

## La thérapie cellulaire du cartilage : bases cellulaires et moléculaires

Marie-Thérèse Corvol<sup>1</sup>, Khadija Tahiri<sup>1</sup>, Alexandra Montebault<sup>2</sup>, Alain Daumard<sup>2</sup>, Jean-François Savouret<sup>1</sup> et François Rannou<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR-S747-Inserm-Université Paris Descartes, Signalisation et Pharmacologie du cartilage, UFR Biomédicale, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

<sup>2</sup> CNRS UMR 5627- Université Lyon 1, Matériaux Polymères et Biomatériaux, ISTIL, Domaine scientifique de la Doua, 15 boulevard A. Latarget, 69622 Villeurbanne Cedex, France

Auteur correspondant : Marie-Thérèse Corvol, [maite.corvol@univ-paris5.fr](mailto:maite.corvol@univ-paris5.fr)

Reçu le 8 juin 2008

**Résumé** – L'augmentation de l'espérance de vie rend très urgente la mise au point de techniques de réparation des tissus lésés. Le cartilage articulaire est résistant, élastique et dure toute la vie. Il permet les mouvements des articulations et protège l'os sous-jacent contre les agressions mécaniques et traumatiques. Mais lorsqu'il est lésé, le cartilage ne se répare pas spontanément. Aucun traitement médicamenteux n'étant efficace à ce jour, il paraît licite d'agir précocement sur les lésions traumatiques du cartilage de façon à prévenir l'arthrose et reculer d'autant l'heure de la chirurgie prothétique. La thérapie cellulaire pourrait être une voie de prévention de la survenue de l'arthrose. Le cartilage ne contient qu'un seul type cellulaire, le chondrocyte qui synthétise et sécrète une abondante matrice protéique. Cette dernière assure le maintien des fonctions mécaniques du cartilage. Le concept de thérapie cellulaire consiste à combler la lésion cartilagineuse non seulement avec des chondrocytes sains, mais aussi à reconstituer la structure et les propriétés physico-chimiques de la matrice. La greffe de chondrocytes autologues est à la base de ce concept. Les recherches actuelles portent sur l'utilisation de cellules souches ou progénitrices, associées à un biomatériau « intelligent » permettant le maintien du caractère chondrogénique des cellules, l'introduction du greffon dans la lésion articulaire par des méthodes peu invasives et l'acquisition de propriétés mécaniques proches de celle du cartilage natif.

**Mots clés** : Cartilage / chondrocytes / biomatériaux / chitosan / cellules souches

**Abstract** – Cell therapy in cartilage repair: cellular and molecular bases.

The destruction of articular cartilage represents the outcome of most inflammatory and degenerative rheumatic diseases and leads to severe disability. Articular cartilage being unable to repair spontaneously, alterations of the joint surface often results in end-stage osteoarthritis, requiring surgical intervention and total joint replacement. This makes damaged tissues repair a major challenge in our aging society. Cartilage harbors only one cell type, the chondrocyte, which synthesizes and secretes specific matrix proteins such as type II collagen and high molecular weight proteoglycans. Matrix proteins are responsible for the conservation of the chondrocyte phenotype and the maintenance of the mechanical functions of cartilage. Development of therapeutic strategies for cartilage repair should thus comprise not only the replacement of lost cartilage cells but also that of extracellular matrix with cartilage-like properties. Different protocols are under investigation. The most commonly employed materials include transplantation of autologous osteochondral tissue. More recently, cell-based therapies using autologous mature chondrocytes or pre-chondrogenic stem cells have drawn particular attention. Tissue-engineering procedures represent the actual trend in cartilage repair. This approach combines biodegradable polymeric three-dimensional

**matrixes and isolated prechondrogenic stem cells. The cells are seeded within the biocompatible matrix and then implanted into the joint. Numerous non-degradable and degradable polymers, which efficiently “mimic” the natural surroundings of cartilage cells, are currently under investigation.**

**Key words:** Cartilage / chondrocytes / biomaterials / chitosan / stem cells

## 1 Introduction

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif avasculaire et non innervé recouvrant les épiphyses osseuses. Il est résistant, élastique et dure toute la vie. Il permet les mouvements des articulations et protège l'os sous-jacent contre les agressions mécaniques et traumatiques. Amortissant les contraintes physiques auxquelles sont soumises les articulations, le cartilage joue un rôle majeur dans la protection de ces dernières. Mais lorsqu'il est lésé le cartilage ne se répare pas spontanément. La prothèse reste le seul traitement efficace.

En dehors des pathologies inflammatoires où le rôle de la synovite semble prépondérant dans la genèse des lésions cartilagineuses (polyarthrites), la détérioration du cartilage articulaire peut résulter soit d'une destruction post-traumatique (ostéochondrite disséquante, jeunes sportifs), soit d'une dégénérescence progressive entraînant des lésions plus étendues (vieillesse, arthrose). Au décours d'un traumatisme articulaire, une arthrose se développe en moyenne en 10 ans. La prévalence de la gonarthrose symptomatique est de 7 % dans les tranches d'âge 65-70 ans et de 11,2 % après 80 ans, et encore plus élevée en ce qui concerne la gonarthrose radiologique (proche de 25 % au delà de 65 ans chez les femmes). Aucun traitement médicamenteux n'étant efficace à ce jour, il paraît licite d'agir précocement sur les lésions traumatiques du cartilage de façon à prévenir l'arthrose et reculer d'autant l'heure de la chirurgie prothétique.

