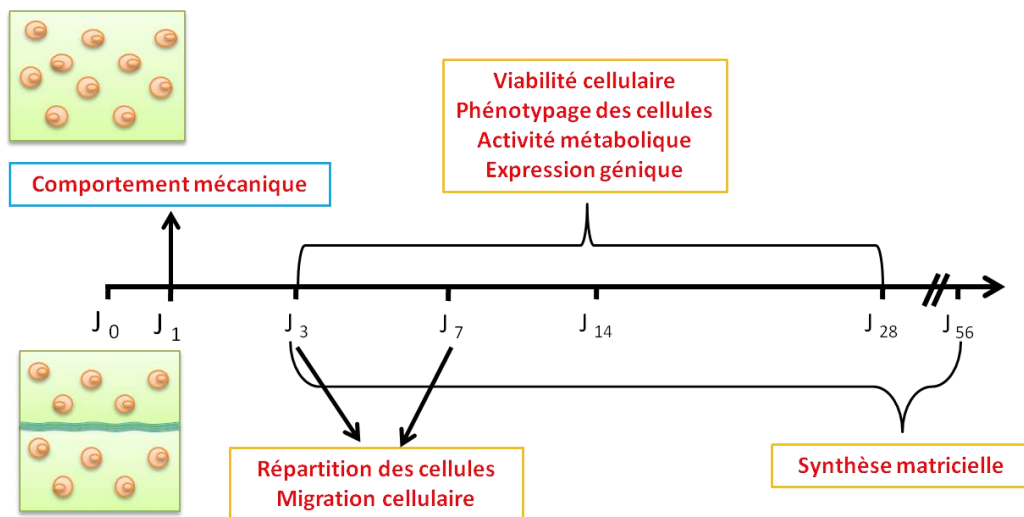


Figure 23 : Paramètres étudiés au cours de la seconde étape de ce travail

- **Fonctionnalisation des biomatériaux par apport d'éléments constitutifs et par stimulation mécanique** : des cellules souches mésenchymateuses ont été cultivées dans des hydrogels stratifiés composés :

- d'alginate supplémenté en acide hyaluronique dans les deux couches et séparés par 5,5 couches de polyélectrolytes (PLL/HA) : Alg/HA-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA,
- d'alginate supplémenté en hydroxyapatite (Hap) dans la couche inférieure et en acide hyaluronique (HA) dans la couche supérieure (Alg/HA-Alg/HAP). Des multicouches de polyélectrolytes (PLL/HA) séparent également ces couches entre elles : Alg/HA-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA

Ces dernières constructions ont été soumises à des stimulations mécaniques cycliques (1Hz) et intermittentes (4 heures par jour) pendant 28 jours. Le comportement des CSM a été exploré, au cours de la culture, en analysant la viabilité, le phénotype et le potentiel de différenciation en chondrocytes (expression génique et synthèse matricielle).

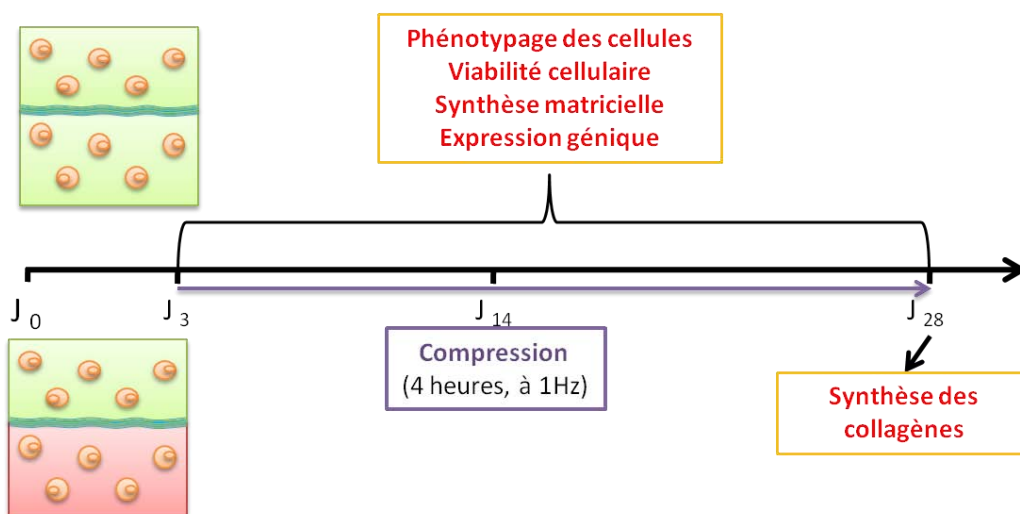
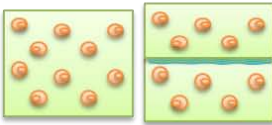
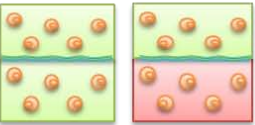


Figure 24 : Paramètres étudiés au cours de la troisième étape de ce travail

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

Le présent travail s'étant échelonné en 3 étapes, différentes sources cellulaires provenant de différentes espèces ont étéensemencées dans un hydrogel à base d'alginate construit à partir de différents procédés. Chaque étape ayant un objectif scientifique bien déterminé, plusieurs méthodes ont ainsi été utilisées. Afin de pouvoir fournir une vue d'ensemble, nous avons synthétisé dans le tableau I les caractéristiques et les techniques utilisées au cours des 3 axes de recherche.

Tableau I : Récapitulatif des méthodes utilisées pour chaque étape de l'étude

		Etape I	Etape II	Etape III
Objectif		Valider le procédé de pulvérisation	Valider la construction stratifiée par pulvérisation	Fonctionnaliser la construction stratifiée
Type de cellule		Chondrocyte de rat	Cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse humaine	Cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse humaine
Biomatériaux		Alginate de sodium à 1,5 %	-Alginate/acide hyaluronique (Alg/HA) à 1,5 % - PLL/HA (Poly-L-Lysine) 5,5 bicouches	- Alg/HA à 1,5 % - Alg/Hap à 1,5 % (Alginate + hydroxyapatite) - PLL/HA (Poly-L-Lysine) 5,5 bicouches
Méthode de fabrication de la structure		Moulage vs pulvérisation	Pulvérisation	Pulvérisation
Construction				
Phénotype cellulaire			X	X
Viabilité des cellules		X	X	X
Activités métaboliques			X	
Stress cellulaire (Nitrite)		X		
Répartition de l'actine dans les cellules		X	X	
Expression génique			X	X
Migration cellulaire			X	
Synthèse matricielle	GAG, collagène	X	X	X
	Collagènes de type I, II et X	X	X	X
Propriétés mécaniques (hydrogel sans cellule)		X		X

I. Extraction et culture primaire de cellules

Dans cette étude, les différents types cellulaires utilisés (chondrocytes et cellules souches mésenchymateuses) sont issus de tissus natifs et cultivés *in vitro* - ce sont des cultures primaires. Tout d'abord, des chondrocytes issus de têtes fémorales de rat ont été choisis pour la première étape de la recherche non seulement pour leur facilité d'obtention, mais également pour l'homogénéité et la reproductibilité de leur réponse. Puis, des cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse humaine ont été utilisées pour les étapes suivantes pour se rapprocher de l'ingénierie tissulaire stratifiée avec une application clinique.

A. Extraction de chondrocytes issus de têtes fémorales de rat

* Réactifs :

- Prélèvement du cartilage :

- Rats Wistar mâles de 200 grammes (Charles River, France)
- Anesthésiques : Kétamine, Imalgène 500® (CERP, France) + Vetranquille® à 1% (Ceva Santé Animal, France).

- Milieus de culture :

- Milieu de culture Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) F-12 (réf. 21331, Gibco, France)
- Sérum de veau fœtal (SVF, Sigma, France) décomplémenté à +56°C pendant 30 min (Gibco, France).
- L - Glutamine à 2 mM (réf. G7513, Sigma, France)
- Antibiotiques : Pénicilline à 10 mU/mL / Streptomycine à 10 ng/mL (P/S, réf. 15070-063, Gibco, France) et Amphotéricine B à 2,5 µg/mL (réf. 15290-026, Gibco, France).

Lorsque le milieu de base DMEM F-12 est supplémenté en antibiotiques, glutamine et SVF (10%, v/v), il forme le milieu complet "Chrat" (pour "**Chondrocytes de rat**").

- Enzymes :

- Pronase à 2 mg/mL (réf. P6911, Sigma, France), solubilisé dans une solution de NaCl à 0,9% contenant des antibiotiques.
- Trypsine-EDTA (réf. 25300-054, Sigma, France) en solution à 0,05% dilué de moitié avec de l'HBSS.

➤ Collagenase B à 2 mg/mL (réf. 1088815, Roche Applied Science, USA), dissous dans du milieu DMEM-F12 contenant des antibiotiques.

- Autres réactifs :

- Tampon Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, réf. H2387, Sigma, France)
- Tampon Phosphate Buffer Saline (PBS, réf. 14190, Invitrogène, France)
- Diméthyl Sulfoxide (DMSO, réf. D5879, Sigma, France)

*** Matériel :**

- Boîte de culture ventilée, avec un bouchon à filtre (CC7682-4875, CytoOne)
- Centrifugeuse "Labofuge 400" (Heraeus Instruments)
- Cryotube (366656, Nunc, Denmark)

*** Méthodologies :**

- Isolement des chondrocytes de rat :

Après avoir été anesthésiés, les rats sont sacrifiés par dislocation cervicale en respectant les bonnes pratiques de manipulation des animaux. Les têtes fémorales sont isolées pour faciliter le prélèvement du cartilage articulaire, puis le cartilage est retiré, et lavé dans une solution d'HBSS contenant des antibiotiques. Après avoir enlevé le surnageant, 30 mL de solution de pronase sont ajoutés aux têtes fémorales et incubés pendant 2 heures à +37°C, 5% CO₂, pour dissoudre tout autre tissu qui serait présent sur le cartilage (ligament, tendon). Le surnageant est éliminé après un lavage avec du PBS, puis 30 mL de solution de Collagenase B sont ajoutés, et l'ensemble est incubé toute une nuit à +37°C sous agitation.

- Culture primaire de chondrocytes en monocouche :

Après une nuit d'incubation, les chondrocytes sont dissociés du tissu et le surnageant est transféré dans un tube stérile, puis centrifugé pendant 10 min à 300g. Après avoir suspendu le culot cellulaire dans du milieu complet "Chrat", les cellules sontensemencées dans des boîtes de culture à 13 300 cellules/cm² et incubées à +37°C, 5% CO₂. Le milieu de culture des chondrocytes est renouvelé après 24 heures, puis changé 2 fois par semaine jusqu'à l'obtention de 80% de confluence, c'est-à-dire jusqu'au recouvrement de 80% de la surface de la boîte de culture par les cellules. Cette opération permet d'obtenir une culture primaire de chondrocytes de rat à un passage 0 (P0). A ce stade, la morphologie hexagonale, spécifique des chondrocytes, est

observable (figure 25-A). Par la suite, les cellules seront ensemencées dans un biomatériau après une amplification jusqu'à la fin de P1. En effet, au-delà de ce passage, la dédifférenciation chondrocytaire devient trop importante, comme l'indique le changement de morphologie des cellules qui devient fusiforme (Kino-Oka *et al.* 2005), (figure 25-B).

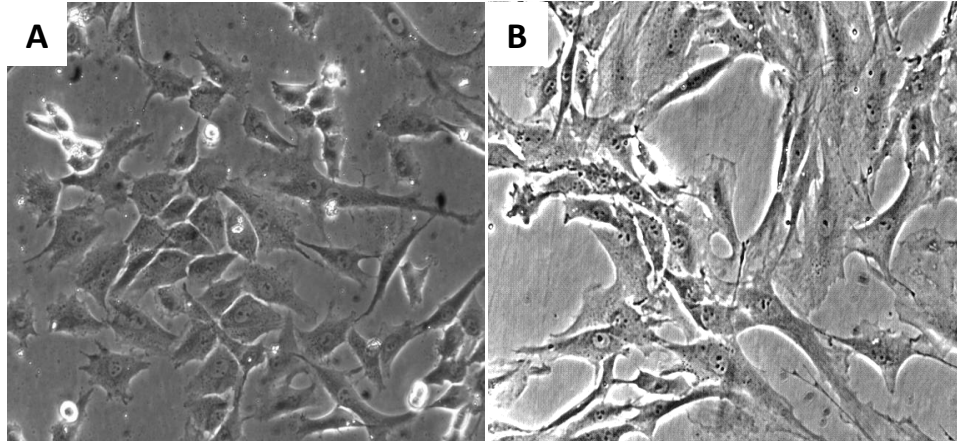


Figure 25 : Morphologies des chondrocytes de rat cultivés en monocouche

Après 6 jours de culture à P0, les chondrocytes adoptent une forme hexagonale (A). Cependant au cours de l'amplification, la dédifférenciation des cellules induit un allongement de ces dernières (B).

- Passage, congélation et décongélation des cellules :

A subconfluence, les cellules sont détachées de leur support de culture. Pour éliminer le SVF qui inhiberait la trypsine et qui est présent dans le milieu de culture, les cellules sont rincées 2 fois avec une solution d'HBSS. Puis, une solution de trypsine à 0,025% est ajoutée dans la boîte de culture et laissée au contact des cellules pendant 5 min à +37°C. Pour stopper l'action de l'enzyme, du milieu complet "Chrat" est ajouté. Le surnageant contenant les cellules est récupéré, puis centrifugé à 300g pendant 10 min.

Pour poursuivre l'amplification des chondrocytes, ils sont ensemencés à la même densité que précédemment (13 300 cellules/cm²).

Pour conserver des cellules inutilisées, le culot cellulaire est suspendu dans du SVF supplémenté avec 10% de DMSO à 2.10⁶ cellules/mL. La suspension cellulaire est réfrigérée à +4°C pendant 30 min, puis 30 min à -20°C et enfin conservée à -80°C. Pour une conservation plus longue dans le temps (supérieure à 1 mois), les échantillons peuvent être maintenus à -196°C dans de l'azote liquide.

Pour remettre en culture des cellules conservées à -80°C, la suspension cellulaire est ramenée à +37°C en la mélangeant avec du milieu complet de culture à cette même température. Après centrifugation pendant 10 min à 300g, le culot cellulaire est suspendu dans du milieu complet et les cellules sont ensemencées avec du milieu complet supplémenté à 20% de SVF. Enfin, le renouvellement du milieu de culture est fait deux fois par semaine.

B. Isolement de cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse

Les cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse humaine (CSM) utilisées proviennent de pose de prothèse totale de hanche ou de moelle osseuse saine (UTCT).

* Réactifs :

- Milieus de culture :

- Milieu de culture Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose (réf. 31885, Gibco, France)
- Sérum de veau fœtal (SVF, Sigma, France) décomplémenté à +56°C pendant 30 min.
- L-Glutamine à 2 mM (réf. G7513, Sigma, France)
- Antibiotiques : Pénicilline à 10 mU/mL / Streptomycine à 10 ng/mL (P/S) (réf. 15070-063, Gibco, France) et Amphotéricine B à 2,5 µg/mL (réf. 15290-026, Gibco, France).
- human Fibroblaste Growth Factor (FGF) à 1 ng/mL (réf. 234-FSE, RcDSYSTEMS)

Lorsque le milieu de base DMEM low glucose est supplémenté en antibiotiques, glutamine, SVF (10%, v/v) et FGF, il forme le milieu complet "CSM".

- Autres réactifs :

- Tampon Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (réf. H2387, Sigma, France)
- Solution de Leucoplate (réf. 3101.002, Sobiocell, France)
- Héparine (H3393, Sigma) diluée à 5 000 unités pour 20 mL d'HBSS

* Matériel :

- Boîte de culture ventilée, avec un bouchon à filtre (CC7682-4875, CytoOne)
- Centrifugeuse "Labofuge 400" (Heraeus Instruments)

* Méthodologie :

Lors d'une intervention chirurgicale pour une pose de prothèse totale de hanche, les extrémités des os sont coupées ou le cartilage atteint enlevé. Ainsi, de la moelle osseuse contenant des cellules souches mésenchymateuses est libérée. A l'aide d'une seringue, la moelle osseuse est récupérée et mise en suspension dans une solution d'HBSS héparinée pour éviter la coagulation des plaquettes.

Cette suspension contient plusieurs types de cellules (globules rouges, cellules mononuclées). Ainsi, 20 mL de milieu complet "CSM" est ajouté à la suspension, puis elle est

centrifugée pendant 10 min à 300g pour séparer les cellules des liquides (milieu de culture et sérum). Du milieu complet "CSM" est à nouveau ajouté, puis seules les cellules mononuclées sont comptées et mises en culture. Pour cela, 190 μL d'une solution de Leucoplate sont ajoutés à 10 μL de la suspension cellulaire pour effectuer le comptage des cellules en l'absence des globules rouges, qui sont lysés par cette solution. Enfin, les cellules sontensemencées à 50 000 cellules mononuclées/ cm^2 , puis cultivées avec du milieu complet "CSM". L'entretien de la culture se fait deux fois par semaine avec du milieu complet "CSM".

Les protocoles d'amplification de P0 à P3 et de conservation des cellules à -80°C sont identiques à ceux décrits dans le paragraphe précédent (cf. II-A-1). Cependant, après le premier passage, P0, les cellules sontensemencées à 1 000 cellules/ cm^2 .

II. Construction de biomatériaux tridimensionnels à base d'alginate de sodium

* Principe :

L'alginate de sodium est un polysaccharide composé d'acide mannuronique et guluronique en différentes proportions en fonction de son origine (algue ou bactérien). Il a la propriété de se polymériser en présence d'ions bivalents, comme les ions calcium Ca^{2+} , et de former ainsi un hydrogel dont on peut faire varier la rigidité en modifiant le temps de polymérisation et la concentration de la solution de polymérisation (Kuo *et al.* 2001). Des liaisons ioniques entre les chaînes du polysaccharide et les ions Ca^{2+} forment des "boîtes à œuf" et permettent la cohésion des chaînes entre elles et donc la solidification du gel d'alginate en hydrogel (figure 26). Les techniques actuelles permettent de construire des billes mais aussi des formes très différentes à l'aide de moules (Sharma *et al.* 2007).

L'objectif de l'étude est de donner une alternative aux techniques existantes pour permettre de construire des structures stratifiées. Ainsi, nous avons adapté pour l'ingénierie du cartilage un procédé de fabrication d'hydrogel d'alginate par pulvérisation (Navarro *et al.* 2001; Grant *et al.* 2002; Hafez *et al.* 2003). Cette dernière permet notamment d'obtenir des hydrogels fins. Pour valider ce procédé, les résultats ont été comparés avec une méthode de moulage plus couramment utilisée pour la construction d'hydrogel à base d'alginate (Wong *et al.* 2001).

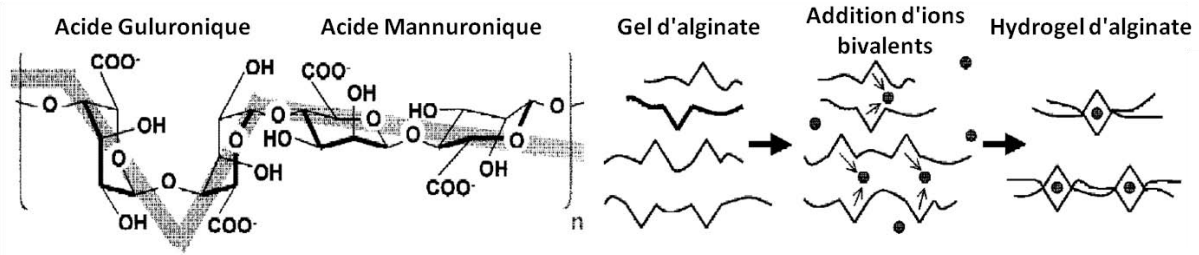


Figure 26 : Structure de l'alginate et polymérisation de ses chaînes

Les chaînes d'alginate sont composées d'une succession d'acide guluronique et mannuronique en différentes proportions en fonction de son origine. Les chaînes du polysaccharide en suspension dans un liquide forment un gel, puis forment des liaisons ioniques avec des ions bivalents, comme le Ca^{2+} , pour former des "boîtes à œufs", et ainsi obtenir un hydrogel d'alginate. (Becker et al. 2001)

*** Réactifs :**

- Alginate de sodium, extrait d'algue brune, de viscosité moyenne avec une concentration en acide mannuronique de 65% (réf. A2033, Sigma, France), (1,5% ; p/v dans une solution de NaCl à 0,9%), poudre autoclavée 50 min à +120°C pour la stérilisation.
- Acide hyaluronique (HA, réf. 25177, Acros, USA) ; dissous à 1 mg/mL de solution de rinçage pour la construction des multicouches de polyélectrolyte.
- Nanoparticules d'hydroxyapatite (Hap) d'un diamètre de 5 à 25 μm (lot n°525-090601, Science Applications Industries, Lyon, France).
- Poly-L-Lysine (PLL, réf. P2636, Sigma, France) à 1 mg/mL d'une solution de rinçage
- Solution de polymérisation : Chlorure de Calcium (CaCl_2) à 102 mM (réf. C4901, Sigma, France) + 10 mM de Tris (réf. 15 456-3, Sigma, France) dissous dans de l'eau distillée, pH 7,4.
- Milieu complet "Chrat" supplémenté de 1 mM de CaCl_2 forment le milieu "Chrat - CaCl_2 " (composition cf II-A-1).
- Milieu de différenciation : DMEM high glucose à 4,5 g/L de glucose (réf. 41965, Gibco, France) supplémenté de 1 mM de pyruvate de sodium (réf. P-5282, Sigma, France), 300 μM de L-proline (réf. P-5607, Sigma, France), 280 μM de L-acide ascorbique (réf. A-4544, Sigma, France), 1 mM de CaCl_2 , 100 nM de dexaméthasone (réf. D2915, Sigma, France) et 10% de SVF (v/v).
- Solution de rinçage : NaCl à 0,9% + 10 mM de Tris (réf. 15 456-3, Sigma, France) dissous dans de l'eau distillée, pH 7,4.

*** Matériel :**

- Moules en inox (Wong et al. 2001) montés avec des filtres de 5 μm de taille de pore (réf. SMWPO4700, MF™ Membrane Filters, Millipore, Suisse), voir figure 27-A.
- Seringue de 10 mL (réf. 309110, BD)

- Aiguille (réf. 301155, BD)
- Biopsy Punch (poinçon), diamètre de 5 mm (réf. 505, Stiefel, Allemagne)
- Système de pulvérisation : compresseur (FengHua BiDa, Chine), buse-VL + réservoir (Paasche®, USA, figure 27-B).

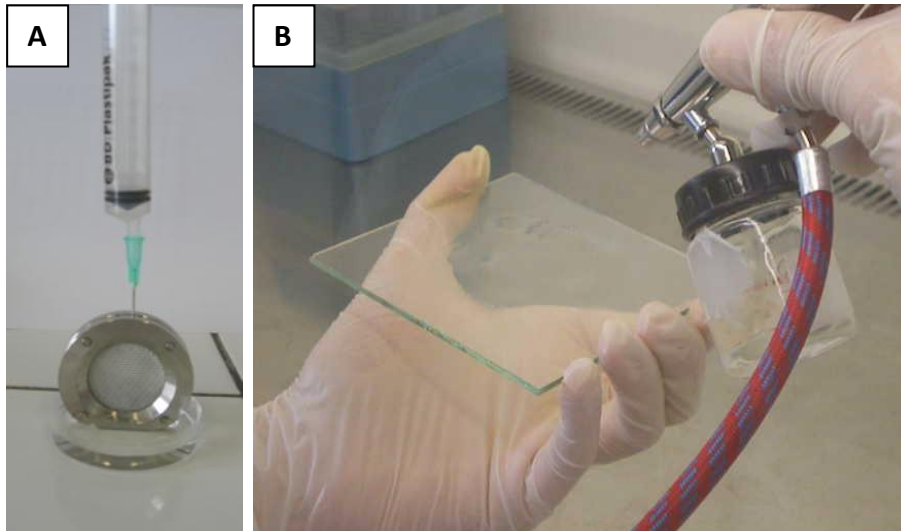


Figure 27 : Techniques de moulage (A) et de pulvérisation (B) des gels d'alginate

Pour obtenir un hydrogel d'alginate, le gel a été préalablement injecté dans un moule (moulage, A) ou pulvérisé sur une lame de verre (B). Puis, le support (moule ou lame de verre) est plongé dans un bain de CaCl_2 pour polymériser le gel. Il est important de noter que les cellules sontensemencées dans le gel, avant le moulage ou la pulvérisation.

A. Moulage d'un gel d'alginate de sodium

Le moulage est un procédé employé couramment avec l'alginate de sodium, il sera utilisé pour construire des hydrogelsensemencés ou non de chondrocytes de rat. Pour les expérimentations mécaniques, les hydrogels ne contiennent pas de cellules, et pour les analyses du métabolisme des cellules, des cylindres dits "blancs", c'est-à-dire sans cellule, sont fabriqués pour servir de "contrôle biomatériaux".

Pour construire les hydrogels moulés, des chondrocytes de rat sont homogénéisés avec un gel d'alginate de sodium à 1,5%, à une densité de $2 \cdot 10^6$ cellules/mL. Le gelensemencé est injecté à l'aide d'une seringue de 10 mL et d'une aiguille dans un moule stérile. Pour permettre la polymérisation du gel, ce moule est immergé dans une solution de CaCl_2 à 102 mM à $+37^\circ\text{C}$ pendant 15 min. Enfin, l'hydrogel est lavé deux fois avec une solution de NaCl à 0,9% avant d'être découpé sous forme de cylindres de 5 mm de diamètre qui sont ensuite mis en culture dans du milieu "Chrat - CaCl_2 ".

B. Mise au point de la pulvérisation de gel d'alginate de sodium

1. Technique originale de pulvérisation

La technique originale consiste à pulvériser le gel d'alginate sur une lame histologique inclinée à 45° pendant quelques secondes, puis de pulvériser la solution de CaCl_2 quelques secondes sur le gel (figure 28 étape 1-2, à gauche). L'inclinaison de la lame permet d'obtenir une première couche d'hydrogel fine et homogène. Pour permettre la cohésion de deux couches d'alginate, des films multicouches de polyélectrolytes sont construits pour servir de ciment entre les deux strates. Ainsi, les multicouches sont créées en alternant le dépôt d'une couche de polycation et de polyanion (figure 28 étape 3, à gauche). Enfin, ces étapes sont alternées pour construire des hydrogels stratifiés dont l'épaisseur est fine, de l'ordre de quelques dizaines de micromètres (Mjahed *et al.* 2008; Grossin *et al.* 2009).

2. Adaptation de la technique de pulvérisation

Afin de pouvoir construire un biomatériau stratifié de plusieurs millimètres d'épaisseur, il a fallu adapter la technique d'origine. Les adaptations ont concerné plus particulièrement : le support, l'inclinaison de la lame, les modalités de polymérisation et la viscosité du polysaccharide à polymériser.

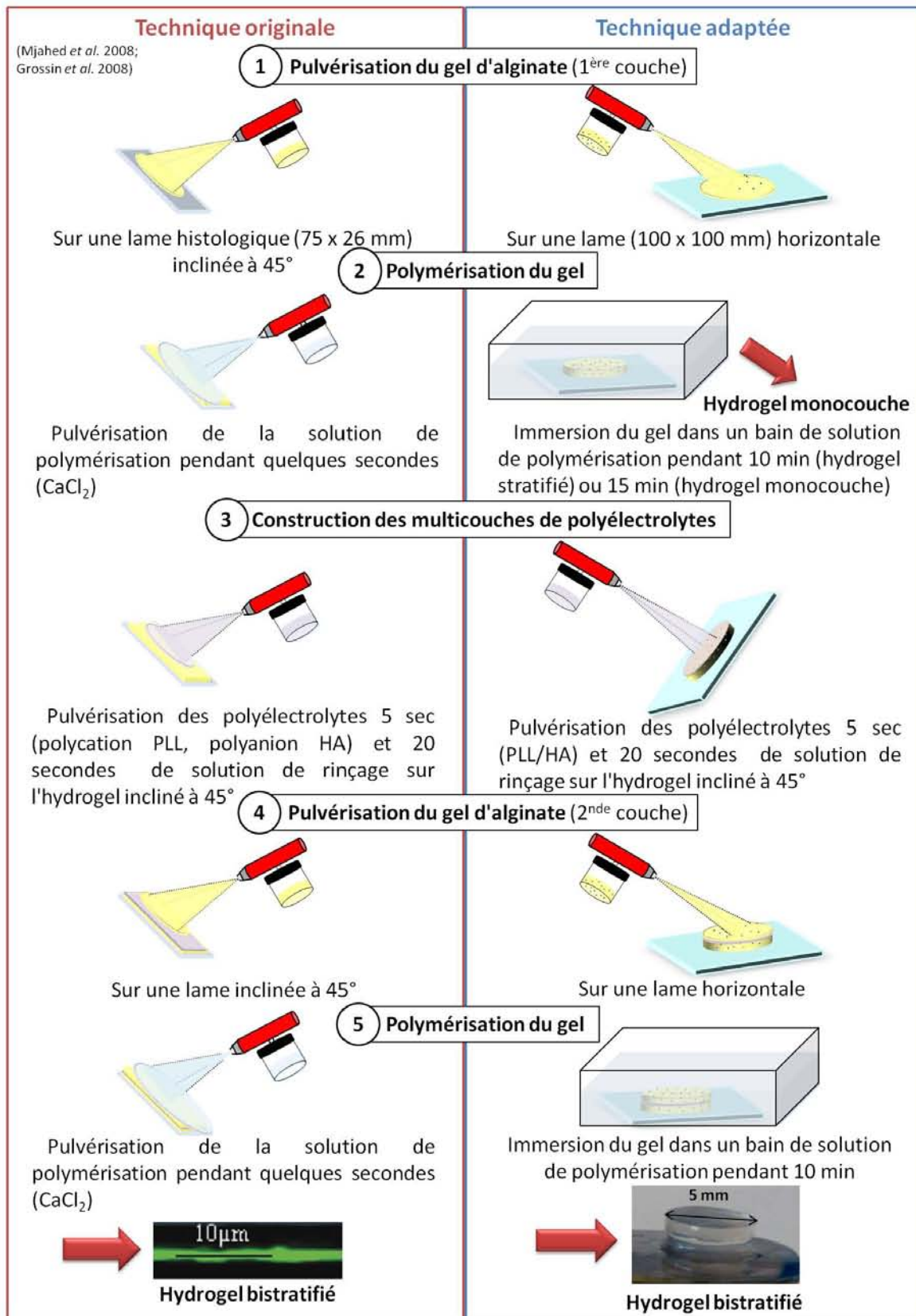


Figure 28 : Comparaison des procédés de construction originale et adaptée

La construction de gel bistratifié a été adaptée par rapport à la technique originale de construction décrite par Mjahed et al. et Grossin et al. Les 5 étapes de construction d'un hydrogel d'alginate sont : la pulvérisation du gel, la polymérisation, la construction des films multicouches de polyélectrolytes, la pulvérisation de gel sur la première couche d'hydrogel et enfin la polymérisation de la seconde couche. La technique originale permettait d'obtenir un gel fin (image en bas à gauche extraite de Grossin et al. 2009) ; alors que les changements d'inclinaison de la lame (étapes 1 et 4), de support, et la polymérisation du gel

par immersion dans un bain (étapes 2 et 5), ont permis de construire un hydrogel bistratifié d'environ 2 mm d'épaisseur (image en bas à droite). Il est important de noter que la construction des films multicouches de polyélectrolytes a été inchangée (étape 3).

a. Le type de support et son inclinaison

L'adaptation du support s'est faite en augmentant la surface de pulvérisation, en passant d'une lame histologique de dimensions 75 x 26 mm à une lame de 100 x 100 mm (figure 28, étape 1). Ainsi, le volume de gel pulvérisé est plus important et les hydrogels obtenus ont une épaisseur et une surface plus importantes. Ceci a permis aussi d'obtenir plus de matériel pour les tests biologiques et mécaniques et d'obtenir des hydrogels d'une épaisseur plus satisfaisante pour l'ingénierie du cartilage (environ 2 mm).

En revanche, l'augmentation du volume d'alginate pulvérisé a modifié l'orientation de la lame lors de la pulvérisation. Il a fallu laisser la lame horizontale et non inclinée à 45°, pour éviter que le gel ne s'échappe de la lame. De plus, nous avons orienté la buse obliquement à la lame (45°) pour que l'énergie d'impact soit diminuée sur les cellules et ainsi atténuer le stress qu'elles subissent lors de la construction de l'hydrogel.

b. La polymérisation du gel

La polymérisation du gel se faisait originalement par pulvérisation de la solution de polymérisation (CaCl_2) pour permettre d'obtenir une fine couche d'hydrogel (figure 28, étape 2). Cependant le volume de gel d'alginate pulvérisé étant très supérieur dans cette étude, la polymérisation s'est faite dans un bain pour obtenir une polymérisation homogène dans toute l'épaisseur de l'hydrogel. En effet, la pulvérisation seule de la solution de polymérisation aurait fourni un hydrogel faiblement polymérisé. La combinaison de la pulvérisation et d'un bain de CaCl_2 aurait permis d'obtenir deux couches d'hydrogel juxtaposées, comme l'avait également remarqué Mjahed et al. avec un hydrogel plus fin (Mjahed *et al.* 2008) :

- la première couche (superficielle) résultant de la polymérisation de l'alginate pendant la pulvérisation de la solution de CaCl_2 ,
- la seconde correspondant au reste de gel d'alginate ayant polymérisé dans le bain de CaCl_2 .

c. La viscosité du gel

La viscosité de gels d'alginate à différentes concentrations a été évaluée, ainsi que la qualité de pulvérisation de ces mêmes gels. Il en a été déduit que la viscosité de l'alginate augmente exponentiellement en fonction de la concentration, et un **seuil de pulvérisation** a été déterminé à

180-200 mPa.s pour une pression de pulvérisation de 0,9 bar (figure 29).

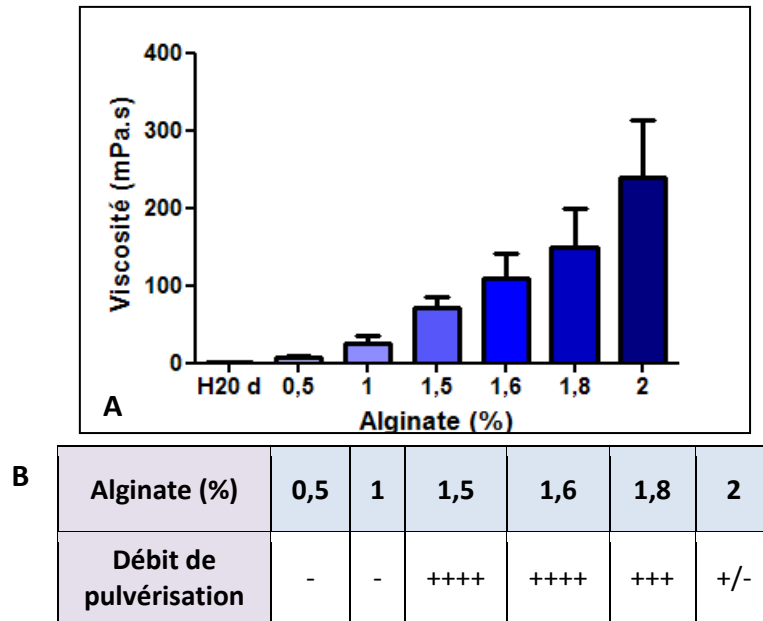


Figure 29 : Influence de la concentration d'un gel d'alginate sur sa viscosité et sa pulvérisation

La viscosité d'un gel d'alginate augmente de manière exponentielle par rapport à sa concentration (A). La qualité de la pulvérisation du gel diminue à partir d'une viscosité d'environ 200 mPa.s, pour une concentration d'alginate de 1,8-2%.

3. Construction d'un hydrogel d'alginate à une couche

Les hydrogels à une couche ont été utilisés dans la première étape de l'étude avec des chondrocytes de rat pour valider le procédé de pulvérisation, puis dans la seconde avec des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) pour valider la pulvérisation de ces cellules qui sont plus sensibles que les premières.

Les chondrocytes sont homogénéisés à 2.10^6 cellules/mL dans une solution d'alginate de sodium à 1,5%, puis pulvérisés sur une lame de verre à différentes pressions (0,9 ou 1,2 bar). Le gel pulvérisé est plongé **rapidement** dans une solution de CaCl_2 à 102 mM à +37°C (figure 28, étapes 1 et 2).

Après 15 min de polymérisation, l'hydrogel est lavé deux fois avec la solution de rinçage. Les cylindres sont découpés et cultivés de la même manière que pour les hydrogels moulés. Quant aux hydrogels ensemencés de CSM, ils sont construits de la même manière mais les cellules sont ensemencées à 3.10^6 cellules/mL dans un gel d'alginate supplémenté avec de l'acide hyaluronique.

Pour les tests mécaniques et les "contrôles biomatériaux" pour les tests d'Alamar Blue, le protocole de construction des hydrogels est identique, mais aucune cellule n'est ensemencée dans le gel.

4. Construction de biomatériaux multicouches par pulvérisation

L'intérêt de la construction multicouche est de pouvoir inclure différents constituant matriciels dans un même hydrogel sans mélange. Des biomatériaux multicouches ensemencés de CSM ont été construits par pulvérisation de gels d'alginate supplémentés en acide hyaluronique (Alg/HA, pour mimer les couches cartilagineuses supérieures) ou hydroxyapatite (Alg/Hap, pour mimer la couche calcifiée du cartilage), respectivement, à 20% et 5% du poids de la poudre d'alginate (figure 30). Ces constructions ont été utilisées pour valider la construction stratifiée par pulvérisation d'un gel d'alginate et pour étudier la différenciation des CSM dans cet environnement (cf. Objectifs de la thèse).

Les hydrogels bistratifiés sont construits en 5 étapes, et les tristratifiés en 8 étapes. Le volume total de gel pulvérisé est conditionné par le nombre de cellules obtenues après leur détachement du support de culture. Les CSM sont amplifiées jusqu'à la fin du passage 3 et sont ensemencées à 3.10^6 cellules/mL de gel à base d'alginate à 1,5%. Le volume d'alginate pulvérisé est divisé en 2 volumes pour des constructions à 2 couches, 60% pour la première couche pulvérisée (couche inférieure) et 40% pour la seconde. Pour une construction tristratifiée, la répartition est de 50% pour la première, 30% pour la seconde et 20% pour la dernière.

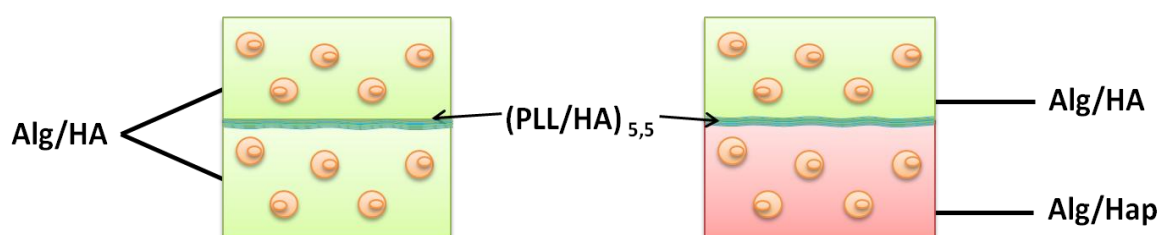


Figure 30 : Constructions multicouches (de la présente étude)

Deux motifs de constructions bistratifiées ont été réalisés : des constructions composées uniquement d'alginate/acide hyaluronique (Alg/HA), Alg/HA-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA, pour valider la construction stratifiée et des constructions d'alginate/hydroxyapatite-Alg/HA, Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA, pour guider la différenciation des CSM vers deux phénotypes différents : chondrocytaire pour l'Alg/HA et des cellules osseuses avec l'Alg/Hap. Les deux couches sont solidarisées grâce à la construction de multicouches de polyélectrolytes de poly-L-lysine/HA sur la première couche d'hydrogel.

Les premières étapes de construction permettent d'obtenir un hydrogel de la même manière que pour la fabrication d'un hydrogel à une couche. Puis, pour déposer une seconde couche, un film multicouche de polyélectrolytes (MPE) est déposé pour souder les deux couches d'un hydrogel (figure 28, étape 3). En effet, l'alginate étant chargé négativement, le film multicouche de polyélectrolytes va avoir une première et une dernière couche chargées positivement. Ainsi, les ions positifs des polyélectrolytes et négatifs de l'alginate peuvent créer des liaisons électrostatiques qui vont souder toutes les strates ensemble. Ainsi, la troisième étape consiste en la pulvérisation alternative de polyélectrolytes positifs, PLL (Poly-L-Lysine), suivi d'un lavage avec la

solution de rinçage pendant 20 secondes, puis la pulvérisation de polyélectrolytes de charge négative, HA, suivi du lavage. La lame doit être inclinée d'environ 45° pendant la construction des MPE pour obtenir des épaisseurs de couches homogènes sur toute la surface de l'hydrogel. Les bicouches de polyélectrolytes sont construites 5,5 fois pour terminer par une couche de PLL qui permet l'adhésion de la seconde couche de gel à la première.

Enfin, les 4^{ème} et 5^{ème} étapes consistent au dépôt et à la polymérisation d'une seconde couche de gel à base d'alginate (figure 28, étape 4-5). Lorsque la structure est constituée de 3 couches, les étapes 3 à 5 sont répétées une nouvelle fois.

Après la construction des biomatériaux stratifiés, l'ensemble est mis en culture avec du milieu de différenciation. Le milieu est renouvelé deux fois par semaine.

Pour les tests mécaniques, les hydrogels sans cellule sont conservés à +37°C jusqu'à l'utilisation dans une solution de rinçage supplémentée avec 2 mM de CaCl₂.

III. Fonctionnalisation du biomatériau par stimulation mécanique

* Principe :

Le cartilage articulaire est un tissu très sollicité mécaniquement et dont la composition de la matrice extracellulaire est liée aux contraintes subies (cf. I-A-3). Ainsi, la stimulation mécanique de cellules semble être un moyen intéressant pour améliorer la production matricielle de cellules natives du tissu ou pour induire la différenciation de cellules souches en chondrocytes, dans le cadre de la construction d'un néocartilage *in vivo*.

Dans cette étude, des stimulations mécaniques ont été appliquées uniquement sur des biomatériaux bistratifiés composés d'Alg/Hap-Alg/HA, etensemencés de CSM. L'influence de la stimulation a été explorée sur la différenciation des cellules souches et sur leur synthèse matricielle. Les échantillons soumis à des stimulations mécaniques seront dénommés "stimulés" (St) et ceux non stimulés seront dénommés "repos".

Dans cette étude, un appareil, le Flexer Cell®, sera utilisé pour appliquer des stimulations cycliques et intermittentes. Cette méthode a déjà été utilisée précédemment dans l'équipe de recherche, ce qui a permis de déterminer les paramètres optimaux en termes de rapport synthèse matricielle/fréquence et temps de stimulation (Thèse de Yun Wang et travaux de Céline Huselstein et coll.).

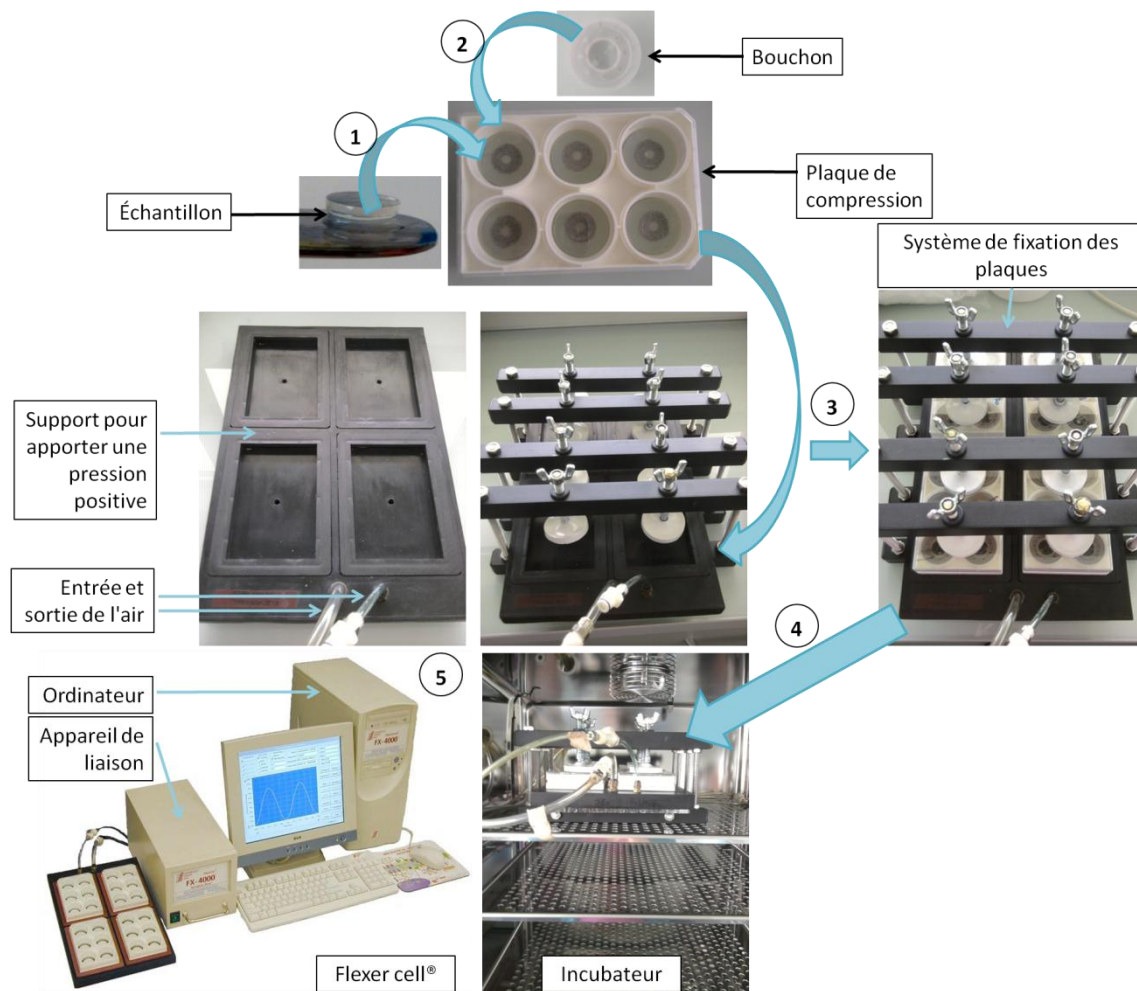


Figure 31 : Etapes de mise en place du système de compression

Après avoir placé les échantillons dans les puits des plaques de compression (1), des bouchons sont déposés sur les puits (2). Ainsi, l'échantillon est stabilisé sur les côtés par une mousse et par le bouchon. Puis, les plaques de compression sont immobilisées sur le support qui apporte une pression positive, avec le système de fixation de manière à rendre hermétique la partie inférieure de celles-ci (3). L'ensemble est placé dans un incubateur et relié par des tuyaux à un compresseur (4). Enfin, l'ordinateur du Flexer Cell® va indiquer au système de liaison de délivrer une pression positive dans les tuyaux, reliés au support en-dessous des plaques, pour induire la déformation des échantillons (5).

*** Matériel :**

- Plaques de compression (réf. BF300C, Dunn, Allemagne)
- Flexer cell® strain unit FX-4000™ (Dunn, Allemagne) :
 - un ordinateur (Flex Central®),
 - un logiciel (Flex Soft™ V4.0),
 - un compresseur (Jun Air, OF 302, Danemark),
 - un appareil de liaison avec le compresseur (Flex Link®),
 - une plaque pour rendre étanche la partie inférieure des plaques de compression (Flexer cell® positive pressure baseplate),
 - un support de fixation des plaques de compression et une plaque Plexiglas®

baseplate, qui seront dénommés "système de fixation".

* Méthodologie :

Des hydrogels bistratifiés d'Alg/Hap-Alg/HA ont été construits et cultivés *in vitro* comme décrit précédemment (cf. II-B-2-4). Des cylindres de 5 mm de diamètre sont découpés dans les hydrogels, puis placés dans les puits des plaques de compression (figure 31). Un bouchon est placé sur les puits pour empêcher l'hydrogel de se déplacer lorsque l'appareil va induire la déformation de l'échantillon. Les plaques sont ensuite placées sur le support Flexer cell® positive pressure baseplate, puis bloquées avec le système de fixation. En effet, pour appliquer la déformation de l'échantillon, une pression positive va être créée entre la partie inférieure des plaques et le support, ainsi, les membranes de silicone se déforment avec les échantillons qui y reposent.

Dans cette étude, après 3 jours de repos, une pression de consigne de 220 kPa est indiquée informatiquement et les échantillons sont stimulés 4 heures par jour avec des déformations cycliques, à une fréquence de 1 Hz, et appliquées par intermittence (30 min de stimulation, 30 min de repos), (figure 32).

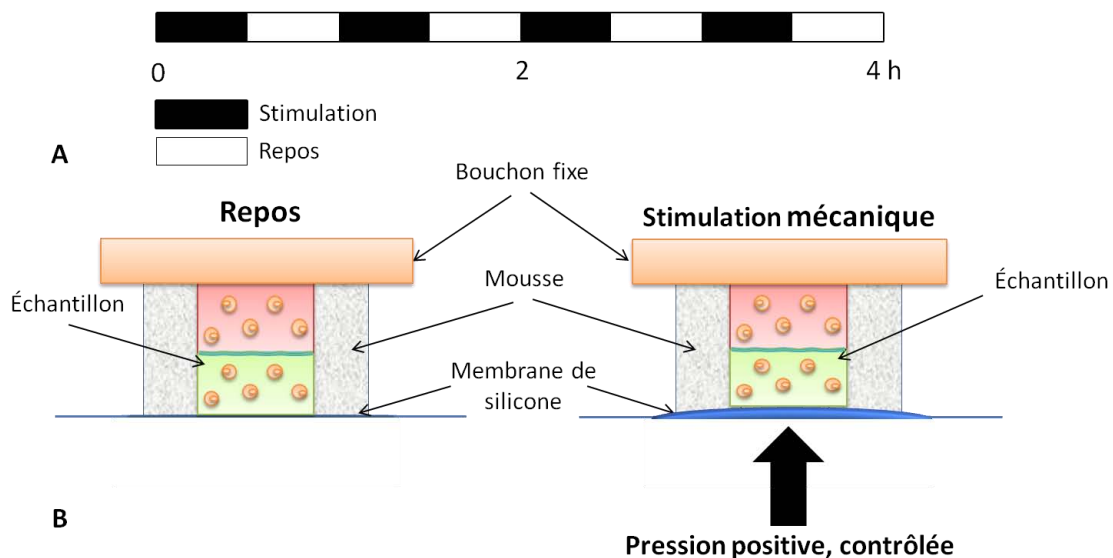


Figure 32 : Stimulation mécanique intermittente d'un hydrogel stratifié

Des hydrogels composés d'Alg/HA (vert) et d'Alg/Hap (rouge) ont été fonctionnalisés en stimulant les échantillons avec des déformations cycliques à 1 Hz pendant 4 heures, et de manière intermittente avec 30 min de stimulation et 30 min de repos (A). Pour se faire, des cylindres de 5 mm de diamètres sont placés dans un système composé d'une membrane de silicone, d'une mousse qui empêche l'échantillon de se déplacer et d'un bouchon sur le dessus qui retient l'échantillon lorsque celui-ci est soumis à une compression (B). L'échantillon est stimulé mécaniquement grâce à la déformation de la membrane de silicone lorsqu'une pression positive et contrôlée, est imposée sous la membrane.

IV. Analyses du comportement biologique des cellules

A. Etudes analytiques des cellules

1. Viabilité cellulaire

* Principes :

- La mort cellulaire (apoptose/nécrose) :

Les cellules peuvent mourir de deux manières : soit par apoptose (suicide cellulaire génétiquement programmé), soit par nécrose (destruction non programmée des cellules). Lors des premières étapes de l'apoptose, les phosphatidylsérines (PS) passent de la couche interne à la couche externe de la bicouche de phospholipides constituant la membrane plasmique des cellules. En effet, la cellule, en apoptose, ne dépense plus d'ATP pour compenser le "flip-flop" des phospholipides. L'annexine V est une protéine sur la face interne de la membrane phospholipidique et qui interagit avec la PS pour réguler l'organisation des microfilaments d'actine. Ainsi, son couplage à un fluorochrome permet de détecter les cellules apoptotiques dès que les PS sont exposées à l'extérieur des cellules (figure 33). D'autre part, lors de la nécrose ou dans les dernières étapes de l'apoptose, la membrane plasmique des cellules se détériore et ne joue plus son rôle de barrière sélective. Ainsi, l'iodure de propidium (IP), un intercalant de l'ADN, peut entrer dans les cellules et se fixer sur les acides nucléiques contenus dans le noyau (figure 33).

La proportion de cellules vivantes est mesurée en détectant la proportion de cellules qui entrent en apoptose (utilisation de l'annexine V couplée à un fluorochrome) et celles qui sont dans une phase de nécrose (utilisation de l'iodure de propidium). Ces deux marquages permettent ainsi de distinguer les cellules apoptotiques et nécrotiques.

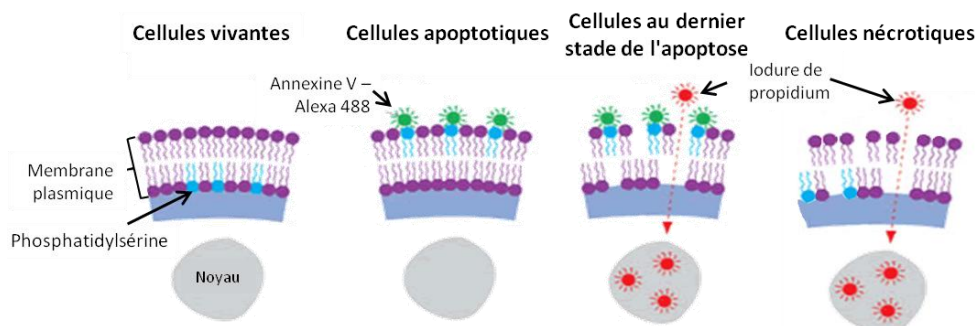


Figure 33 : Marquage des cellules apoptotiques et nécrotiques

Lorsque les cellules sont vivantes, la membrane plasmique sert de barrière sélective et est composée d'une bicouche de phospholipides dont la phosphatidylsérine (PS) qui se situe dans la couche interne de la membrane. Lorsque les cellules entrent en apoptose, la PS passe alors dans la couche externe. L'annexine V-Alexa 488 peut s'y fixer. D'autre part lorsque les cellules sont dans les derniers stades de l'apoptose ou en nécrose, la membrane plasmique devient perméable et permet à l'IP de s'intercaler dans les brins d'ADN. (Extrait de www.biomol.de)

- La cytométrie en flux :

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse semi-quantitative de signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux du laser. En effet, elle permet de distinguer des populations cellulaires en fonction de leur taille et de leur granulosité (dépendant de la composition du cytoplasme, des organites ...) et d'y sélectionner une population de cellules d'intérêt. Pour obtenir ces paramètres, les cellules passent une à une devant un laser (figure 34). Les signaux de la diffusion, récoltés sous un angle de 90° (Side Scatter, SSC), correspondent à la structure intracellulaire de la cellule (réfringence du cytoplasme, morphologie, rapport nucléocytoplasmique). Les signaux de diffraction sont récoltés, c'est-à-dire récoltés dans un petit angle de diffusion (Forward Scatter, FSC), et donnent des informations sur la taille des cellules. Enfin, après un immunomarquage fluorescent, le laser peut exciter le fluorochrome qui va émettre de l'énergie à une longueur d'onde supérieure à l'énergie du laser et la fluorescence va être captée par l'appareil. Ainsi, les données de ces trois paramètres vont être collectées par des photomultiplicateurs (PMT), puis amplifiées, numérisées, traitées et finalement stockées par un ordinateur. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres et permet de savoir pour une population donnée le pourcentage de cellules positives à un immunomarquage.

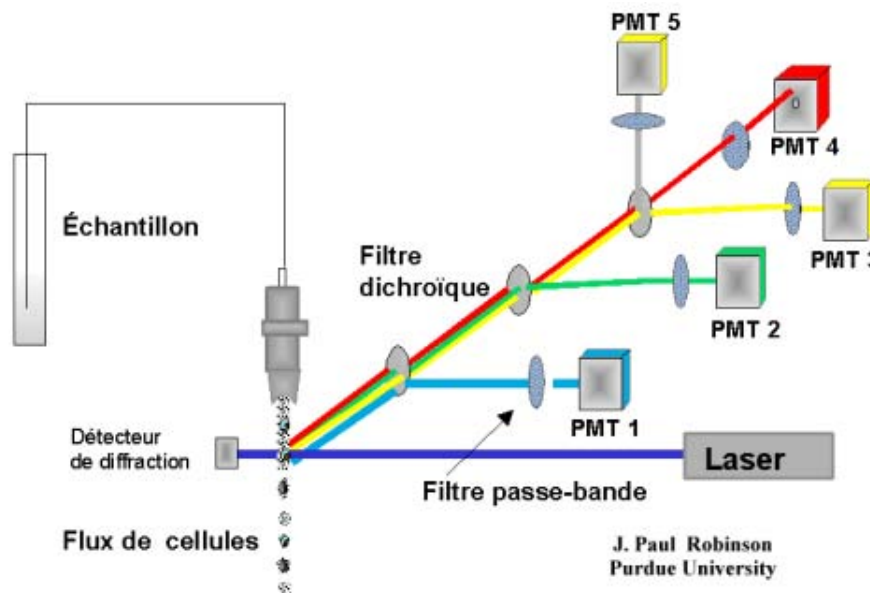


Figure 34 : Principe de la cytométrie de flux

Les cellules passent une par une devant un laser. Les signaux récoltés dans un angle de 90° par rapport à la source du laser (SSC) sont ensuite filtrés, puis récoltés par les photomultiplicateurs (PMT), et numérisés par un ordinateur. Ainsi des valeurs semi-quantitatives de fluorescence, de granulométrie seront analysées par traitement informatique. Quant aux signaux récoltés par le détecteur de diffraction (FSC), ils permettent de donner des informations sur la taille des cellules. (Extrait du site pedagogie.ac-amiens.fr)

- Immunomarquage de protéines de surface

Les cellules synthétisent des protéines et glycoprotéines membranaires dont l'expression et/ou la position peuvent être des paramètres importants à détecter. Il existe deux manières de les marquer. La première consiste à utiliser une molécule ou une autre protéine ayant une affinité pour la protéine d'intérêt, et qui est couplée à un fluorochrome. Par exemple, l'annexine V couplée à Alexa 488 se fixe à la phosphatidylsérine.

La seconde méthode consiste à utiliser des anticorps (Ac) couplés à un fluorochrome et dirigés contre la protéine d'intérêt, on parle alors d'immunomarquage direct. Il est également possible d'utiliser des Ac dirigés contre la protéine mais non couplés à un fluorochrome. Un deuxième Ac (Ac secondaire) dirigé contre la partie Fc du premier Ac (Ac primaire) et couplé à un fluorochrome, est alors nécessaire. On parle alors d'immunomarquage indirect (figure 35).

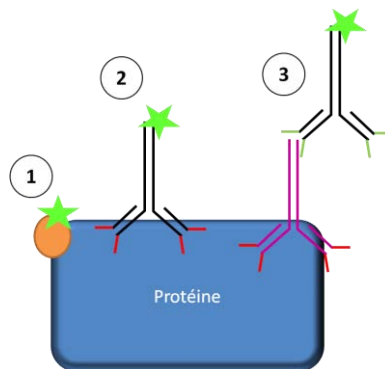


Figure 35 : Procédés de marquages d'une protéine d'intérêt pour la cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de détecter des molécules fluorescentes. Pour évaluer la présence d'une protéine d'intérêt, différents procédés existent pour la cibler par fluorescence : avec une protéine couplée à un fluorochrome ayant une affinité pour cette protéine (1), par immunomarquage direct (2) et par immunomarquage indirect (3).

* Réactifs :

- Solution de Triton X-100 dilué à 0,1%, (v/v dans de l'eau distillée, réf. T8787, Sigma, France)
- Vybrant/Apoptosis™ kit #2 (réf. V13241, Invitrogène, France) :
 - Tampon annexine-liant 5X, dilué 5 fois dans l'eau déionisée avant utilisation (1X) ;
 - Solution d'annexine V couplée au fluorochrome Alexa Fluor® 488 ;
 - Solution d'iodure de propidium (IP) 100 µg/mL.
- Anticorps (pour l'induction de l'apoptose) :
 - Ac primaire : Mouse Anti-Fas humain (APO-1-3) purifié dilué à 200 ng/mL dans du tampon annexine-liant 1X (réf. 176 ALX-805-020-C100, Alexis Biochemicals, USA)
 - Ac secondaire : Rat anti-mouse IgG3 purifié dilué à 10 µg/mL dans du tampon annexine-liant 1X (réf. 55 34 04, BD, France)

- Tampon Phosphate Buffer Saline (PBS) (réf. 14190, Invitrogène, France)
- Solution de citrate-EDTA à 55 mM et 50 mM, respectivement, dans de l'eau distillée (réf. 54641, Sigma, et 8418, Merck, France)

*** Matériel :**

- Tube à hémolyse (réf. 212-1837, VWR)
- Centrifugeuse "Labofuge 400" (Heraeus Instruments)
- Cytomètre en flux BD FACs quanto (France)
- Logiciel : Diva FACs quanto

*** Méthodologie :**

Pour extraire les cellules de l'hydrogel, les biomatériaux sont dissous dans 500 μ L de solution de citrate-EDTA (pour un cylindre de 5 mm de diamètre), pendant 10 min. Puis, 1 mL de PBS est ajouté dans chaque tube avant d'être centrifugé (5 min à 300g).

Des cellules, servant de contrôle négatif, subiront toutes les étapes de lavage et de centrifugation comme tous les échantillons, mais pas de marquage. L'apoptose et la nécrose seront induites séparément sur des cellules pour obtenir des contrôles positifs des marquages d'apoptose et de nécrose.

L'apoptose est induite en ajoutant 100 μ L de solution d'Ac anti-Fas (Ac primaire) pendant 1h, puis après un lavage dans du PBS et une centrifugation (5 min 300g), en suspendant le culot cellulaire avec 100 μ L de solution d'Ac secondaire dirigé contre l'Ac primaire. Après 1 h, le marquage de l'apoptose pourra être fait comme il est décrit par la suite en utilisant l'annexine V-Alexa 488 (figure 36-A). D'autre part, la nécrose est induite en ajoutant un détergent, une solution de triton à 0,1%, pour perforer la membrane plasmique des cellules. Seul le marquage de la nécrose (IP) sera réalisé pour le contrôle positif (figure 36-B).

Le marquage se fait en homogénéisant le culot cellulaire dans 100 μ L de tampon annexine-liant 1X, auquel 2,5 μ L d'annexine V couplée au fluorochrome Alexa Fluor® 488 (marquage de l'apoptose) et 1 μ L d'IP à 100 μ g/mL (marquage de la nécrose) sont ajoutés. Les cellules de l'échantillon "contrôle négatif" sont suspendues dans 103,5 μ L de tampon annexine-liant 1X. Après 15 min d'incubation, 200 μ L de tampon annexine-liant 1X sont ajoutés dans tous les échantillons et contrôles. Après une homogénéisation délicate, les échantillons sont prêts pour l'analyse par cytométrie en flux. Les cellules sont analysées en mesurant la fluorescence à 519 nm et 617 nm correspondant respectivement aux longueurs d'ondes d'émission de fluorescence de

l'Alexa 488 (cellules apoptotiques) et de l'IP (cellules nécrotiques). D'autre part, pour chaque condition testée, 3 échantillons seront préparés.

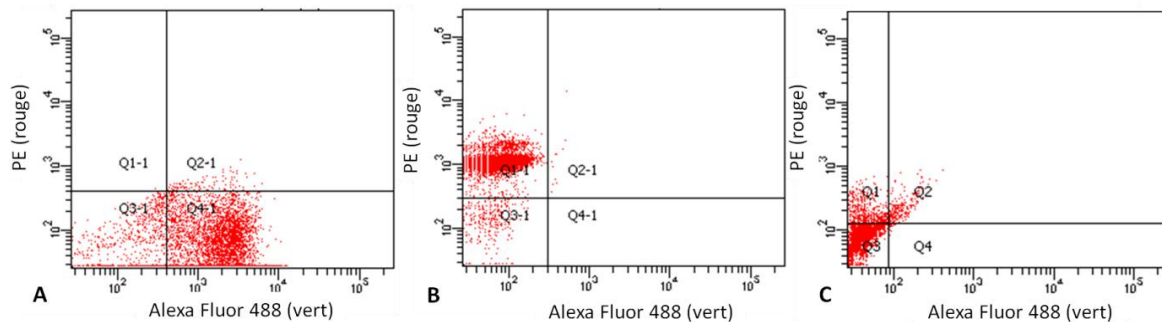


Figure 36 : Scattogrammes permettant d'identifier les cellules apoptotiques (A), nécrotiques (B) et vivantes (C)

Pour vérifier les réglages du cytomètre, l'apoptose et la nécrose de cellules sont induites et marquées, respectivement, uniquement avec l'annexine V-Alexa 488 (A) et l'iodure de propidium (B). Les curseurs sont positionnés afin de s'affranchir de l'autofluorescence des cellules non marquées (contrôle négatif). Ainsi, les cellules apoptotiques fluorescent dans le vert et sont dans les parties Q2 et Q4 des scattogrammes, les cellules nécrotiques fluorescent dans le rouge et sont dans les parties Q1 et Q2 des scattogrammes. Quant aux cellules vivantes, elles ne fluorescent pas et sont dans la zone Q3 (C).

Pour évaluer l'auto-fluorescence des cellules, un échantillon dit "contrôle négatif" est analysé pour permettre de déterminer le seuil au-delà duquel la fluorescence captée n'est pas l'auto-fluorescence des cellules. D'autre part, des échantillons dits "contrôles positifs" sont analysés pour vérifier que les seuils de détection de chaque fluorochrome, précédemment déterminés, sont corrects. Ainsi, des cellules connues pour être positives aux marquages pour chaque fluorochrome sont utilisées (un échantillon par fluorochrome). Enfin, chacun des échantillons peut être marqué avec un ou plusieurs anticorps si les fluorochromes utilisés n'émettent pas dans le même spectre de fluorescence.

2. Activité métabolique

* Principe :

L'Alamar Blue est un composé qui s'oxyde lorsque la chaîne respiratoire mitochondriale fonctionne, sans capter ses électrons. Ainsi, le test d'Alamar Blue est un indicateur de métabolisme qui laisse les cellules produire l'ATP dont elles ont besoin. Plus l'activité mitochondriale est forte, plus la réduction du composé d'Alamar Blue va être importante. Les absorbances des composés réduits et oxydés étant différentes, il est possible de calculer un *ratio* entre les deux et d'évaluer le pourcentage de réduction de l'Alamar Blue.

Ainsi, la réduction d'Alamar Blue est rapportée à la quantité d'ADN par cylindre pour comparer les différentes conditions entre elles et suivre l'évolution de l'activité mitochondriale.

*** Réactifs :**

- Milieu de culture : DMEM-F12 sans rouge de phénol supplémenté d'antibiotiques (cf. II-A-1-a), de L-Glutamine à 2 mM, et de CaCl_2 à 1 mM, est appelé "milieu sans rouge de phénol"
- Solution d'Alamar Blue : Alamar Blue™ (réf. DAL1100, Invitrogène, France) utilisé à 10% (v/v dans du milieu sans rouge de phénol)
- Solution de citrate-EDTA à 55 mM et 50 mM, respectivement, dans de l'eau distillée (réf. 54641, Sigma, et 8418, Merck, France)
- Solution de Hoechst : Hoechst 33258 (réf. H3569, Invitrogène, France) à 0,1 $\mu\text{g/mL}$ dans un tampon de Hoechst (10 mM de Tris, 1 mM d'EDTA et 0,1 mM de NaCl à un pH de 7,4)
- ADN de thymus de veau (réf. D3664, Sigma, France)

*** Matériel :**

- Plaques 48 puits (réf. 677 180, Greiner Bio-one)
- Spectrofluorimètre : Varioskan (Thermoscientific)
- Tubes Eppendorf DNase RNase free (réf. 3213, Costar)
- Centrifugeuse à Eppendorf (Bioblock Scientific 1-15, Sigma)
- Plaque 96 puits noire (réf. 353241, BD Falcon)

*** Méthodologie :****- Test d'Alamar Blue :**

Les échantillons d'hydrogel d'alginate contenant des cellules (chondrocytes de rat ou CSM) sont cultivés avec du milieu de culture DMEM contenant du rouge de phénol. Les cylindres sont lavés pendant 15 min dans du "milieu sans rouge de phénol" pour éliminer toute interférence de ce composé lors de la lecture de l'absorbance. Chaque cylindre est placé individuellement dans un puits d'une plaque à 48 puits et 500 μL de la solution d'Alamar Blue à 10% sont ajoutés. Les biomatériaux sont alors incubés pendant 4h à $+37^\circ\text{C}$, 5% CO_2 . Parallèlement aux échantillons, des contrôles biomatériaux et du milieu sans cylindre ni cellule sont incubés dans les mêmes conditions que celles mentionnées précédemment. Les surnageants seront ainsi récupérés et la lecture de l'absorbance des composés réduits et oxydés est faite à $\lambda = 570 \text{ nm}$ et $\lambda = 600 \text{ nm}$, respectivement. Enfin, les cylindres sont lavés pour éliminer les traces d'Alamar Blue, puis ils sont remis en culture jusqu'au prochain point de test sauf 3 cylindres qui serviront à doser l'ADN. Enfin, les rapports entre les composés réduits et oxydés seront calculés selon la formule suivante.

$$\text{Réduction d'Alamar Blue} = \frac{(A_{570 \text{ nm}}^{\text{échantillon}} \times 117\,216) - (A_{600 \text{ nm}}^{\text{échantillon}} \times 80\,586)}{(A_{600 \text{ nm}}^{\text{Blanc}} \times 155\,677) - (A_{570 \text{ nm}}^{\text{Blanc}} \times 14\,652)} \text{ (en \%)}$$

- Dosage ADN :

Pour chaque test d'Alamar Blue, trois échantillons d'ADN contenant l'ADN d'un cylindre d'hydrogel sont conservés afin de pondérer la réduction de l'Alamar Blue à la quantité d'ADN pour obtenir une information relative au métabolisme cellulaire. Chaque cylindre est dissous dans 500 μL de solution de citrate-EDTA pendant 10 min dans un tube Eppendorf exempt de DNase et de RNase. Après centrifugation à 300g pendant 5 min, le culot cellulaire est conservé à -20°C jusqu'au dosage. Une gamme étalon d'ADN est également réalisée à partir d'ADN de thymus de veau à des concentrations allant de 0 à 1 $\mu\text{g/mL}$ (tableau II). Les échantillons permettant d'obtenir les différents points de la gamme sont traités de la même façon que les échantillons cellulaires, dès lors que les cellules ont été lysées. Le culot cellulaire des échantillons est homogénéisé dans 100 μL de tampon de Hoechst, puis les cellules sont lysées grâce à 4 cycles successifs de congélation-décongélation en passant les tubes d'un bain d'azote liquide (-196°C) à un bain marie ($+37^\circ\text{C}$). 900 μL de solution de Hoechst sont ensuite ajoutés et homogénéisés aux échantillons contenant l'ADN. L'Hoechst 33258 est un intercalant de l'ADN qui émet dans la partie ultra-violet du spectre. Ainsi, l'intensité de fluorescence (IF) est lue avec un spectrofluorimètre à une $\lambda_{\text{excitation}} = 356 \text{ nm}$ et une $\lambda_{\text{émission}} = 458 \text{ nm}$. La quantité d'ADN présente dans les échantillons est obtenue à partir de l'équation $IF = f([ADN])$. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/mL}$.

Enfin, le pourcentage de réduction d'Alamar Blue est rapporté à la quantité d'ADN pour obtenir l'activité métabolique des cellules.

Tableau II : Construction d'une courbe étalon d'ADN

Concentration finale d'ADN (en $\mu\text{g/mL}$)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0,05	0
Volume de solution d'ADN à 100 $\mu\text{g/mL}$ (en μL)	100	80	60	40	20	10	5	0
Volume d'eau (en μL)	0	20	40	60	80	90	95	10

3. Dosage des nitrites produits par les cellules

* Principe :

La mesure des concentrations de nitrite (NO_2^-) et de nitrate (NO_3^-) est fréquemment utilisée pour explorer le métabolisme du monoxyde d'azote et l'implication de ce radical notamment dans

la défense immunitaire suite à une agression tissulaire. Ce métabolisme est aussi impliqué dans des processus qui régulent le tonus du système cardiovasculaire, la mort neuronale au cours de l'ischémie, certains mécanismes de l'apprentissage et de la mémoire, les processus inflammatoires ou le choc septique.

La réaction de Griess permet de transformer le nitrite en un composé absorbant (figure 37). En effet, l'acide sulfanilique (composant B) est converti en un sel de diazonium en réaction avec du nitrite dans une solution acide. Puis le sel de diazonium se couple au N-(1-naphthyl) ethylenediamine pour former le colorant "azo" dont l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 548 nm. Ainsi, à l'aide d'une courbe étalon, on peut évaluer la quantité de nitrite produit par les cellules et en déduire l'état de stress des cellules.

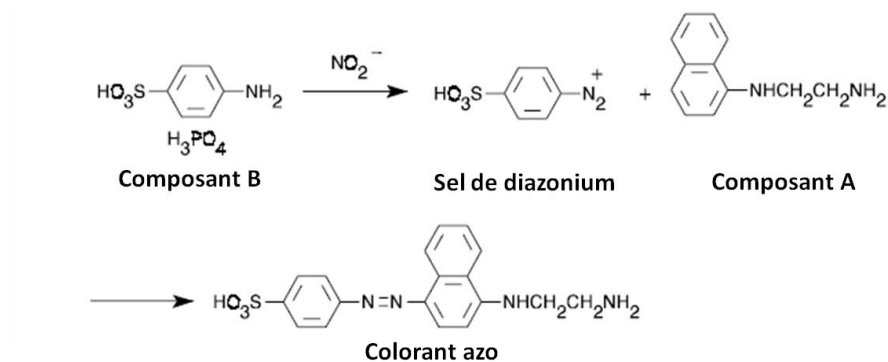


Figure 37 : Réaction de Griess permettant le dosage du nitrite

La réaction de Griess permet de produire en présence d'acide sulfanilique (composant B) et de nitrite, du sel de diazonium qui lui-même en présence de N-(1-naphthyl) ethylenediamine (composant A) permet d'obtenir le colorant azo dont on peut mesurer l'absorbance.

*** Réactifs :**

Griess Reagent kit (réf. G7921, Invitrogène, France)

- Composant A : solution de N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (1 mg/mL)
- Composant B : Solution d'acide sulfanilique 10 mg/mL dans 5% d'acide phosphorique
- Composant C : Solution standard de nitrite à 1 mM dans de l'eau déionisée

*** Matériel :**

- Spectrofluorimètre : Varioskan (Thermoscientific)
- Tubes Eppendorf DNase RNase free (réf. 3213, Costar)
- Centrifugeuse à Eppendorf (Bioblock Scientific 1-15, Sigma)
- Plaque 96 puits transparente (réf. 655 101, Greiner bio-one)

* Méthodologie :

Pendant la culture des chondrocytes de rat ensemencés dans des hydrogels d'alginate, 2 mL de milieu de culture sont aspirés, centrifugés pendant 5 min à vitesse maximale. Le surnageant est ensuite conservé à -20°C jusqu'au dosage du nitrite. En parallèle, du milieu de culture sans cellule sert de "blanc" pour les échantillons.

Une gamme étalon est faite en doublon, c'est-à-dire que deux gammes sont faites en parallèle. Des solutions contenant du nitrite à une concentration de 100 μM jusqu'à 0,78 μM sont constituées par une dilution en cascade de la solution C (figure 38-A), pour réaliser la gamme étalon. Un puits "blanc" est fait avec de l'eau ultrapure. 150 μL des échantillons sont déposés, en triplicat, dans les puits d'une plaque 96 puits. Puis, 130 μL d'eau déionisée sont ajoutés dans tous les puits (gamme étalon, "blanc" et les échantillons). Enfin, 20 μL d'une solution composée à 50% du composant A et à 50% du composant B sont ajoutés dans tous les puits. Après 30 min d'incubation, à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre à une longueur d'onde de 548 nm. Les concentrations des échantillons seront déduites grâce à la courbe étalon (figure 38-B).

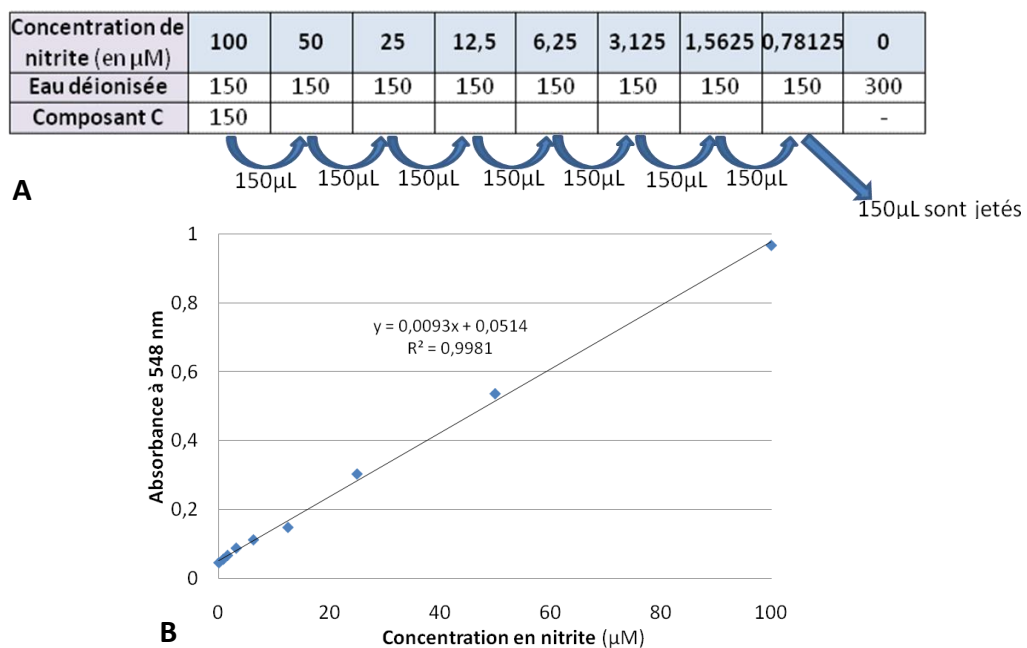


Figure 38 : Courbe étalon pour le dosage du nitrite

Une courbe étalon est construite pour calculer la quantité de nitrite dans les échantillons. Elle est construite par une dilution en cascade d'un premier puits contenant 150 μL d'eau déionisée et 150 μL de composant C pour obtenir une concentration de 100 μM de nitrite (A). En effet, pour calculer la concentration en nitrite des échantillons, l'absorbance des échantillons a été comparée à celle obtenue avec la courbe étalon (B). L'équation de la courbe (y) est obtenue en faisant une régression linéaire. Cette dernière est bonne lorsque le coefficient de régression (R^2) est proche de 1.

4. Phénotypage des cellules souches mésenchymateuses

* Principe

Les cellules expriment des protéines membranaires, appelées clusters de différenciation (CD), dont la présence ou l'absence permettent de déterminer le phénotype des cellules. La détection de ces protéines par un immunomarquage et une analyse par cytométrie en flux permettent d'évaluer le ou les types de cellules présentes dans l'échantillon étudié.

* Réactifs :

- Solution de blocage : Albumine de sérum bovin (réf. A9647, Sigma, France) dans du DMEM sans rouge de phénol à 0,5% (Poids/Volume)
- Solution de marquage : des solutions d'Anticorps (Ac) sont utilisées à différentes concentrations dans un volume final de 100 µL de solution de blocage (tableau III).
- Solution de citrate-EDTA à 55 mM et 50 mM, respectivement, dans de l'eau distillée (réf. 54641, Sigma, et 8418, Merck, France)
- Milieu de culture DMEM F-12 sans rouge de phénol (réf. 11880, Gibco, France)

* Matériel :

- Tube à hémolyse (réf 212-1837, VWR)
- Centrifugeuse "Labofuge 400" (Heraeus Instruments)
- Cytomètre: BD FACSCanto (BD, France)
- Logiciel : Diva FACs quanto (BD)

* Méthodologie :

Après le décollement des cellules des boîtes de culture (cf. II-A-1), ou la dissolution de l'hydrogel à base d'alginate en présence d'une solution de citrate-EDTA, les suspensions cellulaires sont déposées dans des tubes à hémolyses servant pour la cytométrie en flux (100 000 cellules par tube).

La suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 min à 300g, puis les sites de fixation aspécifiques des cellules sont bloqués en ajoutant 500 µL de solution de blocage au culot cellulaire pendant 5 min. Après une nouvelle centrifugation, un "contrôle négatif" (sans Ac), les "contrôles isotypiques" et les échantillons sont préparés en suspendant le culot cellulaire avec les solutions contenant les Ac aux doses figurant dans le tableau III. Après 30 min, le marquage est arrêté par addition de 500 µL de DMEM sans rouge de phénol. Après une centrifugation (5 min à 300g), le culot cellulaire est suspendu dans 300 µL de DMEM sans rouge de phénol. Les échantillons sont

ensuite analysés par cytométrie en flux en mesurant l'émission de fluorescence des cellules marquées avec des Ac couplés au FITC (Fluorescéine IsoThiocyanate, $\lambda_{\text{émission}} = 518 \text{ nm}$) ou à la PE (phycoérythrine, $\lambda_{\text{émission}} = 578 \text{ nm}$).

Tableau III : Anticorps utilisés pour le phénotypage des CSM

Les clusters de différenciation (CD) des cellules sont marqués avec des Ac couplés aux fluorochromes phycoérythrine (PE) ou à la Fluorescéine IsoThioCyanate (FITC).

Marqueur de surface	Fluorochrome	Volume de solution (pour 100 μL de volume final pour 10^6 cellules)	Fournisseur (référence)
CD 34	PE	20 μL	BD Pharmigen (555822)
CD 44	FITC	20 μL	Beckman Coulter (IOTest, IM1219U)
CD 45	FITC	20 μL	DakoCytomation (F0861)
CD 73	PE	20 μL	BD Pharmigen (550257)
CD 90	PE	10 μL	BD Pharmigen (555596)
CD 105	PE	20 μL	Beckman Coulter (IOTest, A07414)
CD 166	PE	20 μL	Beckman Coulter (IOTest, A22361)
HLA-DR	FITC	20 μL	Beckman Coulter (IOTest, IM0463U)
Contrôle négatif IgG1, RFITC	FITC	10 μL	DakoCytomation (X0927)
Contrôle négatif IgG1 RPE	PE	10 μL	DakoCytomation (X0928)

Pour évaluer l'auto-fluorescence des cellules, un échantillon dit "contrôle négatif" est analysé pour permettre de déterminer le seuil au-delà duquel la fluorescence captée n'est pas l'auto-fluorescence des cellules. D'autre part, des échantillons dits "contrôles isotypiques" sont analysés pour vérifier qu'il n'y a pas de fixation aspécifique de chaque couple isotype Ac-fluorochrome. Ainsi, des cellules seront marquées comme des échantillons mais avec des Ac "contrôle isotypique". Enfin, chacun des échantillons peut être marqué avec un ou plusieurs anticorps si les fluorochromes utilisés n'émettent pas dans le même spectre de fluorescence.

B. Analyse de l'expression génique des cellules par qRT-PCR

* Principe :

Les ARNm exprimés par une cellule permettent de connaître leur phénotype. Ainsi, la qPCR en temps réel (qRT-PCR) permet d'obtenir de manière semi-quantitative une estimation du transcrit génique au moment de l'extraction des cellules. Cette expérience est possible grâce à la rétrotranscriptase qui permet à partir d'ARNm d'obtenir l'ADNc (ADN complémentaire) du brin d'ARNm (figure 39). Ainsi, des amorces poly-Thymine se fixent sur la queue poly-Adénine des ARNm mature pour initier sa rétrotranscription. L'ADNc obtenu peut être utilisé pour la qRT-PCR. A la fin de la réaction, les concentrations des gènes d'intérêt sont rapportées à celle d'un gène rapporteur (ici RP-29), qui est exprimé de la même manière dans toutes les cellules et dans toutes les conditions.

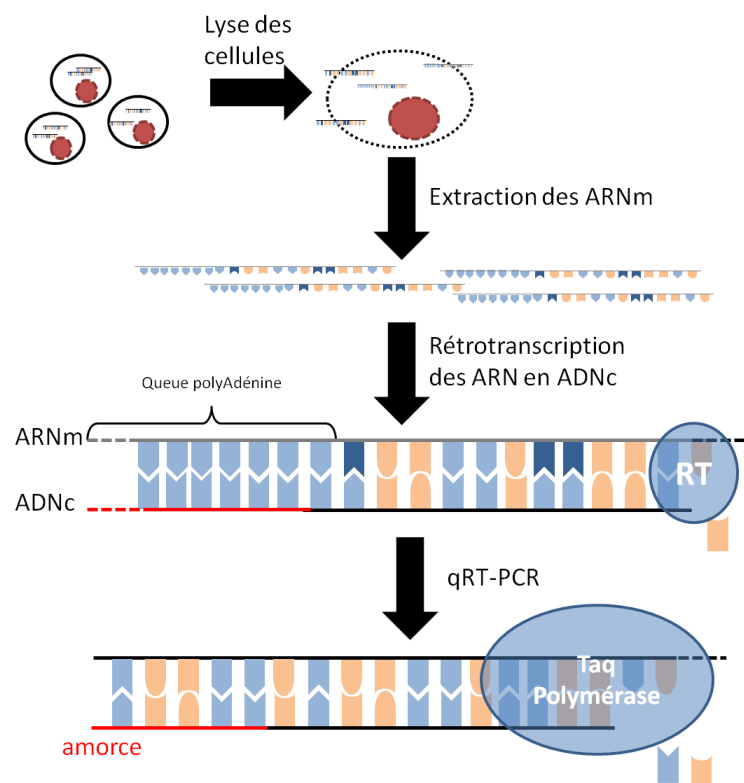


Figure 39 : Principe de la qPCR en temps réel (qRT-PCR)

Après la lyse des cellules, les ARNm contenus dans les cellules sont extraits et rétrotranscrits en ADNc grâce à la fixation d'une amorce poly T (3^{ème} étape, trait rouge) sur la queue poly A et de l'action de la rétrotranscriptase. Enfin, la réaction de qRT-PCR est possible grâce à la fixation d'une amorce spécifique sur la séquence de cet ADNc (4^{ème} étape, trait rouge), et à l'action de la Taq polymérase.