Dans les conditions actuelles de nos connaissances, c'est dans le cadre de la **prévention de la survenue de l'arthrose que se situe la thérapie cellulaire du cartilage**, et non dans le traitement des lésions arthrosiques (Chevalier, 2000).

### *Le cartilage lésé ne se répare pas spontanément*

Le chondrocyte est l'unique type cellulaire du cartilage et assure la synthèse de la matrice extracellulaire qui l'entoure. C'est de la composition biochimique et de l'arrangement tri-dimensionnel de cette matrice que dépendent les propriétés fonctionnelles du cartilage articulaire (Hunziker *et al.*, 2002). La matrice extracellulaire du cartilage se compose de 70 %

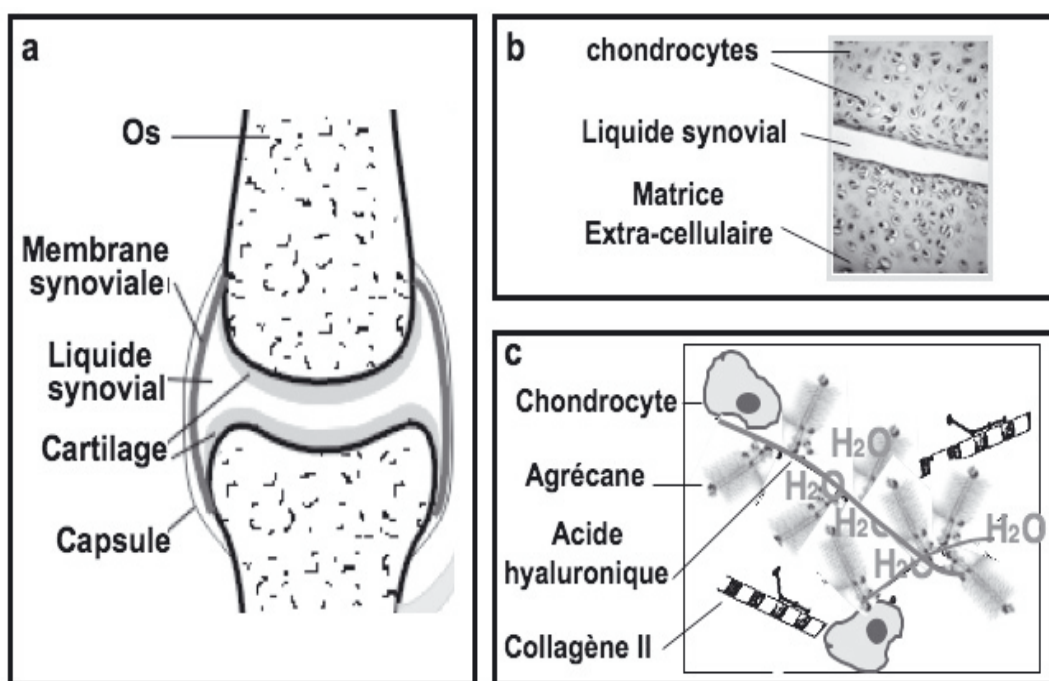
d'eau et d'un réseau très complexe de macromolécules protéiques, essentiellement constituées de collagènes (dont 95 % de type II) et de protéoglycanes (dont 90 % d'agrécans). Les protéoglycanes, de par la présence de glycosaminoglycanes chargés négativement, attirent les molécules d'H<sub>2</sub>O, et créent une pression osmotique importante qui assure l'hydratation du cartilage et met en tension le réseau collagénique (Figure 1). Enfin, la matrice contient toutes les enzymes protéolytiques permettant la dégradation de la matrice au cours de son renouvellement (métalloprotéinases matricielles et agrécanses) et de nombreux facteurs de croissance et cytokines produits par les chondrocytes et/ou provenant d'autres cellules (synoviocytes). Dans les conditions normales, le renouvellement matriciel est constant mais extrêmement lent, avec une demi-vie de 1000 jours pour les protéoglycanes et de 200 ans pour le collagène de type II. Toute atteinte qualitative et/ou quantitative à l'intégrité de la structure du réseau matriciel cartilagineux entraîne une modification du phénotype des chondrocytes qui se différencient. Ces cellules synthétisent alors du collagène de type I au lieu du type II, et des protéoglycanes différents, versicanes au lieu d'agrécans. L'ensemble aboutit à un fibro-cartilage qui ne possède plus les capacités de résistance du cartilage originel et avec le temps tend à se dégrader de façon irréversible. Les os frottent ainsi directement les uns contre les autres entraînant douleurs et mobilité réduite.