Dans l'étude de la chondrogenèse des CSM, des gènes spécifiques du cartilage comme Sox9 (facteur de transcription impliqué dans la chondrogenèse), Coll2 (collagène de type II), COMP (protéine de la matrice extracellulaire), Agg (protéoglycane spécifique du cartilage, l'agrécane) et le versican (PG spécifique du cartilage) pourront être quantifiés au cours du temps (après 3, 14

et 28 jours de culture *in vitro* dans les hydrogels). D'autre part, le chondrocyte n'étant pas un stade final de différenciation, mais une étape intermédiaire menant à un phénotype hypertrophique puis ostéocytaire, des gènes spécifiques de l'os ou de la différenciation ostéocytaire pourront être étudiés comme Runx2 (facteur de transcription), les collagène de type I, III et X (collagène de type X exprimé au stade du chondrocyte hypertrophique), MMP13 (métalloprotéinase), l'ostéocalcine.

*** Réactifs :**

➤ Solution de citrate-EDTA à 55 mM et 50 mM, respectivement, dans de l'eau distillée (réf. 54641, Sigma, et 8418, Merck, France)

➤ RNeasy mini kit (réf. 74106, Qiagen, France) :

- Colonne RNeasy Mini Spin (rose)
- Tubes Eppendorf (1,5 ml)
- Tubes pour les effluents (2 ml)
- Tampon RLT
- Tampon RW1
- Tampon RPE
- Eau RNase-Free

➤ Solution de DNase (par échantillon) : 10 µL de solution DNase I et 70 µL de tampon RDD du kit RNase-free DNase (réf. 79254, Qiagen, France)

➤ Solution de rétrotranscription (par échantillon) : 1 µL de solution d'enzyme rétrotranscriptase (RNase H⁺ MMLV reverse transcriptase) + 4 µL de solution iScript reaction mix (amorces poly T et acides nucléiques), provenant du kit iscript™ cDNA synthetis (réf. 1708891, Biorad, France).

➤ Capillaire qPCR (réf. 04 929 292 001, Roche applied Science)

➤ Quantitect SYBR Green PCR kit (réf. 204145, Qiagen, France)

➤ Solutions d'amorces forward et reverse à 10 µM pour chaque gène testé (tableau IV, Eurogentech, France)

➤ Solution mère d'ADN de chaque gène à 1 ng/µL

➤ Quiaquick® PCR purification kit (réf. 28104, Qiagen, France)

- Colonne QIAquick Spin
- Tampon PB
- Tampon PE

- Tampon EB
- Tubes pour les effluents (2 ml)

Tableau IV : Liste des amorces "forward" et "reverse" utilisées pour la qRT-PCR

L'expression de gènes spécifiques du cartilage mature (surligné en orange) et spécifiques de l'os ou du cartilage hypertrophique (surligné en mauve) sont analysés par qRT-PCR grâce aux amorces détaillées dans le tableau. RP29 est un gène rapporteur qui est exprimé de la même manière dans toutes les conditions. Les qRT-PCR sont réalisées à des températures de fusion (T_m) adaptées à chaque couple d'amorces.

Nom de l'amorce	Séquence (5' – 3')	T _m
Collagène 2 total	Reverse GAACCTGCTATTGCCCTCTG Forward ATGACAATCTGGCTCCCAAC	55°C
Collagène 2A	Reverse ATCTCAGGGCTGAGGCAGT Forward GCAGGATGGGCAGAGGTAT	60°C
Agrécanne	Reverse TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA Forward TCGAGGACAGCAAGGCC	62°C
COMP	Reverse TCTGCATCAAAGTCGTCCTG Forward ACAATGACGGAGTCCCTGAC	60°C
Sox9	Reverse CCTGGGATTGCCCCGA Forward GAGCAGACGCACATCTC	55°C
Versican	Reverse CTTCCACAGTGGGTGGTCTT Forward TGTTCTCCCACTACCCTTG	62°C
Collagène 10	Reverse CTCCAGGATCACCTTTTGGGA Forward GCTAAGGGTGAAAGGGGTTC	60°C
Runx2	Reverse CGTTACCCGCCATGACAGTA Forward CCCGTGGCCTTCAAGGT	60°C
Ostéocalcine	Reverse TCAGCCAACTCGTCACAGTC Forward GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT	62°C
MMP13	Reverse TCTAAGCCGAAGAAAGACTGC Forward TGGTGGTGATGAAGATGATTT	57°C
Collagène 1	Reverse GGACCACTTTACCCCTTGT Forward AGGTGCTGATGGCTCTCCT	60°C
RP29 (Gène de référence)	Reverse AGACGCGCAAGAGCGAGAA Forward AAGATGGGTCAACCAGCAGCTCTACTG	60°C

*** Matériel :**

- Tubes Eppendorf Dnase Rnase free (réf. 3213, Costar).
- Centrifugeuse à Eppendorf Bioblock Scientific 1-15 (Sigma).
- Spectrofluorimètre Nanodrop (Thermo Scientific).
- Appareil pour la rétrotranscription : MyCycler™ thermal cycler (Biorad)
- Capillaire (réf. 04929292001, Roche Applied Science)

➤ Appareil pour les qRT-PCR : Light Cycler (Roche Applied Science)

* **Méthodologie :**

- Extraction d'ARN

Après dissolution d'environ 1 cm² de l'hydrogel, les cellules sont lavées 5 fois avec une solution de PBS pour éliminer les traces d'alginate. Puis, les ARN sont extraits à l'aide du kit RNeasy mini selon le protocole fourni par le constructeur. Brièvement, les cellules sont lysées avec 350 µL de tampon RLT (pour moins de 5.10⁶ cellules), homogénéisées plusieurs fois dans une seringue, puis 350 µL d'éthanol à 70% sont ajoutés. La suspension est déposée dans une colonne qui est centrifugée 15 secondes à 8000g pour séparer les ARN des solutions et les fixer sur la membrane. Après un lavage avec 350 µL de tampon RW1, 80 µL de solution de DNase est appliquée pendant 15 min sur la membrane pour éliminer toute contamination d'ADN. Après un lavage avec 350 µL de tampon RW1 et un autre avec 500 µL de tampon RPE, l'ARN est isolé de la membrane en y déposant 30 µL d'eau ultrapure DNase-RNase free et en centrifugeant pendant 1 min à 8000g la colonne pour récupérer la solution contenant l'ARN dans un tube Eppendorf exempt de DNase-RNase. L'absorbance de cette solution est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre, pour connaître la concentration d'ARN. En effet, les mesures d'absorbance à 260 nm et 280 nm sont spécifiques pour doser, respectivement, les acides nucléiques et les protéines. La contamination protéique est déterminée en fonction du rapport de DO à 260 et 280 nm. Le rapport en ARN "pur" doit être compris entre 1,9 et 2,1. La concentration d'ARN est calculée grâce à la formule suivante : [ARN] (en µg/mL) DO_{260 nm} X dilution X 40. L'ARN peut être conservé à -80°C jusqu'à l'étape suivante.

- Rétrotranscription

L'étape de rétrotranscription se fait avec le kit iscript™ cDNA synthetis selon le protocole fourni. Pour obtenir de l'ADNc, 15 µL de la solution d'ARN (pour une quantité < à 1 µg d'ARN) sont homogénéisés avec 5 µL de la solution rétrotranscription. Ces étapes se réalisent à +4°C pour ralentir la dégradation des ARN. Les échantillons sont placés dans l'appareil Thermal cycler pour faire varier la température selon le déroulement suivant : 5 min à +25°C, 30 min à +42°C, 5 min à +85°C, puis un retour à +4°C. Enfin, les échantillons seront conservés à -20°C avant de réaliser les qRT-PCR.

- Réaction de qPCR en temps réel

La qRT PCR s'effectue avec l'appareil Light Cycler (Roche Applied Science) permettant de

faire la réaction sur 32 capillaires simultanément. Dans chaque capillaire, sont ajoutés : 10 μL de la solution de Quantitect SYBR Green PCR, 1 μL de solution d'amorces reverse, 1 μL de solution d'amorces forward et 6 μL d'eau ultra pure. Puis, 2 μL d'eau ultra pure sont ajoutés dans le premier capillaire pour servir de blanc, c'est-à-dire sans ADN. Les 4 suivants sont utilisés pour faire une gamme étalon allant d'une concentration de 10^{-3} à 10^{-6} ng/ μL à partir d'une solution mère d'ADN spécifique pour chaque gène. Enfin, 2 μL d'échantillon sont ajoutés dans les autres capillaires.

Les capillaires sont placés dans un tourniquet, puis centrifugés (15 secondes à 1500 tours/min) et l'ensemble est positionné dans l'appareil Light Cycler. Pour faire la qPCR, 45 cycles de dénaturation, d'amorçage, et d'extension sont faits (figure 40). A chaque cycle, chaque capillaire passe devant le système optique où la fluorescence est mesurée. A la fin de la réaction, les courbes de fluorescence obtenues pour chaque capillaire sont traitées (enlever le bruit, vérifier le coefficient de régression de la courbe étalon) et analysées pour évaluer les concentrations d'ADN dans chaque échantillon. En effet, la courbe étalon fournit une concentration d'ADN en fonction du nombre de cycles où la fluorescence est apparue. La concentration de chaque gène est rapportée à celle d'un gène rapporteur.

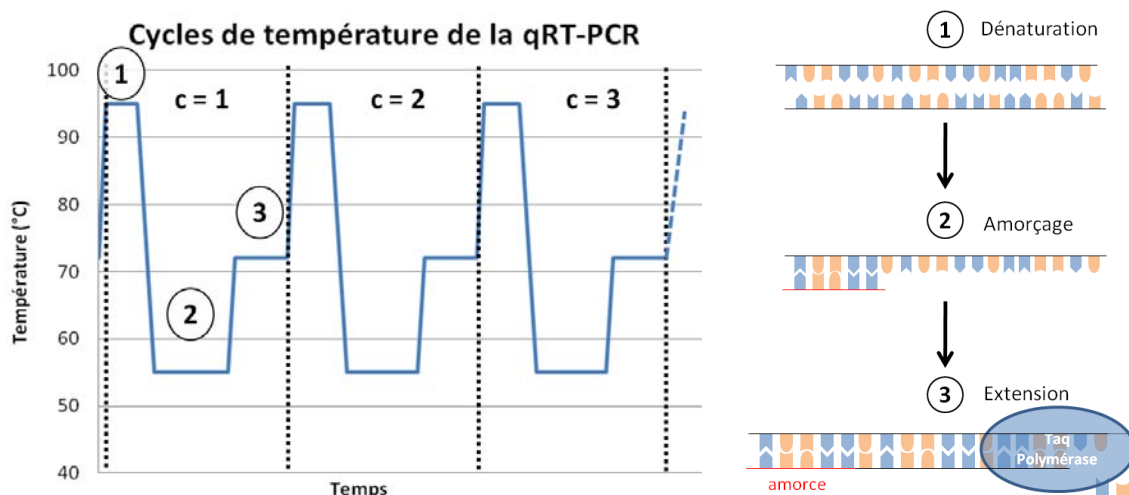


Figure 40 : Etapes d'une qPCR en temps réel (qRT-PCR)

La qRT-PCR se déroule avec une succession de cycles de température qui permettent : la dissociation des brins d'ADNc à une température de $+95^{\circ}\text{C}$ (1), la fixation spécifique des amorces sur chaque brin à une température de fusion (T_m) spécifique pour chaque couple d'amorce (2), et la duplication des brins d'ADNc par la Taq polymérase à $+72^{\circ}\text{C}$ (3). Après un cycle, un double brin d'ADNc est dupliqué en deux doubles brins d'ADN.

- Solution mère d'ADN

Pour doser l'ADNc d'une qRT-PCR, une solution mère spécifique à chaque gène est nécessaire afin de créer une courbe étalon. Ainsi, une qRT-PCR est réalisée sur des échantillons connus pour exprimer ce gène. Puis, l'ADN issu de la qRT-PCR est extrait avec un kit Quiaquick®

PCR purification selon le protocole fourni par le fournisseur. Brièvement, la solution contenant l'ADN est homogénéisée avec 5 volumes de tampon PB, puis l'ensemble est déposé dans une colonne. Après une centrifugation 30 secondes à vitesse maximale, 750 µL de tampon PE sont déposés dans la colonne. Après une autre centrifugation pendant 1 min à vitesse maximale, l'ADN est décollé de la membrane en déposant 30 µL de tampon EB ou de l'eau ultrapure et en centrifugeant la colonne pendant 1 min à vitesse maximale. Enfin, la quantité d'ADN est dosée avec l'aide d'un spectrofluorimètre. L'absorbance est mesurée à 260 nm. Ainsi, la concentration d'un ADN double brin est calculée grâce à la formule suivante : $[\text{ADN}] \text{ (en } \mu\text{g/mL)} = \text{DO}_{260 \text{ nm}} \times \text{dilution} \times 50$.

La concentration de la solution mère d'ADN est ramenée à une concentration de 1 ng/µL dans de l'eau ultrapure DNase-RNase free. Enfin, une qRT-PCR est faite avec une courbe étalon à partir de la solution mère d'ADN créée pour vérifier que les amorces correspondent bien à ce qui a été amplifié à la première qRT-PCR.

C. Observation de la synthèse matricielle et de la répartition des cellules

1. Observation en microscopie confocale à balayage laser

* Principes :

- Microscopie confocale

La microscopie confocale à balayage laser conventionnel (SP2 AOBS-MP, Leica) permet de capter la fluorescence émise uniquement dans le plan focal observé, dans un repère xy. C'est grâce à un diaphragme (pinhole) que la fluorescence des autres plans est discriminée de celle du plan focal. Un photomultiplicateur permet également de récolter le signal lumineux pour le transformer en un signal électrique (dynamique 8-12 bits) qui est envoyé à l'ordinateur. La commande informatique gère les miroirs de balayage, le moteur pas à pas (ou la platine galvanométrique) contrôle ainsi le déplacement en z de la platine et l'ouverture du pinhole.

La microscopie confocale est un outil important dans l'observation d'échantillon biologique. Il permet d'observer, avec une bonne résolution, la position de protéine ou molécule marquée dans une cellule ou un tissu et d'effectuer plusieurs plans dans l'axe des z. Ainsi, la reconstitution de toutes les images permettra d'obtenir une image en trois dimensions.

Trois lasers différents peuvent être utilisés simultanément, le laser Argon à 488 nm, le laser Hélium/Néon à 543 nm et le laser Hélium/Néon à 633 nm, ce qui permet de marquer les cellules avec trois fluorochromes différents.

- Marquages réalisés

L'utilisation de la microscopie confocale nous a ainsi permis d'observer la répartition des cellules ensemencées dans les hydrogels d'alginate et plus spécifiquement leur cytosquelette et les collagènes synthétisés. D'autre part, grâce aux marquages de leur noyau et de leur membrane plasmique avec différents fluorochromes, nous avons pu suivre leur migration entre deux couches d'un hydrogel bistratifié.

La phalloïdine est connue pour être un anti-mitotique, il empêche la polymérisation-dépolymérisation des filaments d'actine en se fixant dessus. La phalloïdine-Alexa 488 a donc été utilisée pour marquer le cytosquelette et ainsi observer la répartition des cellules dans les biomatériaux et celle de l'actine dans les cellules.

Après 28 jours de culture *in vitro*, les collagènes de type I, II et X ont chacun été marqués spécifiquement par un immunomarquage indirect sur les échantillons (cf. principe II-C-1-a).

Enfin, la migration de CSM a été suivie en utilisant des fluorochromes qui permettent de conserver les cellules vivantes après leur marquage : Syto 16 et PKH 26 qui se fixent respectivement sur les acides nucléiques et la membrane plasmique. Les CSM de chaque couche d'un hydrogel bistratifié ont été marquées avec un des deux fluorochromes avant leur ensemencement.

* **Réactifs :**

- Milieu de culture DMEM F-12 sans rouge de phénol (réf. 11880, Gibco, France)
- Milieu complet "CSM" (sans FGF, cf. II-A-B)
- Solution de Triton X-100 dilué à 0,1% (v/v dans de l'eau distillée) (réf. T8787, Sigma, France).
- Tampon Phosphate Buffer Saline (PBS) (réf. 14190, Invitrogène, France)
- Phalloïdine-Alexa Fluor 488 (réf. A12379, Invitrogène, France) dilué au 100^{ème} dans une solution de Triton.
- Anticorps primaires et secondaires dilués au 50^{ème} dans la solution de blocage (voir tableau V).
- Syto[®] 16 à 10 µM dans du PBS (réf. S7578, Invitrogène)
- Kit de marquage PKH 26 à 10 µM dilué avec l'éluant C fournit dans le kit (réf. PKH26GL, Sigma)
- Solution de blocage : Albumine de veau (réf. A9647, Sigma, France) dans du DMEM sans rouge de phénol à 0,5% (Poids/Volume).

➤ Solution de fixation : Paraformaldéhyde (PFA) (réf. P6148, Sigma, France) à 4%, 100 mM de sodium Cacodylate Trihydrate (réf. C4945, Sigma), 10 mM de CaCl_2 dissous dans de l'eau distillée pH 7,4.

Tableau V : Anticorps pour l'immunomarquage indirect des protéines collagéniques

Les anticorps (Ac) anti-collagène serviront d'Ac primaire dans les marquages de ces protéines. Ils vont se fixer spécifiquement sur les protéines de collagène. L'Ac IgG-Alexa Fluor® 488 est l'Ac secondaire qui se fixera sur la partie Fc des Ac primaires et rendra visible en microscopie confocale à fluorescence les protéines de collagène.

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Fournisseur (référence)
Anti collagène type I	Humain	IgG (Lapin)	Merck (234167)
Anti collagène type II	Humain	IgG (Lapin)	Merck (234188)
Anti collagène type X	Humain	IgG (Lapin)	Merck (234196)
IgG-Alexa Fluor® 488	Lapin	IgG (Chèvre)	Molecular Probes (A-110008)

*** Matériel :**

- Plaques 48 puits (réf. 677 180, Greiner Bio-one)
- Centrifugeuse "Labofuge 400" (Heraeus Instruments)
- Microscope confocal Leica TCS SP2-AOBS (Leica Microsystems, Allemagne)

*** Méthodologie :**

- Visualisation du cytosquelette :

Le marquage des microfilaments de F-actine est réalisé en présence de phalloïdine-Alexa 488 après avoir fixé et perméabilisé les échantillons. Pour cela, chaque échantillon est placé dans un puits d'une plaque 48 puits, puis lavé avec 500 μL de PBS pendant 10 min. Les échantillons sont fixés dans 200 μL de solution de fixation, pendant 5 min. Après un nouveau lavage avec du PBS, les cellules sont perméabilisées avec 200 μL de solution de Triton à 0,1%, pendant 15 min. Puis, 200 μL de la solution Phalloïdine-Alexa 488 sont ajoutés et incubés pendant 30 min. Le marquage est ensuite arrêté en ajoutant 500 μL de DMEM sans rouge de phénol. Les échantillons sont lavés deux fois dans du DMEM sans rouge de phénol pendant 5 min et conservés avec ce même milieu à +4°C et à l'abri de la lumière, jusqu'à l'observation de la fluorescence à l'aide du microscope confocal.

- Marquage des cellules pour observer leur migration :

Avant la construction d'un hydrogel stratifié composé uniquement d'Alg/HA, des CSM ont été marquées avec Syto 16 dans une couche et avec PKH 26 dans l'autre. Après le détachement des cellules du support d'amplification en monocouche (cf. II-A-B), le culot cellulaire a été divisé en deux pour construire un hydrogel bistratifié (cf. II-B-2-4), avec d'un côté 60% des cellules qui seront marquées avec Syto 16, et de l'autre 40% des cellules qui seront marquées avec PKH 26. Après le comptage des cellules, ces dernières sont lavées deux fois avec une solution de PBS. Après une centrifugation 10 min à 300g, chaque culot cellulaire est mis en contact avec les solutions contenant 10 μ M de Syto 16 ou de PKH 26 pendant 15 et 5 min, respectivement. Puis, les cellules sont lavées dans 10 mL de milieu complet "CSM", la suspension cellulaire est centrifugée 5 min à 300g, puis 10 mL de milieu complet "CSM" est à nouveau ajouter et la suspension cellulaire est transférée dans un nouveau tube. Après une nouvelle centrifugation et un nouveau comptage, le culot cellulaire est prêt pour êtreensemencé dans un gel à base d'alginate et pour construire un hydrogel bistratifié (cf. II-C-2-4). Après 3 et 7 jours de culture *in vitro*, la migration des cellules entre deux couches de l'hydrogel a été suivie par microscopie confocale par l'observation des fluorescences rouges et vertes de PKH 26 et Syto 16, respectivement.

- Visualisation des protéines collagéniques (types I, II et X) :

Un "contrôle négatif" et un contrôle de l'Ac secondaire sont faits. Le premier va subir tous les lavages sans aucun marquage, et le second contrôle va subir les lavages et sera mis en présence seulement de l'Ac secondaire pour vérifier qu'il ne se fixe pas aspécifiquement sur les échantillons. Les constructions cellulaires sont incubées dans 500 μ L de solution de blocage pendant 15 min. Pour faire l'immunomarquage, les échantillons sont incubés 45 min, à température ambiante avec 200 μ L de solution de blocage contenant soit l'anticorps anti-collagène de type I, II ou X. Puis, les échantillons sont lavés dans 500 μ L de solution de blocage pendant 10 min. Ensuite, les échantillons sont incubés avec 200 μ L de solution d'immunomarquage incluant l'anticorps secondaire pendant 45 min, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après 10 min de lavage avec du DMEM sans rouge de phénol, les échantillons sont fixés dans 500 μ L de solution de fixation pendant 10 min avant d'être à nouveau lavés dans du DMEM sans rouge de phénol puis conservés à +4°C ou observés en microscopie confocale.

- Observation au microscope confocal à balayage laser :

Les observations des filaments d'actine, et des protéines collagéniques sont réalisées en

utilisant un microscope confocal avec un objectif X40 (ON = 0,8, à immersion à eau) ou X10 (ON = 0,3). Deux fluorescences sont observées : le vert, avec l'Alexa 488 et Syto 16 qui sont excités une longueur d'onde de 488 nm et l'énergie fluorescente est récoltée à une longueur d'onde de 519, et le rouge avec PKH 26 où $\lambda_{\text{excitation}} = 551 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 567 \text{ nm}$. Les réglages ont été optimisés avec les différents contrôles : négatifs et de l'Ac secondaire. Des images de haute résolution (512 x 512 pixels) ont ainsi été obtenues.

2. Observation par histologie

* Principe :

L'histologie permet d'identifier différents types de tissus grâce à l'observation de la composition de leur matrice extracellulaire, de son organisation et de la morphologie des cellules après la coloration de différents éléments. Elle permet aussi de visualiser *in situ* une néomatrice extracellulaire, ainsi que la répartition des cellules et des molécules et ainsi de comparer avec le tissu natif. Des coupes minces (5 μm d'épaisseur) et transparentes des tissus sont réalisés pour colorer spécifiquement des protéines et observer par microscopie optique les échantillons.

Trois colorations sont utilisées dans cette étude : HES, Rouge Sirius et Bleu Alcian. La coloration **HES** repose sur trois colorants :

- l'**Hématoxyline** colore l'ADN du noyau en bleu-violet.
- l'**Eosine** se fixe sur les structures basiques comme les protéines du cytoplasme et le colore en rouge.
- le **Safran** colore les fibres conjonctives en jaune-orangé.

D'autre part, le **Bleu Alcian** permet de mettre en évidence les mucopolysaccharides. A un pH acide (de 1,3 utilisé dans cette étude), il colore uniquement les polysaccharides sulfatés en bleu comme les GAG (sauf l'acide hyaluronique qui n'est pas sulfaté). Il met ainsi en évidence indirectement les protéoglycannes. D'autre part, l'alginate étant un polysaccharide, cette coloration à un pH acide limite la coloration aspécifique du biomatériau. Pour visualiser plus précisément les cellules, le noyau est coloré en rouge avec une solution de Kernechtrot.

Enfin, le **Rouge Sirius** permet d'observer les protéines collagéniques dans les tissus.

* Réactifs :

➤ Solution de fixation: Paraformaldéhyde (PFA) (réf. P6148, Sigma, France) à 4% (poids/volume), 100 mM de sodium Cacodylate Trihydrate (réf. C4945, Sigma), 10 mM de CaCl_2 dissous dans de l'eau distillée à pH 7,4.

- Solution de lavage : 100 mM de sodium Cacodylate trihydrate (réf. C4945, Sigma), 50 mM de BaCl₂ (réf. B0750, Sigma) dissous dans de l'eau distillée.
- Solution de Bleu Alcian : Bleu Alcian 8GX Gurr (réf. M/N24, Searle Diagnostic, France) dilué à 0,1 %.
- Solution de Kernechtrot : 0,5 g de poudre de Kernechtrot (réf. 5189, Merck, USA), 25 g de sulfate d'aluminium (réf. 21070.297, Prolabo, France) dissous dans 500 mL d'eau distillée.
- Solution de Rouge Sirius diluée dans une solution d'acide picrique à 0,1% (réf. 20 642, Prolabo).
- Solution d'Hémathoxyline : Haematoxyline (réf. 34034, Gurr microscopy material)
- Solution d'éosine : Erythrosine 239 (réf. 312820-0100, réactifs ral) dilué à 1% dans de l'eau distillée.
- Solution de Safran : pistil de safran (réf. 11507736, Labonord) dilué à 1% dans de l'alcool absolu.
- Tissue Clear (1466 Tissue-Clear® 5 L Xylene Substitute, Sakura)
- Résine de montage PERTEX (réf. 02407831, Baler, France)

* **Matériel :**

- Cassette (M490-6, Simport)
- Mousse en forme de rectangle (réf. M476-1, biopsy foam pads, Simport, Canada)
- Appareil pour la déshydratation : ASP 300S (Leica, Allemagne)
- Appareil pour l'inclusion : Tissue - Tek® DRS 2000E-D2 (Sakura)
- Microtome RM 2135 (Leica, Allemagne)
- Lame pour le microtome (Acu Edge 4690, Sakura)
- Lames de verre (réf. LCSF02, Menzel-Gläser SUPERFROST®, Thermo Scientific)
- Appareil pour la coloration : Tissue-Tek® TEC (Sakura)
- Microscope optique : DMD 108 (Leica, Allemagne)

* **Méthodologie :**

A différents temps de culture (3, 14 et 28 jours), les échantillons sont lavés avec du PBS, puis fixés 4 heures dans la solution de fixation. Puis, ils sont conservés à +4°C dans la solution de lavage jusqu'à l'étape suivante.

Les échantillons sont ensuite placés entre deux rectangles de mousse dans des cassettes en

plastique. Les cassettes sont placées dans un appareil de déshydratation pour que les échantillons soient dans un premier temps déshydratés progressivement dans des bains croissant d'alcool : un bain d'alcool à 70° pendant une heure minimum, deux bains d'une heure d'alcool à 95°, et trois bains d'alcool absolu d'une heure. L'alcool est ensuite éliminé avec trois bains de toluène de 15 min. Enfin, les échantillons sont laissés dans un bain de paraffine liquide (+58°C) pendant 2-3 heures. Les prélèvements sont ensuite inclus définitivement dans la paraffine, puis les blocs se solidifient avec la diminution de la température.

Tableau VI : Protocoles de coloration d'histologie

Après des déshydratations successives, les échantillons sont plongés dans des bains de colorants spécifiques pour chaque protocole de coloration (HES, Bleu Alcian et Rouge Sirius). Enfin, les échantillons sont à nouveau déshydratés avant la fin du protocole.

HES		Bleu Alcian		Rouge Sirius	
Réactifs	Temps (en min)	Réactifs	Temps (en min)	Réactifs	Temps (en min)
Tissue Clear	10	Tissue Clear	10	Tissue Clear	10
Alcool à 100°	5	Alcool à 100°	5	Alcool à 100°	5
Alcool à 95°	5	Alcool à 95°	5	Alcool à 95°	5
Alcool à 70°	5	Alcool à 70°	5	Alcool à 70°	5
Lavage	5	Lavage	5	Lavage	5
Hematoxyline	5	Bleu Alcian	60	Rouge sirius	60
Lavage	3	Bleu Alcian	60	HCl à 0,01N	2
Alcool Ammoniacal	1	Lavage	5	Alcool à 95°	2
Lavage	3	Kernechtrot	5	Alcool à 100°	2
Eau distillée	3	Lavage	5	Tissue Clear	5
Eosine	5	Alcool à 95°	0,5	Fin	
Lavage	3	Alcool à 100°	0,5		
Alcool 95°	3	Tissue Clear	5		
Alcool à 100°	3	Fin			
Safran	5				
Alcool à 100°	5				
Tissue Clear	5				
Fin					

Les blocs sont alors découpés de manière transversale en tranche d'une épaisseur de 5 μm , à l'aide d'un microtome et les coupes sont déposées sur des lames histologiques. Enfin, les échantillons sont passés successivement dans différents bains d'alcool décroissants pour les réhydrater, puis ils sont colorés et déshydratés par un appareil de coloration comme décrits succinctement dans le tableau VI. Les échantillons seront colorés avec du Bleu Alcian à un pH de 1,3, du Rouge Sirius et l'HES. Après la coloration, les lames histologiques sont montées sous lamelles avec une résine synthétique PERTEX pour permettre l'observation des colorations avec un microscope optique.

V. Exploration des propriétés mécaniques des biomatériaux

Dans cette étude, les propriétés rhéologiques des hydrogels à base d'alginate sont décrites, comme pour tout matériau, par le biais d'une loi de comportement mécanique. Selon le langage du mécanicien, on entend par « loi de comportement » une relation décrivant le passage entre les sollicitations et la réponse du milieu. Relation qui revêt un certain caractère universel, c'est-à-dire qui n'est pas dépendante du type d'expérience utilisée pour la mettre en évidence.

Mais, en ce qui nous concerne, les essais de caractérisation mécanique devraient surtout nous permettre de cerner les effets du mode d'élaboration des hydrogels (moulage et pulvérisation), ainsi que les effets de l'ajout de certains composants (acide hyaluronique et hydroxyapatite). Du reste, nous cherchons également à cerner l'incidence de la stratification des hydrogels sur la tenue mécanique du biomatériau, puisqu'il nous faut rappeler que nous avons affaire à des composites multicouches.

Le type d'essais (ou de tests) retenu devrait donc conduire à des résultats quantitatifs exploitables, en dépit d'une dispersion statistique intrinsèquement liée à la faible quantité de matière testée lors de chaque expérience.

A. Modes de sollicitation mécanique spécialement mis au point pour caractériser le comportement des biomatériaux

Les tests mécaniques peuvent être réalisés avec différents systèmes de compression, afin de faire varier le mode de sollicitation, et de parvenir à une description fine des propriétés, correspondant au mieux aux sollicitations perçues *in situ* par le tissu visé. Ces sollicitations *in situ* sont globalement de type compressif, et de surcroît triaxial en termes de contraintes. La figure 41 donne un bref aperçu des différentes catégories d'essais ; il s'agit en particulier de :

- la **compression continue** : la compression est imposée à une vitesse de déplacement ($\dot{\delta}$) constante. Ainsi, la réponse en contrainte vraie de l'échantillon est enregistrée au cours de la déformation.

- la **compression cyclique** : le déplacement sinusoïdal à fréquence fixe est imposée à un des plateaux de compression, l'autre étant fixe (la déformation et la vitesse de déformation sont donc sinusoïdales). Cette procédure permet, par exemple, d'approcher les états de déformations subies par le cartilage, en particulier lors de la marche ou d'une course, en appliquant une fréquence de sollicitation et une vitesse de déformation dans les plages observées *in vivo*. Néanmoins, l'essai de compression cyclique génère des contraintes uniaxiales, alors qu'en réalité (*in vivo*) il s'agit plutôt d'états de contraintes triaxiaux.

- d'un **test de relaxation** : une déformation est appliquée rapidement (chargement), puis elle est maintenue constante. L'évolution des contraintes est enregistrée puis analysée au cours du temps. Ce type de tests peut contenir plusieurs séquences de chargement au cours desquelles la déformation est ramenée à un niveau quasiment nul. Cela permet de compléter la panoplie des propriétés mécaniques usuellement déduites d'essais de compression continus (ou monotones).

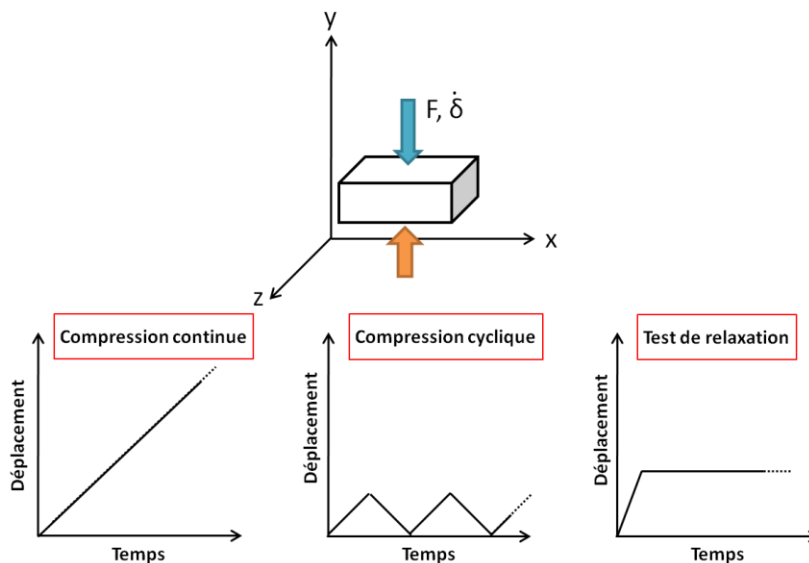


Figure 41 : Sollicitations mécaniques usuelles

Un échantillon peut être soumis à une compression à vitesse de déplacement constante ($\dot{\delta}$). Plusieurs sollicitations sont possibles : la compression continue à vitesse constante ; la compression cyclique se faisant à une fréquence donnée ; et les tests de relaxation comportant une montée en charge rapide suivie d'un maintien de la déformation.

Ces essais mécaniques peuvent être effectués dans différents systèmes d'amarrage fabriqués sur mesure, mais toujours proches des conditions en vigueur dans le domaine de la mécanique des matériaux. Ainsi, le système de compression est composé d'un support inférieur fixe recevant l'échantillon et d'un plateau supérieur mobile. D'autres dispositifs peuvent être mis

en place pour générer des trajets de déformation différents. La figure 42 résume schématiquement les principaux systèmes employés, il s'agit en particulier de :

- La **compression simple**, ou **non confinée**, qui est réalisée grâce à un dispositif simple comportant essentiellement deux plateaux lisses, rigides, étanches, et disposés normalement à l'axe de sollicitation. Ainsi, la phase liquide contenue dans l'échantillon peut s'échapper latéralement lors de la compression (selon les axes x et z). En l'absence de frottement, les contraintes et les déformations sont uniaxiales (axe y).

- La **compression semi-confinée** qui est exécutée grâce à un système similaire au précédent, mais qui comporte en plus des parois poreuses empêchant toute déformation latérale selon les directions x et z . Seule la déformation axiale (axe y) est non-nulle. Le liquide contenu dans l'échantillon peut donc s'échapper par les pores des parois latérales, ce qui a pour effet d'atténuer la pression hydrostatique. Cet essai s'apparente à l'essai oedométrique bien connu des géologues et des ingénieurs du génie civil.

- La **compression confinée** consiste à imposer des conditions aux limites latérales de déplacement nul. L'échantillon ne peut se déformer que selon l'axe y ; la pression hydrostatique augmente donc au cours de la descente du poinçon (remplaçant le plateau supérieur). Cette configuration est la plus proche de ce que l'on retrouve *in vivo* au niveau du cartilage. En effet, le véritable tissu est comprimé de façon triaxiale, le liquide interstitiel ne pouvant s'échapper. Dans ce cas l'état de contrainte est de type triaxial (contraintes dans les trois directions de l'espace), alors que les déformations sont uniaxiales (uniquement selon l'axe y de compression principale).

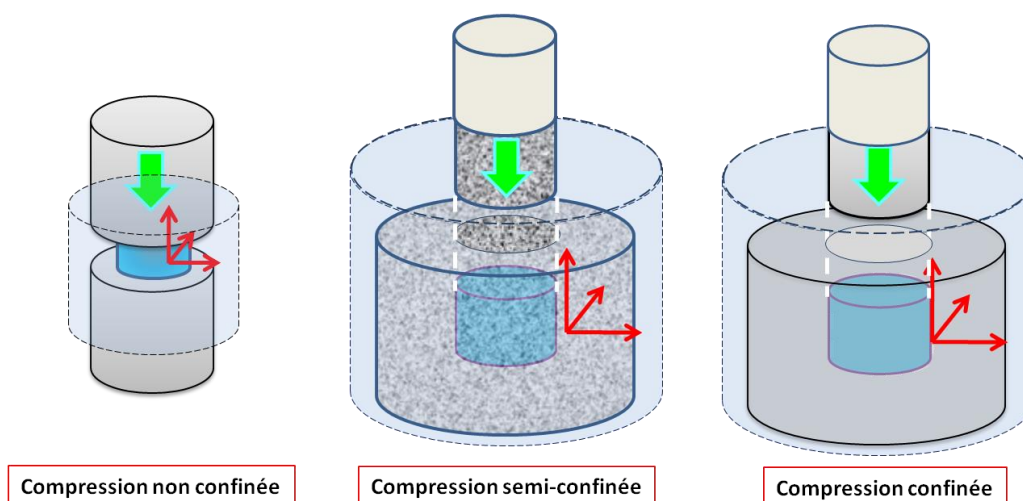


Figure 42 : Systèmes de compression

Les échantillons (bleu) sont placés sur le plateau inférieur et un plateau supérieur, ou poinçon, impose une déformation à une vitesse de déplacement (δ) donnée. Avec ce type de système, les échantillons se déformeront dans les trois directions de l'espace. Cependant, ils se déformeront uniquement selon l'axe des y lorsqu'ils sont placés dans un système à parois poreuses (semi-confiné), ou non (confiné).

Cependant il existe un autre test mécanique qui permet de se rapprocher de la configuration que l'on retrouve *in vivo* dans le cartilage. Il s'agit du test de bipoinçonnement, qui génère des états de contrainte triaxiaux.

B. Le test de bipoinçonnement (Plain strain compressive test)

* Principe :

La technique du poinçonnement bilatéral, communément appelé bipoinçonnement, a également été explorée avec avantage, sachant que nos biomatériaux se présentent, juste après élaboration, sous forme de plaques (figure 43-44). Signalons que le dispositif expérimental employé ici, est habituellement dédié à la caractérisation des tôles métalliques minces en grandes déformations. Il intéresse surtout le grand secteur industriel de la mise en forme : emboutissage, pliage... L'échantillon étant placé entre deux poinçons prismatiques, comme pour la compression simple, le protocole consiste à déplacer le poinçon supérieur à une vitesse imposée $v(t) = \dot{\delta}(t)$ souvent prise constante. Le poinçon inférieur est immobile. Le déplacement $\delta(t)$ du poinçon supérieur engendre un état de déformation biaxiale (dans le plan vertical contenant l'axe de compression y). La déformation principale, axiale, parfaitement maîtrisée $\varepsilon(t)$ est à associer à la vitesse de déformation axiale $\dot{\varepsilon}$. Aucune déformation n'a lieu dans la direction parallèle à la génératrice des poinçons, c'est-à-dire selon le grand axe z des échantillons. Ce phénomène, difficile à saisir, est intimement lié au processus de frottement régnant le long des poinçons. On parle, dans ce cas, d'état de déformation plane, dans le plan $(x \text{ o } y)$.

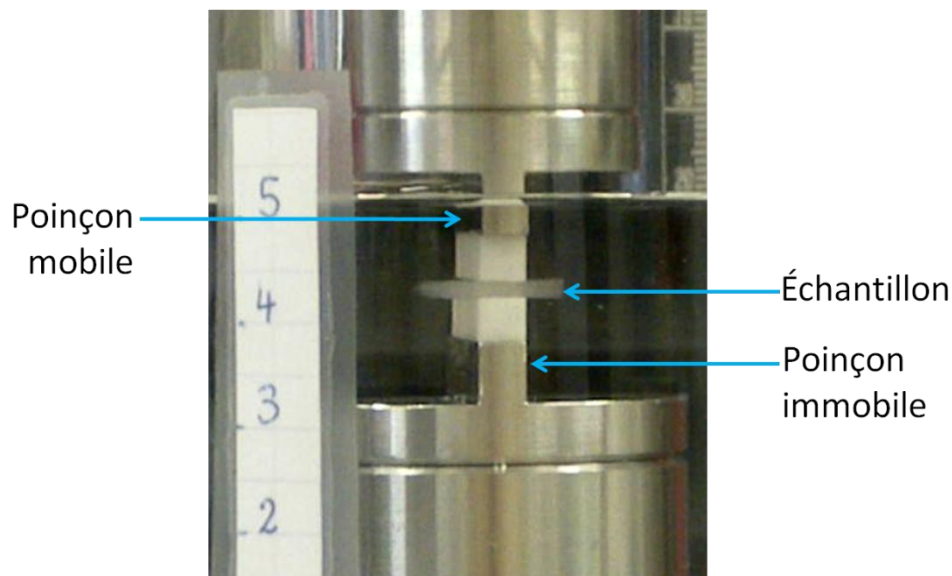


Figure 43 : Système de bipoinçonnement

Les tests de bipoinçonnement se font avec un système comprenant deux poinçons : un poinçon inférieur immobile, et un second supérieur mobile qui impose une déformation à une vitesse contrôlée. L'échantillon est placé entre ces deux poinçons et bloqué jusqu'à ce que le test mécanique commence.

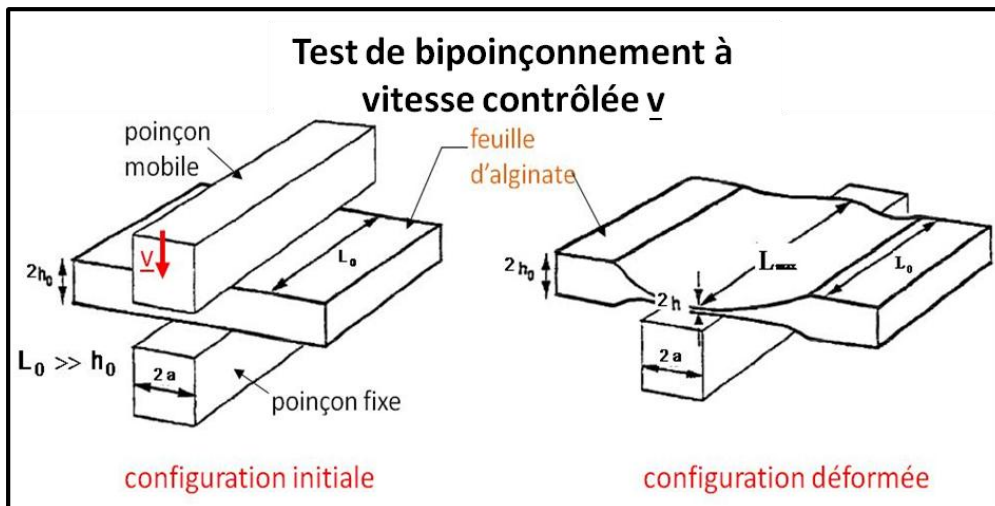


Figure 44 : Définition des grandeurs géométriques relatives au test de bipoinçonnement

Lors d'un test de bipoinçonnement des gels d'alginate à température ambiante, le poinçon supérieur se déplace à une vitesse $v(t)$ vers le poinçon fixe, ce qui engendre une diminution de l'épaisseur au cours du temps, de $2h_0$ à $2h$. La longueur L_0 ne varie quasiment pas lors de l'essai (condition de déformation plane). La largeur du poinçon est désignée par $2a$.