Le but de ce manuscrit est de passer en revue un certain nombre de « concepts » correspondant à différentes étapes stratégiques de recherche dans la thérapie cellulaire du cartilage.

### *Remplacement des chondrocytes lésés par des chondrocytes sains : greffe de chondrocytes autologues*

Les zones de cartilage lésé étant dépourvues de chondrocytes, le concept est d'introduire dans la lésion des chondrocytes sains du patient, en espérant que ces cellules produiront les protéines matricielles nécessaires à la formation d'un néo-cartilage. C'est la greffe de chondrocytes autologues inaugurée en Suède par Brittberg et collaborateurs (Brittberg *et al.*, 1994).

Le principe consiste à prélever un fragment de cartilage sain (200 mg à 400 mg) sous arthroscopie dans



**Fig. 1. Articulation normale et structure du cartilage articulaire.** (a) L'articulation entre deux os longs est une cavité fermée, formée par le cartilage articulaire qui recouvre chaque extrémité des os et latéralement par le tissu synovial. Le cartilage articulaire assure le jeu et la mobilité de l'articulation et empêche, avec le liquide synovial, le frottement des surfaces osseuses. (b) Le chondrocyte est l'unique type cellulaire du cartilage et assure la synthèse de la matrice extracellulaire qui l'entoure. La disposition des chondrocytes dans ce type de cartilage est particulière. Les cellules superficielles sont aplaties et parallèles à la surface articulaire; les cellules profondes sont plus arrondies et prennent une disposition en colonnes perpendiculaires à la surface articulaire. Les chondrocytes se nourrissent essentiellement à partir du liquide synovial, et, pour une part, grâce à des échanges avec l'os sous-chondral. (c) C'est de la composition biochimique et de l'arrangement tri-dimensionnel de la matrice que dépendent les propriétés fonctionnelles du cartilage articulaire. La matrice extracellulaire du cartilage est constituée d'un réseau très complexe de macromolécules protéiques, essentiellement constituées de collagènes (dont 95 % de type II) et de protéoglycanes (dont 90 % d'agrécane) associés à l'acide hyaluronique. Les agrécanes sont porteurs de glycosaminoglycanes sulfatés (chondroïtine-sulfate et kératane-sulfate) riches en radicaux acides chargés négativement très hydrophiles. Ils retiennent l'eau et créent une pression osmotique importante qui assure l'hydratation du cartilage et met en tension le réseau collagénique.

une zone non portante. Ces fragments de cartilage sont transférés dans un laboratoire de culture cellulaire ayant tous les agréments pour manipuler des cellules humaines à des fins de transplantation. Les chondrocytes sont amplifiés *in vitro*. Le nombre de cellules à obtenir est variable suivant les laboratoires et varie de 3 à 30 millions. Le culot cellulaire est ensuite remis au chirurgien qui, sous anesthésie générale et arthrotomie, injecte les chondrocytes dans la lésion, sous couvert d'un lambeau périosté qui a été préalablement suturé sur les berges de la lésion et étanchéifié.

Plus de 15 ans après son initiation, cette technique n'a pas démontré son efficacité par comparaison avec les techniques chirurgicales classiques. Une étude randomisée compare la greffe de chondrocytes aux microfractures : aucune différence entre les deux groupes n'est observée tant sur le plan clinique, arthroscopique

qu'au niveau de la biopsie (Knutsen *et al.*, 2007). C'est d'ailleurs l'une des raisons qui ont amené la Haute Autorité de Santé à ne pas encore autoriser cette technique en France.

Toutefois, les tentatives de greffe de chondrocytes autologues ont permis de mettre à jour plusieurs questions cruciales auxquelles les travaux récents essaient d'apporter des réponses : faible nombre et faible potentialité de multiplication des chondrocytes sains disponibles chez l'adulte ; dédifférenciation des chondrocytes après amplification ; absence d'accumulation de matrice extra-cellulaire autour des chondrocytes et par voie de conséquence, accélération de la dé-différenciation cellulaire ; durée de vie limitée des chondrocytes greffés ; accélération de la maturation cellulaire des chondrocytes vers la différenciation terminale ; absence de contrôle de la répartition des

cellules dans la lésion; non restitution de l'os sous chondral pouvant être un facteur fragilisant le greffon; fibrose ou détachement du lambeau périosté...

#### *Utilisation de chondroprécurseurs : recherche de cellules souches pluripotentes*

Les chondrocytes sains chez l'adulte sont en nombre limité, ces cellules ont un degré de maturation cellulaire élevé, et leur potentiel de prolifération est restreint. Une alternative intéressante serait d'utiliser des cellules souches ou progénitrices (Krampera *et al.*, 2006; Luyten *et al.*, 2001).

Le terme de « cellule souche » est utilisé pour désigner une cellule qui est capable de se multiplier, avec une haute capacité de prolifération. Cette cellule n'exprime aucune spécialisation tissulaire mais, lorsqu'elle est placée dans un environnement approprié, elle est capable de produire des cellules spécialisées qui acquièrent une morphologie et une fonction spécifiques du tissu envisagé (Donovan & Gearhart, 2001).

La première question posée est celle de **la source de cellules souches**. À côté de l'ovule fécondé, seule cellule souche totipotente capable de donner naissance à un individu entier, les premières cellules souches caractérisées ont été les cellules germinales et les cellules embryonnaires du blastocyste (cellules ES pour *Embryonic Stem cells*) (Donovan & Gearhart, 2001). Les seules sources envisageables pour la médecine régénérative seraient d'utiliser les dérivés des embryons fécondés *in vitro* (embryons surnuméraires de FIV) ou des embryons fécondés par transfert nucléaire à partir d'un noyau de cellule somatique adulte transféré dans un ovule énucléé (Wilmut *et al.*, 1997). Les recherches dans ce domaine ont été très limitées en France compte tenu de la loi de bioéthique de 2004 qui s'oppose à toute recherche sur l'embryon humain sauf exceptions bien définies. Toutefois la mise en évidence de cellules souches multipotentes dans le sang du cordon, et dans presque tous les tissus de l'adulte (Ringe *et al.*, 2002), a ouvert de nouvelles perspectives. Très récemment, Takahashi *et al.* (2007) de l'Université de Kyoto, Japon, et Yu *et al.* (2007) de l'Université de Wisconsin, USA, sont parvenus pour la première fois à « reprogrammer » des cellules adultes humaines en cellules possédant des propriétés similaires à celles des cellules souches embryonnaires. Des cellules adultes, issues de la peau, ont été transfectées avec quatre gènes qui, chez la souris, ne s'expriment normalement qu'au stade embryonnaire. Ces cellules, dites « pluripotentes induites », ont ensuite été orientées *in vitro* vers différents types cellulaires, parmi lesquels le cartilage. Ces résultats vont sans aucun doute accélérer la recherche vers la thérapie cellulaire. Toutefois, on ne

sait pas comment évolueront ces cellules modifiées génétiquement. Parmi les « gènes reprogrammeurs » certains sont cancérigènes et les virus utilisés pour insérer ces gènes dans le génome de la cellule adulte représentent également un risque de cancers. La sécurisation et la reproductibilité du processus de dédifférenciation sont loin d'être maîtrisées.

Dans le domaine ostéoarticulaire, l'utilisation de la moelle osseuse comme source de cellules à potentialité ostéo-chondro-génique est suggérée dès 1968 par Friedenstein (Friedenstein *et al.*, 1968). Trente années plus tard, la pluralité de différenciation des cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse en lignages ostéoblastiques, adipocytaires et chondrocytaires est caractérisée par des marqueurs moléculaires spécifiques (Pittenger *et al.*, 1999). De nombreux travaux ont depuis confirmé cette multipotentialité (Bosnakovski *et al.*, 2006; Dennis *et al.*, 1999; Van Damme *et al.*, 2002). De plus, d'autres tissus sont sources de précurseurs chondrogéniques, comme le tissu adipeux (Zuk *et al.*, 2002), l'os trabéculaire (Noth *et al.*, 2002), et le tissu synovial (De Bari *et al.*, 2001), le périoste (De Bari *et al.*, 2006), et le cartilage articulaire lui-même (Dowthwaite *et al.*, 2004).

La deuxième question porte sur le **potentiel chondrogénique** des cellules souches qui est très variable suivant le tissu d'où elles proviennent. Ainsi, les cellules souches de moelle osseuse se différencient volontiers en cellules cartilagineuses, alors que cette même évolution ne s'opère que dans 10 % des cas pour les cellules souches isolées à partir de tissu adipeux (Im *et al.*, 2005). Et la potentialité de lignage chondrogénique est plus élevée dans les cellules souches de périoste que de moelle osseuse (Djouad *et al.*, 2005). De plus les profils d'expression des facteurs de transcription sont différents dans les cellules souches qui proviennent de moelle osseuse ou de périoste.

Quelle que soit la source de cellules souches, les conditions nécessaires à l'induction chondrogénique sont loin d'être définies de façon reproductible. La connaissance des événements moléculaires séquentiels qui contrôlent la chondrogenèse au cours du développement embryonnaire est une aide précieuse dans ce domaine. La mise en évidence de SOX 9 comme facteur de transcription principal du collagène de type II (Akiyama *et al.*, 2002; Bi *et al.*, 1999; Lefebvre *et al.*, 1997), marqueur chondrogénique majeur, a été une étape importante. Toutefois, la bi-potentialité ostéo-chondrogénique de cellules souches exprimant SOX9 oriente les recherches vers d'autres facteurs de régulations, tel le facteur Dickkopf1 (Diarra *et al.*, 2007). De nouvelles voies de signalisation connues pour contrôler la différenciation cellulaire de plusieurs tissus, comme la voie Notch (Fiuza & Arias, 2007; Fujimaki *et al.*, 2006; Wilson & Radtke, 2006) ou la voie Wnt (Akiyama *et al.*, 2004; Church

& Francis-West, 2002; Enomoto-Iwamoto *et al.*, 2002; Tamamura *et al.*, 2005), semblent impliquées dans le processus de différenciation chondrogénique. Le récepteur Notch pourrait être un marqueur de cellules souches présentes à la surface du cartilage articulaire (Dowthwaite *et al.*, 2004). La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ caténine s'avère discriminatoire entre les lignages ostéogénique (Wnt / $\beta$ caténine positive) et chondrogénique (Wnt/ $\beta$ caténine négative), ce qui oriente les recherches vers les facteurs qui contrôlent cette voie.