La machine d'essais dans laquelle est monté le dispositif de bipoinçonnement, est équipée d'une cellule de charge mesurant à tout instant t la réponse en force $F(t)$ de l'échantillon. Ceci permet de déduire la contrainte $\sigma(t)$ ressentie par l'échantillon. Cependant, comme dans le cas du bipoinçonnement, nous avons affaire à un essai triaxial, le dépouillement des données n'est pas trivial. Il nécessite une modélisation de l'écoulement plastique du biomatériau dans la zone d'emprise située entre les deux poinçons. Nous sommes donc amenés à employer des grandeurs scalaires, dites équivalentes, déduites de cette modélisation et permettant de ramener ce problème de chargement complexe au cas simple d'une compression uniaxiale (voir formule dans le tableau VII). Concernant la modélisation de ce test, nous nous appuyons sur les travaux de Montmitonnet et Masaki (Montmitonnet *et al.* 2000; Masaki *et al.* 2008).

Cet inconvénient d'ordre théorique est relativisé par l'avantage appréciable de pouvoir travailler avec des feuilles et des plaques de biomatériau et de ne pas être contraint d'élaborer des éprouvettes de forme cylindrique élancée (hauteur environ 1 à 2 fois le diamètre). Le bipoinçonnement permet donc de tester des échantillons de volume appréciable, et de fournir la loi de comportement mécanique du biomatériau constitutif dans le cas des grandes déformations. Par ailleurs, il ne génère ni striction, comme dans le cas des essais de traction, ni bombement comme dans celui de la compression. En revanche, le coefficient de frottement est simplement évalué, compte tenu de la nature des surfaces en contact et de la lubrification naturelle liée au gel.

Tableau VII : Bilan des grandeurs permettant d'analyser des données acquises lors des tests de bipoinçonnement

A chaque instant t , la force ressentie par l'hydrogel d'alginate $F(t)$ est déterminée pour un déplacement $\delta(t)$ du poinçon mobile. Les grandeurs de base sont : le coefficient de frottement $\bar{m}$, et celle décrite dans la figure 44. Les grandeurs mécaniques déduites sont : la vitesse de déplacement du poinçon, la vitesse de déformation équivalente, la contrainte équivalente et la déformation équivalente.

Grandeurs calculées	Formules
Vitesse de déplacement du poinçon $v(t)$ (considérée constante)	$\delta(t)/t$
Vitesse de déformation $ \dot{\epsilon} $	$\frac{2}{\sqrt{3}} \frac{v(t)}{h_0}$
Contrainte équivalente σ_{equ}	$\left[\frac{\frac{\sqrt{3}}{2}}{1 + \bar{m} \frac{a}{4(h_0 - \delta(t))}} \right] \frac{F(t)}{2aL_0}$
Déformation équivalente ϵ_{equ}	$\frac{2}{\sqrt{3}} \ln \left(\frac{h_0}{h_0 - \delta(t)} \right)$

* **Matériel**

- Appareil de compression et de torsion Zwick Roell 2.5 (Zwick, Allemagne)
- Solution de conservations de NaCl à 0,9% supplémenté avec 2 mM de CaCl_2 (réf. C4901, Sigma, France).

* **Conditions environnementales des tests :**

Plusieurs expériences ont été réalisées avec des hydrogels d'alginate produits selon les deux modes de fabrication : la pulvérisation et le moulage. De plus, les propriétés mécaniques d'hydrogels pulvérisés de compositions différentes ou stratifiés ont été explorées. Les paramètres suivants sont pris en compte : la viscosité de gel, le temps de polymérisation, l'épaisseur initiale (h_0), la longueur initiale (L_0) des échantillons, la vitesse de compression $v(t)$, la température de test des échantillons et les conditions de conservation des échantillons (température, composition du milieu où est conservé le gel).

Notons que deux grandes campagnes de tests ont été réalisées (tableau VIII). La première pour évaluer l'impact du mode de construction des hydrogels d'alginate sur les propriétés mécaniques. Les conditions d'élaboration, de conservation et de test des hydrogels sont décrites dans le tableau VIII. La seconde campagne de test a permis d'évaluer :

- l'influence de la composition des biomatériaux utilisés pour les tests biologiques, et
- l'influence de la stratification des hydrogels sur leurs propriétés mécaniques.

Des hydrogels monostratifiés et des hydrogels bistratifiés ont été fabriqués par pulvérisation d'un gel d'alginate à 1,5% (poids/volume de NaCl), d'alginate/acide hyaluronique à 1,5% (80%/20%) et d'alginate/hydroxyapatite (95%/5%), (cf. II-B). Le temps total de polymérisation pour un hydrogel bistratifié est de 20 min (10 min après la pulvérisation de chaque couche), ainsi, les hydrogels monostratifiés ont été polymérisés durant 20 min (au lieu de 15 min précédemment) pour comparer les propriétés mécaniques des hydrogels dans les mêmes conditions de polymérisation. D'autre part, tous les échantillons ont été conservés à +37°C dans un incubateur de culture cellulaire, et dans une solution de NaCl à 0,9% supplémenté de 2 mM de CaCl₂ pour avoir les mêmes concentrations que le milieu de différenciation. Enfin, les tests ont été réalisés dans un bain de solution de conservation à +37°C.

Tableau VIII : Conditions expérimentales

Les conditions expérimentales d'élaboration, de conservation et de tests sont décrites pour les deux campagnes d'essais réalisés au cours de cette étude.

Campagnes d'essais	Première	Deuxième
Objectif	Evaluer l'influence du procédé de fabrication (pulvérisation vs moulage)	Evaluer l'influence de : - la composition du biomatériau - la stratification
Composition des biomatériaux	Alginate à 1,5 %	- Alginate à 1,5% - Alg/HA à 1,5% (80% d'Alg/20% d'HA) - Alg/Hap à 1,5% (95% d'Alg/5% Hap)
Temps de polymérisation	15 min	20 min (au total)
Mode de conservation	Dans une solution de conservation à 10 mM de CaCl ₂ à +4°C, toute une nuit	Dans une solution de conservation à 2 mM de CaCl ₂ à +37°C, toute une nuit
Conditions du test	A température ambiante	A +37°C, dans du milieu de conservation

*** Analyse des résultats d'essais :**

Après l'acquisition des données, une courbe de réponse est obtenue où la force $F(t)$ est représentée en fonction du déplacement du poinçon mobile $\delta(t)$. Chaque couple de mesures, à un intervalle de temps régulier (0,1 sec), est converti en contrainte équivalente (σ_{equ}) et déformation équivalente (ϵ_{equ}). Ces mesures permettent d'obtenir la courbe de réponse intrinsèque du

biomatériau étudié, et en particulier la contrainte à la rupture qui représente la valeur ultime atteinte à chaque essai.

Les courbes de σ_{equ} en fonction de la ϵ_{equ} permettent de comparer les données obtenues à différentes vitesses. La contrainte à la rupture et la déformation à la rupture sont des informations importantes qui permettent d'apprécier la résistance du biomatériau.

VI. Analyse statistique

Toutes les données sont présentées selon leur moyennes $\pm$ l'erreur standard de la moyenne (Standard error of the mean, SEM). Pour chaque étude, un minimum de 3 intra-essais est réalisé. Les différences statistiques entre les groupes d'expériences sont analysées par une analyse de variance (test ANOVA) à une ou deux directions, à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Un test T de Tukey ou de Bonferri est effectué et les valeurs p inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives statistiquement.

CHAPITRE III : Résultats et discussion

I. Validation du procédé de pulvérisation pour l'ingénierie du cartilage

Le protocole de pulvérisation d'un gel d'alginate a tout d'abord été validé en comparant le comportement des cellulesensemencées dans des hydrogels construits avec cette méthode, ou par moulage. Cette dernière technique, très utilisée pour obtenir des hydrogels d'alginate en ingénierie du cartilage, nous servira de référence. L'impact de la pression de pulvérisation sur les cellules (chondrocytesensemencés à 2 millions/mL de gel), a été exploré après pulvérisation du gel à 0,9 et 1,2 bar. Plusieurs paramètres ont été évalués au cours de la culture *in vitro* : la répartition des cellules dans l'hydrogel, la biocompatibilité du procédé et la synthèse matricielle. Parallèlement à ces études biologiques, les propriétés mécaniques des hydrogels ont été déterminées afin de savoir si le procédé de fabrication avait une influence sur la résistance à la contrainte des biomatériaux. Par abus de langage, les hydrogels construits avec la technique de moulage ou de pulvérisation seront dénommés "moulés" (M) et "pulvérisés" (P), de même pour les cellulesensemencées dans ces hydrogels.

A. Influence du procédé de fabrication sur des chondrocytes de rat

1. Répartition des cellules dans l'hydrogel et de l'actine dans les cellules

Les figures 45 et 46 représentent des chondrocytes de rat dont l'actine a été marquée avec de la phalloïdine-Alexa 488. Après 3 et 14 jours de culture *in vitro* (J3 et J14), ce marquage a permis de visualiser la répartition des cellules après le moulage (M) ou la pulvérisation (P) du gel à 0,9 ou 1,2 bar.

Quel que soit le mode de construction de l'hydrogel, la répartition des cellules est restée homogène dans le biomatériau (figure 45). Lorsque les chondrocytes ont été cultivés en monocouche, l'actine se présente sous forme de fibres de stress (figure 46-G). Après leur ensemencement dans un hydrogel d'alginate, l'actine semble périphérique, quels que soient le mode de fabrication et le temps de culture (figure 46 A à F). Il semble, cependant, qu'à J3, l'actine se rassemble sous forme de points lorsque le gel et les cellules ont été pulvérisés, alors qu'elle est périphérique et homogène après moulage. Après 14 jours de culture *in vitro*, l'actine est répartie sous forme de points dans les cellulesensemencées dans les hydrogels moulés et pulvérisés surtout à 0,9 bar (figure 46 B, D et F).

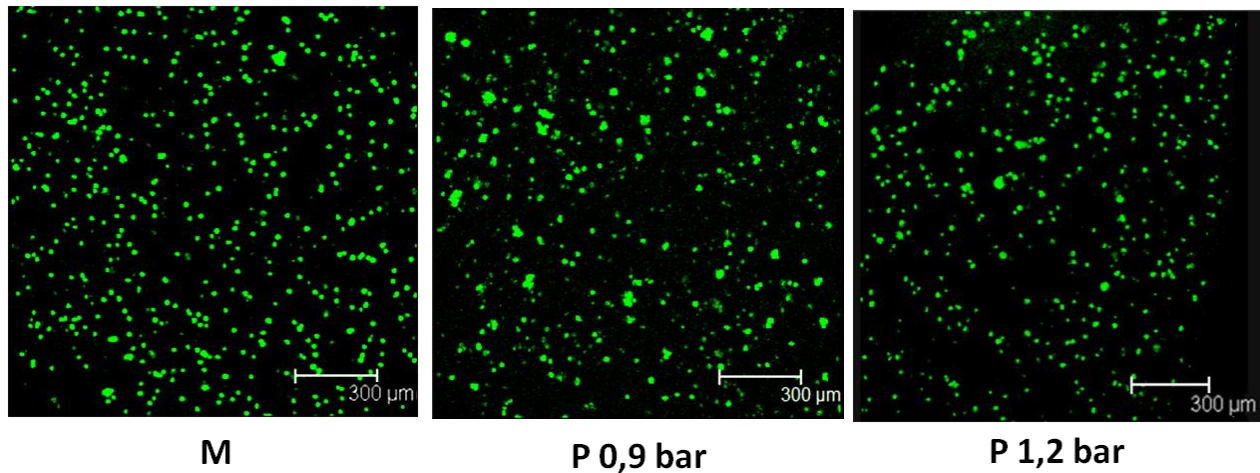


Figure 45 : Influence du procédé de fabrication des hydrogels sur la répartition des cellules

Après la fabrication des hydrogels par moulage (**M**) ou pulvérisation (**P**) à 0,9 ou 1,2 bar, les hydrogels sont cultivés *in vitro*. Après 3 jours, le réseau d'actine est marqué, puis la fluorescence est observée par microscopie confocale (Leica SP2AOBS, Objectif x10, ON = 0,3). Les chondrocytes de rat semblent être répartis de manière homogène dans l'hydrogel quel que soit le processus de fabrication. Les barres d'échelle représentent 300 µm.

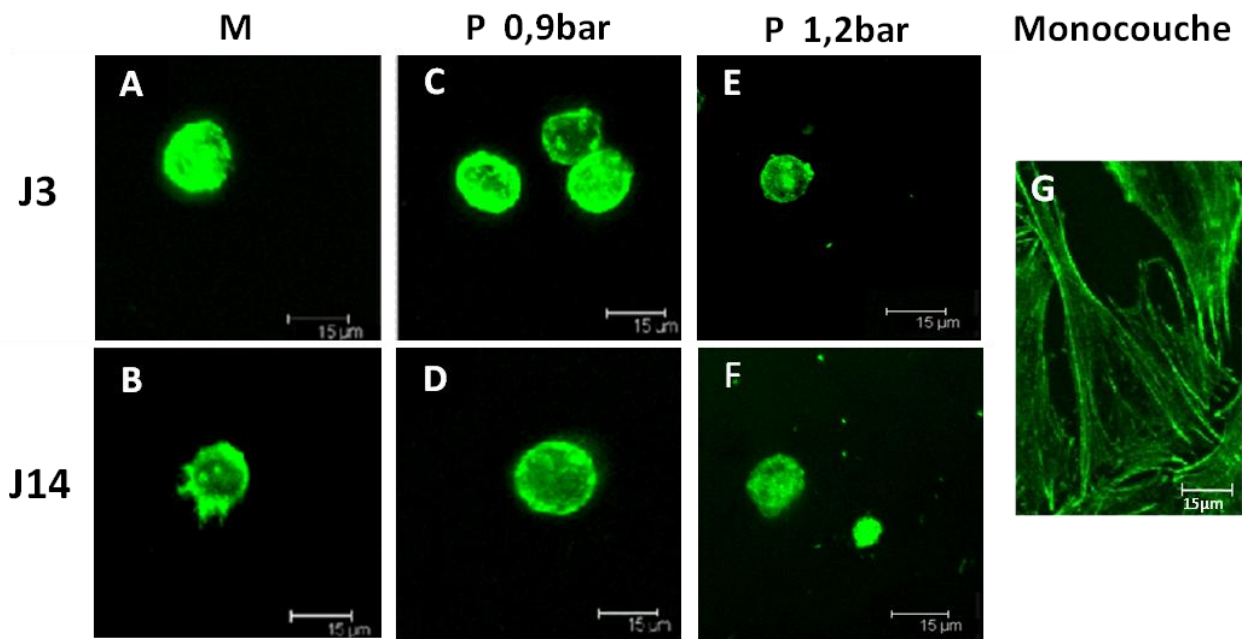


Figure 46 : Influence du mode de construction des hydrogels sur la répartition de l'actine dans les cellules

Les cellules ont étéensemencées dans un gel d'alginate qui a été moulé (**M**, **A-B**) ou pulvérisé (**P**) à 0,9 ou 1,2 bar (**C à F**), puis polymérisé pour obtenir un hydrogel. Après 3 et 14 jours de culture (**J3** et **J14**), l'actine a été marquée, puis la fluorescence a été observée par microscopie confocale (Leica SP2AOBS, Objectif x40, ON = 0,8). L'actine de cellules cultivées en monocouche a été également marquée et observée ; elle semble être répartie sous forme de filament (**G**). Après 3 jours de culture, l'actine semble être distribuée de manière homogène et péricellulaire dans les chondrocytes des hydrogels moulés, et être répartie sous forme de spot après 14 jours. D'autre part, elle semble avoir la forme de points lorsque le gel et les cellules ont été pulvérisées quel que soit le temps de culture. Les barres d'échelles représentent 15 µm.

2. Viabilité et synthèse de nitrite

Les figures 47 et 48 représentent, respectivement, l'évolution de la viabilité et de la production de nitrite par les cellules au cours du temps.

La viabilité des chondrocytes de rat a été évaluée, pendant 14 jours, en déterminant, par cytométrie en flux, la proportion de cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques dans le biomatériau. Après 3 jours de culture, la proportion de cellules vivantes mesurée est de $97,8 \pm 1,6\%$ pour les cellules moulées, contre $88,3 \pm 6,8\%$ et $80,8 \pm 4,9\%$ pour des cellules pulvérisées à 0,9 et 1,2 bar, respectivement. Des différences significatives ont été observées entre les échantillons moulés et pulvérisés à 0,9 ($p < 0,01$) et 1,2 bar ($p < 0,001$). Les cellules mortes présentes dans le biomatériau étaient principalement dans un état de nécrose. Après 7 jours de culture, la viabilité était supérieure à 95%, quel que soit le procédé de fabrication, et sans qu'aucune différence significative ne soit observée entre les différents types de biomatériau.

Le dosage des nitrites produits par les chondrocytesensemencés dans des hydrogels moulés ou pulvérisés a montré une diminution de la production à partir de 3 jours de culture, quel que soit le procédé de fabrication.

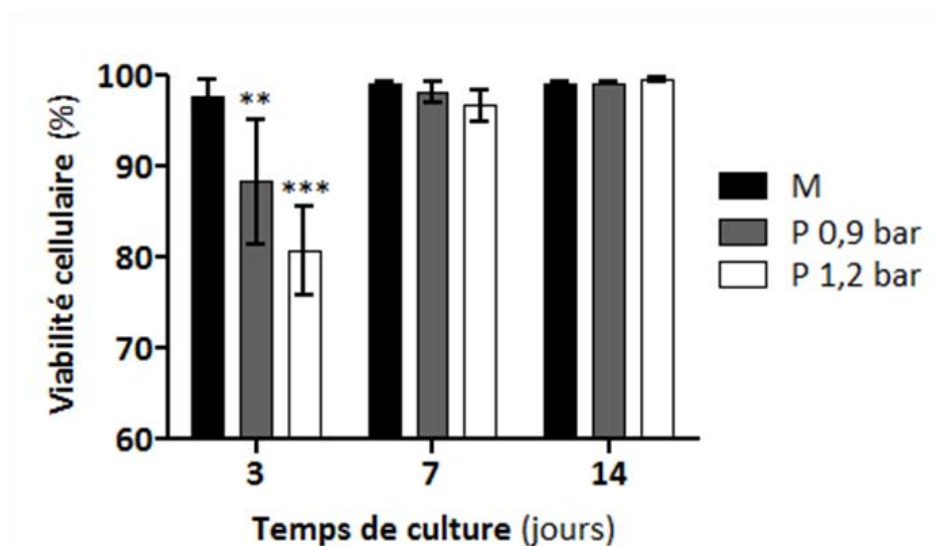


Figure 47 : Evolution de la proportion de chondrocytes vivants

Après leur ensemencement et leur culture, les proportions de cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques ont été évaluées par cytométrie en flux. Après 3 jours de culture, la viabilité des cellules pulvérisées (P) à 0,9 ou 1,2 bar, est significativement plus faible que celle des cellules ensemencées dans un hydrogel d'alginate moulé (M). Cependant, après 7 jours, les viabilités cellulaires sont supérieures à 95% indépendamment du mode de fabrication des hydrogels. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, N = 3, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ pour M vs S xbar.

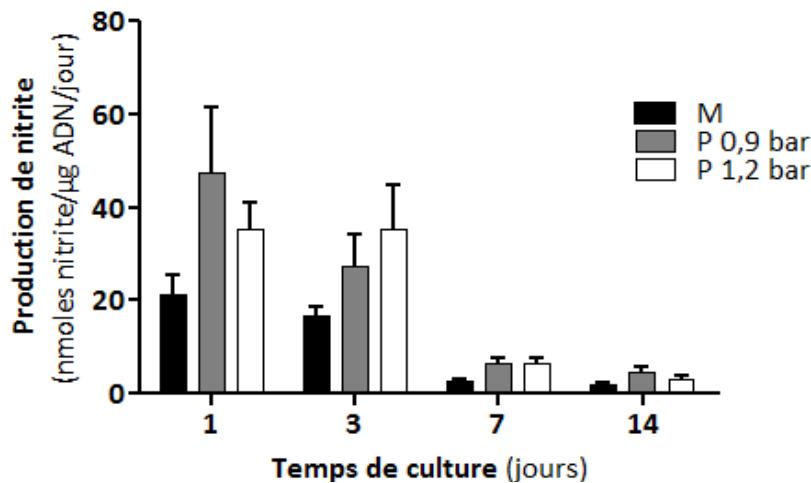


Figure 48 : Evolution de la production de nitrite par des chondrocytes de rat ensemencés dans un hydrogel d'alginate

Après la construction d'hydrogel par pulvérisation (*P*) à 0,9 ou 1,2 bar, et par moulage (*M*), le dosage du nitrite a été réalisé durant les 14 jours de culture. A partir de 3 jours, la production de nitrite diminue. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, $N = 3$.

3. Synthèse matricielle

L'analyse de la synthèse matricielle a été réalisée d'une part, par histologie, pour visualiser la synthèse des collagènes totaux (coloration au Rouge Sirius) et la production de GAG (coloration au Bleu Alcian) après 28 jours de culture (figure 49), et d'autre part, par immunofluorescence et observation au microscope confocal, pour détecter la synthèse des collagènes de type I et II (figure 50).

Les images obtenues montrent, tout d'abord, des différences significatives des épaisseurs entre les hydrogels pulvérisés et moulés. Pour un même volume d'alginate pulvérisé (12 mL), l'hydrogel pulvérisé à une pression de 1,2 bar est 1,5 fois moins épais que celui pulvérisé à 0,9 bar, et 1,7 fois moins épais que le gel moulé.

Après 28 jours, les collagènes et les GAG synthétisés par les chondrocytes de rat étaient observés dans la matrice péricellulaire ; indépendamment du procédé de fabrication. Par ailleurs, il semblerait que les hydrogels obtenus après une pulvérisation à 1,2 bar contenaient plus de bulles d'air que les hydrogels pulvérisés à 0,9 bar ou les hydrogels moulés.

L'immunomarquage des collagènes de type I et II et leur observation au microscope confocal montrent, sur la figure 50, que les collagènes de types I et II sont synthétisés par les chondrocytes de rat au cours des 28 jours de culture. Il semble, cependant, que le collagène de type II soit un peu plus synthétisé au sein des hydrogels moulés par rapport aux hydrogels pulvérisés.

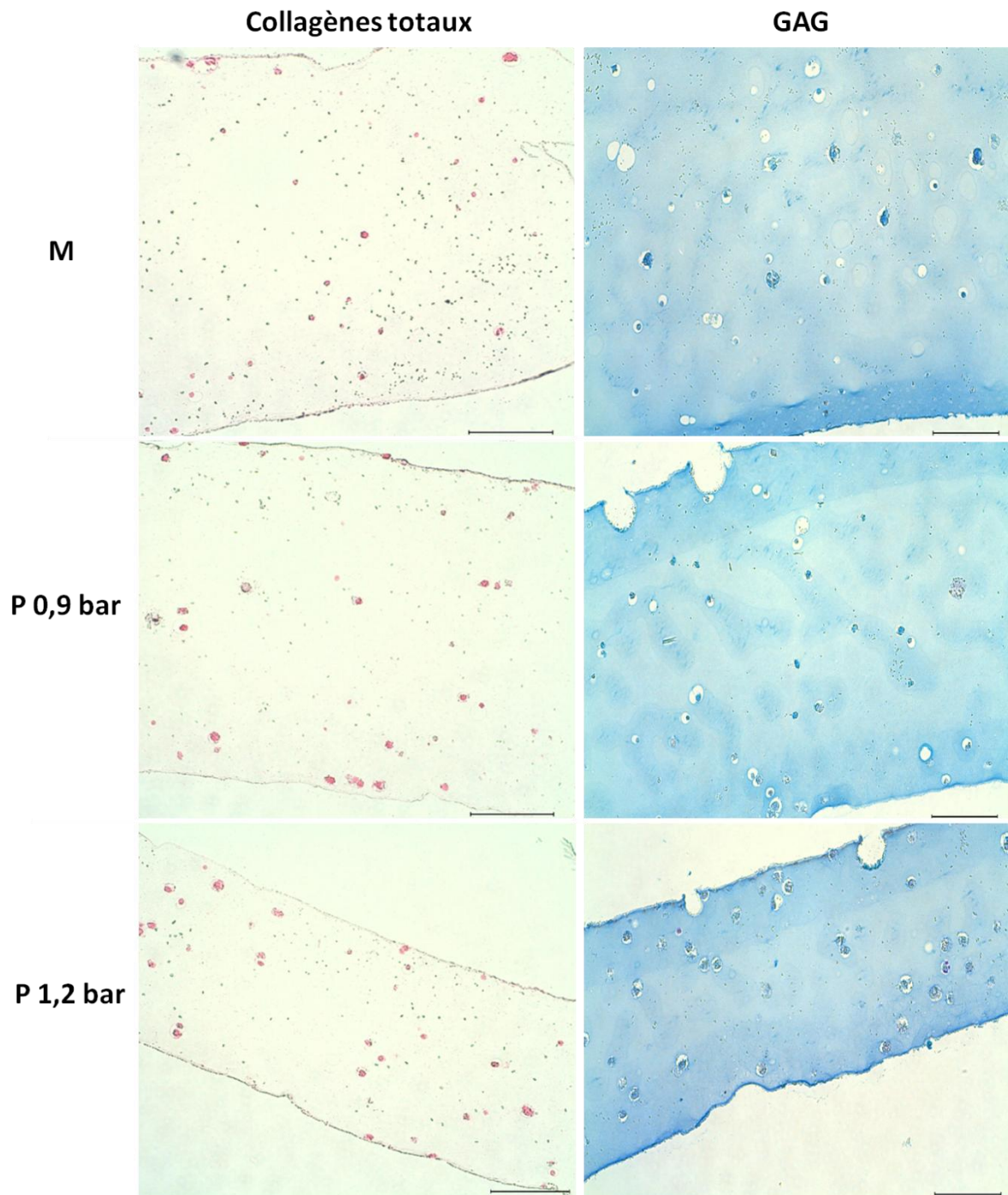


Figure 49 : Influence du procédé de fabrication des hydrogels sur la production des collagènes et des GAG

Après 28 jours de culture, les hydrogels moulés (M) et pulvérisés (P) à 0,9 ou 1,2 bar sont fixés et colorés avec du Rouge Sirius ou du Bleu Alcian pour mettre en évidence, respectivement, les collagènes totaux et les GAG. Dans toutes les conditions testées, la synthèse des collagènes et des GAG semble péricellulaire. Les images ont été prises avec un objectif X20 et les barres d'échelle représentent 100 μ m.

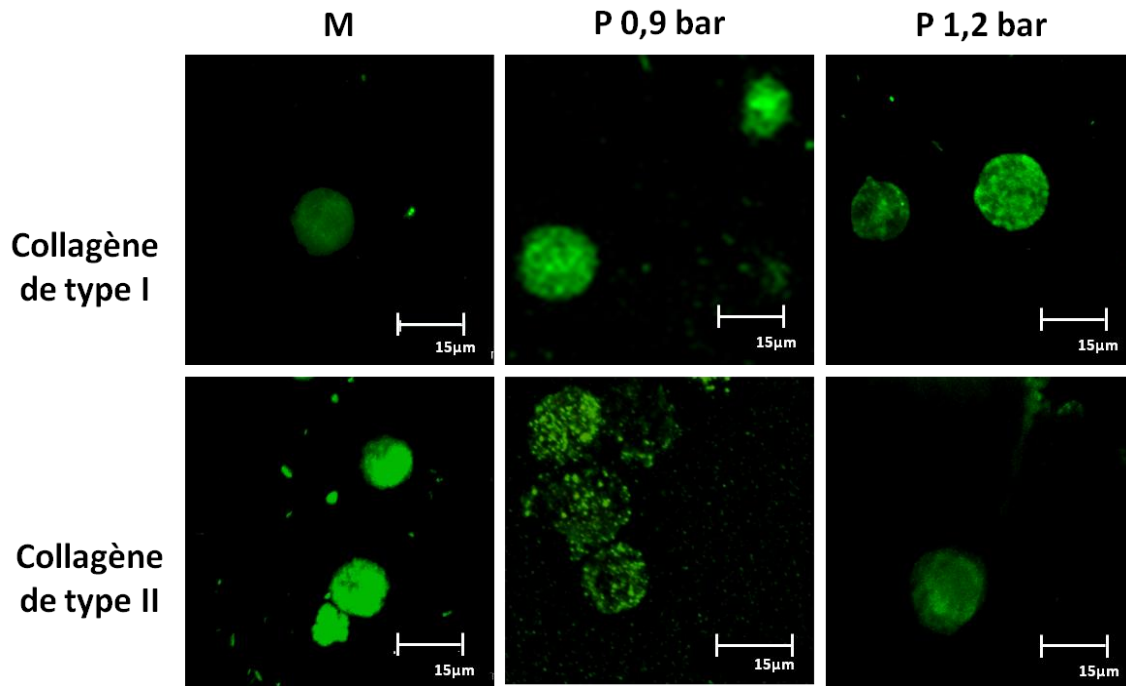


Figure 50 : Influence du procédé de fabrication des hydrogels sur la synthèse des collagènes de type I et II

Après 28 jours de culture in vitro, les collagènes de type I et II d'hydrogels pulvérisés (P) à 0,9 ou 1,2 bar, et moulés (M) sont immunomarqués, puis la fluorescence a été observée par microscopie confocale. La synthèse des collagènes de type I et II reste péri-cellulaire dans toutes les conditions étudiées. Les barres d'échelle représentent 15 μm (Leica SP2AOBS, Objectif x40, ON = 0,8).

B. Exploration des propriétés mécaniques du biomatériau

Des tests de bipoinçonnement ont été réalisés à différentes vitesses de déformation monotone sur des échantillons d'hydrogel d'alginate, sans cellule, moulés ou pulvérisés à 0,9 bar.

La figure 51 représente les courbes de contrainte équivalente (σ_{equ}) en fonction de la déformation équivalente (ϵ_{equ}) à $\dot{\delta}$ variant de 0,1 à 6 $\text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$. Les courbes de réponses des hydrogels pulvérisés sont plus fortes pour une même déformation équivalente que celles des hydrogels moulés. Par exemple, à $\dot{\delta} = 0,6 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ et $\epsilon_{\text{equ}} = 0,5$, on a une σ_{equ} d'environ 50 kPa pour les hydrogels pulvérisés et d'environ 15 kPa pour ceux qui ont été moulés. Cependant, pour $\dot{\delta} = 2 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$, les écarts diminuent entre les deux méthodes testées.

La figure 52 représente la réponse des échantillons après une sollicitation mécanique à différentes $\dot{\epsilon}$ pour plusieurs niveaux de déplacement : 0,3 (A), 0,5 (B) et 0,7 mm (C). Ainsi, quel que soit le niveau de déformation, les hydrogels d'alginate pulvérisés montrent une résistance à la déformation significativement plus forte qu'après moulage ($p < 0,05$ à 0,001). Par exemple, pour une $\dot{\epsilon}$ de $0,8\% \text{ s}^{-1}$, la contrainte équivalente, en réponse à une déformation de 0,3 mm, est de $5,3 \pm 1,5 \text{ kPa}$ dans le cadre du moulage, contre $22 \pm 1,9 \text{ kPa}$ pour la pulvérisation. D'autre part, une résistance maximale des hydrogels pour une $\dot{\epsilon}$ d'environ $2,5\% \text{ s}^{-1}$ a été observée quels que soient

le niveau de déformation et le procédé d'élaboration de l'hydrogel. Pour des vitesses de déformation plus importantes, la résistance mécanique des hydrogels pulvérisés et moulés diminue.

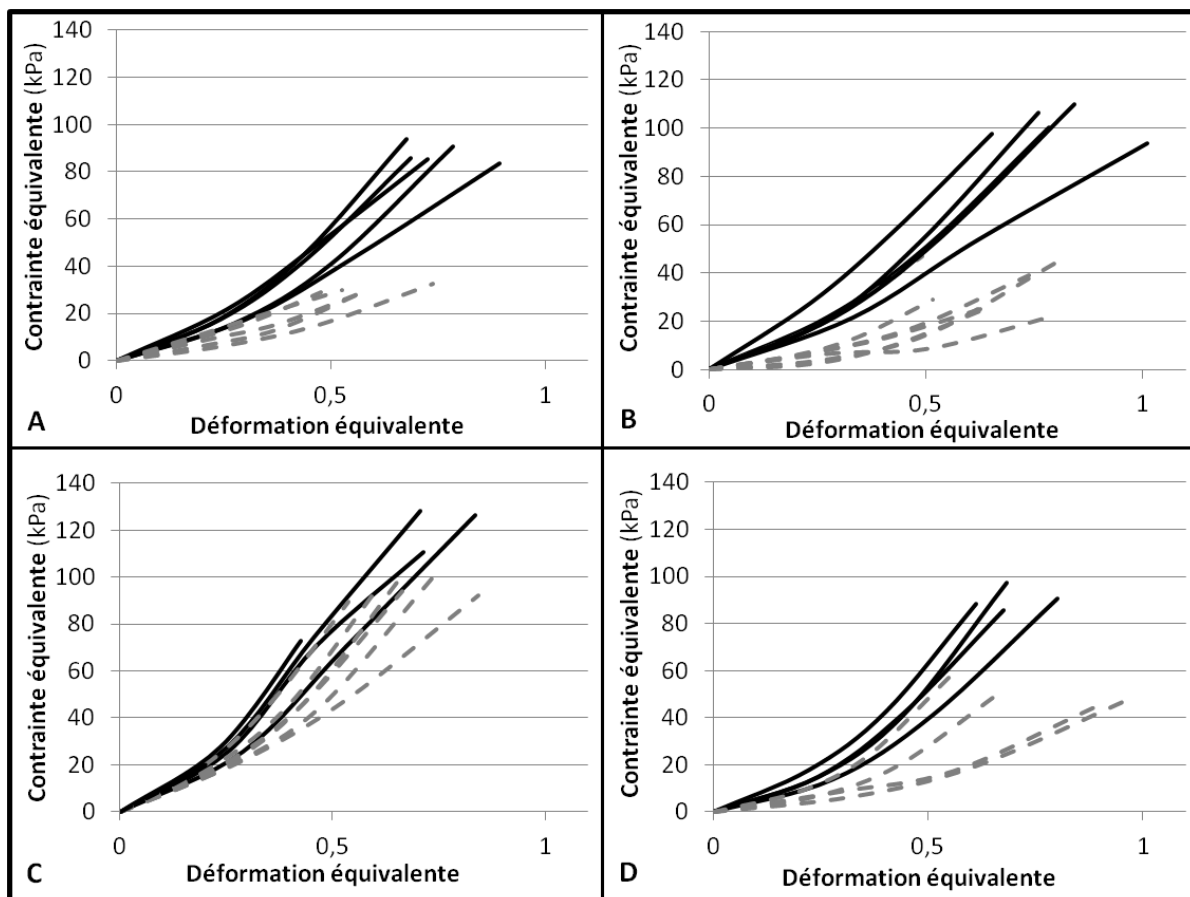


Figure 51 : Influence du procédé de fabrication des hydrogels sur leur comportement mécanique
Des échantillons d'alginate pulvérisés (ligne continue) et moulés (ligne discontinue) ont été soumis à des tests de bipoinçonnement à des vitesses de déplacement constantes de 0,1 (A), 0,6 (B), 2 (C) et 6 mm.min⁻¹ (D). Les courbes de réponses des hydrogels, aux tests de bipoinçonnement, montrent que pour toutes ces vitesses de déplacement, les hydrogels pulvérisés ont une meilleure résistance mécanique que les moulés (plus grande contrainte à même niveau de déformation).

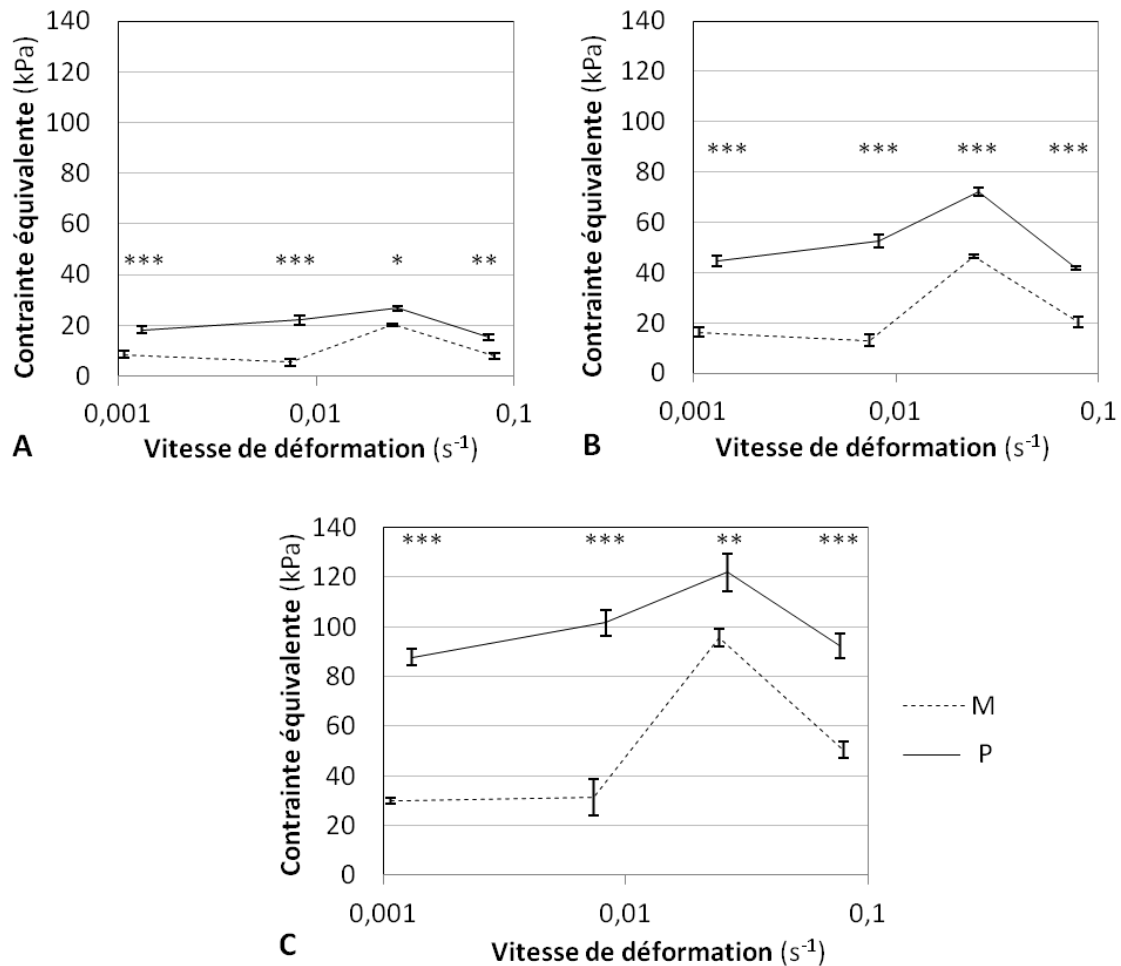


Figure 52 : Influence de la vitesse de déformation sur la réponse des hydrogels pour différents niveaux de déplacement (écrasement)

Les contraintes équivalentes mesurées en réponse aux déformations des hydrogels pulvérisés (**P**, lignes continues) ou moulés (**M**, lignes discontinues), ont été représentées en fonction de la vitesse de déformation pour des niveaux de déplacement de 0,3 (**A**) - 0,5 (**B**) et 0,7 mm (**C**). La contrainte équivalente ressentie augmente jusqu'à une vitesse de déformation de 2,5% s⁻¹, puis elle diminue quel que soit le mode de construction des hydrogels. D'autre part, indépendamment de la vitesse de déformation et du niveau de déplacement, les hydrogels pulvérisés ont une meilleure résistance mécanique que les moulés. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, $N = 3$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ pour M vs P.

C. Discussion

La validation du protocole de pulvérisation a été divisée en 2 parties : d'une part une validation du comportement des cellules dans l'hydrogel, et d'autre part la caractérisation du comportement mécanique du biomatériau en fonction du procédé de fabrication.

Pour chacune des parties, les résultats obtenus ont été comparés à une méthode largement utilisée dans la construction d'hydrogel d'alginate : le moulage (Wong *et al.* 2001). Les résultats ont tout d'abord montré l'effet d'une pression de pulvérisation de 1,2 bar non seulement sur la morphologie du biomatériau mais aussi sur le comportement des cellules. En effet, tous les

hydrogels pulvérisés étaient significativement moins épais que leurs homologues pulvérisés à 0,9 bar. Sheperd et al. ont montré que l'épaisseur du cartilage du coude et du genou se situait dans des ordres de grandeurs de 1 à 1,62 mm et de 1,69 à 2,55 mm respectivement, et pour la hanche de 1,35 à 2 mm (Shepherd *et al.* 1999). Or, une pression de 1,2 bar ne permet pas d'obtenir des hydrogels d'une épaisseur de cet ordre. De plus, une proportion plus importante de bulles d'air était également observée dans les hydrogels pulvérisés à 1,2 bar, rendant la répartition des cellules plus hétérogène. Les études de viabilité ont également montré qu'à cette pression la proportion de cellules vivantes était plus faible dans les premiers jours qui suivaient la fabrication des hydrogels par rapport aux hydrogels obtenus après pulvérisation à 0,9 bar ou les hydrogels moulés. Si l'alginate est considéré comme un fluide incompressible et que l'angle de pulvérisation est toujours identique, alors l'équation de Bernoulli peut être appliquée. Dans ces conditions, l'énergie est directement proportionnelle à la pression de pulvérisation. Ainsi, entre 0,9 et 1,2 bar, l'énergie d'impact augmentait de 33%. On peut alors supposer que pour une pression supérieure à 0,9 bar, l'impact des cellules sur le support peut causer des dommages plus importants. Ceci est confirmé par Jeffrey et al. qui ont montré que la proportion de chondrocytes d'un cartilage soumis à un impact diminue avec l'augmentation de l'énergie d'impact (Jeffrey *et al.* 1995). Dans la suite du travail, seule la pression à 0,9 bar a été utilisée pour construire les biomatériaux pulvérisés.

D'autre part, plusieurs études ont montré que la production de NO dirigeait les chondrocytes vers l'apoptose et induisait une destruction du cartilage *via* l'activation de MMP (Grigolo *et al.* 2005). Ainsi, la production de nitrite pouvait être considérée comme un indicateur du stress ressenti par les chondrocytes (Ewers *et al.* 2001). Dans cette étude, la production de nitrite tend à diminuer de J1 à J3. Au-delà de 3 jours de culture, il semblerait que les cellules se soient adaptées à leur environnement puisque la proportion de cellules vivantes avoisine les 95% et les taux de production de nitrite ont diminué, quelle que soit la pression de pulvérisation.

Dans les cellules pulvérisées à 0,9 bar, la distribution du réseau d'actine se fait sous forme de points, ce qui semble indiquer que ces cellules se redifférencient plus rapidement en chondrocytes que les autres. En effet, selon Kino-oka et al., la suppression de la dédifférenciation des chondrocytes passerait par la rupture du cytosquelette d'actine qui formerait des points d'actine-F (Kino-Oka *et al.* 2005). Ces auteurs ont montré que la rupture du cytosquelette dans des cellules rondes, et donc dans un environnement tridimensionnel, facilite la formation du collagène de type II spécifique des chondrocytes et du cartilage. Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec les travaux de Kino-oka puisqu'associés à une redistribution du réseau d'actine dans

les hydrogels moulés et pulvérisés à 0,9 bar, une néosynthèse du collagène de type II a été observée dans la matrice péricellulaire. La synthèse du collagène de type I par des chondrocytes encapsulés dans une matrice tridimensionnelle, après avoir été cultivés en monocouche, a largement été décrite par différents auteurs (Heyland *et al.* 2006; Wang *et al.* 2008; Lin *et al.* 2009). Cette synthèse s'expliquerait notamment par une dédifférenciation des chondrocytes lors de la culture en monocouche ainsi que par un turn-over relativement lent des fibres de collagène.

L'interprétation des phénomènes mécaniques n'est pas clairement élucidée. Cette configuration du test est sensible aux forces de frottement des échantillons. Cependant, nous avons vu que, quelle que soit la vitesse de déformation, la résistance mécanique des hydrogels obtenus par pulvérisation est supérieure à celle des moulés. Les contraintes peuvent sembler faibles par rapport à ce que subit le cartilage *in vivo*, cependant, les vitesses de déformation utilisées sont importantes, dont $\dot{\epsilon} = 7,9\% \text{ s}^{-1}$ qui correspond à ce que subit le cartilage articulaire lors d'un impact violent au niveau du genou après un saut d'une chaise selon Eckstein *et al.* (Eckstein *et al.* 2005). De plus, la résistance mécanique augmente puis diminue lorsque la vitesse de déformation augmente, et ce quel que soit le mode de fabrication. De ce point de vue, le comportement du biomatériau peut être décrit comme viscoplastique pour de fortes déformations. Le comportement mécanique de l'alginate a été analysé en tenant compte de la morphologie, de la distribution et de l'interaction des chaînes d'alginate (Mancini *et al.* 1999). Malgré ce dernier point, le comportement mécanique du biomatériau pulvérisé à 0,9 bar est supérieur à celui des hydrogels moulés indépendamment du niveau de déformation et de la vitesse de déformation. De plus, les ordres de grandeur des contraintes estimées concordent avec ceux qu'observent d'autres auteurs. Les courbes contrainte-déformation ont les mêmes apparences mais avec une déformation de 50% à la rupture à une vitesse de 120 mm.min^{-1} chez Mancini *et al.*, contre 80% à 6 mm.min^{-1} pour les résultats de cette étude. Il est important de noter que Mancini *et al.* n'ont pas autoclavé leur alginate, ce qui diminue fortement la viscosité du gel.

Pour tous les paramètres biologiques testés, peu de différences ont été observées entre les échantillons pulvérisés et moulés, que ce soit au niveau de la biocompatibilité du procédé, ou de la synthèse de MEC par les cellules. Cependant, les tests mécaniques permettent de montrer que la pulvérisation est une meilleure alternative que les moulages pour ce qui concerne la résistance mécanique. Ces résultats permettent de valider la pulvérisation comme méthode de construction d'un hydrogel d'alginate et d'initier la construction d'hydrogel stratifié. Par la suite, des cellules

souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse humaine seront utilisées car les chondrocytes humains sains sont difficiles à obtenir en grand nombre et leur dédifférenciation lors de l'amplification en monocouche limite l'utilisation.

Points essentiels :

- la pulvérisation des chondrocytes ensemencés dans un gel d'alginate n'est pas délétère pour les cellules,
- une pression de pulvérisation de 0,9 bar permet d'obtenir des hydrogels d'une épaisseur satisfaisante,
- la résistance mécanique des hydrogels pulvérisés à 0,9 bar est supérieure à celle des hydrogels moulés.

II. Construction, par pulvérisation, d'hydrogels stratifiés ensemencés en CSM humaines

Dans cette seconde étape du travail, des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) ont été utilisées, notamment, pour leur facilité d'obtention en grand nombre. Avant de construire des hydrogels stratifiés, ces CSM ont été ensemencées dans un gel d'alginate supplémenté avec de l'acide hyaluronique (Alg/HA) qui a été pulvérisé, puis polymérisé dans un bain de CaCl_2 pour obtenir un hydrogel monostratifié. Les hydrogels obtenus sont cultivés dans un milieu chondrogénique sans facteur de croissance. Cette étape permet de valider la biocompatibilité de la pulvérisation de CSM humaines en analysant la viabilité des cellules, leur phénotype et leur différenciation dans cet environnement. Puis, des hydrogels bistratifiés d'Alg/HA ensemencés de CSM ont été construits et cultivés avec le même milieu de différenciation. La migration des cellules et la synthèse matricielle ont été explorées dans ces hydrogels multicouches. Parallèlement, l'influence de la composition du biomatériau sur la résistance mécanique des hydrogels a été explorée, ainsi que l'influence de la stratification.

A. Comportement des CSM pulvérisées dans un système à une couche

1. Répartition des cellules dans l'hydrogel

L'actine des cellules a été marquée avec de la phalloïdine-Alexa 488, puis observée par microscopie confocale. Ce marquage a, tout d'abord, permis de visualiser l'ensemble des cellules à l'intérieur de l'hydrogel. Ainsi, il apparaît, sur les figures 53A et 53B, une répartition homogène des cellules au sein de l'hydrogel pulvérisé. Si certaines cellules se présentent de manière individuelle,

des regroupements de deux ou plusieurs cellules sont également observés.

L'observation de l'actine au niveau des cellules montre une répartition plutôt périphérique (figures 53-C et 53-D).

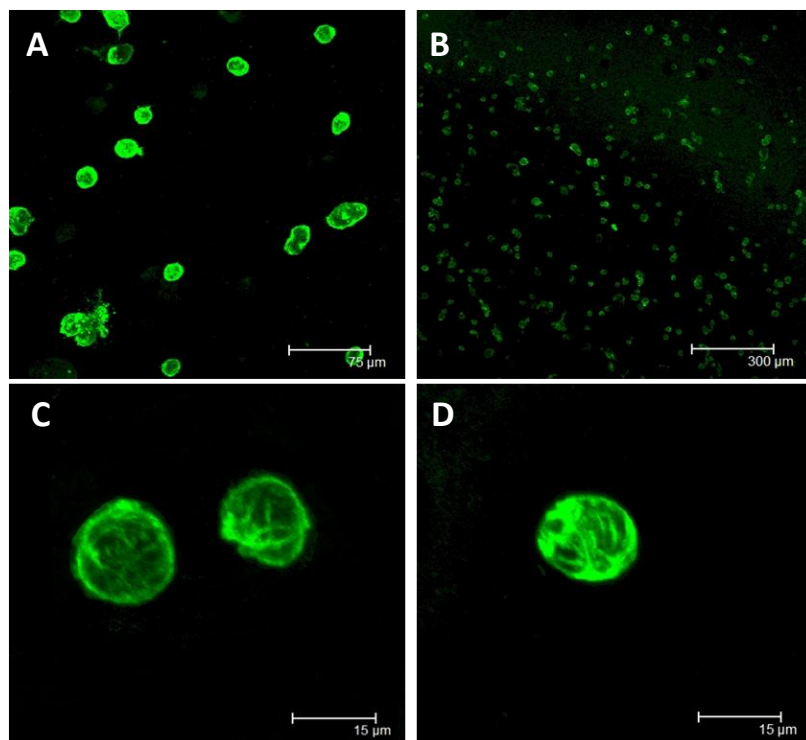


Figure 53 : Répartition des cellules dans un hydrogel d'Alg/HA

Après 7 jours de culture, l'actine des CSM a été marquée avec de la phalloïdine-Alexa 488. Les CSM sont distribuées de manière homogène dans l'hydrogel après leur pulvérisation (A-B). D'autre part, la répartition de l'actine semble périphérique (A-B). Les images ont été obtenues par microscopie confocale (Leica SP2AOBS, Objectif x40, ON = 0,8 (A à C) et objectif X10, ON = 0,3 (D)). Les barres d'échelles représentent 15 (A-B), 75 (C) et 300 µm (D).

2. Viabilité et activité métabolique

Les figures 54 et 55 représentent l'évolution de la viabilité cellulaire et de l'activité métabolique des CSM ensemencées dans des hydrogels d'Alg/HA à une couche. La viabilité des CSM est contrôlée, après 3, 14 et 28 jours de culture, en utilisant un kit Vybrant/Apoptosis™ qui permet de distinguer trois populations cellulaires : vivantes, nécrotiques et apoptotiques, par cytométrie en flux.

Après 3 jours de culture, la viabilité est de $57,3 \pm 3,9\%$. La proportion de cellules apoptotiques est toujours inférieure à 1%, quel que soit le temps de culture. Le reste des cellules mortes sont en nécrose. Au-delà de 7 jours (J7), la viabilité cellulaire augmente significativement et ce jusqu'à la fin de la culture pour atteindre une viabilité supérieure à 90% ($p > 0,01$ à J7, et $p < 0,001$ à J14, J21 et J28).

L'activité métabolique, représentée sur la figure 55, a été calculée grâce au pourcentage de

réduction de l'Alamar Blue rapporté à la quantité d'ADN dans un échantillon. Entre le 3^{ème} et le 7^{ème} jour de culture, l'activité métabolique des cellules est maintenue constante ($p>0.05$). A partir de 14 jours de culture, l'activité métabolique tend à augmenter sans qu'aucune différence significative ne soit observée par rapport à J3. Cette tendance devient significative à partir du 21^{ème} jour de culture ($p<0,001$ à J21 et J28).

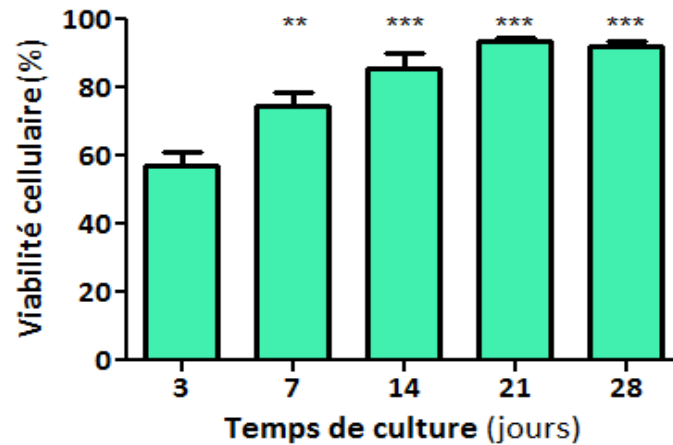


Figure 54 : Evolution de la viabilité des CSM après leur pulvérisation

Après la construction par pulvérisation d'un hydrogel d'alginate/acide hyaluronique (Alg/HA)ensemencé de CSM, la proportion de cellules vivantes a été évaluée par cytométrie en flux. Après 3 jours de culture, 57,2% des cellules sont vivantes. Dès 7 jours de culture, la viabilité cellulaire augmente pour atteindre plus de 90% au-delà de 14 jours. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, $N = 3$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ pour J3 vs Jx.

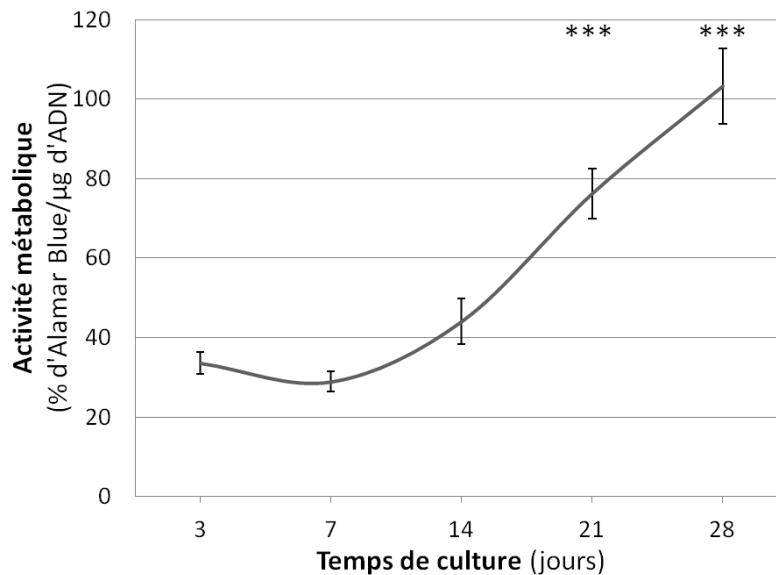


Figure 55 : Evolution de l'activité métabolique des CSM après leur pulvérisation

L'activité métabolique des CSM ensemencées dans un hydrogel d'Alg/HA pulvérisé a été calculée grâce au pourcentage de réduction d'Alamar Blue rapporté à la quantité d'ADN. L'activité métabolique est stable jusqu'à 14 jours de culture, puis elle augmente significativement après 21 et 28 jours de culture. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, $N = 3$, *** $p < 0,001$ pour J3 vs Jx.

3. Immunophénotypage des CSM au cours de la culture

L'immunophénotypage des CSM est réalisé par immunomarquage direct et par cytométrie

en flux. Il permet d'analyser la proportion de cellules exprimant un marqueur de surface caractérisant les CSM. Ce test est réalisé sur les cellules en monocouche (à l'issue du 3^{ème} passage) et sur les cellules ensemencées dans l'hydrogel d'Alg/HA.

a. Exclusion de certains marqueurs de surface

Sur la figure 56 sont représentés des histogrammes de fluorescence obtenus lors de l'analyse des marqueurs de surface CD34, CD45 et HLA-DR. L'histogramme blanc représente l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) obtenue lors de l'analyse du contrôle isotypique. L'histogramme coloré représente l'IMF obtenue lors de l'analyse des échantillons cellulaires. La superposition de ces deux histogrammes montre que les CSM n'expriment ni les marqueurs CD34 et CD45 (figure 56-A et 56-B) ni l'antigène HLA-DR (figure 56-C).

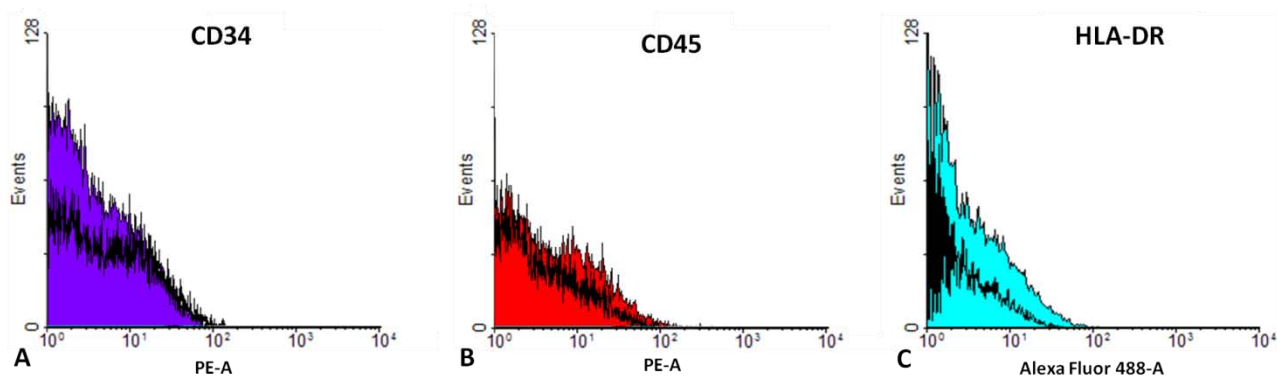


Figure 56 : Expression des marqueurs CD34 (A), CD45 (B) et HLA-DR (C) à la surface des CSM

L'histogramme blanc représente l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) obtenue lors de l'analyse du contrôle isotypique (PE ou FITC). L'histogramme coloré représente l'IMF obtenue lors de l'analyse des échantillons cellulaires.

b. Expression des marqueurs de surface en monocouche et en structure tridimensionnelle

La figure 57 représente la proportion de cellules exprimant les marqueurs CD44 (figure 57-A), CD73 (figure 57-B), CD90 (figure 57-C), CD105 (figure 57-D) et CD166 (figure 57-E) à l'issue de la culture en monocouche (P3) ou en structure tridimensionnelle (après 3, 14 et 28 jours de culture). Il apparaît que l'expression du marqueur CD105 et CD166 diminue, de manière significative, lorsque les cellules sont cultivées dans une matrice tridimensionnelle par rapport à la culture en monocouche (figure 57-D et -E). En revanche, la proportion de cellules exprimant le marqueur CD44 augmente significativement en culture tridimensionnelle par rapport à la culture en monocouche (figure 57-A).

Enfin, durant les 28 jours de culture des CSM dans le biomatériau d'Alg/HA, la proportion de

cellules exprimant les marqueurs CD44, CD73 et CD90 est restée constante (figure 57-A, B et C).

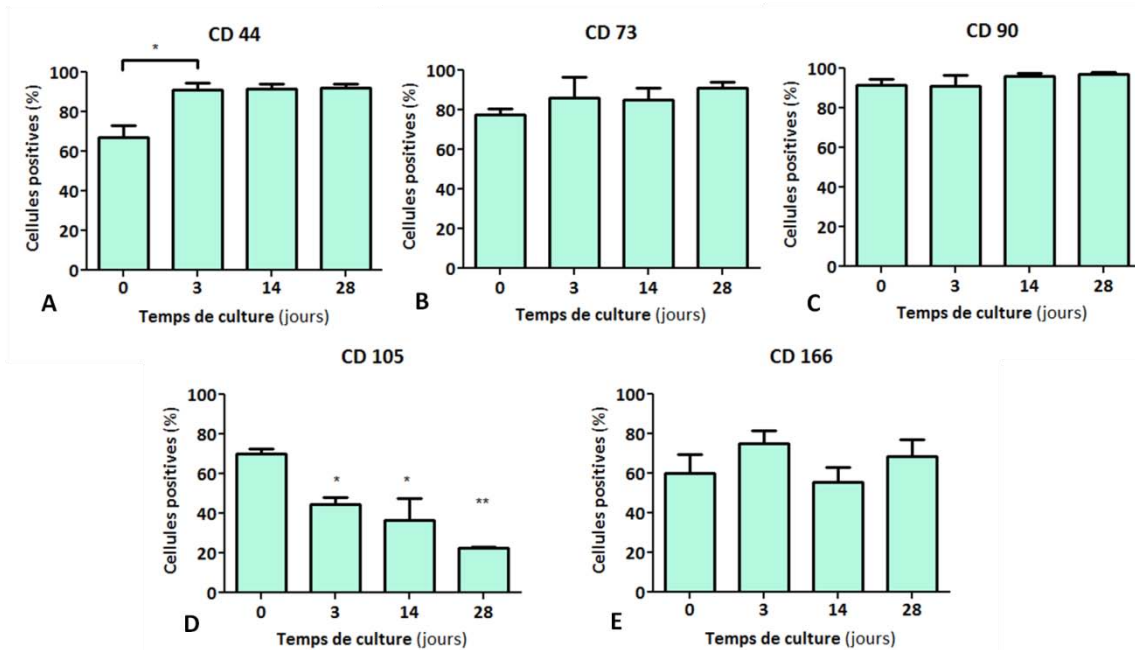


Figure 57 : Evolution du phénotype de CSM ensemencées dans un hydrogel d'Alg/HA

Avant et après leur ensemencement, le phénotype des cellules souches mésenchymateuses a été étudié après un immunomarquage des clusters de différenciation (CD) 44 (A), 73 (B), 90 (C), 105 (D) et 166 (E). Le pourcentage de cellules positives est représenté en fonction du temps de culture pour chacun des CD, J0 étant les cellules en monocouche à la fin de la P3. L'expression de CD44 et CD105 est différente significativement entre la culture en monocouche des cellules, et leur culture dans un hydrogel d'Alg/HA à J3. L'évolution des cellules positives par rapport au 3^{ème} jour de culture ne montre aucune différence significative. Le pourcentage de cellules positives n'évolue pas pour CD44, 73 et 90. Quant à CD105 et CD166, le nombre de cellules positives semble diminuer au cours du temps. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, N = 3, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ pour J0 vs Jx.

4. Expression des gènes d'intérêt

Les figures 58 et 59 représentent l'évolution de l'expression génique de facteurs de transcription et de protéines matricielles par des CSM ensemencées dans un hydrogel d'Alg/HA pulvérisé et cultivées dans un milieu chondrogénique sans facteur de croissance.

L'expression génique est rapportée à celle de RP29 pour obtenir l'expression relative de chaque gène.

Les expressions relatives de Sox9, COMP, Col1 et Agg augmentent significativement au cours de la culture des CSM ($p < 0,01$ pour Sox9 et $p < 0,001$ pour Col1, Agg et COMP). D'autres gènes comme Runx2 et Col10 sont exprimés tout au long de la cinétique, mais sans variation significative de leur expression relative ($p > 0,05$). Par ailleurs, l'expression génique de l'ostéocalcine (OC), du versican et du collagène 2 total (Col2 total) augmente jusqu'à 14 jours de culture, puis stagne. Enfin, l'expression relative de Col2A semble diminuer jusqu'à 28 jours de culture, mais pas de manière significative.

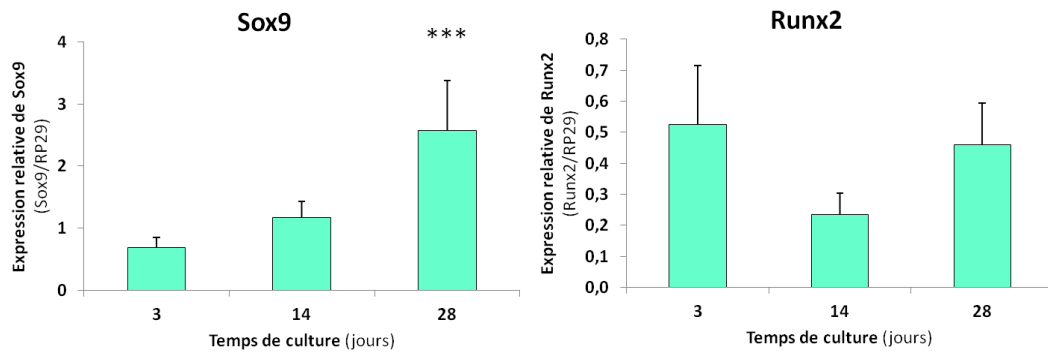


Figure 58 : Evolution de l'expression génique de facteur de transcription

L'expression génique de facteurs de transcription spécifique de la chondrogenèse et de l'ostéogenèse, Sox9 et de Runx2, a été reportée à celle de RP29 et analysée au cours de la culture des CSM dans un hydrogel d'Alg/HA. Après 28 jours de culture, l'expression relative de Sox9 augmente significativement, alors que celle de Runx2 est stable tout au long de l'étude. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, N = 5, *** $p < 0,001$ pour J3 vs Jx.

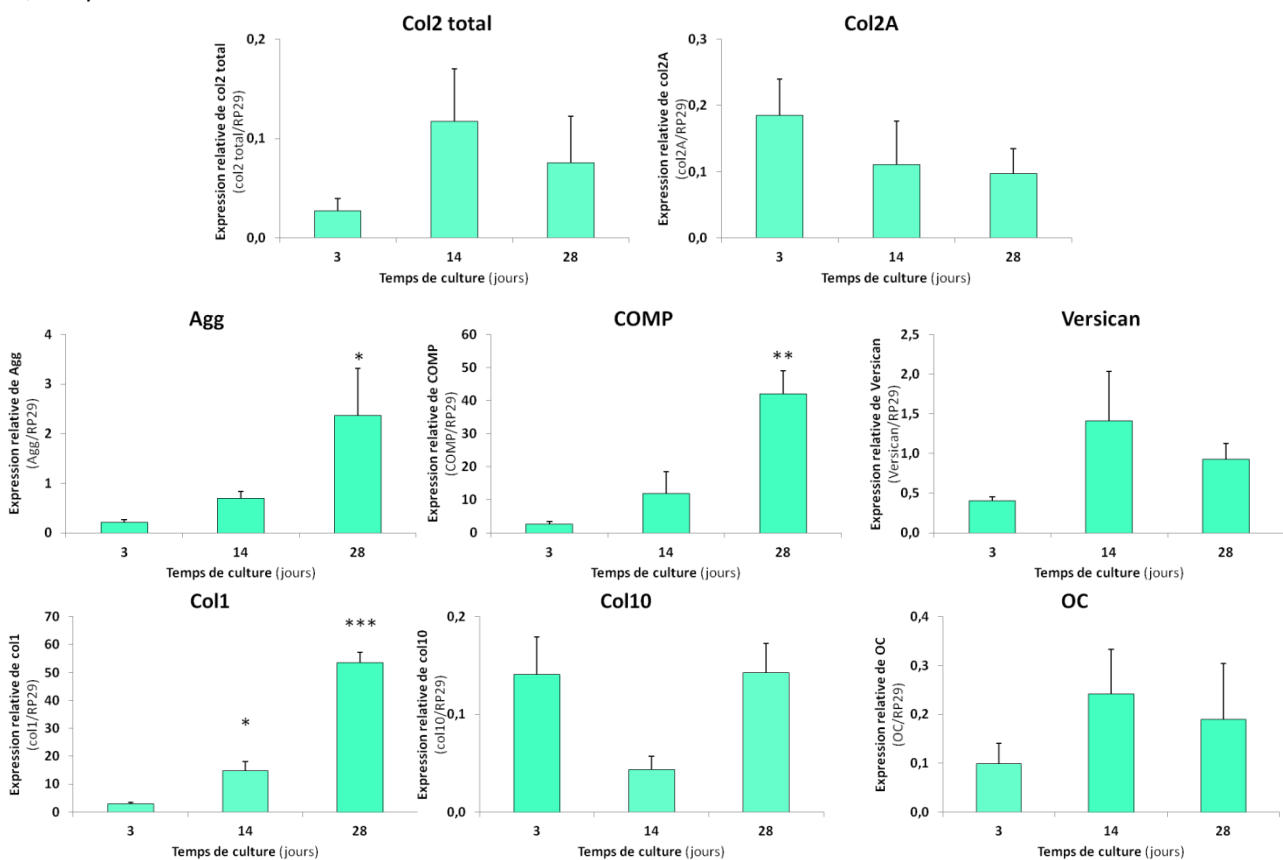


Figure 59 : Evolution de l'expression génique de composants de la matrice extracellulaire

Pendant 28 jours, l'expression génique de composants de la matrice extracellulaire a été évaluée : les collagènes de type I, II total, IIA, X (Col1, Col2 total, Col2A, Col10), la protéine core de l'aggrécane (Agg), le versican, la COMP, l'ostéocalcine (OC). Les expressions géniques de Col2 total, de Versican, Col10 et OC semble être stable. Celles d'Agg, de COMP et de Col1 augmentent significativement au cours du temps. Enfin, l'expression de Col2A semble diminuer au cours de la culture. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, N = 5, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ pour J3 vs Jx.

B. Construction d'hydrogels stratifiés etensemencés de CSM

Des hydrogels bistratifiés ont été construits par la pulvérisation alternative d'un gel d'Alg/HA et de polyélectrolytes : Alg/HA-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA, et Alg/HA-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA-(PLL/HA)_{5,5}-

Alg/HA. Des cellules souches mésenchymateuses ont été ensemencées dans le gel avant la pulvérisation. La migration des cellules entre les couches, la synthèse matricielle, ainsi que la cohésion des couches ont été explorées.

1. Migration des cellules

Pour visualiser la répartition des cellules dans chaque strate du biomatériau, un marquage par PKH 26 et SYTO 16 a été réalisé sur les CSM avant leur inclusion dans le gel. Les fluorochromes PKH 26 (fluorescence rouge) et Syto 16 (fluorescence verte) se fixent, respectivement, dans la membrane plasmique et sur les acides nucléiques. Ce marquage a permis de suivre les CSM, par microscopie confocale, au cours de la culture.

La figure 60, ainsi, montre l'émission d'une fluorescence rouge dans la partie supérieure du biomatériau et une fluorescence verte dans la partie inférieure après 3 et 7 jours de culture. Au-delà du 7^{ème} jour de culture, la fluorescence diminue et ne permet plus de discriminer les cellules. A J3 et J7, une répartition homogène de la fluorescence au sein du biomatériau est observée sans aucun recouvrement de fluorescence (rouge ou verte).

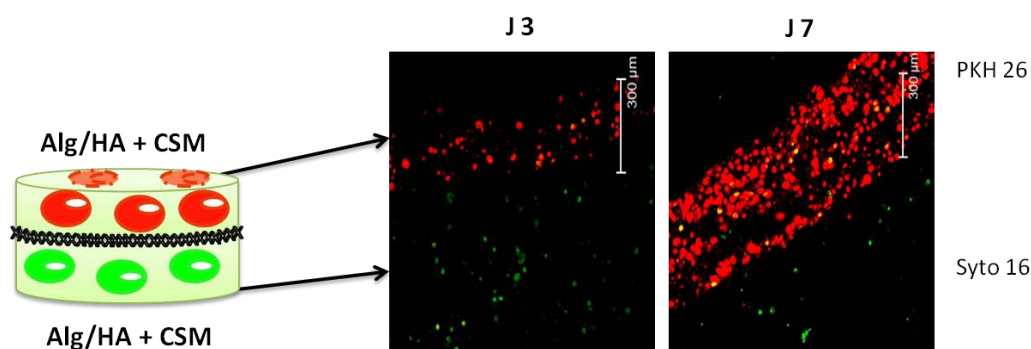


Figure 60 : Migration des CSM entre 2 couches d'Alg/HA

Après amplification en monocouche, les acides nucléiques des CSM ou leur membrane plasmique ont été marqués, respectivement, soit avec Syto 16 (vert), soit avec PKH 26 (rouge). Puis, les cellules sont ensemencées séparément lors de la construction de l'hydrogel d'Alg/HA bistratifié. Après 3 et 7 jours de culture (J3 et J7), une répartition homogène de la fluorescence au sein du biomatériau est observée sans aucun recouvrement de fluorescence (rouge ou verte). Les images ont été obtenues par microscopie confocale (Leica SP2AOBS, Objectif x10, ON = 0,3), les barres d'échelle représentent 300 µm.

2. Cohésion des couches et synthèse matricielle

La synthèse de MEC a été observée après colorations histologiques HES, Rouge Sirius et Bleu Alcian, pour mettre en évidence, respectivement, les cellules, les collagènes totaux et les GAG sulfatés après 56 jours de culture (figure 61). Puis, des immunomarquages des collagènes de type I et de type II ont été réalisés sur des échantillons jusqu'à 56 jours de culture, puis observés par microscopie confocale (figure 62).

De J3 à J56, il apparaît que les biomatériaux se composent de trois parties distinctes (de bas en haut sur les figures 61 A, D, G) : un gel inférieur contenant les cellules, des multicouches de polyélectrolytes dans la zone intermédiaire et enfin un gel supérieur contenant, à nouveau, des cellules.

Les colorations histologiques permettent, non seulement, de mettre en évidence la synthèse de MEC mais également les films multicouches de polyélectrolytes. Dès 28 jours de culture, la synthèse de MEC semble rester pérircellulaire et un peu plus étendue pour les GAG que pour les collagènes. D'autre part, les couches des hydrogels d'Alg/HA stratifiés semblent rester soudées jusqu'à 56 jours de culture *in vitro*.

Après 28 et 56 jours de culture, la synthèse de collagène de types I et II, par les CSM, a été suivie par immunofluorescence indirecte puis observation de la fluorescence par microscopie confocale. Quel que soit le temps de culture, les deux types de collagène ont été détectés dans la couche supérieure et inférieure du biomatériau.

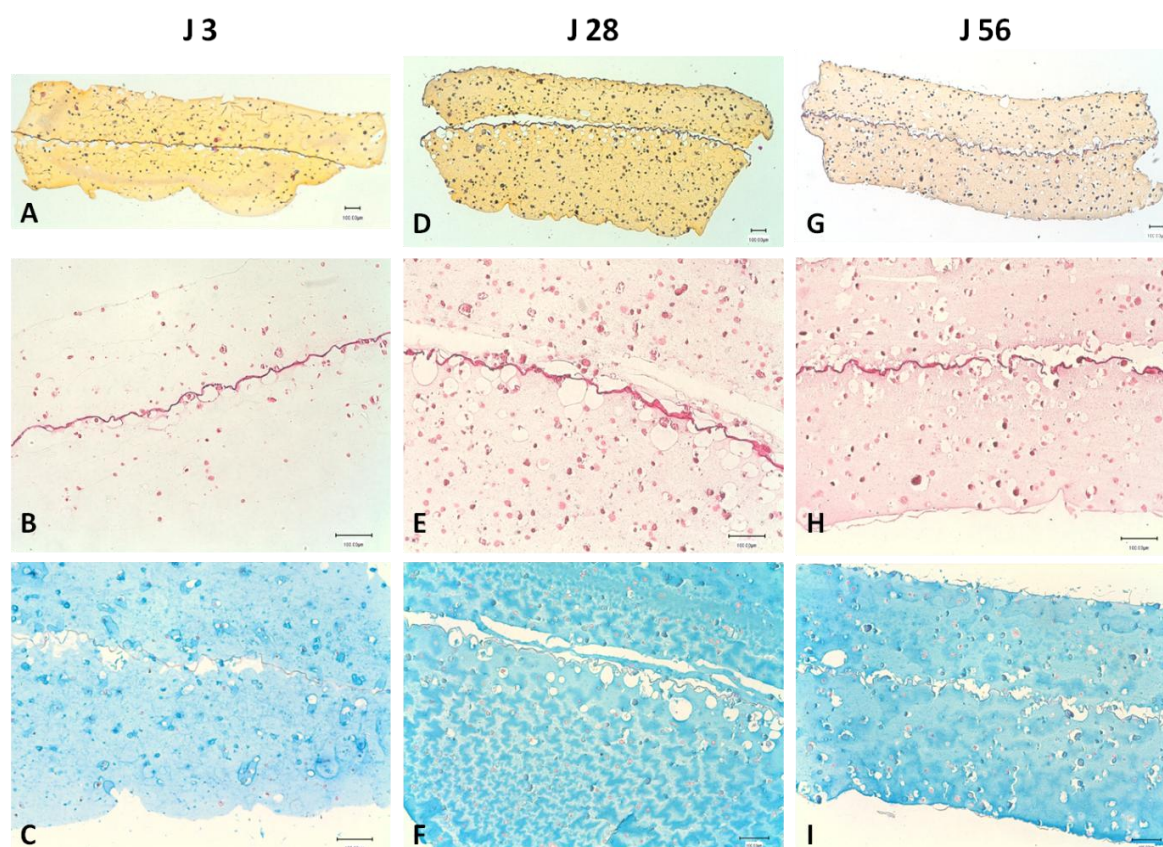


Figure 61 : Evolution de la synthèse de matrice extracellulaire par des CSM ensemencées dans un hydrogel d'Alg/HA stratifié

Des hydrogels bistratifiés ont été obtenus par pulvérisation alternative d'un gel d'Alg/HA ensemencés de CSM et d'un film multicouches de polyélectrolytes (PLL/HA). Après 3, 28 et 56 jours (J3, J28 et J56) de culture, des hydrogels ont été traités puis colorés en HES (A, D et G), au Rouge Sirius (B, E et H) et au Bleu Alcian (C, F et I). Jusqu'à J56, l'expression des collagènes et des protéoglycannes est pérircellulaire et continue. D'autre part, une coloration plus foncée des polyélectrolytes est observée. Les images ont été obtenues après observation en microscopie optique avec un objectif X4 pour les colorations HES, et X10 pour les colorations Rouge Sirius et Bleu Alcian. Les barres d'échelle représentent 100 μm.

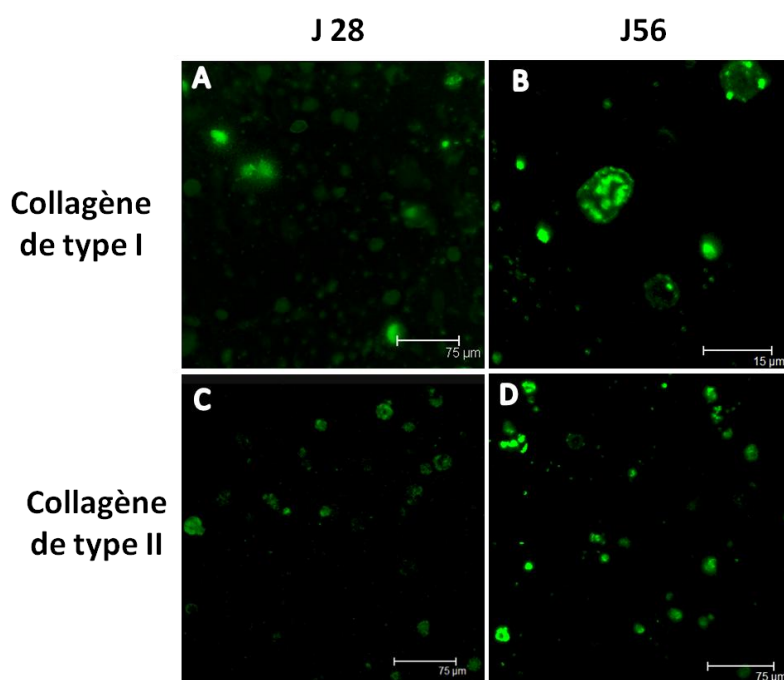


Figure 62 : Evolution de la synthèse des collagènes de types I et II

Des CSM ensemencées dans un hydrogel d'Alg/HA bistratifié ont été cultivées pendant 56 jours. Après 28 et 56 jours de culture (J28 et J56), les collagènes de type I (A et B) et de type II (C et D) ont été immunomarqués et observés par microscopie confocale (Leica SP2AOBS, Objectif x40, ON = 0,8). A partir de J28, une synthèse de collagène de type I et II est observée. Les barres d'échelles représentent 75 μm pour les images A, C et D, et 15 μm pour l'image B.

C. Exploration des propriétés mécaniques d'hydrogels à base d'alginate

Pour évaluer l'impact de la composition et de la stratification des hydrogels sur leur propriétés mécaniques, des tests de bipoinçonnement ont été réalisés sur des hydrogels à une couche et composés seulement d'alginate à 1,5% (Alg), d'alginate supplémenté avec de l'acide hyaluronique (Alg/HA) et de l'alginate enrichi avec de l'hydroxyapatite (Alg/Hap). Les mêmes tests ont été conduits sur des hydrogels bistratifiés Alg/HA-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA et Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA. Les tests ont été réalisés à deux vitesses de déformations différentes : 0,7% s^{-1} et 2% s^{-1} .

La figure 63 représente les courbes de réponses des hydrogels aux tests de bipoinçonnement pour les deux vitesses testées. Généralement, les hydrogels à une couche ont des réponses similaires jusqu'à une déformation équivalente de 20%. Les réponses d'hydrogel composé d'Alg/Hap sont plus fortes que celles d'hydrogels composés d'alginate seul, indépendamment de la vitesse de déformation appliquée, avec respectivement une σ_{eq} de $3,4 \pm 0,8$ kPa (Alg/Hap) contre $1,8 \pm 0,4$ kPa (Alg) pour une ϵ_{eq} de 0,5 à une $\dot{\epsilon}$ de 0,7% s^{-1} . Les différences sont significatives pour une déformation équivalente de 100% ($p < 0,001$). D'autre part, la résistance mécanique des hydrogels à une couche contenant de l'acide hyaluronique (σ_{eq} de $3,4 \pm 0,6$ kPa, pour une ϵ_{eq} de 0,7) est proche de celle de l'alginate seul (σ_{eq} de $3,6 \pm 0,7$ kPa, pour une ϵ_{eq} de 0,7), quelle que soit

la vitesse, et pour de grandes déformations. Des différences significatives sont observées pour des déformations équivalentes de 70% et 100% pour les essais conduits à une vitesse de déformation de $2\% \text{ s}^{-1}$ ($p < 0,01$ et $0,001$).

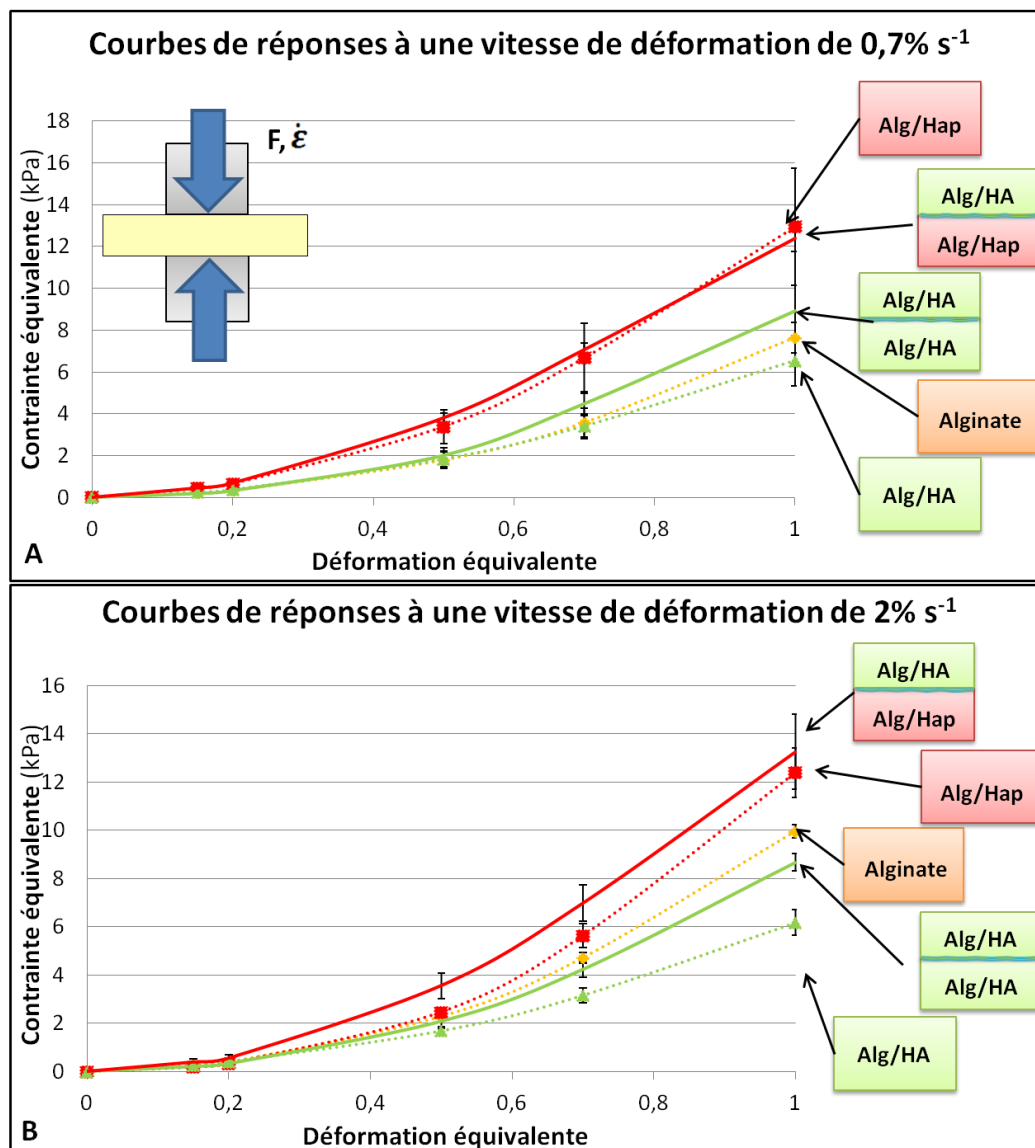


Figure 63 : Influence de la composition des hydrogels et de la stratification sur leur comportement mécanique

Des hydrogels à une couche sans cellule sont construits par pulvérisation de gel d'alginate (Alg), d'alginate/acide hyaluronique (Alg/HA) et d'alginate/hydroxyapatite (Alg/Hap), et des hydrogels bistratifiés Alg/HA-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA et Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA sont construits par pulvérisation. Des tests de bipoinçonnement ont été réalisés sur des échantillons de ces hydrogels à des vitesses de déformation de $0,7$ (A) et $2\% \text{ s}^{-1}$ (B). Les hydrogels à une couche d'Alg résistent plus fortement à la déformation que ceux Alg/HA, et plus faiblement que ceux Alg/Hap indépendamment de la vitesse de déformation. Les courbes de réponse des hydrogels mono- et bicouches contenant de l'hydroxyapatite sont supérieures aux autres. Les hydrogels bistratifiés d'Alg/HA ont une réponse plus forte que ceux à une couche. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, $N = 3$ pour les hydrogels à une couche et $N = 2$ pour les hydrogels stratifiés.