### Rôle d'un support tridimensionnel

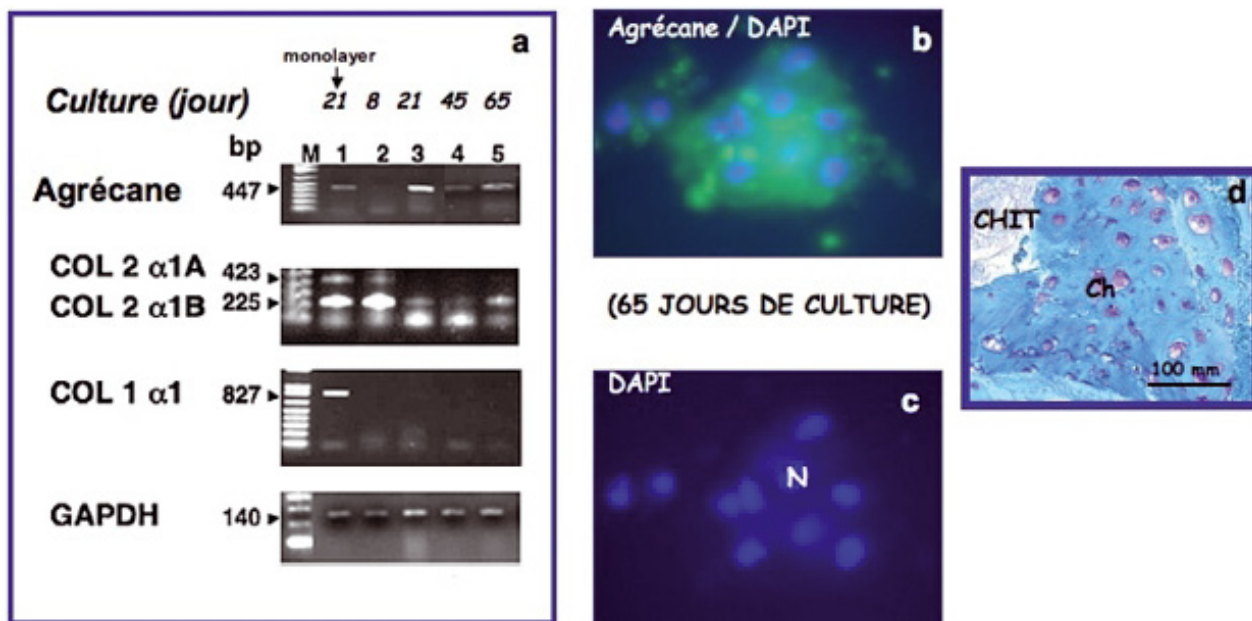
Une autre question concerne les **conditions environnementales** requises pour induire de façon reproductible la voie chondrogénique. Il s'agit ici des contacts cellule-cellule et cellule-matrice qui jouent un rôle majeur dans la différenciation chondrogénique *in vivo* et *in vitro*. Au cours du développement embryonnaire le processus de chondrogenèse est précédé d'un phénomène d'agrégation cellulaire suggérant l'existence de signaux moléculaires intercellulaires. À l'âge adulte la destruction partielle de la matrice protéique extra-cellulaire s'accompagne de la dédifférenciation des chondrocytes. Le rôle essentiel joué par la structure tri-dimensionnelle de la matrice dans le maintien du phénotype chondrocytaire a été montré *in vitro* il y a plus de deux décennies (Benya, 1982; Benya & Shaffer 1982). Les chondrocytes en culture monocouche se dédifférencient, mais réexpriment les marqueurs chondrogéniques (COL II et agrécanes) lorsqu'ils sont transférés dans une matrice d'alginate. Ces données ont été reproduites en utilisant différents types de matrices biocompatibles et biodégradables. On peut citer des polymères synthétiques de type polyesters, acide polylactique ou polyglycolique (Bryant & Anseth, 2002; Temenoff & Mikos, 2000), des polymères naturels comme l'alginate (Lindenhayn *et al.*, 1999), le chitosane (Donati *et al.*, 2005; Montembault *et al.*, 2006), l'agarose (Quinn *et al.*, 2002), le collagène actuellement utilisé sous forme de membrane (Ebert *et al.*, 2008; Kawamura *et al.*, 1998), l'acide hyaluronique seul ou mélangé à de la fibrine (Dausse *et al.*, 2003; Grigolo *et al.*, 2001). Les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels le contact cellule-matrice permet aux cellules de retrouver leur phénotype font l'objet de nombreux travaux et font intervenir plusieurs concepts : simple support, molécules mimétiques ou leurre biologique ?

Le concept de départ est d'utiliser un biomatériau comme simple support permettant aux protéines matricielles néosynthétisées par les chondrocytes de rester dans l'environnement cellulaire. Le biomatériau pourrait en fait jouer un rôle plus complexe, comme

le suggère l'utilisation de polymères présents dans le cartilage comme l'acide hyaluronique ou des chaînes de chondroïtine sulfate (Tahiri *et al.*, 2008). Des polymères naturels, comme par exemple le chitosan, famille de glycosaminoglycane composés de chaînes (1-4)-2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucan (GlcN) et (1-4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucan (GlcNAc) ont des effets similaires (Figure 2). Lorsque des chondrocytes humains sont mélangés *in vitro* avec un broyat d'hydrogel de chitosane déacétylé, ils s'attachent aux fragments d'hydrogel sans les pénétrer. Les agrécanes néosynthétisés par les cellules s'accumulent dans un premier temps aux points de contact entre cellules et biomatériau, puis s'étendent au pourtour des cellules pour réaliser de véritables greffons de néo-cartilage (Figure 2) (Montembault *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont été obtenus avec des chondrocytes de porc et un hydrogel de lactose-chitosane (Donati *et al.*, 2005) ou un mélange de chondrocytes de lapin et un biomatériau hybride acide hyaluronique-chitosane (Yamane *et al.*, 2005). Un certain nombre d'arguments expérimentaux suggèrent que ces polymères miment la présence d'une matrice protéique cartilagineuse et activent des mécanorécepteurs spécifiques (intégrines) susceptibles d'induire l'expression des gènes « chondrogéniques » par des voies de signalisation propres (figure 3). Le biomatériau n'est plus un simple support mais devient un « leurre biologique » (Montembault *et al.*, 2006).

### Propriétés architecturales d'un greffon néo-cartilagineux

Le dernier point à régler concerne la nécessité pour le greffon de reproduire au mieux un néo-tissu cartilagineux, ayant des **propriétés de résistance mécanique** proches de celles du cartilage adulte (Hunziker *et al.*, 2002; Sandell & Aigner, 2001). La fonction mécanique du cartilage est essentiellement liée à la présence des protéines matricielles (fibrilles de collagène et agrécanes) accumulées autour des chondrocytes suivant une architecture bien définie, en grande partie liée au gradient de maturation cellulaire des chondrocytes. De la superficie vers la profondeur, les chondrocytes sont successivement isolés sous forme quiescente, puis en clusters de deux à 5 cellules parallèles les uns aux autres. Ce gradient rappelle la structure en colonnes du cartilage de croissance. Toutefois, dans le cartilage articulaire normal, le processus de maturation cellulaire s'arrête au stade préhypertrophique. Les chondrocytes ne se dirigent que très lentement vers le processus de différenciation terminale et la mort par apoptose qui caractérisent les chondrocytes de croissance pendant le processus d'ossification endo-chondrale. L'avantage d'utiliser des cellules chondrogéniques jeunes, obtenues à