Quant à la réponse des hydrogels stratifiés, elle est plus forte que celle des hydrogels à une couche, en particulier lorsque l'ensemble est composé d'Alg/HA, indépendamment de la vitesse de déformation. En effet, la résistance de l'hydrogel stratifié Alg/HA-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA est

supérieure à celle d'un hydrogel à une couche d'Alg/HA, avec respectivement une σ_{eq} de $3,4 \pm 0,6$ kPa (Alg/HA) contre $4,5 \pm 0,3$ kPa (Alg/HA-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA) pour une ε_{eq} de 0,7 à une $\dot{\varepsilon}$ de $0,7\% s^{-1}$. Enfin, les courbes de réponse des hydrogels bistratifiés Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA (σ_{eq} de $7,1 \pm 0,3$ kPa, pour une ε_{eq} de 0,7), et Alg/Hap à une couche (σ_{eq} de $6,7 \pm 1,7$ kPa, pour une ε_{eq} de 0,7) sont similaires (aucune différence significative). Ce dernier résultat montre que la vitesse n'a pas d'effet, et souligne le rôle de Hap.

D. Discussion

La seconde partie de ce travail a permis d'explorer l'impact de la pulvérisation et de la construction stratifiée d'hydrogel d'Alg/HA sur des cellules souches mésenchymateuses humaines. Les hydrogels ont été cultivés *in vitro* dans un milieu de différenciation chondrogénique sans facteur de croissance. Le choix des CSM humaines a été motivé par leur facilité d'obtention en grand nombre, ainsi que pour leur utilisation en ingénierie du cartilage (Derfoul *et al.* 2006; Stok *et al.* 2009). En effet, les chondrocytes humains sains étant difficiles à obtenir et se différenciant pendant leur amplification, de nombreuses études décrivent les CSM comme une source alternative de cellules pour l'ingénierie tissulaire.

Le principe de l'ingénierie tissulaire est d'associer un biomatériau biocompatibleensemencé de cellules appropriées afin de favoriser la différenciation et la maturation cellulaire vers le tissu à régénérer. Afin de s'assurer que le procédé de fabrication de l'hydrogel d'alginate n'était pas délétère sur une population de cellules souches mésenchymateuses, l'influence de la pulvérisation a été étudiée en analysant la viabilité, le métabolisme et le phénotype des cellules.

A l'issue de la culture en monocouche et avant d'inclure les CSM dans les hydrogels, un immunophénotypage a permis de s'assurer que les cellules étaient bien positives pour les clusters de différenciation CD44 (récepteur de HA), CD73 (marqueur de la prolifération), CD90 (marqueur de l'indifférenciation des cellules), CD105 (marqueur de la capacité de synthèse matricielle) et CD166 (spécifiques des cellules indifférenciées), (Uccelli *et al.* 2008), et négatifs pour les marqueurs hématopoïétiques (CD34 et CD45) ou encore pour l'antigène HLA-DR. L'analyse de ce dernier fait partie du contrôle qualité auquel les CSM sont soumises en vu de leur potentielle application clinique.

Le pourcentage de cellules positives à CD44 augmente après leur ensemencement dans un hydrogel d'Alg/HA et reste stable à plus de 95% jusqu'à J28. Ces résultats sont en accord avec ceux de Chung *et al.* qui ont montré que la culture de CSM dans un hydrogel à base d'acide

hyaluronique permettait une forte expression de ce récepteur CD44, 6 heures après leur encapsulation (Chung *et al.* 2009). En revanche, dans des hydrogels d'alginate seuls, en absence d'acide hyaluronique, une forte diminution de l'expression de ce même marqueur est observée, par Lee *et al.*, après 2 semaines de culture. Ces derniers ont également montré que la culture des CSM dans un environnement 3D induisait une diminution des marqueurs caractérisant le potentiel indifférencié des CSM : CD105 et CD166 (Lee *et al.* 2009). Il semble donc que lorsque les CSM sont cultivées dans un hydrogel d'Alg/HA pulvérisé, pendant 28 jours, la diminution d'expression de CD105 et CD166 pourrait traduire une entrée des CSM dans une voie de différenciation.

Par ailleurs, même si au début de la culture, la viabilité était inférieure à 60% ; après 28 jours de culture dans les hydrogels d'alginate, la viabilité cellulaire dépassait 90%. L'alginate est couramment utilisé comme matrice support pour l'ingénierie du cartilage. Il est possible d'y inclure des chondrocytes ou des cellules plus précoces comme les cellules souches mésenchymateuses (Awad *et al.* 2004; Jeon *et al.* 2009; Klein *et al.* 2009). Les études utilisant les CSM humaines dans des hydrogels d'alginate ont montré que les cellules pouvaient s'engager dans la chondrogénèse que le milieu de culture soit enrichi ou non en facteurs de croissance tels que le TGF- β 3 ou l'IGF-1 (Heng *et al.* 2004; Herlofsen *et al.* 2010).

Selon Heng *et al.*, les CSM provenant de la MO sont en fait une population fortement hétérogène, avec seulement une proportion limitée de cellules (environ 1 sur 100 000) ayant la capacité à s'engager dans la lignée chondrogénique. Dans ce cas, la viabilité des CSM au sein de l'hydrogel devient un élément primordial dans le concept d'ingénierie tissulaire (Heng *et al.* 2004). Récemment, Cohen *et al.* ont montré que l'alginate de sodium ne causait aucune toxicité sur les CSM issues de la moelle osseuse et après chélation de l'alginate, les données de qRT-PCR montraient que les cellules exprimaient l'ARNm du collagène de type II (Cohen *et al.* 2011). Un biomatériau à base d'alginate est donc un biomatériau biocompatible pour la culture des CSM et leur confère un environnement favorable pour induire une différenciation chondrocytaire (Becker *et al.* 2001; Wong *et al.* 2001). Par ailleurs, nos résultats montrent que le procédé de pulvérisation semble non délétère pour les CSM humaines, sur le long terme, tout comme pour les chondrocytes de rat.

Le potentiel de différenciation des CSM cultivées dans des hydrogels d'Alg/HA pulvérisés a, par la suite, été étudié. L'expression relative de gènes spécifiques du cartilage comme Sox9, COMP et Agg augmente significativement jusqu'à 28 jours de culture, alors que l'expression génique de

Runx2 et de Col10, spécifiques du cartilage hypertrophique, stagne tout au long de la culture *in vitro*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Herlofsen et al. qui montrent qu'au cours de leur différenciation en chondrocytes, les CSM humaines ensemencées dans un hydrogel d'alginate ont une expression relative de Sox9, Col2 et COMP qui augmente alors que l'expression de Runx2 reste stable jusqu'à 21 jours de culture (Herlofsen *et al.* 2010). Park et al. obtiennent des résultats similaires (augmentation de l'expression génique de Col2, COMP, Sox9 et Agg) par des CSM stimulées, avec du TGF β 3, et contenues dans des nanoparticules, puis implantées dans une souris nude pendant 6 semaines (Park *et al.* 2010). Nos résultats montrent également que l'expression génique de Col2 total semble augmenter jusqu'à J14 alors que l'expression de Col2A diminue tout au long de la culture. Ce dernier étant spécifique des chondroprogéniteurs (Vinatier *et al.* 2009), sa diminution indiquerait que les CSM se différencient vers un phénotype de chondrocyte mature (Henderson *et al.* 2009).

Dans la suite de notre travail, nous avons construit des hydrogels stratifiés produits par la pulvérisation alternative d'un gel d'Alg/HA et de multicouches polyélectrolytes (PLL/HA). Bien que la pulvérisation d'un hydrogel d'alginate ait déjà été proposée précédemment par Mjahed et al., les hydrogels obtenus possédaient une épaisseur de l'ordre de quelques centaines de micromètres (Mjahed *et al.* 2008). Les multicouches de polyélectrolytes ont ainsi permis d'augmenter l'épaisseur du biomatériau mais aussi la cohésion de chaque strate. Cette cohésion provient des interactions électrostatiques entre les charges négatives de l'alginate et les charges positives des polycations (PLL) qui vont se créer pour permettre la tenue du motif stratifié (Ball *et al.* 2009). Il est donc important de déposer 5,5 couches de polyélectrolytes afin de terminer le dépôt par la poly-L-lysine, chargée positivement. Ainsi, après 56 jours de culture *in vitro*, les images obtenues en histologie montrent que les biomatériaux stratifiés gardaient leur intégrité. Les films multicouches de polyélectrolytes s'identifient clairement entre les deux couches d'hydrogels puisqu'ils sont plus fortement colorés comme l'ont également remarqué Kerdjoudj et al. (Kerdjoudj *et al.* 2007).

Les résultats obtenus par microscopie confocale ont permis de montrer l'absence de migration des cellules entre les couches de l'hydrogel. Ce phénomène est peut être dû à la combinaison des films multicouches de polyélectrolytes et de leur ensemencement dans l'hydrogel. Ainsi, non seulement les films multicouches de polyélectrolytes servent de mortiers électrostatiques entre les couches d'hydrogels stratifiés, mais ils empêchent aussi la migration des

cellules ce qui permettrait d'y ensemer des phénotypes cellulaires différents.

Enfin, l'utilisation du PLL peut être un élément important dans le cadre de la différenciation de cellules vers un phénotype chondrocytaire. En effet, Woodward *et al.* ont montré que la présence de PLL stimulait la chondrogenèse de cellules mésenchymateuses issues d'un bourgeon de membre d'un embryon de poulet (Woodward *et al.* 1999).

Dès 28 jours de culture, les cellules synthétisent une matrice spécifique du cartilage (collagène de type II et GAG). En cumulant les résultats obtenus par qRT-PCR et ceux obtenus en imagerie (histologie et microscopie confocale), il semblerait que les CSM se soient engagées dans la chondrogénèse pour obtenir un phénotype chondrocyte-like. Bien que ce genre de résultats aient déjà été observés en ingénierie du cartilage, des facteurs de croissance sont fréquemment utilisés pour guider la différenciation (Freyria *et al.* 2008; Heymer *et al.* 2009; Liu *et al.* 2010). Dans notre cas, le fait que l'hydrogel contienne de l'acide hyaluronique a pu contribuer à induire la différenciation des cellules. En effet, Chung *et al.* ont démontré qu'un hydrogel à base d'acide hyaluronique permettait de potentialiser la différenciation de CSM humaines, qui y sont ensemencées, *via* des récepteurs de surface qui pourrait diriger le comportement des cellules et assister la différenciation des cellules souches (Chung *et al.* 2009).

Notons enfin la grande disparité des résultats obtenus par qRT-PCR. Comme mentionné plus haut, il semblerait que les CSM provenant de la moelle osseuse n'aient pas toutes le même potentiel de différenciation (Heng *et al.* 2004). De plus, des études ont montré que l'âge du donneur pouvait également influencer le potentiel de différenciation chondrocytaire. Ainsi, l'augmentation de l'âge semblent diminuer la capacité chondrogénique de CSM issues de moelle osseuse humaine, et plus particulièrement avec des cellules d'hommes (Payne *et al.* 2010). Les cellules utilisées dans cette étude provenaient essentiellement de personnes de plus de 70 ans qui ont subi une pose de prothèse. La moyenne d'âge était de 62,5 années.

Récemment, Nguyen *et al.* ont montré que la variation de la composition du biomatériau enrichi ou non de GAG spécifique du cartilage (HA, chondroïtine sulfate) permettait d'orienter différemment la différenciation de CSM (Nguyen *et al.* 2011). Il semblerait, également, que la composition et les propriétés mécaniques d'un biomatériau peuvent influencer la différenciation des cellules et donc leur synthèse matricielle (Discher *et al.* 2005; Lutolf *et al.* 2005; Lutolf *et al.* 2009; Nguyen *et al.* 2011). Ainsi, différents biomatériaux ont été testés mécaniquement pour évaluer d'une part la faisabilité des constructions avec différents biomatériaux et l'impact de la

composition des hydrogels et de leur stratification. Pour ce faire, l'alginate a été supplémenté avec des composants de la matrice extracellulaire du cartilage (acide hyaluronique) ou du cartilage calcifié et de l'os (hydroxyapatite). Des hydrogels sans cellule à une couche ou bistratifié ont été testés. Il est important de noter qu'entre les résultats des tests mécaniques obtenus dans la première étape de l'étude et cette seconde étape, les conditions de conservation des échantillons et les modalités de tests sont différentes, ce qui peut expliquer les différences observées entre des contraintes équivalentes à même niveau de déformation. Les vitesses de déformation de 0,7 et 2% s⁻¹ ont été choisies compte tenu des résultats précédents (première étape). En effet, dans la première partie de ce travail, il a été montré que la résistance mécanique des échantillons augmente avec la vitesse de déformation jusqu'à 2,5% s⁻¹. Ainsi, les deux vitesses ont été choisies pour représenter la première phase de réponse du biomatériau. Par ailleurs, la vitesse de 2% s⁻¹ correspond approximativement à ce que subit le cartilage articulaire *in vivo* lors de la marche. En effet, Eckstein et al. ont montré qu'après une marche de 5 min la déformation du cartilage est d'environ -2,8% (Eckstein *et al.* 2005) dont la fréquence est habituellement estimée à 0,33 Hz. Concernant nos résultats, nous avons pu observer que quelle que soit la vitesse de déformation (dans la plage explorée), la résistance mécanique des hydrogels à une couche contenant de l'hydroxyapatite est supérieure à celle de l'alginate seul, alors que la supplémentation en acide hyaluronique la réduit. Ces résultats sont similaires à ceux de Lin et al. qui ont montré que l'augmentation de la proportion d'hydroxyapatite dans un biomatériau à base de PLA (Poly Lactic acid) améliore la résistance à la compression et l'élasticité de ce dernier (Lin *et al.* 2007). Par ailleurs, nous avons remarqué que la stratification des hydrogels ne diminue pas les propriétés mécaniques, mais au contraire les améliore. En effet, un hydrogel bistratifié composé uniquement d'Alg/HA et de polyélectrolyte à l'interface des couches offre une meilleure résistance à la déformation qu'un hydrogel à une couche construit avec le même gel. Ce résultat laisse imaginer que les films multicouches de polyélectrolytes améliorent la tenue mécanique du biomatériau. De plus, les hydrogels bistratifiés composés d'Alg/Hap et d'Alg/HA ont une résistance mécanique similaire à celle d'un hydrogel à une couche construit avec un gel d'Alg/Hap et ce malgré la présence d'Alg/HA. Il semblerait donc que les polyélectrolytes jouent un rôle important dans la résistance à la déformation de ce type de construction. Des tests mécaniques de type AFM (Atomic Force Microscopy) ont exploré l'influence de l'épaisseur et de la concentration des films multicouches de polyélectrolytes sur leurs propriétés mécaniques. Ainsi, Boudou et al. ont montré que le module de Young augmentait linéairement par rapport au nombre de liaisons covalentes créées dans les films multicouches de PLL/HA (Boudou *et al.* 2009). Cependant, il semblerait

qu'aucune étude jusqu'à maintenant, n'ai démontré leur influence sur ce type de construction.

Ainsi, leur utilisation était surtout connue pour induire l'adhésion de cellules ou pour délivrer des molécules bioactives (Schneider *et al.* 2006; Semenov *et al.* 2009), mais ces résultats montrent que leur présence permet la cohésion à long terme des hydrogels stratifiés et améliore leurs propriétés mécaniques.

En conclusion, des hydrogels bistratifiés ensemencés de CSM ont pu être construits et cultivés *in vitro* pendant 56 jours sans dissociation des couches et en montrant une différenciation vers un phénotype chondrocytaire. De plus, des hydrogels contenant à la fois des composants de la MEC cartilagineuses (HA) et osseuses (Hap) peuvent être construits sans que leurs propriétés mécaniques ne soient altérées par la stratification.

Points essentiels :

- la pulvérisation des cellules souches mésenchymateuses n'inhibe pas leur capacité de différenciation,
- des hydrogels bistratifiés construits par pulvérisation alternative d'Alg/HA et de polyélectrolytes sont stables au moins jusqu'à 56 jours de culture,
- la présence de polyélectrolytes empêche la migration des cellules et n'altèrent pas les propriétés mécaniques des hydrogels stratifiés.

III. Fonctionnalisation d'un biomatériau stratifié par apport d'éléments constitutifs et par stimulations mécaniques

La dernière étape de ce travail consiste à fonctionnaliser des hydrogels stratifiés en modifiant la composition des couches ou en apportant des stimulations mécaniques. Dans un premier temps, deux types d'hydrogels ont été construits et comparés : un hydrogel composé d'alginate/acide hyaluronique dans les deux couches, Alg/HA-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA (Alg/HA 2X), et un second composé d'une couche inférieure d'alginate/hydroxyapatite et d'une supérieure d'Alg/HA, Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA (Alg/Hap-Alg/HA). Puis, cette dernière construction d'hydrogel a été soumise à des déformations cycliques intermittentes. Il est important de noter que pour ce dernier hydrogel, les deux couches ont été analysées séparément (HA et Hap), pour explorer l'influence de la composition des couches sur la différenciation des cellules. La viabilité, ainsi que l'évolution du phénotype des cellules ont été suivis, puis la différenciation des cellules a été

étudiée *via* l'expression génique et la synthèse matricielle.

A. Influence de la composition du biomatériau sur les CSM

1. Viabilité – Phénotypage

L'influence de la composition des biomatériaux a été explorée sur la viabilité et le phénotype des CSM (figure 64 et tableau IX). La proportion de cellules vivantes dans des hydrogels d'Alg/HA 2X et d'Alg/Hap-Alg/HA augmente au cours de la culture jusqu'à J28. La comparaison des différentes conditions ne montre aucune différence significative entre elles pour un même temps de culture (figure 64). De plus, aucune différence significative du phénotype des cellules n'a été observée entre les hydrogels Alg/HA 2X et les deux couches des hydrogels Alg/Hap-Alg/HA (tableau IX).

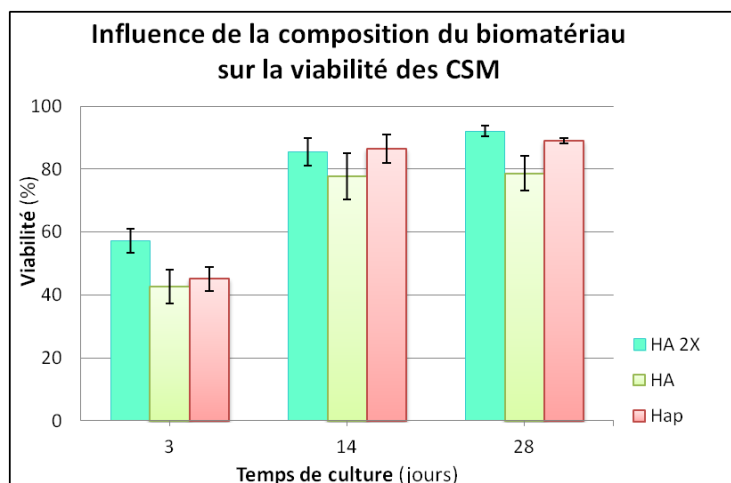


Figure 64 : Influence de la composition du biomatériau sur la viabilité des CSM

La viabilité des CSM ensemencées dans des hydrogels stratifiés a été mesurée jusqu'à 28 jours de culture. Deux constructions sont comparées : un hydrogel bistratifié Alg/HA 2X (trait continu, vert, **HA 2X**), et un hydrogel bistratifié d'Alg/Hap dans une couche (**Hap**, trait discontinu, rouge) et d'Alg/HA dans la seconde (**HA**, trait discontinu, vert). La viabilité cellulaire augmente au cours du temps dans tous les biomatériaux étudiés, sans aucune différence significative entre eux pour un même temps de culture. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, $N = 3$.

Tableau IX : Phénotypes des CSM ensemencées dans un hydrogel stratifié composé d'Alg/HA ou d'Alg/Hap/Alg/HA

Après leur ensemencement (J3), le phénotype des cellules souches mésenchymateuses a été étudié après un immunomarquage de HLA-DR et des clusters de différenciation (CD) 34, 45, 44, 73, 90, 105 et 166. L'expression de CD est représentée en fonction du pourcentage de cellules positives : - lorsqu'il est inférieur à 10%, + entre 10 et 50%, ++ entre 50 et 90%, et +++ >90%. Aucune différence significative n'a été observée.

Clusters de différenciation (CD)	Alg/HA 2X (J3)	Alg/HA (J3)	Alg/Hap (J3)
CD34	-	-	-
CD45	-	-	-
HLA-DR	-	-	-
CD44	+++	+++	+++
CD73	++	+++	+++
CD90	+++	+++	+++
CD105	+	+	+
CD166	++	++	++

2. Expression des gènes d'intérêt

L'expression génique des CSM ensemencées dans un hydrogel stratifié Alg/HA-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA, et un hydrogel d'Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA ont été étudiées.

L'expression relative des facteurs de transcription Sox9 et Runx2 par les CSM n'est pas différente significativement entre les différentes conditions testées, sauf à J3 où l'expression de Sox9 dans la couche Hap est supérieure significativement à celle de Alg/HA 2X (figure 65). La tendance est la même quel que soit le biomatériau.

Les expressions relatives de Col2 total, de Col10, d'Agg et de COMP augmentent au cours de la culture indépendamment du biomatériau (figure 66). Dès 14 jours de culture, l'expression relative de COMP est significativement plus forte dans des hydrogels Alg/HA-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA par rapport à la couche HA de l'hydrogel d'Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA ($p < 0,01$ à J14 et $p < 0,001$ à J28), et après 28 jours par rapport à la couche Hap ($p < 0,001$). L'expression d'Agg semble plus forte dans les hydrogels d'Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA par rapport à Alg/HA-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA, mais les différences ne sont pas significatives. Après 28 jours de culture, l'expression relative de Col10 augmente significativement dans les deux couches de l'hydrogel d'Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA par rapport à l'hydrogel Alg/HA-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA ($p < 0,05$ pour HA et $p < 0,01$ pour Hap).

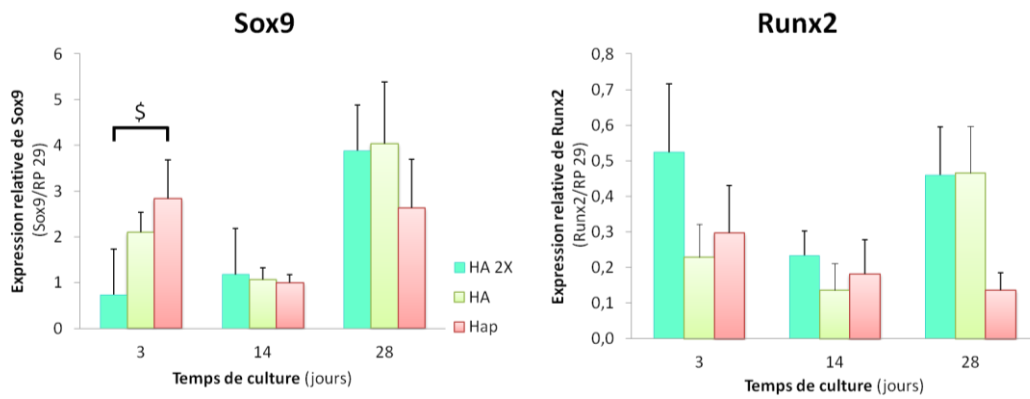


Figure 65 : Influence du biomatériau sur l'expression génique de facteur de transcription

L'évolution de l'expression de Sox9 et Runx2 par des CSMensemencées dans des hydrogels bistratifiés a été étudiée. Deux constructions sont comparées : un hydrogel Alg/HA 2X (trait continu, vert, **HA 2X**), et un hydrogel bistratifié d'Alg/Hap dans une couche (**Hap**, trait discontinu, rouge) et d'Alg/HA dans la seconde (**HA**, trait discontinu, vert). L'expression relative de Runx2 n'est pas significativement différente entre les conditions testées tout au long de la culture. Alors que l'expression de Sox9 est différente significativement après 3 jours de culture entre HA 2X et Hap, puis ne l'est plus. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, N = 3, \$ $p > 0,05$ HA 2X vs Hap.

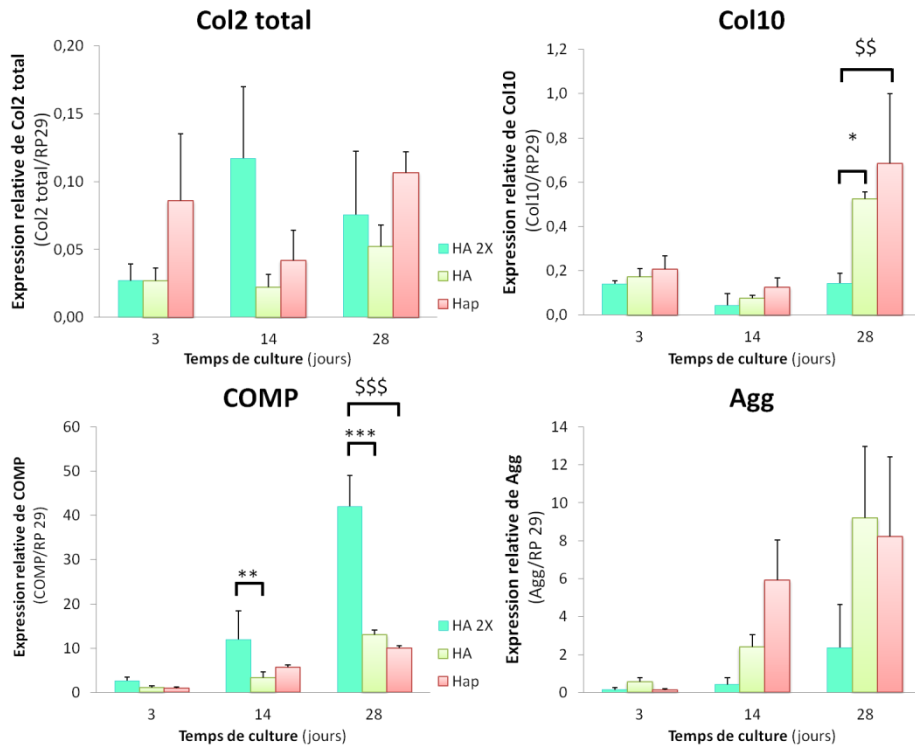


Figure 66 : Influence du biomatériau sur l'expression génique de protéines de la MEC

L'expression relative de Col2 total, Col10, COMP et Agg a été analysée sur des CSMensemencées dans des biomatériaux. Deux constructions sont comparées : un hydrogel Alg/HA 2X (trait continu, vert, **HA 2X**), et un hydrogel bistratifié d'Alg/Hap dans une couche (**Hap**, trait discontinu, rouge) et d'Alg/HA dans la seconde (**HA**, trait discontinu, vert). L'expression relative de COMP est significativement différente dès 14 jours dans HA 2X, alors que Col2 total et Agg ne sont pas exprimés différemment entre les différents biomatériaux. De plus, l'expression relative de Col10 est différente significativement entre les conditions qu'après 28 jours de culture. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, N = 3, \$\$ $p < 0,01$ et \$\$\$ $p < 0,001$ pour HA 2X vs Hap, et * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ pour HA 2X vs HA.

3. Synthèse matricielle

La synthèse de MEC a été observée après les colorations histologiques au Rouge Sirius et au Bleu Alcian, pour mettre en évidence, respectivement, les collagènes totaux et les GAG sulfatés après 3 et 28 jours de culture (figure 67). Puis, des immunomarquages des collagènes de type I, II et X ont été réalisés sur des échantillons, et la fluorescence émise a été observée par microscopie confocale (figure 68).

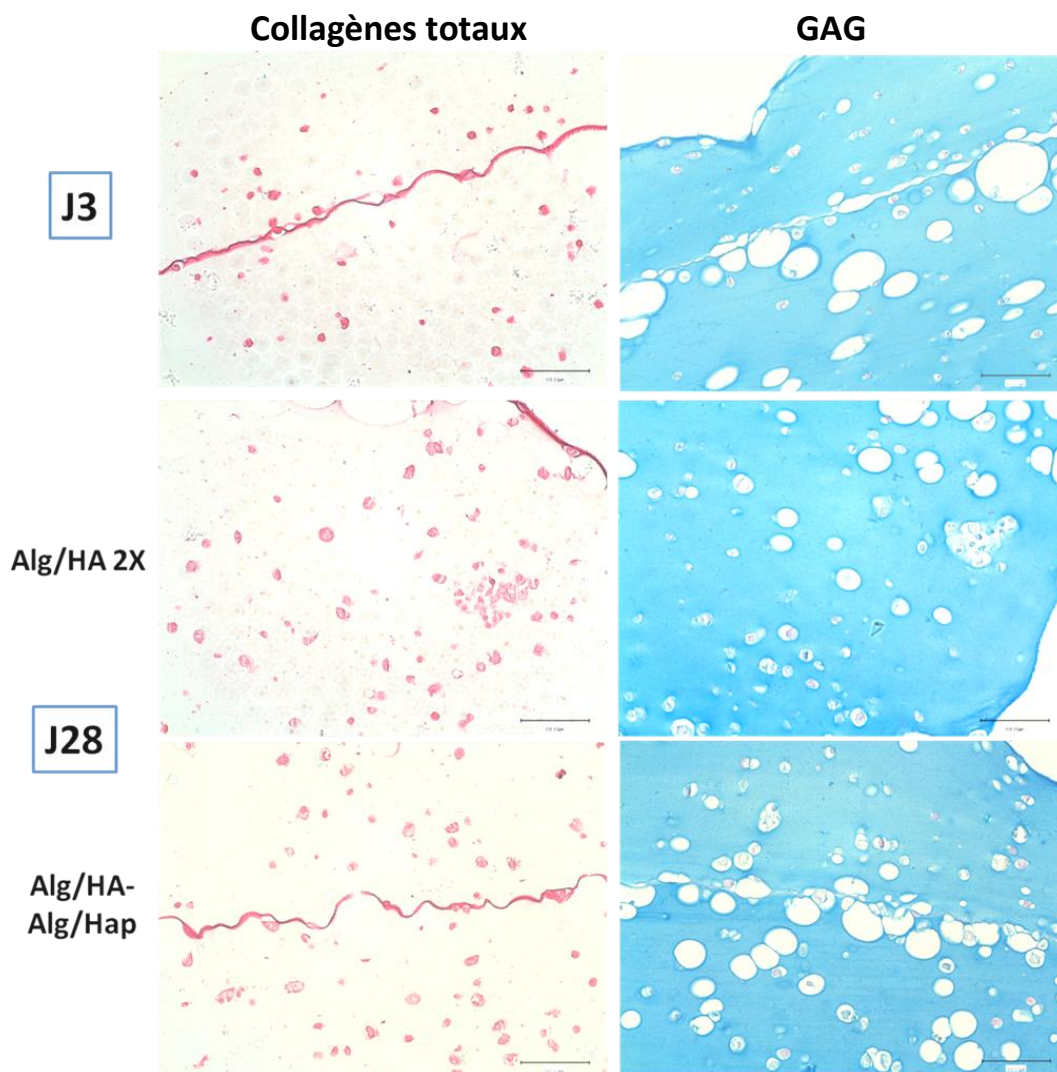


Figure 67 : Influence du biomatériau sur la synthèse des collagènes et de GAG par les CSM

Deux types de structures bistratifiées ensemencées de CSM ont été construites et cultivées pendant 28 jours : Alg/HA 2X et Alg/Hap-Alg/HA. Après 3 et 28 jours (**J3** et **J28**), les hydrogels sont colorés avec du Rouge Sirius et du Bleu Alcian pour mettre en évidence la synthèse de collagène et de GAG, respectivement. Après 3 jours de culture in vitro, les images sont similaires quelle que soit la composition du biomatériau. A J28, les synthèses de collagènes et de GAG semblent similaires dans toutes les conditions. Des amas de cellules sont observés ponctuellement dans les hydrogels où la synthèse matricielle semble plus abondante de par la proximité des cellules. Les lames sont observées en microscopie optique avec un objectif X20. Les barres d'échelle représentent 100 μ m.

Les colorations des hydrogels, après 3 jours, sont identiques dans les deux hydrogels. Après 28 jours de culture, la synthèse de collagènes et de GAG reste péricellulaire dans les deux hydrogels, indépendamment de la composition du biomatériau. Il semblerait que la production de

GAG soit un peu plus abondante dans les hydrogels d'Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA. Dans tous les biomatériaux testés, des amas de cellules sont observés ponctuellement dans les deux types d'hydrogels où la synthèse matricielle semble plus abondante.

Les immunomarquages des collagènes de type I, II et X mettent en évidence une synthèse péricellulaire de ces protéines dans tous les biomatériaux testés (figure 68). Il semblerait que la quantité de collagène ne varie pas significativement entre les biomatériaux.

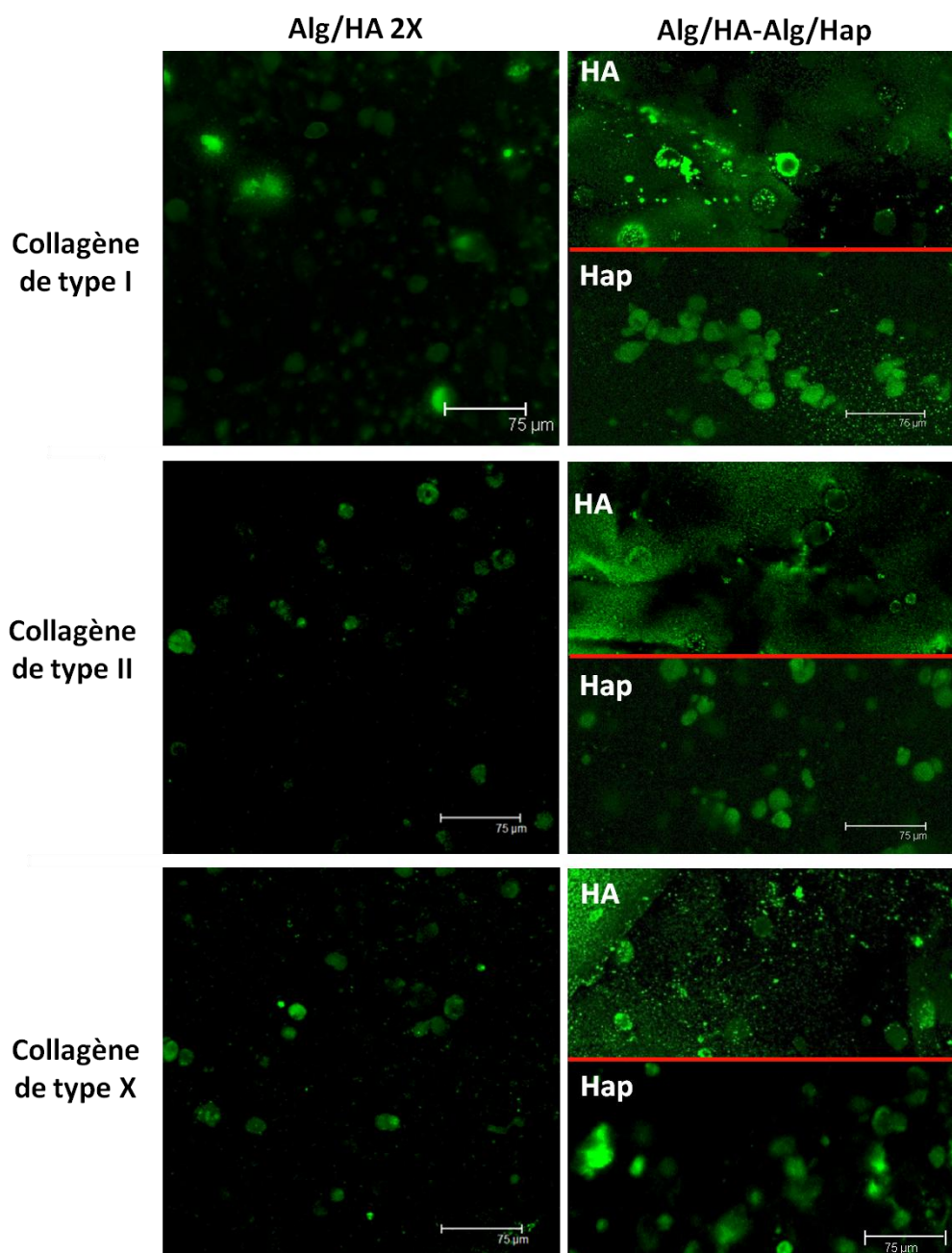


Figure 68 : Influence du biomatériau sur la synthèse des collagènes de types I, II et X

Après leur ensemencement et la construction des biomatériaux stratifiés (Alg/HA 2X et Alg/Hap-Alg/HA), les CSM ont été cultivées pendant 28 jours, puis les collagènes de types I, II et X ont été immunomarqués, et la fluorescence a été observée en microscopie confocale (Leica SP2AOBS, Objectif x40, ON = 0,8). Tous les types de collagènes marqués sont observés dans toutes les conditions étudiées. Les barres d'échelle représentent 75 μm.

B. Influence de la stimulation mécanique sur les CSM dans des hydrogels bistratifiés

Des hydrogels d'Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA ont été construits par pulvérisation, puis cultivés avec un milieu de différenciation basique et soumis à des stimulations mécaniques. Des déformations sont appliquées sur les échantillons à une fréquence de 1 Hz pendant 4 heures de manière intermittente (30 min de stimulation, 30 min de repos). Les échantillons soumis à des stimulations mécaniques seront dénommés "stimulés", alors ceux qui n'en ont pas subi seront dénommés "repos".

1. Viabilité et phénotype des CSM

Après leur ensemencement dans les hydrogels d'Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA, la viabilité et le phénotype des cellules ont été suivis par cytométrie en flux.

La figure 69 montre l'influence de la contrainte mécanique sur l'expression des marqueurs CD73 (figure 69-A) et CD166 (figure 69-B), après 3, 14 et 28 jours de culture. Pour un même temps de culture, aucune différence significative n'est observée concernant l'influence de la stimulation mécanique sur la proportion des cellules CD73⁺. Par contre, l'expression de ce marqueur tend à diminuer après J14.

Pour le marqueur CD166, il apparaît que, lorsque les cellules sont soumises à des contraintes mécaniques, la proportion de cellules CD166⁺ augmente, quelle que soit la nature du biomatériau, excepté à J28 pour un hydrogel enrichi en HA.

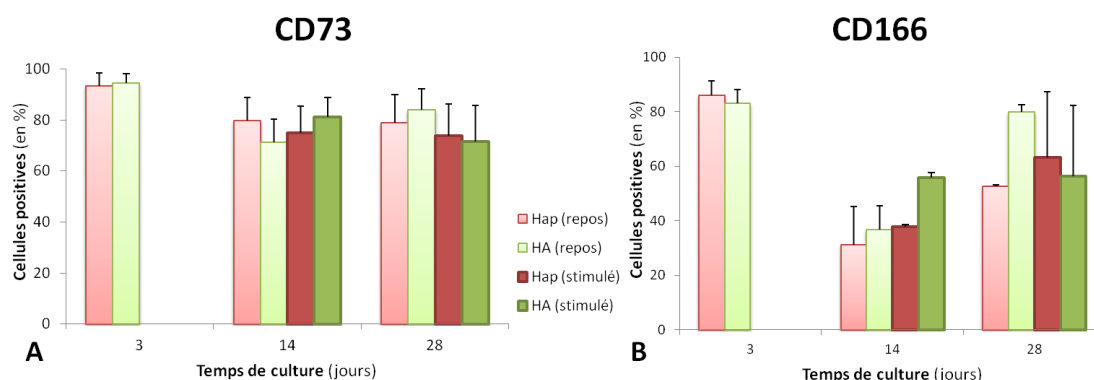


Figure 69 : Influence de la contrainte mécanique sur l'expression des marqueurs CD73 (A) et CD166 (B)

Après leur ensemencement dans un hydrogel d'Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA, le phénotype des cellules souches mésenchymateuses a été étudié après un immunomarquage des clusters de différenciation (CD) 73 (A) et 166 (B) sur les cellules ensemencées dans la couche HA (vert) et Hap (rouge) séparément, et stimulées mécaniquement ou non (repos). Le pourcentage de cellules positives à CD73 semble diminuer, alors que celui de CD166 diminue puis augmente. La stimulation mécanique des cellules semble diminuer le pourcentage de cellules CD73 à J28, alors qu'elle semble augmenter le pourcentage de cellules positives à CD166, mais pas de manière significative. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM.

La figure 70 représente la viabilité des cellules dans chaque hydrogel composant le biomatériau stratifié (Alg/HA et Alg/Hap). Après 3 jours de culture, 44% des cellules sont vivantes dans l'ensemble du biomatériau stratifié. A partir de 14 jours de culture, en présence ou non de contraintes mécaniques, la viabilité cellulaire augmente significativement, dans chaque strate du biomatériau, par rapport au début de la culture pour atteindre plus de 80% ($p < 0.001$).

Enfin, aucune différence significative n'est observée sur la viabilité des cellules en fonction de la nature du biomatériau, et des stimulations mécaniques.

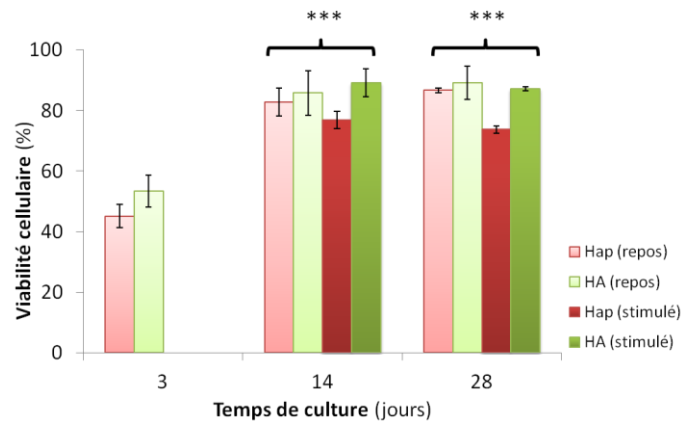


Figure 70 : Evolution de la viabilité sur les CSM soumises à des stimulations mécaniques.