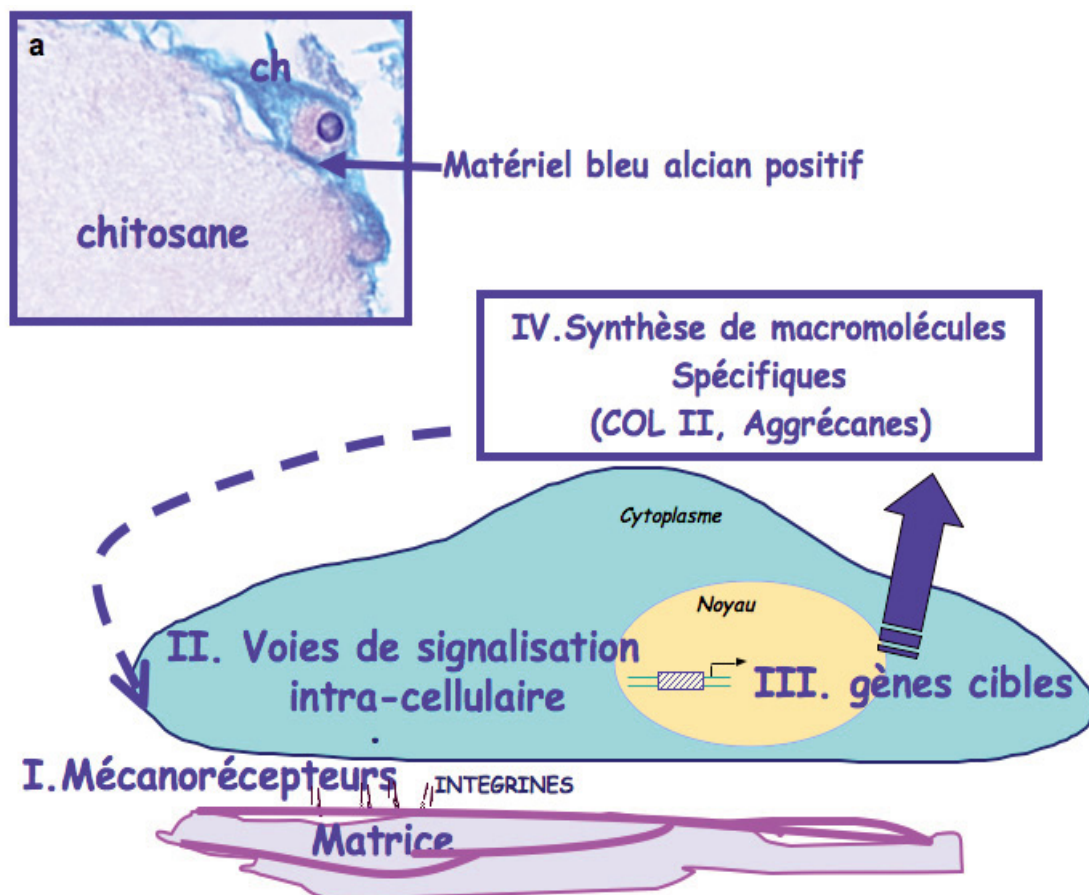
**Fig. 2. Exemple de redifférenciation de chondrocytes humains mis au contact de fragments d'hydrogel de chitosane.** Des chondrocytes ont été prélevés sur une tête fémorale d'un sujet de 65 ans, non arthrosique, victime d'une fracture du col. Les chondrocytes sont mis en culture primaire et amplifiés pendant 21 jours. Une partie de ces cellules est mélangée *in vitro* avec un broyat d'hydrogel de chitosane et mis en culture sous forme d'agrégats cellules/chitosane. A différents temps de culture les ARN totaux sont extraits et l'expression des ARNm de marqueurs chondrocytaires est analysée par RT-PCR (a) : Les chondrocytes en culture primaire se sont en partie différenciés comme le montre l'expression des ARNm de Col1 $\alpha$ 1 et la présence de COL2  $\alpha$ 1A immature (a, colonne 1). En revanche, lorsque les cellules sont en contact prolongé avec le chitosane, pendant 21, 45 ou 65 jours (Colonnes 3, 4 et 5 respectivement) les ARNm de Col1 $\alpha$ 1 ne sont plus exprimés et seul les transcrits de COL2 $\alpha$ 1B mature sont observés. M : marqueurs de taille. A 65 jours les cellules ont synthétisé des agrécane comme le montre l'analyse par immunocytochimie des greffons (b et c). L'accumulation des agrécane autour des cellules est mise en évidence par coloration au bleu alcian sur coupe histologique d'un greffon (d). CHIT = Ch = Chondrocytes.

partir de cellules souches, peut donc devenir un handicap si ces cellules, une fois introduites dans la lésion, poursuivent leur processus de maturation vers la différenciation terminale, comme le montrent certaines observations (Kafienah *et al.*, 2007; Peltari *et al.*, 2006).

Il est donc impératif d'éviter la progression des néo-chondrocytes vers la différenciation terminale. Les étapes successives de la maturation cellulaire du cartilage de croissance sont contrôlées de façon très complexe par des facteurs de croissance et des morphogènes comme FGFs, PTHrP, IHH, BMPs et leurs récepteurs (FGF3-R, PTHrP-R, Patched) (revue dans Kobayashi & Kronenberg, 2005). En revanche, les facteurs qui inhibent la différenciation terminale des chondrocytes articulaires ne sont pas connus (Pacifi *et al.*, 2000; Zuscik *et al.*, 2004). Des données très récentes montrent que les facteurs morphogènes qui contrôlent la maturation du cartilage de croissance sont aussi exprimés dans le

cartilage adulte normal et pathologique et dans l'os sous-chondral (Gomez-Barrena *et al.*, 2004; Huch *et al.*, 2003; Terkeltaub *et al.*, 1998). Des essais d'inhibition du processus de différenciation terminale sur des cellules préchondrogéniques sont en cours (Kafienah *et al.*, 2007).

**En conclusion,** la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire ouvrent des perspectives intéressantes pour traiter les lésions du cartilage, mais un certain nombre de problèmes restent à résoudre : hétérogénéité des cellules souches, choix d'une matrice appropriée, difficulté pour maîtriser le processus de différenciation et de maturation des cellules chondrogéniques, multiplication excessive et perte des moyens de contrôle... La caractérisation des propriétés mécaniques du greffon, sa standardisation et sa reproductibilité seront les étapes ultimes à maîtriser avant que cette thérapie soit applicable au traitement des lésions du cartilage chez l'homme.



**Fig. 3. Mécano-transduction matrice/cellule : une voie possible de redifférenciation chondrocytaire.** Les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels le contact cellule-matrice permet aux cellules de retrouver leur phénotype ne sont pas encore connus. Nous avons observé que les cellules, mises en contact avec les fragments de chitosane, s'attachent à ces fragments sans les pénétrer (encart a). Les agrécanes néosynthésés par les cellules s'accumulent dans un premier temps aux points de contact entre cellules et biomatériau, avant de s'étendre au pourtour des cellules pour réaliser de véritables greffons de néo-cartilage (voir figure 2). Un certain nombre d'arguments expérimentaux suggèrent que ces polymères miment la présence d'une matrice protéique cartilagineuse et activent des mécanorécepteurs spécifiques (intégrines) susceptibles d'induire l'expression des gènes « chondrogéniques » par des voies de signalisation propres. Le biomatériau n'est plus un simple support mais devient un « leurre biologique ».