Après leur construction, les hydrogels bistratifiés d'Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA sont cultivés pendant 28 jours et soumis (**stimulé**, couleurs foncées) ou non (**repos**, couleurs claires) à des stimulations mécaniques. La viabilité des CSM a été explorée par cytométrie en flux après la dissociation des 2 couches des hydrogels, d'Hap (rouge) et d'HA (vert). Après 3 jours de culture, la viabilité cellulaire augmente significativement au cours du temps dans toutes les conditions. Aucune différence significative n'est observée entre les couches pour une même condition (temps de culture et état de stimulation). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, $N = 3$, *** $p < 0,001$ pour J3 vs Jx.

2. Expression génique

Les figures 71 à 73, représentent l'évolution de gènes d'intérêt exprimés par des CSM ensemencées dans un hydrogel d'Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA pulvérisé et cultivées dans un milieu chondrogénique sans facteur de croissance, et stimulées ou non avec des déformations cycliques intermittentes. L'expression génique est rapportée à celle de RP29 pour obtenir l'expression relative de chaque gène.

Il apparaît, sur la figure 71, qu'aucune différence significative n'est observée pour l'expression du facteur de transcription Sox9 et celle de Runx2 ($p > 0,05$).

En revanche, au cours de la culture, une variation d'expression est observée pour un même facteur de transcription. Ainsi, l'expression de Sox9 augmente après 14 jours de culture lorsque les CSM sont cultivées dans des hydrogels stimulés par rapport aux mêmes hydrogels maintenus au repos. L'expression de Runx2 semble être augmentée lorsque les CSM sont cultivées dans un hydrogel enrichi en Hap et que ce dernier est soumis à une stimulation mécanique pendant 28

jours.

L'expression relative de MMP13 semble augmentée au cours de la culture, mais pas de manière significative et indépendamment du biomatériau ou de la stimulation mécanique. Notons une tendance à l'augmentation de son expression, à J28 au repos, et une baisse après stimulations mécaniques (figure 72). Enfin, les expressions relatives de COMP, Col10 et Agg augmentent au cours de la culture et semblent être influencées par les stimulations mécaniques. L'expression du gène Col2 total semble augmenter jusqu'à J14 uniquement sous stimulation mécanique, puis jusqu'à J28, la stimulation mécanique n'a plus d'influence (figure 73). Seule, l'expression relative d'Agg est significativement différente entre des hydrogels stimulés ou non après 28 jours de culture ($p > 0,01$, repos vs stimulé). Alors que l'expression relative de Col10 augmente pendant la culture et est significativement supérieure seulement dans le biomatériau Hap stimulé par rapport au repos après 28 jours de culture ($p > 0,05$).

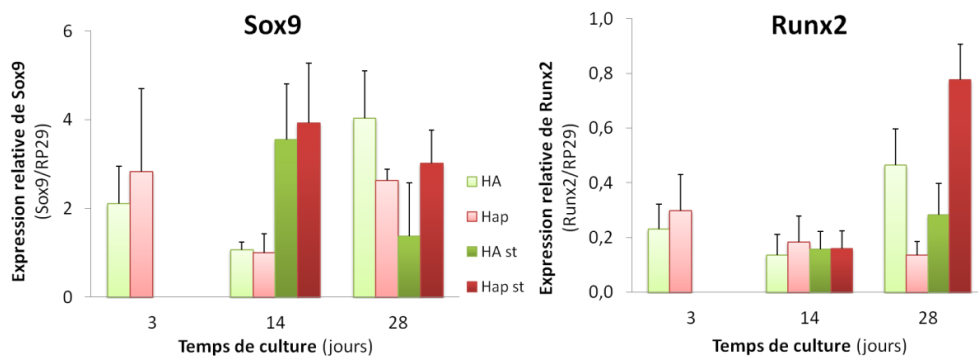


Figure 71 : Influence de la stimulation mécanique des CSM sur l'expression génique de facteurs de transcription

Des hydrogels d'Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA ont été soumis à des stimulations mécaniques (**st**) ou non, puis l'expression génique des CSM ensemençées a été explorée en dissociant les couches d'Alg/Hap (**Hap**) et d'Alg/HA (**HA**). L'expression de Sox9 reste au même niveau lorsque les cellules sont stimulées, alors que sans, son expression diminue à 14 jours de culture. Quant à l'expression relative de Runx 2, la stimulation mécanique augmente fortement son expression dans la couche Hap de l'hydrogel (**Hap st**). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, N = 3.

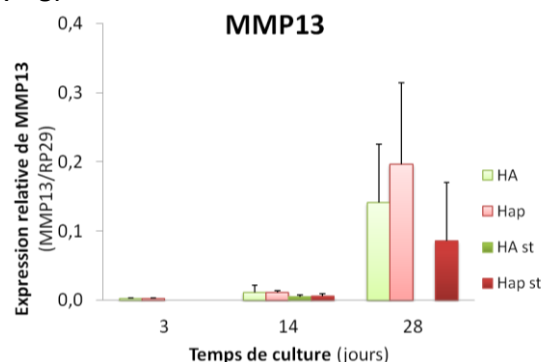


Figure 72 : Influence des stimulations mécaniques sur l'expression génique de MMP13

Des hydrogels d'Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA ont été soumis à des stimulations mécaniques (**st**) ou non, puis l'expression relative des CSM a été explorée en dissociant les couches d'Alg/Hap (**Hap**) et d'Alg/HA (**HA**). L'expression de MMP13 semble augmenter après 28 jours de culture au repos, mais pas de manière significative. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, N = 3.

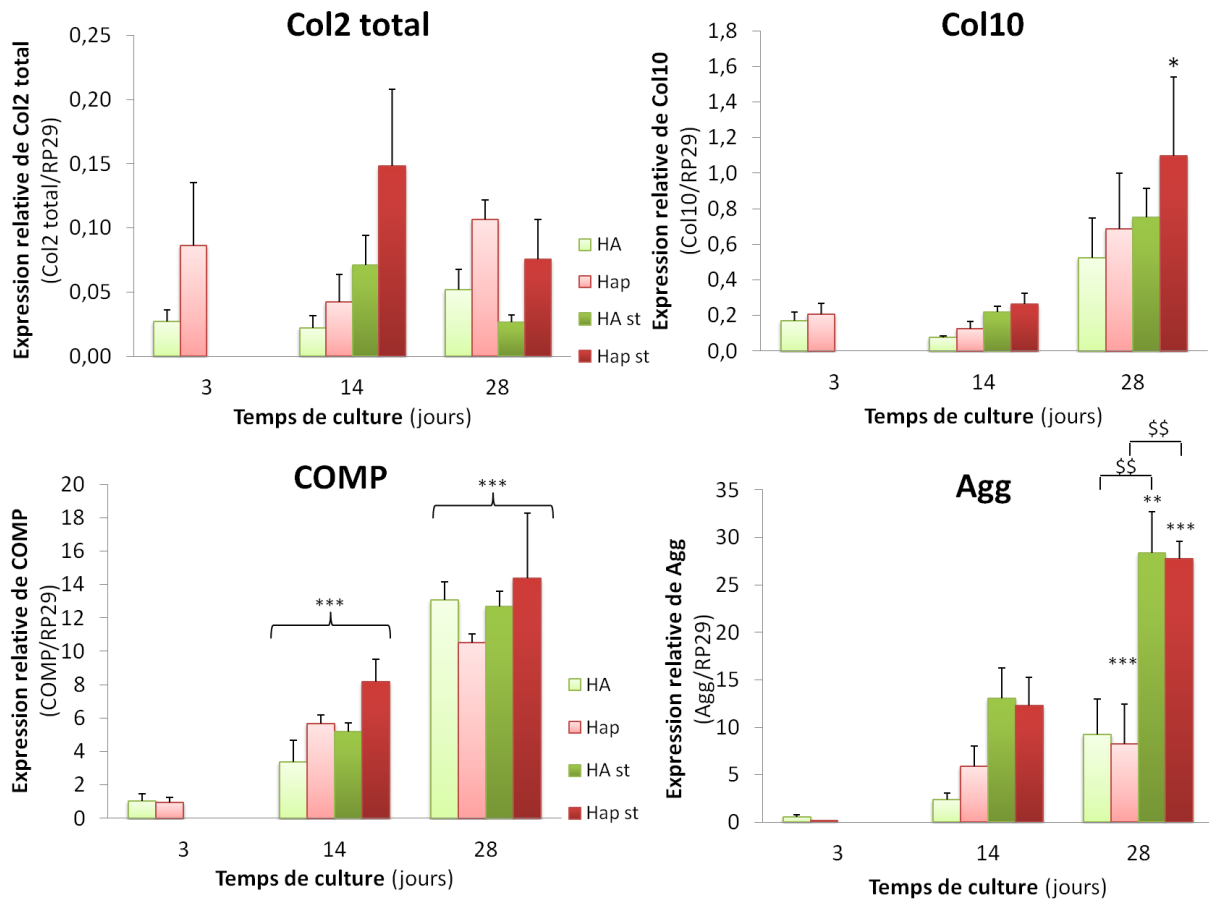


Figure 73 : Influence des stimulations mécaniques sur l'expression génique de composants de la MEC

Des hydrogels Alg/Hap-Alg/HA ont été soumis à des stimulations mécaniques (*st*) ou non, puis l'expression relative par les CSM a été explorée en dissociant les couches d'Alg/Hap (**Hap**) et d'Alg/HA (**HA**). L'expression génique de Col2 total, Col10, COMP et Agg ont été explorées. Il semble que celle de Col2 total est stable au cours de la culture, alors que celles d'Agg, Col10 et COMP augmentent au cours du temps. La stimulation mécanique augmente significativement l'expression d'Agg à J28 dans les deux couches de l'hydrogel. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, N = 3 ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ pour J3 vs Jx pour le même biomatériau et \$\$ $p < 0,01$ pour stimulé vs non stimulé.

3. Synthèse matricielle

La synthèse matricielle a été observée grâce à des colorations histologiques Rouge Sirius et Bleu Alcian, pour mettre en évidence, respectivement, les collagènes totaux et les GAG après 3 et 28 jours de culture (figure 74). Puis, des immunomarquages des collagènes de type I, II et X ont été réalisés sur des échantillons, puis observés par microscopie confocale (figure 75).

Après 28 jours de culture, la production de GAG et de collagènes semble périphérique quel que soit l'état de stimulation des cellules. Cependant, la coloration au Bleu Alcian semble plus intense et dispersée autour des CSM qui ont été stimulées. Les observations sont identiques pour la production des collagènes. Enfin, aucune différence entre les biomatériaux ne semble apparaître.

L'immunomarquage des collagènes de types I, II et X et leur observation en microscopie

confocale montre, dans la figure 75, une synthèse de toutes ces protéines dans les hydrogels Alg/HA-Alg/Hap stimulés et au repos. Une fluorescence plus importante est observée dans les biomatériaux HA et Hap stimulés pour les collagènes de types II et X, respectivement. Il semble aussi que le collagène de type I soit plus synthétisé dans la couche HA des hydrogels stimulés.

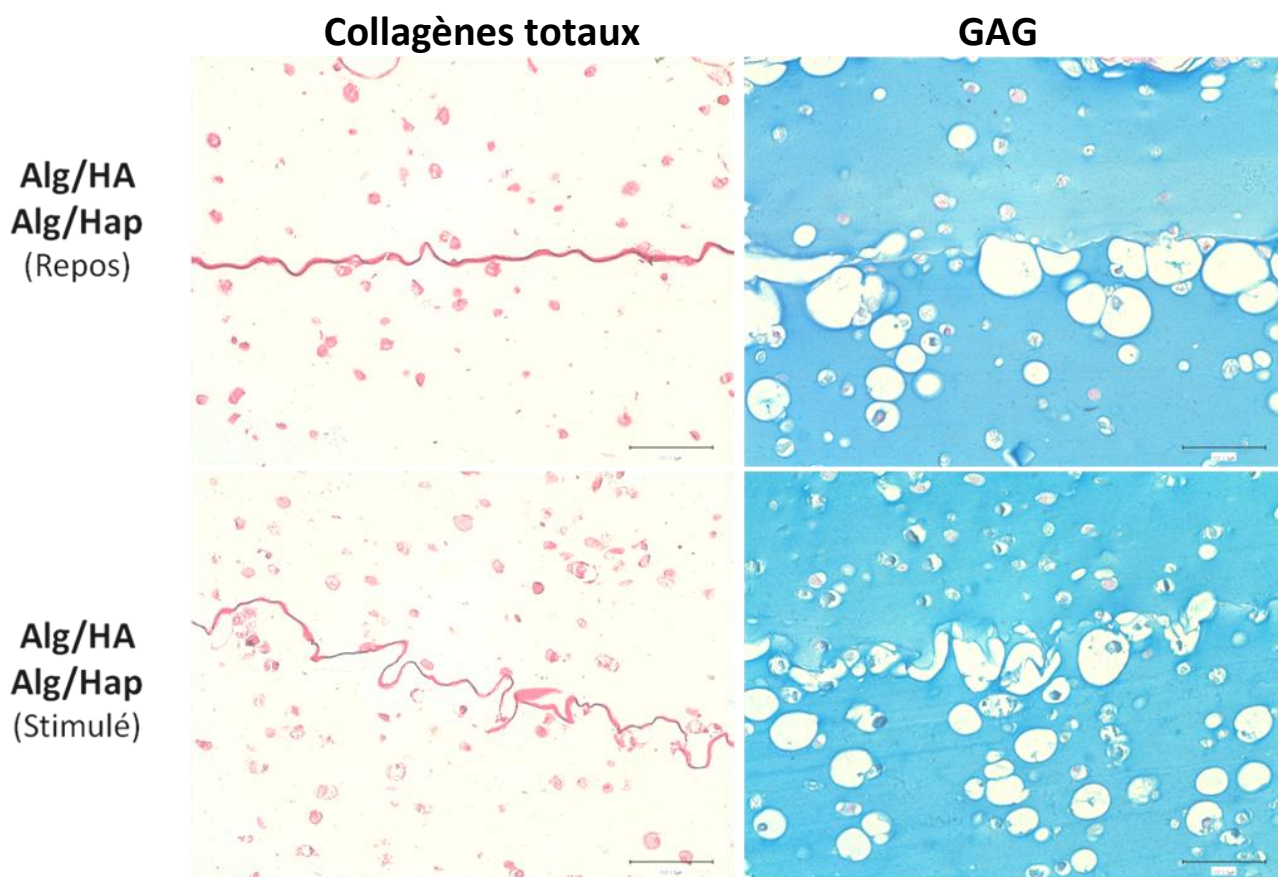


Figure 74 : Influence des stimulations mécaniques sur la synthèse des collagènes et des GAG

Des structures bistratifiées Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA, ensemencées de CSM, ont été construites, cultivées *in vitro* et soumises (**repos**) ou non à des stimulations mécaniques (**stimulé**). Après 3 et 28 jours, des échantillons d'hydrogels sont traités, puis des colorations histologiques au Rouge Sirius et au Bleu Alcian sont faites. Les synthèses de collagènes et surtout de GAG semblent plus importantes après la stimulation mécanique des échantillons. En effet, autour des cellules, les surfaces rouges sont plus étendue (collagène) et le bleu semble plus foncé et étendu (GAG). Les colorations sont observées en microscopie optique avec un objectif X20. Les barres d'échelle représentent 100 μ m.

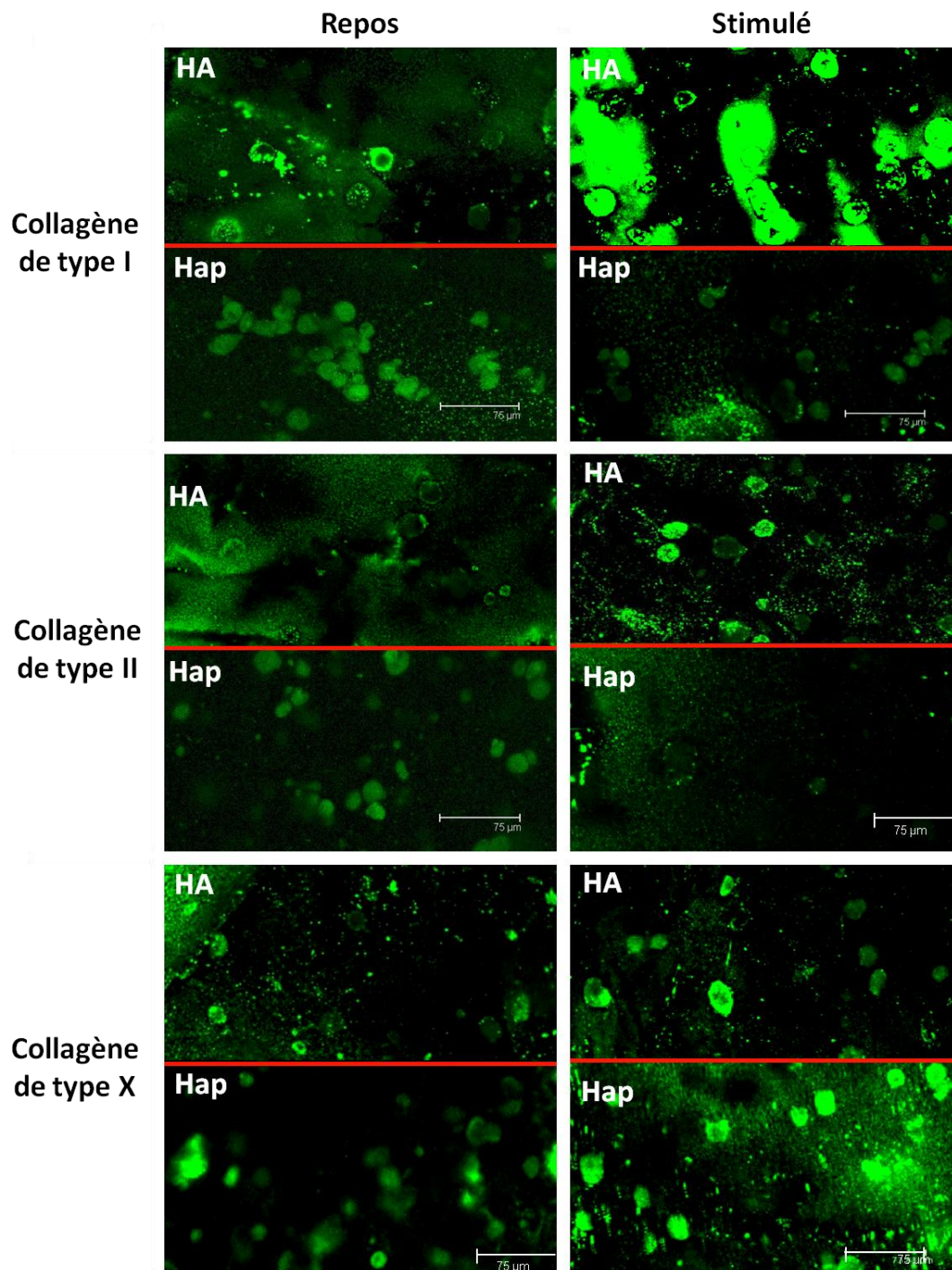


Figure 75 : Influence des stimulations mécaniques sur la synthèse des collagènes de type I, II et X

Après l'ensemencement des CSM et la construction par pulvérisation des hydrogels d'Alg/Hap-(PLL/HA)_{5,5}-Alg/HA, ces derniers sont cultivés pendant 28 jours et soumis (**stimulé**) ou non (**repos**) à des stimulations mécaniques. Les collagènes de type I, II et X ont été immunomarqués et observés en microscopie confocale (Leica SP2AOBS, Objectif x40, ON = 0,8). Tous les types de collagènes explorés sont synthétisés quels que soient la composition et l'état de stimulation. En revanche, la fluorescence semble plus forte après stimulation dans les couches Hap et HA pour les collagènes de type X et II, respectivement. Les barres d'échelle représentent 75 μm.

C. Discussion

Une fois les paramètres de dépôt établis et validés pour une culture utilisant les CSM humaines, nous avons fonctionnalisé puis évalué les constructions obtenues avec (1) des matériaux de composition différentes (chondro-inducteur et ostéo-inducteur) et (2) des compressions cycliques et intermittentes (220 kPa, 1 Hz et 4 h/jour), par des techniques d'histologie classique et de biologie moléculaires nous permettant de déterminer le comportement des cellules encapsulées dans les matériaux.

La philosophie de l'ingénierie tissulaire stratifiée est de mimer l'organisation zonale du cartilage et de reproduire, *in fine*, la composition naturelle du tissu (Kim *et al.* 2003; Klein *et al.* 2009; Kon *et al.*). Deux approches concernant une construction zonale sont décrites dans la littérature :

- La première consiste à ensemercer des cellules différentes dans des couches de biomatériau de composition identique. Dans cette approche, les cellules, de phénotypes différents, vont synthétiser une MEC spécifique. En 2003, Kim T.K. a utilisé des sous-populations chondrocytaires issues des différentes couches cartilagineuses (superficielle, moyenne, profonde) dans un polymère synthétique (Kim *et al.* 2003).
- La seconde consiste à ensemercer des cellules identiques (chondrocytes ou CSM) dans des couches de biomatériaux de composition différente. La spécificité du biomatériau doit guider la différenciation des cellules vers un phénotype spécifique. Ainsi, Kon E. et al. ont mis au point un biomatériau triphasique composé de collagène de type I et d'hydroxyapatite en proportion différente en fonction des strates. Les auteurs tentent ainsi, de mimer la MEC cartilagineuse et sous-chondrale (Kon *et al.* 2009).

C'est cette dernière stratégie qui a été retenue dans le cadre de ce travail. Ainsi, l'acide hyaluronique a été ajouté aux hydrogels pour favoriser la différenciation chondrocytaire tandis que l'hydroxyapatite a été ajouté pour ces capacités d'ostéo-induction.

La caractérisation des CSM a été réalisée à la fois, par l'étude de l'expression des marqueurs de surface et par l'analyse de l'expression des facteurs de transcription Sox9 et Runx2, caractérisant, respectivement la différenciation chondrocytaire et la différenciation terminale (chondrocyte hypertrophique) (Vinatier C. *et coll.*, 2009). Lorsque les CSM sont ensemençées dans une matrice tridimensionnelle, l'expression des marqueurs étudiés diminue par rapport à la culture en monocouche : dès J3 pour CD166, CD105 et à partir de J14 pour CD73. Chacun de ces

marqueurs caractérisant, entre autre, le potentiel indifférencié des CSM, cette diminution d'expression traduirait, selon Lee et al., une entrée des CSM dans une voie de différenciation (Lee et al. 2009). Il apparaît également que, tout au long de la culture, la nature du biomatériau (présence de HA ou Hap) ne semble pas influencer la proportion de CSM exprimant ces récepteurs.

L'engagement des CSM dans une voie de différenciation se confirme avec l'étude de l'expression des facteurs de transcription Sox9, Runx2 ainsi que des gènes d'intérêt soit en faisant varier la nature du biomatériau, soit en soumettant les matrices stratifiées à des contraintes mécaniques.

Il apparaît, en effet, que **l'ajout de composants matriciels** influence non seulement la différenciation mais aussi la synthèse matricielle des CSM. Après 14 jours de culture, en absence de stimulation mécanique, une différenciation des CSM est observée, dans les hydrogels enrichis en Hap, impliquant le facteur de transcription Runx2. Ainsi l'ajout d'Hap dans les hydrogels d'alginate tend à augmenter l'expression génique de Col10 et d'Agg par des CSM par rapport aux cellulesensemencées dans les hydrogels d'Alg/HA. Ce dernier constituant induit une augmentation de l'expression du facteur de transcription Sox9 dans des matrices cultivées pendant 28 jours. Ces résultats sont en accord avec l'étude récente de Nguyen et al., qui rapporte que la composition des biomatériaux influence la différenciation des CSM vers des phénotypes plus chondrocytaires, hypertrophiques ou ostéocytaires (Nguyen et al. 2011). Si l'acide hyaluronique est connu pour ces capacités chondro-inductrices, l'hydroxyapatite est régulièrement utilisé pour l'ingénierie ostéochondrale ou osseuse (Heymer et al. 2009). Oliveira et al. ont créé des éponges à partir d'hydroxyapatite et y ontensemencé des CSM de chèvre. Après 72 h de culture, ils ont montré une viabilité cellulaire qui avoisine les 100% ainsi qu'une orientation de la différenciation des cellules dans la voie ostéocytaire (Oliveira et al. 2006). La tendance à l'augmentation de la production de collagène de type X suggèrent que les hydrogels bistratifiés contenant de l'hydroxyapatite se différencient plus vers un phénotype chondrocytaire hypertrophique, et ceux composés uniquement de l'Alg/HA initieraient une différenciation vers un phénotype chondrocytaire. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les différents biomatériaux. Il est possible que les concentrations d'Hap testées aient été insuffisantes pour avoir un effet marqué sur la différenciation des cellules. En effet, Liu et al. ont montré que la concentration de nanoparticules d'hydroxyapatite influençait l'expression génique d'ostéopontine et d'ostéocalcine, qui sont spécifiques de l'os, par les CSM (Liu et al. 2009).

Le cartilage articulaire est un tissu soumis de manière constante à différentes stimulations mécaniques : du frottement et de la compression dans la zone superficielle, puis la compression diminue et la pression hydrostatique augmente vers les couches inférieures (Wong *et al.* 2003). En conséquence, les stimulations mécaniques des CSM semblent être pertinentes, pour fonctionnaliser les biomatériaux dans le cadre de l'ingénierie du cartilage. Ainsi, des stimulations mécaniques cycliques et intermittentes ont été imposées sur des hydrogels d'Alg/Hap-Alg/HA pendant 28 jours. Cela signifie que chaque hydrogel stratifié a été stimulé à une fréquence de 1 Hz pendant 4 heures, et de manière intermittente (30 min de stimulation, 30 min de repos). Ces paramètres ont été déterminés grâce aux résultats obtenus à la suite d'une thèse réalisée précédemment au sein de l'équipe (Wang 2007). De plus, selon Sim *et al.*, les stimulations mécaniques intermittentes seraient bénéfiques dans le cadre de la chondrogenèse des CSM, en effet, elles leur permettraient de répondre aux stimuli pendant les phases de repos contrairement à des stimulations continues (Sim *et al.* 2007). Les résultats obtenus montrent que cette stimulation mécanique permet de potentialiser l'effet du biomatériau sur la différenciation des CSM. En effet, à J14 l'expression de Col2 total et Sox9 est plus importante sous stimulation mécanique quel que soit le biomatériau. Après 28 jours de stimulation, les expressions relatives des gènes spécifiques du cartilage hypertrophique comme, Runx2 et Col10, sont plus importantes dans la couche contenant de l'Hap. En parallèle, la synthèse protéique de collagène de type X semble augmenter dans la couche Hap stimulée tandis que celle du collagène de type II augmenterait seulement dans le biomatériau contenant de l'HA. Ces résultats montrent l'effet de la stimulation mécanique sur la synthèse matricielle et la différenciation des CSM. Ces résultats sont en accord avec l'étude Kupcsik *et al.* qui ont montré qu'après 14 jours de stimulation quotidienne pendant 1 heure, l'expression génique de Col10, de COMP et d'Agg est augmentée par rapport au contrôle (Kupcsik *et al.* 2010). D'autre part, l'aggrécanne est le protéoglycane le plus abondant dans la matrice extracellulaire du cartilage. Il lui confère sa capacité de rétention d'eau ce qui permet au tissu d'être très résistant à la compression (Kiani *et al.* 2002). Après 28 jours de stimulation mécanique, non seulement l'expression génique d'Agg (la protéine core de l'aggrécanne) par les CSM a augmenté significativement et indépendamment du biomatériau, mais la quantité de GAG, colorés en histologie au Bleu Alcian, semble également augmenter. Kisiday *et al.* ont montré qu'une stimulation mécanique des CSM durant 12 heures quotidiennement et pendant 21 jours, permet d'augmenter la production de GAG et ce, sans facteur de croissance (Kisiday *et al.* 2009). Les CSM répondraient à leur déformation en activant la synthèse d'un élément de la matrice extracellulaire qui leur permettrait de résister aux stimuli auxquels elles

sont soumises. Ainsi, il est suggéré que des voies de mécanotransduction soient activées dans les cellules lorsqu'elles sont soumises à des déformations (Kiani *et al.* 2002 et Kisiday *et al.* 2009).

Ainsi, si l'ajout du constituant matriciel seul ne permettait pas d'obtenir de variation significative, les stimulations mécaniques potentialiseraient l'effet du biomatériau sur la différenciation des CSM vers des phénotypes de chondrocytes dans un hydrogel contenant de l'HA et vers le chondrocyte hypertrophique avec l'Hap. Ces stimulations mécaniques activeraient des voies de transduction du signal différentes pour diriger la différenciation et activer la synthèse de composant de la MEC spécifique.

Points essentiels :

- L'ajout de composants naturels du cartilage ou de l'os dans un hydrogel d'alginate induit une différenciation spécifique,
- Les stimulations mécaniques permettent de potentialiser l'effet du biomatériau sur la différenciation des cellules,
- Les CSM répondent aux stimuli mécaniques en activant la synthèse d'éléments matriciels leur permettant d'y résister.

CHAPITRE IV : Conclusions et perspectives

L'objectif de ce travail est de fournir un procédé original de fabrication d'hydrogels d'alginate stratifiés pouvant être utilisés dans le cadre de l'ingénierie du cartilage. En effet, le cartilage articulaire est un tissu stratifié dont la matrice extracellulaire et le phénotype des chondrocytes varient dans l'épaisseur. L'ingénierie du cartilage disposait jusqu'à maintenant de peu de méthodes de construction de biomatériaux stratifiés qui permettaient de réparer des lésions cartilagineuses profondes ou des atteintes ostéocondrales. La majorité des études y ensemencent des cellules natives des tissus lésés. Cependant, l'obtention de chondrocytes sains en quantité est difficile tout en maintenant leur phénotype. Ainsi, des CSM peuvent être ensemencées dans des biomatériaux pour y être différenciées afin de créer un néocartilage *in vitro*. Ces biomatériaux peuvent avoir plusieurs origines (synthétiques et naturelles) et se présentent sous plusieurs formes (hydrogels, réseaux...) pour supporter la chondrogenèse des CSM ou pour guider la différenciation des cellules. En effet, il est connu maintenant que la composition des biomatériaux influence la différenciation des cellules. D'autre part, le cartilage articulaire est un tissu soumis à de fortes forces de compression. Ainsi des stimulations mécaniques peuvent être appliquées sur les constructions pour activer des voies de mécanotransduction qui vont induire la différenciation des cellules et/ou améliorer leur synthèse matricielle.

Cette étude a permis d'obtenir des hydrogels stratifiés grâce à la pulvérisation progressive couche par couche d'un gel à base d'alginate et de polyélectrolytes. En effet, l'originalité de la pulvérisation successive des différentes couches réside non seulement sur la possibilité d'obtenir un hydrogel stratifié au niveau de la structure, mais surtout au niveau de la composition des biomatériaux et des phénotypes cellulaires ensemencés sans qu'il n'y ait de mélange entre les strates. La tenue des hydrogels stratifiés est possible grâce à la formation de liaisons électrostatiques entre les charges positives des polyélectrolytes et celles négatives de l'alginate. Ce travail s'est développé en 3 axes qui ont permis de valider le procédé de pulvérisation pour l'ingénierie du cartilage, puis d'obtenir des hydrogels stratifiés, et enfin, de fonctionnaliser ces constructions.

La première étape a permis de valider le procédé de pulvérisation d'un gel à base d'alginate ensemencé de chondrocytes de rat en le comparant à un biomatériau de référence obtenu par moulage. Ainsi, le comportement des cellules a été analysé. Les propriétés rhéologiques du biomatériau à base d'alginate, ont également été décrites, comme pour tout matériau, par le biais d'une loi de comportement mécanique. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'UMR 7563

CNRS INPL. Cette caractérisation nous a permis de cerner les effets du mode d'élaboration des hydrogels, et de fournir des résultats quantitatifs comme leur contrainte à la rupture.

Ainsi, il a été démontré que :

- Des hydrogels construits par pulvérisation à 0,9 bar d'un gel d'alginate ont une épaisseur suffisante pour une application en ingénierie du cartilage. En effet, le cartilage articulaire est un tissu d'environ 2 mm d'épaisseur, ainsi le comblement de ses lésions nécessite un biomatériau avec une épaisseur du même ordre de grandeur.
- La répartition des cellules est homogène dans les hydrogels construits par pulvérisation. Ce procédé ne semble pas délétère pour les chondrocytes car ils sont encore capables de synthétiser de la matrice extracellulaire spécifique du cartilage après la fabrication de l'hydrogel. Ainsi, la pulvérisation permettrait de construire des néotissus avec une matrice extracellulaire répartie de manière homogène.
- Les propriétés mécaniques des hydrogels pulvérisés sont meilleures comparées à celles d'hydrogels moulés quels que soient le niveau de déformation et la vitesse de déformation. De plus, les hydrogels d'alginate semblent avoir un comportement viscoélastique car sa résistance mécanique varie en fonction de la vitesse de déformation.

Cette première partie du travail a permis de valider le concept et sa faisabilité en étudiant la biocompatibilité de la technique mais aussi les propriétés mécaniques des hydrogels pulvérisés à 0,9 bar. Cette pression a été retenue pour la suite de ce travail.

Dans une seconde étape, des hydrogels stratifiés composés d'Alg/HA etensemencés de cellules souches mésenchymateuses humaines ont été fabriqués après avoir vérifié que ces cellules continuaient à métaboliser et conservaient leur capacité de différenciation dans un hydrogel pulvérisé à une couche. Il a été montré que :

- La pulvérisation des CSM n'est pas délétère pour leur viabilité et leur métabolisme jusqu'à 28 jours de culture. De plus, l'augmentation de l'expression génique de plusieurs marqueurs spécifique du cartilage a montré que leur culture (i) dans un environnement tridimensionnel contenant de l'acide hyaluronique, et (ii) avec un milieu chondrogénique sans facteur de croissance permet d'initier une différenciation chondrocytaire. La synthèse matricielle observée, contenant des GAG et du collagène de type II (spécifique du cartilage), corrobore qu'une chondrogenèse de ces cellules a été initiée.
- Les films multicouches de polyélectrolytes servent de mortier électrostatique entre les couches de l'hydrogel et permettent ainsi leur cohésion, mais aussi ils améliorent les propriétés

mécaniques des hydrogels lorsqu'ils sont utilisés dans leur composition. En effet, pour de grandes déformations, la résistance à la déformation des hydrogels stratifiés est meilleure que celle à une couche lorsqu'ils sont composés uniquement d'alginate supplémenté en acide hyaluronique. De plus, l'absence de migration des cellules entre les couches peut être attribuée à la présence de ces films.

- Les propriétés mécaniques des hydrogels stratifiés, contenant à la fois de l'acide hyaluronique dans une couche et de l'hydroxyapatite dans l'autre, ont une résistance mécanique égales à celles des hydrogels d'alginate/hydroxyapatite à une couche. La présence de l'hydroxyapatite (composant naturel de l'os et du cartilage calcifié) dans les hydrogels à une couche permet d'améliorer sa résistance à la déformation par rapport à l'alginate seul ou supplémenté avec de l'acide hyaluronique.

Ces résultats ont permis de montrer que des hydrogels bistratifiés pouvaient être construits et que l'apport d'acide hyaluronique permettait de promouvoir la chondrogenèse des CSM. De plus, des hydrogels contenant à la fois de l'acide hyaluronique et de l'hydroxyapatite dans des couches séparées ont pu être construits et montrent une meilleure résistance à la déformation que ceux contenant uniquement de l'alginate/acide hyaluronique.

Enfin, dans la troisième partie de ce travail, les hydrogels ont été fonctionnalisés par l'apport de constituants de la matrice extracellulaire et par l'application de stimulations mécaniques. Des hydrogels contenant de l'acide hyaluronique et de l'hydroxyapatite ont été soumis à des stimulations mécaniques cycliques et intermittentes. Cette dernière étape a permis de montrer que :

- Les biomatériaux utilisés permettent de supporter la chondrogenèse des cellules souches mésenchymateuses de la même manière que les hydrogels stratifiés composés uniquement d'Alg/HA. Cependant, la concentration d'hydroxyapatite utilisée ne permet pas d'orienter les cellules plus rapidement vers un phénotype de chondrocyte hypertrophique après 28 jours de culture et sans stimulation mécanique.

- L'influence des biomatériaux sur la différenciation des CSM a été potentialisée par l'apport de stimulations mécaniques. En effet, l'expression et la synthèse du collagène de type X a été augmentée dans la couche contenant de l'hydroxyapatite, alors que la synthèse du collagène de type II semble plus forte en présence d'acide hyaluronique. De plus, les stimulations mécaniques semblent avoir un fort impact sur la synthèse des protéoglycannes. En effet, ces derniers confèrent au cartilage leur capacité de résistance à la déformation en conservant une grande

quantité d'eau dans le tissu grâce à leurs nombreuses charges négatives. Ainsi, les CSM semblent avoir répondu aux déformations grâce à l'activation de voies de mécanotransduction qui ont permis la synthèse de composants de la matrice pouvant résister aux stimulations.

En conclusion, cette étude a permis de montrer non seulement que des hydrogels bistratifiés pouvaient être construits mais aussi que leur stimulation mécanique potentialisait l'effet du biomatériau sur la différenciation des CSM.

À l'issu de ce travail, nous avons pu montrer que le concept de pulvérisation était une approche réalisable et qu'elle permettait d'obtenir des biomatériaux d'un nouveau type, puisque ces derniers peuvent tenir compte du type de lésion à traiter (chondrale, ostéochondrale, diffuse, large) en étant façonnables (composition, épaisseur,...). Des résultats similaires ont été obtenus avec deux contingents cellulaires, ce qui permet d'envisager l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses, même si nous devons encore améliorer la qualité de la matrice extracellulaire néosynthétisée par ces dernières, notamment en utilisant la stimulation mécanique.

Des travaux sont, actuellement en cours pour étudier pour mimer réellement toutes les couches du cartilage, notamment en construisant des hydrogels à 3, voire 4 couches. Des hydrogels tristratifiés d'alginate/HA ont été construits puis cultivés (figure 76). Après 28 jours de culture, les cellules sont toujours présentes dans l'hydrogel et synthétisent de la MEC.

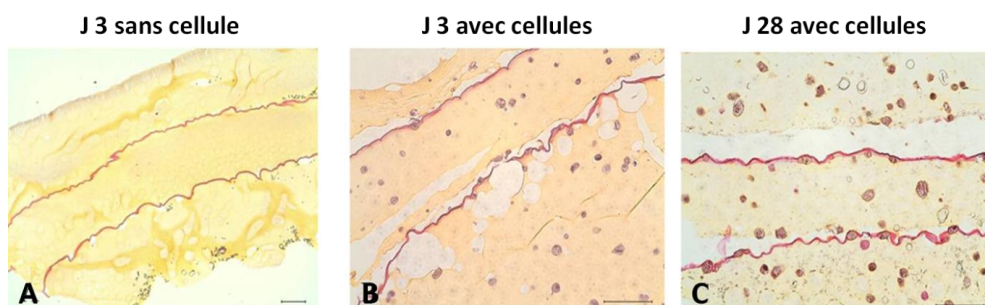


Figure 76 : Hydrogel d'Alg/HA tristratifié construit par pulvérisation

Des hydrogels tristratifiés ont été construits avec (B et C) et sans cellule (A) et colorés en HES. Puis, les hydrogels avec cellules ont été cultivés pendant 28 jours (J 28). Les images ont été obtenues par microscopie optique à un objectif X10 (A) et X 20 (B et C). Les barres d'échelles représentent 100 μ m.

Ainsi, des hydrogels tristratifiés pourraient être construits avec des biomatériaux différents qui pourront chacun orienter la différenciation des CSM vers un phénotype chondrocytaire spécifique à chaque couche du cartilage, par exemple en synthétisant plus de collagène de type II dans celle supérieure. Cependant, la concentration en hydroxyapatite utilisée n'a pas permis de montrer une forte influence sur la différenciation des cellules sans stimulation mécanique. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'effet de la concentration de différents composants de la matrice

extracellulaire afin d'optimiser la composition des différentes couches ainsi que l'a fait Nguyen et al. avec des biomatériaux à base de chondroïtine sulfate, un composant de la matrice extracellulaire du cartilage (Nguyen *et al.* 2011).

En dehors des considérations biologiques, le comportement mécanique des biomatériaux a été exploré en l'absence de cellule. L'analyse du comportement mécanique de ces biomatériaux ensemencés de cellules semble être importante, notamment parce qu'il influencerait la différenciation des cellules (Discher *et al.* 2005), mais aussi parce que les paramètres de stimulation pourraient alors être optimisés pour déterminer la déformation maximale à appliquer sur les hydrogels. De plus, la synthèse matricielle des cellules pourrait avoir un effet sur la résistance mécanique de la structure et alors les interactions cellules-matrice seraient plus précisément explorées. Rappelons que cette étude a permis de montrer une augmentation de la synthèse matricielle en réponse à des déformations cycliques et intermittentes des cellules pendant 28 jours. Des résultats préliminaires montrent qu'après la fonctionnalisation mécanique de ces hydrogels stratifiés, leur résistance à la déformation est améliorée. En effet, la figure 77 représente les courbes de réponses des hydrogels lors de tests mécaniques. La présence des cellules diminue légèrement la résistance mécanique des hydrogels stratifiés Alg/Hap-Alg/HA après 1 jour de culture.

Après 28 jours de culture et de stimulations mécaniques (J28 avec cellules, stimulé), les hydrogels stratifiés ont une résistance mécanique supérieure à celle des échantillons au repos (J27 avec cellules, repos). Ces résultats préliminaires combinés à ceux cités dans ce travail permettent d'imaginer que l'augmentation de la synthèse matricielle, après une stimulation mécanique, explique l'augmentation de la résistance mécanique à la déformation des hydrogels stratifiés. Ainsi, il serait intéressant de confirmer ces résultats et d'évaluer l'influence des cellules et de la matrice extracellulaire sur le comportement mécanique des hydrogels stratifiés.

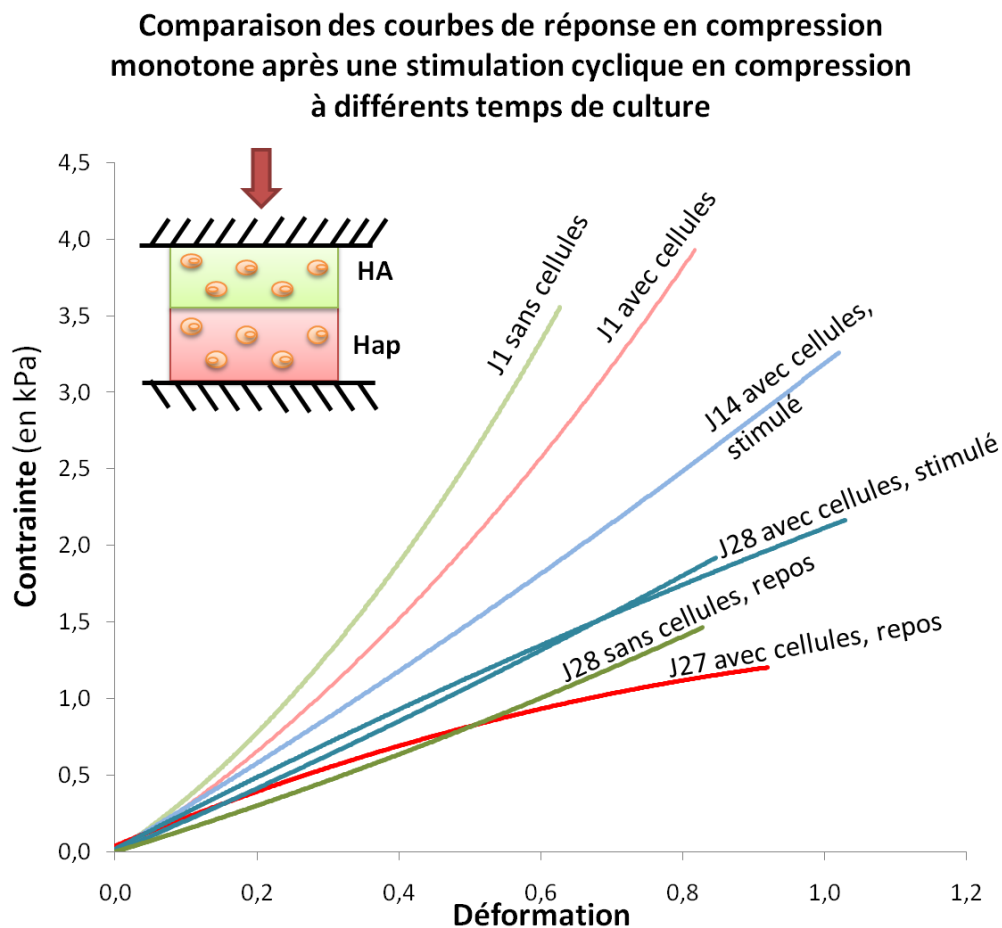


Figure 77 : Influence de la présence des cellules, de la culture *in vitro* et de la stimulation mécanique des biomatériaux sur leur résistance mécanique à la déformation

Des hydrogels bistratifiés composés d'alginate/hydroxyapatite (Hap) et d'alginate/acide hyaluronique (HA) ont été construits avec ou sans cellules souches mésenchymateuses humaines et cultivés pendant 28 jours avec un milieu chondrogénique basique. Les hydrogels avec cellules ont été soumis (stimulé) ou non (repos) à des stimulations mécaniques cycliques et intermittentes. Les propriétés mécaniques des hydrogels ont été explorées avec des tests de compression simple à une vitesse de déformation monotone de $2\% \text{ s}^{-1}$. Chaque courbe représente un échantillon.

Parallèlement, dans ce travail, une grande disparité des résultats a été montrée concernant l'expression génique entre les différentes souches de cellules humaines testées. Ces dernières provenaient en majorité de patients de plus de 70 ans, et ayant subis une arthroplastie. Ainsi, la pathologie et l'âge du patient pourraient avoir une incidence sur l'amplification des cellules, en premier lieu, mais surtout sur la capacité de différenciation des cellules comme l'ont montrée Payne et al. (Payne et al. 2010). Une étude plus approfondie sur l'influence de l'âge et des conditions de prélèvement de la moelle osseuse pourrait améliorer la compréhension des phénomènes observés, mais aussi permettrait de déterminer un protocole plus précis quant à la source et à l'utilisation de ces cellules pour la construction d'un néocartilage *in vitro*. D'autre part, l'utilisation de cellules souches plus jeunes (gelée de Wharton) ou plus précoce obtenues par modification génétique (IPs, cellules souches pluripotentes induites) pourraient être une

alternative aux cellules issues de la moelle osseuse et permettrait, peut être, de restaurer plus rapidement l'intégrité du cartilage. En effet, les CSM issues de la gelée de Wharton semblent être une source prometteuse de par leur capacité d'amplification plus rapide, leur non-immunogénicité et leur très grande disponibilité.

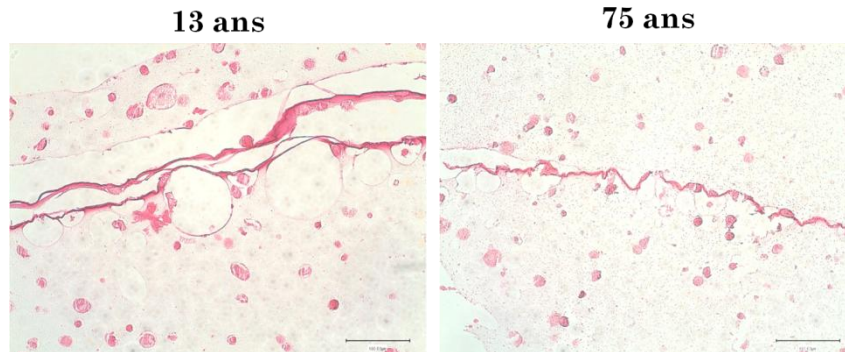


Figure 78 : Influence de l'âge sur la synthèse de collagène

Après 28 jours de culture, la synthèse de collagène par des CSM ensemencées dans des hydrogels d'Alg/HA a été mise en évidence par des colorations histologiques au Rouge Sirius. Les cellules provenaient de deux patients différents âgés de 13 et 75 ans. Ces images représentent des échantillons observés par microscopie optique à un objectif X20.

Enfin, l'implantation *in vivo* de ces constructions serait intéressante à étudier pour évaluer la capacité des structures à s'intégrer dans le tissu natif, ainsi que l'effet des stimulations biochimiques et mécaniques subies *in vivo*. Ainsi, les conditions d'implantation des biomatériaux pourraient être déterminées - après la construction des hydrogels stratifiés, ou après 28 jours de culture *in vitro* où la différenciation serait initiée - pour ensuite pouvoir créer des protocoles d'implantation chez l'homme pour des tests cliniques.

Références bibliographiques

- An Y. H. and Martin K. L. Handbook of histology methods for bone and cartilage, (2003), Humana Press.
- Appelman T. P., Mizrahi J., Elisseff J. H. and Seliktar D. The influence of biological motifs and dynamic mechanical stimulation in hydrogel scaffold systems on the phenotype of chondrocytes. *Biomaterials*, 2011, 32(6): 1508-1516.
- Arden N. and Nevitt M. C. Osteoarthritis: Epidemiology. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2006, 20(1): 3-25.
- Awad H. A., Wickham M. Q., Leddy H. A., Gimble J. M. and Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 2004, 25(16): 3211-22.
- Baksh D., Yao R. and Tuan R. S. Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. *STEM CELLS*, 2007, 25(6): 1384-1392.
- Ball V., Bernsmann F., Betscha C., Maechling C., Kauffmann S., Senger B., Voegel J. C., Schaaf P. and Benkirane-Jessel N. Polyelectrolyte multilayer films built from poly(L-lysine) and a two-component anionic polysaccharide blend. *Langmuir*, 2009, 25(6): 3593-600.
- Becker T. A., Kipke D. R. and Brandon T. Calcium alginate gel: a biocompatible and mechanically stable polymer for endovascular embolization. *J Biomed Mater Res*, 2001, 54(1): 76-86.
- Benkirane-Jessel N., Lavallo P., Hübsch E., Holl V., Senger B., Haikel Y., Voegel J. C., Ogier J. and Schaaf P. Short-Time Tuning of the biological activity of functionalized polyelectrolyte multilayers. *Advanced Functional Materials*, 2005, 15(4): 648-654.
- Berry P. A., Jones S. W., Cicuttini F. M., Wluka A. E. and Maciewicz R. A. Temporal relationship between serum adipokines, biomarkers of bone and cartilage turnover, and cartilage volume loss in a population with clinical knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 2011, 63(3): 700-707.
- Bonzani I. C., George J. H. and Stevens M. M. Novel materials for bone and cartilage regeneration. *Curr Opin Chem Biol*, 2006, 10(6): 568-75.
- Boudou T., Crouzier T., Auzeix Ly-Velty R., Glinel K. and Picart C. Internal Composition versus the Mechanical Properties of Polyelectrolyte Multilayer Films: The Influence of Chemical Cross-Linking. *Langmuir*, 2009, 25(24): 13809-13819.
- Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O. and Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 1994, 331(14): 889-95.
- Brodin K. R., García A. J. and Levenston M. E. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials*, 2004, 25(28): 5929-5938.
- Burdick J. A., Chung C., Jia X., Randolph M. A. and Langer R. Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks. *Biomacromolecules*, 2005, 6(1): 386-91.
- Cao L., Yang F., Liu G., Yu D., Li H., Fan Q., Gan Y., Tang T. and Dai K. The promotion of cartilage defect repair using adenovirus mediated Sox9 gene transfer of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 2011, 32(16): 3910-3920.
- Chawla K., Klein T. J., Schumacher B. L., Jadin K. D., Shah B. H., Nakagawa K., Wong V. W., Chen A. C., Masuda K. and Sah R. L. Short-term retention of labeled chondrocyte subpopulations in stratified tissue-engineered cartilaginous constructs implanted in vivo in mini-pigs. *Tissue Eng*, 2007, 13(7): 1525-37.
- Chen J., Chen H., Li P., Diao H., Zhu S., Dong L., Wang R., Guo T., Zhao J. and Zhang J. Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone in vivo using MSCs induced by a spatially controlled gene delivery system in bilayered integrated scaffolds. *Biomaterials*, 2011, 32(21): 4793-4805.

- Cheng H. W.,Luk K. D.,Cheung K. M. and Chan B. P. In vitro generation of an osteochondral interface from mesenchymal stem cell-collagen microspheres. *Biomaterials*, 2010, 32(6): 1526-35.
- Chung C. and Burdick J. A. Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(2): 243-62.
- Chung C. and Burdick J. A. Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(2): 243-54.
- Cohen J.,Zaleski K. L.,Nourissat G.,Julien T. P.,Randolph M. A. and Yaremchuk M. J. Survival of porcine mesenchymal stem cells over the alginate recovered cellular method. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 96(1): 93-9.
- Coujard R.,Poirier J. and Racadot J. Précis d'histologie humaine, (1980): 205-210.
- Delise A. M.,Fischer L. and Tuan R. S. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000, 8(5): 309-34.
- Derfoul A.,Perkins G. L.,Hall D. J. and Tuan R. S. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells*, 2006, 24(6): 1487-95.
- Dierich A.,Le guen E.,Messaddeq N.,Stoltz J. F.,Netter P.,Schaaf P.,Voegel J. C. and Benkirane-Jessel N. Bone formation mediated by Synergy-Acting Growth Factors embedded in a polyelectrolyte multilayer film. *Advanced Materials*, 2007, 19(5): 693-697.
- Discher D. E.,Janmey P. and Wang Y. L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 2005, 310(5751): 1139-43.
- Eckstein F.,Lemberger B.,Gratzke C.,Hudelmaier M.,Glaser C.,Englmeier K. H. and Reiser M. In vivo cartilage deformation after different types of activity and its dependence on physical training status. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(2): 291-295.
- Elder B. D. and Athanasiou K. A. Systematic assessment of growth factor treatment on biochemical and biomechanical properties of engineered articular cartilage constructs. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17(1): 114-23.
- Engler A. J.,Sen S.,Sweeney H. L. and Discher D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 2006, 126(4): 677-689.
- Ewers B. J.,Dvoracek-Driksna D.,Orth M. W. and Haut R. C. The extent of matrix damage and chondrocyte death in mechanically traumatized articular cartilage explants depends on rate of loading. *J Orthop Res*, 2001, 19(5): 779-84.
- Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*, 2002, 4(1): 30-5.
- Forster R.,Thürmer F.,Wallrapp C.,Lloyd A.,Macfarlane W.,Phillips G.,Boutrand J.-P. and Lewis A. Characterisation of physico-mechanical properties and degradation potential of calcium alginate beads for use in embolisation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2010, 21(7): 2243-2251.
- Fragonas E.,Valente M.,Pozzi-Mucelli M.,Toffanin R.,Rizzo R.,Silvestri F. and Vittur F. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials*, 2000, 21(8): 795-801.
- Freyria A. M.,Courtes S. and Mallein-Gerin F. Differentiation of adult human mesenchymal stem cells: chondrogenic effect of BMP-2. *Pathol Biol (Paris)*, 2008, 56(5): 326-33.
- Gangloff S. C.,Ladam G.,Dupray V.,Fukase K.,Brandenburg K.,Guenounou M.,Schaaf P.,Voegel J. C. and Jessel N. Biologically active lipid A antagonist embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture. *Biomaterials*, 2006, 27(9): 1771-7.
- Garza J. M.,Jessel N.,Ladam G.,Dupray V.,Muller S.,Stoltz J. F.,Schaaf P.,Voegel J. C. and Lavalie P. Polyelectrolyte multilayers and degradable polymer layers as multicompartiment films. *Langmuir*, 2005, 21(26): 12372-7.
- Gelse K.,Poschl E. and Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(12): 1531-46.

- Gigant-Huselstein C.,Hubert P.,Dumas D.,Dellacherie E.,Netter P.,Payan E. and Stoltz J. F. Expression of adhesion molecules and collagen on rat chondrocyte seeded into alginate and hyaluronate based 3D biosystems. Influence of mechanical stresses. *Biorheology*, 2004, 41(3-4): 423-431.
- Golding M. B. and Marcu K. B. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(3): 224.
- Gomoll A. H.,Madry H.,Knutsen G.,Van Dijk N.,Seil R.,Brittberg M. and Kon E. The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2010, 18(4): 434-47.
- Grant I.,Warwick K.,Marshall J.,Green C. and Martin R. The co-application of sprayed cultured autologous keratinocytes and autologous fibrin sealant in a porcine wound model. *British Journal of Plastic Surgery*, 2002, 55(3): 219-227.
- Grayson W. L.,Bhumiratana S.,Grace Chao P. H.,Hung C. T. and Vunjak-Novakovic G. Spatial regulation of human mesenchymal stem cell differentiation in engineered osteochondral constructs: effects of pre-differentiation, soluble factors and medium perfusion. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(5): 714-23.
- Grigolo B.,De Franceschi L.,Roseti L.,Cattini L. and Facchini A. Down regulation of degenerative cartilage molecules in chondrocytes grown on a hyaluronan-based scaffold. *Biomaterials*, 2005, 26(28): 5668-5676.
- Grossin L.,Cortial D.,Saulnier B.,Félix O.,Chassepot A.,Decher G.,Netter P.,Schaaf P.,Gillet P.,Mainard D.,Voegel J.-C. and Benkirane-Jessel N. Step-by-Step Build-Up of Biologically Active Cell-Containing Stratified Films Aimed at Tissue Engineering. *Advanced materials*, 2009, 21(6): 650-655.
- Hafez A. T.,Bägli D. J.,Bahoric A.,Aitken K.,Smith C. R.,Herz D. and Khoury A. E. Aerosol Transfer of bladder urothelial and smooth muscle cells onto demucosalized colonic segments: a pilot study. *The Journal of Urology*, 2003, 169(6): 2316-2320.
- Han E.,Bae W. C.,Hsieh-Bonassera N. D.,Wong V. W.,Schumacher B. L.,Gortz S.,Masuda K.,Bugbee W. D. and Sah R. L. Shaped, stratified, scaffold-free grafts for articular cartilage defects. *Clin Orthop Relat Res*, 2008, 466(8): 1912-20.
- Hangody L.,Kish G.,Kárpáti Z. and Eberhart R. Osteochondral plugs: Autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of focal chondral and osteochondral articular defects. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 1997, 7(4): 312-322.
- Hangody L.,Vásárhelyi G.,Hangody L. R.,Sükösd Z.,Tibay G.,Bartha L. and Bodó G. Autologous osteochondral grafting-technique and long-term results. *Injury*, 2008, 39(1, Supplement): 32-39.
- Hardingham T.,Markus J. S.,Simon P. R. and John P. B. (2006). *Proteoglycans and Glycosaminoglycans. Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Burlington, Academic Press: 85-98.
- Harley B. A.,Lynn A. K.,Wissner-Gross Z.,Bonfield W.,Yannas I. V. and Gibson L. J. Design of a multiphase osteochondral scaffold III: Fabrication of layered scaffolds with continuous interfaces. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 92(3): 1078-93.
- Henderson J. H.,Ginley N. M.,Caplan A. I.,Niyibizi C. and Dennis J. E. Low Oxygen Tension During Incubation Periods of Chondrocyte Expansion Is Sufficient to Enhance Postexpansion Chondrogenesis. *Tissue Engineering Part A*, 2009, 16(5): 1585-1593.
- Heng B. C.,Cao T. and Lee E. H. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. *STEM CELLS*, 2004, 22(7): 1152-67.
- Herlofsen S. R.,Kuchler A. M.,Melvik J. E. and Brinchmann J. E. Chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in self-gelling alginate discs reveals novel chondrogenic signature gene clusters. *Tissue Eng Part A*, 2010, 17(7-8): 1003-13.

- Heyland J.,Wiegandt K.,Goepfert C.,Nagel-Heyer S.,Ilinich E.,Schumacher U. and Portner R. Redifferentiation of chondrocytes and cartilage formation under intermittent hydrostatic pressure. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(20): 1641-8.
- Heymer A.,Bradica G.,Eulert J. and Noth U. Multiphasic collagen fibre-PLA composites seeded with human mesenchymal stem cells for osteochondral defect repair: an in vitro study. *J Tissue Eng Regen Med*, 2009, 3(5): 389-97.
- Hosseini A.,Van De Velde S. K.,Kozanek M.,Gill T. J.,Grodzinsky A. J.,Rubash H. E. and Li G. In-vivo time-dependent articular cartilage contact behavior of the tibiofemoral joint. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2010, 18(7): 909-916.
- Hunziker E. B.,Kapfinger E. and Geiss J. The structural architecture of adult mammalian articular cartilage evolves by a synchronized process of tissue resorption and neoformation during postnatal development. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2007, 15(4): 403-413.
- Hwang N. S.,Kim M. S.,Sampattavanich S.,Baek J. H.,Zhang Z. and Elisseeff J. Effects of Three-Dimensional Culture and Growth Factors on the Chondrogenic Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS*, 2006, 24(2): 284-291.
- Hwang N. S.,Varghese S.,Lee H. J.,Theprungsirikul P.,Canver A.,Sharma B. and Elisseeff J. Response of zonal chondrocytes to extracellular matrix-hydrogels. *FEBS Lett*, 2007, 581(22): 4172-8.
- Indrawattana N.,Chen G.,Tadokoro M.,Shann L. H.,Ohgushi H.,Tateishi T.,Tanaka J. and Bunyaratvej A. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(3): 914-9.
- Jeffrey J. E.,Gregory D. W. and Aspden R. M. Matrix damage and chondrocyte viability following a single impact load on articular cartilage. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 322(1): 87-96.
- Jeon O.,Bouhadir K. H.,Mansour J. M. and Alsberg E. Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties. *Biomaterials*, 2009, 30(14): 2724-2734.
- Jessel N.,Atalar F.,Lavalle P.,Mutterer J.,Decher G.,Schaaf P.,Voegel J. C. and Ogier J. Bioactive Coatings Based on a Polyelectrolyte Multilayer Architecture Functionalized by Embedded Proteins. *Advanced Materials*, 2003, 15(9): 692-695.
- Jin M. and Grodzinsky A. J. Effect of Electrostatic Interactions between Glycosaminoglycans on the Shear Stiffness of Cartilage: A Molecular Model and Experiments. *Macromolecules*, 2001, 34(23): 8330-8339.
- Kemppainen J. M. and Hollister S. J. Differential effects of designed scaffold permeability on chondrogenesis by chondrocytes and bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 2009, 31(2): 279-87.
- Kerdjoudj H.,Boura C.,Moby V.,Montagne K.,Schaaf P.,Voegel J. C.,Stoltz J. F. and Menu P. Re-endothelialization of Human Umbilical Arteries Treated with Polyelectrolyte Multilayers: A Tool for Damaged Vessel Replacement. *Advanced Functional Materials*, 2007, 17(15): 2667-2673.
- Kiani C.,Chen L.,Wu Y. J.,Yee A. J. and Yang B. B. Structure and function of aggrecan. *Cell Research*, 2002, 12(1): 19-32.
- Kim T. K.,Sharma B.,Williams C. G.,Ruffner M. A.,Malik A.,Mcfarland E. G. and Elisseeff J. H. Experimental model for cartilage tissue engineering to regenerate the zonal organization of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003, 11(9): 653-64.
- Kino-Oka M.,Yashiki S.,Ota Y.,Mushiaki Y.,Sugawara K.,Yamamoto T.,Takezawa T. and Taya M. Subculture of Chondrocytes on a Collagen Type I-Coated Substrate with Suppressed Cellular Dedifferentiation. *Tissue Engineering*, 2005, 11(3-4): 597-608.
- Kisiday J. D.,Frisbie D. D.,McIlwraith C. W. and Grodzinsky A. J. Dynamic Compression Stimulates Proteoglycan Synthesis by Mesenchymal Stem Cells in the Absence of Chondrogenic Cytokines. *Tissue Engineering Part A*, 2009, 15(10): 2817-2824.

- Klein T. J.,Malda J.,Sah R. L. and Hutmacher D. W. Tissue Engineering of Articular Cartilage with Biomimetic Zones. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009.
- Klein T. J.,Rizzi S. C.,Reichert J. C.,Georgi N.,Malda J.,Schoorman W.,Crawford R. W. and Hutmacher D. W. Strategies for zonal cartilage repair using hydrogels. *Macromol Biosci*, 2009, 9(11): 1049-58.
- Klein T. J.,Schumacher B. L.,Schmidt T. A.,Li K. W.,Voegtline M. S.,Masuda K.,Thonar E. J. and Sah R. L. Tissue engineering of stratified articular cartilage from chondrocyte subpopulations. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003, 11(8): 595-602.
- Knudson W. and Loeser R. F. CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2002, 59(1): 36-44.
- Kon E.,Delcogliano M.,Filardo G.,Finì M.,Giavaresi G.,Francioli S.,Martin I.,Pressato D.,Arcangeli E. and Quarto R. Orderly osteochondral regeneration in a sheep model using a novel nano composite multilayered biomaterial. *Journal of Orthopaedic Research*, 2009, 28(1): 116-124.
- Kuo C. K. and Ma P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 2001, 22(6): 511-21.
- Kupcsik L.,Stoddart M. J.,Li Z.,Benneker L. M. and Alini M. Improving Chondrogenesis: Potential and Limitations of SOX9 Gene Transfer and Mechanical Stimulation for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A*, 2010, 16(6): 1845-1855.
- Lee C. S.,Gleghorn J. P.,Won Choi N.,Cabodi M.,Stroock A. D. and Bonassar L. J. Integration of layered chondrocyte-seeded alginate hydrogel scaffolds. *Biomaterials*, 2007, 28(19): 2987-93.
- Lee H. J.,Choi B. H.,Min B.-H. and Park S. R. Changes in surface markers of human mesenchymal stem cells during the chondrogenic differentiation and dedifferentiation processes in vitro. *Arthritis & Rheumatism*, 2009, 60(8): 2325-2332.
- Lewandowski K. U. Tissue Engineering and Biodegradable Equivalents, Scientific and Clinical Applications, (2002), M. Dekker.
- Lin P. L.,Fang H. W.,Tseng T. and Lee W. H. Effects of hydroxyapatite dosage on mechanical and biological behaviors of polylactic acid composite materials. *Materials Letters*, 2007, 61(14-15): 3009-3013.
- Lin Y.-J.,Yen C.-N.,Hu Y.-C.,Wu Y.-C.,Liao C.-J. and Chu I. M. Chondrocytes culture in three-dimensional porous alginate scaffolds enhanced cell proliferation, matrix synthesis and gene expression. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, 88A(1): 23-33.
- Liu S. Q.,Tian Q.,Hedrick J. L.,Po Hui J. H.,Ee P. L. and Yang Y. Y. Biomimetic hydrogels for chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells to neocartilage. *Biomaterials*, 2010, 31(28): 7298-307.
- Liu Y. K.,Wang G. C.,Cai Y. R.,Ji H. J.,Zhou G. S.,Zhao X. L.,Tang R. K. and Zhang M. In vitro effects of nanophase hydroxyapatite particles on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, 90(4): 1083-1091.
- Lodish H.,Berk A.,Matsudaira P.,Kaiser C. A. and Darnell J. Biologie moléculaire de la cellule, (2005).
- Louboutin H.,Debarge R.,Richou J.,Selmi T. A. S.,Donell S. T.,Neyret P. and Dubrana F. Osteoarthritis in patients with anterior cruciate ligament rupture: A review of risk factors. *The Knee*, 2009, 16(4): 239-244.
- Lu H.,Guo L.,Kawazoe N.,Tateishi T. and Chen G. Effects of Poly(L-lysine), Poly(acrylic acid) and Poly(ethylene glycol) on the Adhesion, Proliferation and Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Biomaterials Science*, 2009, 20: 577-589.
- Lutolf M. P.,Gilbert P. M. and Blau H. M. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature*, 2009,

- 462(7272): 433-41.
- Lutolf M. P. and Hubbell J. A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(1): 47-55.
- Madry H.,Orth P.,Kaul G.,Zurakowski D.,Menger M.,Kohn D. and Cucchiari M. Acceleration of articular cartilage repair by combined gene transfer of human insulin-like growth factor I and fibroblast growth factor-2 in vivo. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 2010, 130(10): 1311-1322.
- Mallett A. G. and Korbitt G. S. Alginate modification improves long-term survival and function of transplanted encapsulated islets. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(6): 1301-9.
- Mancini M.,Moresi M. and Rancini R. Mechanical properties of alginate gels: empirical characterisation. *Journal of Food Engineering*, 1999, 39(4): 369-378.
- Mara C. S.,Duarte A. S. S.,Sartori A.,Luzo A. C.,Saad S. T. O. and Coimbra I. B. Regulation of Chondrogenesis by Transforming Growth Factor- β 3 and Insulin-like Growth Factor-1 from Human Mesenchymal Umbilical Cord Blood Cells. *The Journal of Rheumatology*, 2010, 37(7): 1519-1526.
- Marcus R.,Feldman D.,Nelson D. A. and Rosen C. J. Osteoporosis, (2008)1: 197-199.
- Masaki K.,Sato Y. S.,Maeda M. and Kokawa H. Experimental simulation of recrystallized microstructure in friction stir welded Al alloy using a plane-strain compression test. *Scripta Materialia*, 2008, 58(5): 355-360.
- Merceron C.,Portron S.,Masson M.,Lesoeur J.,Fellah B. H.,Gauthier O.,Geffroy O.,Weiss P.,Guicheux J. and Vinatier C. The effect of two and three dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel. *Cell Transplant*, 2011.
- Merceron C.,Vinatier C.,Portron S.,Masson M.,Amiaud J.,Guigand L.,Cherel Y.,Weiss P. and Guicheux J. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 298(2): C355-64.
- Merle-Vincent F.,Couris C. M.,Schott A.-M.,Conrozier T.,Piperno M.,Mathieu P. and Vignon E. Les facteurs prédictifs de satisfaction deux ans après la mise en place d'une prothèse totale de genou dans la gonarthrose. *Revue du Rhumatisme*, 2011, 78(4): 356-360.
- Meyer U. and Wiesmann H. P. Bone and cartilage engineering, (2006).
- Miyazaki K.,Trindade M. C.,Lindsey D. P.,Beaupre G. S.,Carter D. R.,Goodman S. B.,Schurman D. J. and Smith R. L. Dose- and time-dependent effects of cyclic hydrostatic pressure on transforming growth factor- β 3-induced chondrogenesis by adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Tissue Eng*, 2006, 12(8): 2253-62.
- Mjahed H.,Porcel C.,Senger B.,Chassepot A.,Netter P.,Gillet P.,Decher G.,Voegel J.-C.,Schaaf P.,Benkirane-Jessel N. and Boulmedais F. Micro-stratified architectures based on successive stacking of alginate gel layers and poly(L-lysine)-hyaluronic acid multilayer films aimed at tissue engineering. *Soft matter*, 2008, 4: 1422-1429.
- Montmitonnet P.,Delamare F. and Rizoulières B. Transfer layer and friction in cold metal strip rolling processes. *Wear*, 2000, 245(1-2): 125-135.
- Moresi M. and Bruno M. Characterisation of alginate gels using quasi-static and dynamic methods. *Journal of Food Engineering*, 2007, 82(3): 298-309.
- Moresi M.,Mancini M.,Bruno M. and Rancini R. Viscoelastic properties of alginate gels by oscillatory dynamic tests. *Journal of Texture Studies*, 2001, 32(5-6): 375-396.
- Mouw J. K.,Case N. D.,Guldberg R. E.,Plaas A. H. and Levenston M. E. Variations in matrix composition and GAG fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005, 13(9): 828-36.
- Mouw J. K.,Connelly J. T.,Wilson C. G.,Michael K. E. and Levenston M. E. Dynamic Compression Regulates the Expression and Synthesis of Chondrocyte-Specific Matrix Molecules in Bone

- Marrow Stromal Cells. *STEM CELLS*, 2007, 25(3): 655-663.
- Mündermann A., Dyrby C. O., D'lima D. D., Colwell C. W. and Andriacchi T. P. In vivo knee loading characteristics during activities of daily living as measured by an instrumented total knee replacement. *Journal of Orthopaedic Research*, 2008, 26(9): 1167-1172.
- Navarro F. A., Stoner M. L., Lee H. B., Park C. S., Wood F. M. and Orgill D. P. Melanocyte repopulation in full-thickness wounds using a cell spray apparatus. *J Burn Care Rehabil*, 2001, 22(1): 41-6.
- Newman J., Pydisetty R. V. and Ackroyd C. Unicompartamental or total knee replacement: the 15-year results of a prospective randomised controlled trial. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume*, 2009, 91(1): 52.
- Neyret P., Selmi T. A. S. and Barnouin L. CARTIPATCH®. Une nouvelle perspective pour les greffes de cartilage. Résultats de l'étude clinique de phase II. e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie, 2007, 6(3): 05-09.
- Ng K. W., Ateshian G. A. and Hung C. T. Zonal chondrocytes seeded in a layered agarose hydrogel create engineered cartilage with depth-dependent cellular and mechanical inhomogeneity. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(9): 2315-24.
- Ng K. W., Wang C. C. B., Mauck R. L., Kelly T.-A. N., Chahine N. O., Costa K. D., Ateshian G. A. and Hung C. T. A layered agarose approach to fabricate depth-dependent inhomogeneity in chondrocyte-seeded constructs. *Journal of Orthopaedic Research*, 2005, 23(1): 134-141.
- Nguyen L. H., Kudva A. K., Guckert N. L., Linse K. D. and Roy K. Unique biomaterial compositions direct bone marrow stem cells into specific chondrocytic phenotypes corresponding to the various zones of articular cartilage. *Biomaterials*, 2011, 32(5): 1327-1338.
- Oliveira J. M., Rodrigues M. R. T., Silva S. S., Malafaya P. C. B., Gomes M. E., Viegas C. A., Dias I. R., Azevedo J. T., Mano J. O. F. and Reis R. L. Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 2006, 27(36): 6123-6137.
- Park J. S., Yang H. N., Woo D. G., Jeon S. Y. and Park K. H. The promotion of chondrogenesis, osteogenesis, and adipogenesis of human mesenchymal stem cells by multiple growth factors incorporated into nanosphere-coated microspheres. *Biomaterials*, 2010, 32(1): 28-38.
- Payne K. A., Didiano D. M. and Chu C. R. Donor sex and age influence the chondrogenic potential of human femoral bone marrow stem cells. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(5): 705-13.
- Peretz S. and Cinteza O. Removal of some nitrophenol contaminants using alginate gel beads. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008, 319(1-3): 165-172.
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S. and Marshak D. R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- Pollard T. D. and Earnshaw W. C. *Biologie cellulaire*, (2004), Elsevier.
- Poole A. R., Kojima T., Yasuda T., Mwale F., Kobayashi M. and Laverty S. Composition and Structure of Articular Cartilage: A Template for Tissue Repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2001, 391: S26-S33.
- Prabhakaran M. P., Venugopal J. R. and Ramakrishna S. Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering. *Biomaterials*, 2009, 30(28): 4996-5003.
- Puetzer J. L., Petite J. N. and Lobo E. G. 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(4): 435-44.

- Quatman C. E., Hettrich C. M., Schmitt L. C. and Spindler K. P. The Clinical Utility and Diagnostic Performance of Magnetic Resonance Imaging for Identification of Early and Advanced Knee Osteoarthritis. *The American Journal of Sports Medicine*, 2011, 39(7): 1557-1568.
- Quintana L., Zur Nieden N. I. and Semino C. E. Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009, 15(1): 29-41.
- Rannou F. and Poiraudou S. Non-pharmacological approaches for the treatment of osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2010, 24(1): 93-106.
- Roach H. I., Aigner T., Soder S., Haag J. and Welkerling H. Pathobiology of Osteoarthritis: Pathomechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Current Drug Targets*, 2007, 8(2): 271-282.
- Roberts S., Menage J., Sandell L. J., Evans E. H. and Richardson J. B. Immunohistochemical study of collagen types I and II and procollagen IIA in human cartilage repair tissue following autologous chondrocyte implantation. *The Knee*, 2009, 16(5): 398-404.
- Robitzer M., David L., Rochas C., Di Renzo F. and Quignard F. Nanostructure of calcium alginate aerogels obtained from multistep solvent exchange route. *Langmuir*, 2008, 24(21): 12547-52.
- Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K. and Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis & Rheumatism*, 2005, 52(8): 2521-2529.
- Schneider A., Vodouhê C., Richert L., Francius G., Le Guen E., Schaaf P., Voegel J.-C., Frisch B. and Picart C. Multifunctional Polyelectrolyte Multilayer Films: Combining Mechanical Resistance, Biodegradability, and Bioactivity. *Biomacromolecules*, 2006, 8(1): 139-145.
- Seibel M. J., Robins S. P. and Bilezikian J. P. Dynamics of bone and cartilage metabolism, (2006): 9-13, 88-95, 417.
- Selmi T. A. S., Verdonk P., Chambat P., Dubrana F., Potel J. F., Barnouin L. and Neyret P. Autologous chondrocyte implantation in a novel alginate-agarose hydrogel: OUTCOME AT TWO YEARS. *J Bone Joint Surg Br*, 2008, 90-B(5): 597-604.
- Semenov O. V., Malek A., Bittermann A. G., Vörös J. and Zisch A. H. Engineered Polyelectrolyte Multilayer Substrates for Adhesion, Proliferation, and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*, 2009, 15(10): 2977-2990.
- Sharma B., Williams C. G., Kim T. K., Sun D., Malik A., Khan M., Leong K. and Elisseeff J. H. Designing zonal organization into tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng*, 2007, 13(2): 405-14.
- Shepherd D. E. and Seedhom B. B. Thickness of human articular cartilage in joints of the lower limb. *Ann Rheum Dis*, 1999, 58(1): 27-34.
- Shi S., Grothe S., Zhang Y., O'connor-Mccourt M. D., Poole A. R., Roughley P. J. and Mort J. S. Link Protein Has Greater Affinity for Versican than Aggrecan. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(13): 12060-12066.
- Sim W. Y., Park S. W., Park S. H., Min B. H., Park S. R. and Yang S. S. A pneumatic micro cell chip for the differentiation of human mesenchymal stem cells under mechanical stimulation. *Lab on a Chip*, 2007, 7(12): 1775-1782.
- Soga Y., Preul M. C., Furuse M., Becker T. and McDougall C. G. Calcium alginate provides a high degree of embolization in aneurysm models: a specific comparison to coil packing. *Neurosurgery*, 2004, 55(6): 1401-9; discussion 1409.
- Solheim E., Hegna J., Øyen J., Austgulen O. K., Harlem T. and Strand T. Osteochondral autografting (mosaicplasty) in articular cartilage defects in the knee: Results at 5 to 9 years. *The Knee*, 2010, 17(1): 84-87.
- Solorio L. D., Fu A. S., Hernández-Irizarry R. and Alsberg E. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cell aggregates via controlled release of TGF-beta1 from incorporated

- polymer microspheres. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009, 92A(3): 1139-1144.
- Spalazzi J. P.,Dagher E.,Doty S. B.,Guo X. E.,Rodeo S. A. and Lu H. H. In vivo evaluation of a multiphased scaffold designed for orthopaedic interface tissue engineering and soft tissue-to-bone integration. J Biomed Mater Res A, 2008, 86(1): 1-12.
- Steadman J. R.,Briggs K. K.,Rodrigo J. J.,Kocher M. S.,Gill T. J. and Rodkey W. G. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: Average 11-year follow-up. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2003, 19(5): 477-484.
- Stevens A. and Lowe J. Histologie humaine, (1997), De Boeck Université.
- Stok K. S.,Lisignoli G.,Cristino S.,Facchini A. and Muller R. Mechano-functional assessment of human mesenchymal stem cells grown in three-dimensional hyaluronan-based scaffolds for cartilage tissue engineering. J Biomed Mater Res A, 2009, 93(1): 37-45.
- Stoltz J. F.,De Isla N.,Huselstein C.,Bensoussan D.,Muller S. and Decot V. Mechanobiology and cartilage engineering: the underlying pathophysiological phenomena. Biorheology, 2006, 43(3-4): 171-80.
- Uccelli A.,Moretta L. and Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol, 2008, 8(9): 726-736.
- Vinatier C.,Mrugala D.,Jorgensen C.,Guicheux J. R. and Noël L. D. L. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. Trends in Biotechnology, 2009, 27(5): 307-314.
- Von Keudell A.,Atzwanger J.,Forstner R.,Resch H.,Hoffelner T. and Mayer M. Radiological evaluation of cartilage after microfracture treatment: A long-term follow-up study. European Journal of Radiology, 2011, in press.
- Wagner W.,Wein F.,Seckinger A.,Frankhauser M.,Wirkner U.,Krause U.,Blake J.,Schwager C.,Eckstein V.,Ansorge W. and Ho A. D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. Experimental Hematology, 2005, 33(11): 1402-1416.
- Wang H.-S.,Hung S.-C.,Peng S.-T.,Huang C.-C.,Wei H.-M.,Guo Y.-J.,Fu Y.-S.,Lai M.-C. and Chen C.-C. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. STEM CELLS, 2004, 22(7): 1330-1337.
- Wang L.,Tran I.,Seshareddy K.,Weiss M. L. and Detamore M. S. A Comparison of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells for Cartilage Tissue Engineering. Tissue Engineering Part A, 2009, 15(8): 2259-2266.
- Wang Y. (2007). Intérêt des cellules souches mésenchymateuses en ingénierie tissulaire du cartilage : effet des stimuli mécaniques et biochimiques. **PhD**.
- Wang Y.,De Isla N.,Huselstein C.,Wang B.,Netter P.,Stoltz J. F. and Muller S. Effect of alginate culture and mechanical stimulation on cartilaginous matrix synthesis of rat dedifferentiated chondrocytes. Biomed Mater Eng, 2008, 18(1 Suppl): S47-54.
- Wheater P. R.,Young B. and Heath J. W. Histologie fonctionnelle, (2004), De Boeck.
- Wieland H. A.,Michaelis M.,Kirschbaum B. J. and Rudolphi K. A. Osteoarthritis: an untreatable disease? Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(4): 331-344.
- Wong M. and Carter D. R. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. Bone, 2003, 33(1): 1-13.
- Wong M.,Siegrist M.,Wang X. and Hunziker E. Development of mechanically stable alginate/chondrocyte constructs: effects of guluronic acid content and matrix synthesis. J Orthop Res, 2001, 19(3): 493-9.
- Woodward W. A. and Tuan R. S. N-Cadherin expression and signaling in limb mesenchymal chondrogenesis: stimulation by poly-L-lysine. Dev Genet, 1999, 24(1-2): 178-87.

- Yang Q.,Peng J.,Guo Q.,Huang J.,Zhang L.,Yao J.,Yang F.,Wang S.,Xu W.,Wang A. and Lu S. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 2008, 29(15): 2378-87.
- Zhang W.,Moskowitz R. W.,Nuki G.,Abramson S.,Altman R. D.,Arden N.,Bierma-Zeinstra S.,Brandt K. D.,Croft P.,Doherty M.,Dougados M.,Hochberg M.,Hunter D. J.,Kwoh K.,Lohmander L. S. and Tugwell P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2008, 16(2): 137-162.

RESUME

Conception d'un hydrogel stratifié : application à l'ingénierie du cartilage

Le cartilage articulaire est composé de chondrocytes et d'une matrice extracellulaire organisés de manière stratifiée dans l'épaisseur du tissu. Ce tissu ne se régénère pas de manière efficace après une lésion. L'objectif de ce travail est de construire par pulvérisation des hydrogels à base d'alginate et de film multicouches de polyelectrolytes pour créer *in vitro* un néotissu pouvant combler des lésions de cartilage articulaire.

La méthode a été validée en observant une bonne viabilité et une synthèse matricielle par les cellules, et de meilleures propriétés mécaniques des hydrogels pulvérisés à 0,9 bar par rapport au moulage. Après la pulvérisation de cellules souches mésenchymateuses, les résultats ont montré une bonne viabilité et une différenciation des cellules. Puis, des hydrogels bistratifiés ont été construits et cultivés jusqu'à 56 jours sans dissociation des couches et sans migration des cellules. Enfin, les hydrogels ont été fonctionnalisés en modifiant la composition des couches et en y appliquant des stimulations mécaniques. Les propriétés mécaniques des hydrogels varient en fonction de leur composition et sont meilleures pour ceux stratifiés. De plus, leur stimulation mécanique a permis de potentialiser l'effet du biomatériau sur la différenciation des cellules.

En conclusion, cette étude montre que des cellules souches mésenchymateuses ensemencées dans un hydrogel bistratifié pulvérisé sont fonctionnelles en termes de différenciation chondrocytaire et de synthèse matricielle. Les propriétés mécaniques des hydrogels stratifiés ne sont pas altérées. De plus, la stimulation mécanique a potentialisé la différenciation des cellules.

Mots-clefs : Biomaterériau, pulvérisation, comportement mécanique, cellules souches mésenchymateuses, stimulations mécaniques.

ABSTRACT

Conception of a stratified scaffold: application for cartilage engineering

The articular cartilage is composed of chondrocytes and of a specific extracellular matrix which are organized depth-dependently. The tissue did not have an efficient self-renewal of defects. The purpose of this study is to build up layer-by-layer a stratified hydrogel by alternating gels and multilayers polyelectrolytes film spraying, in order to obtain a neotissu *in vitro* to fill lesions.

First, the process was validated by observing a good cells viability and matrix synthesis, and stronger mechanical behaviors of sprayed hydrogels compared to molded one. Secondly, after their spraying, mesenchymal stem cells still have a good viability and their differentiation potential. Then, bistratified scaffolds were built up and cultured up to 56 days without layers dissociation and without cells migration between layers. Finally, scaffolds were functionalized by changing biomaterial composition and by applying mechanicals stimulations. Results show us not only that the composition influences the mechanical behavior of the hydrogel, but that the stratification did not affect it. Furthermore, mechanicals stimulations improve stem cells differentiation in function of biomaterials compositions.

In conclusion, this study proves not only that we are able to build up stratified scaffold seeded with mesenchymal stem cells which still have their differentiation capability and synthesize matrix, but that mechanical behaviors are improved after the biomaterial spraying and not alter by the stratification. Moreover, mechanical stimulation applied to the scaffold improves the differentiation of mesenchymal stem cells to a chondrogenic phenotype.

Keywords: Biomaterial, spraying, mechanical behavior, mesenchymal stem cells, mechanical stimulation.