## Références

- Akiyama H., Chaboissier M.C., Martin J.F., Schedl A. & de Crombrugge, B., The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev*, 2002, 16, 2813–2828.
- Akiyama H., Lyons J.P., Mori-Akiyama Y., Yang X., Zhang R., Zhang Z., Deng J.M., Taketo M.M., Nakamura T., Behringer R.R., McCrea P.D. & de Crombrugge B., Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev*, 2004, 18, 1072–1087.
- Benya P.D. & Shaffer J.D., Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 1982, 30, 215–224.
- Bi W., Deng J.M., Zhang Z., Behringer R.R. & de Crombrugge B., Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet*, 1999, 22, 85–89.
- Bosnakovski D., Mizuno M., Kim G., Takagi S., Okumura M. & Fujinaga T., Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels : influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93, 1152–1163.
- Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O. & Peterson L., Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 1994, 331, 889–895.
- Bryant S.J. & Anseth K.S., Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in polyethylene glycol hydrogels. *J Biomed Mater Res*,

- 2002, 59, 63–72.
- Chevalier X., Autologous chondrocyte implantation for cartilage defects : development and applicability to osteoarthritis. *Joint Bone Spine*, 2000, 67, 572–578.
- Church V.L. & Francis-West P., Wnt signalling during limb development. *Int J Dev Biol*, 2002, 46, 927–936.
- Dausse Y., Grossin L., Miralles G., Pelletier S., Mainard D., Hubert P., Baptiste D., Gillet P., Dellacherie E., Netter P. & Payan E., Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials : macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003, 11, 16–28.
- De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P. & Luyten F.P., Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*, 2001, 44, 1928–1942.
- De Bari C., Dell'Accio F., Vanlauwe J., Eyckmans J., Khan I.M., Archer C.W., Jones E.A., McGonagle D., Mitsiadis T.A., Pitzalis C. & Luyten F.P., Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum*, 2006, 54, 1209–1221.
- Dennis J.E., Merriam A., Awadallah A., Yoo J.U., Johnstone B. & Caplan A.I., A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res*, 1999, 14, 700–709.
- Diarra D., Stolina M., Polzer K., Zwerina J., Ominsky M.S., Dwyer D., Korb A., Smolen J., Hoffmann M., Scheinecker C., van der Heide D., Landewe R., Lacey D., Richards W.G. & Schett G., Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med*, 2007, 13, 156–163.
- Djouad F., Bony C., Haupl T., Uze G., Lahlou N., Louis-Plence P., Apparailly F., Canovas F., Reme T., Sany J., Jorgensen C. & Noel D., Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7, R1304–1315.
- Donati I., Stredanska S., Silvestrini G., Vetere A., Marcon P., Marsich E., Mozetic P., Gamini A., Paoletti S. & Vittur F., The aggregation of pig articular chondrocyte and synthesis of extracellular matrix by a lactose-modified chitosan. *Biomaterials*, 2005, 26, 987–998.
- Donovan P.J. & Gearhart J., The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, 2001, 414, 92–97.
- Dowthwaite G.P., Bishop J.C., Redman S.N., Khan I.M., Rooney P., Evans D.J., Houghton L., Bayram Z., Boyer S., Thomson B., Wolfe M.S. & Archer C.W., The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci*, 2004, 117, 889–897.
- Ebert J.R., Robertson W.B., Lloyd D.G., Zheng M.H., Wood D.J. & Ackland T., Traditional vs accelerated approaches to post-operative rehabilitation following matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI) : comparison of clinical, biomechanical and radiographic outcomes. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, in press.
- Enomoto-Iwamoto M., Kitagaki J., Koyama E., Tamamura Y., Wu C., Kanatani N., Koike T., Okada H., Komori T., Yoneda T., Church V., Francis-West P.H., Kurisu K., Nohno T., Pacifici M. & Iwamoto M., The Wnt antagonist Frzb-1 regulates chondrocyte maturation and long bone development during limb skeletogenesis. *Dev Biol*, 2002, 251, 142–156.
- Fiuzza U.M. & Arias A.M., Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol*, 2007, 194, 459–474.
- Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I. & Frolova G.P., Heterotopic transplants of bone marrow. *Transplantation*, 1968, 6, 230–247.
- Fujimaki R., Toyama Y., Hozumi N. & Tezuka K., Involvement of Notch signaling in initiation of prechondrogenic condensation and nodule formation in limb bud micromass cultures. *J Bone Miner Metab*, 2006, 24, 191–198.
- Gomez-Barrena E., Sanchez-Pernaute O., Largo R., Calvo E., Esbrit P. & Herrero-Beaumont G., Sequential changes of parathyroid hormone related protein (PTHrP) in articular cartilage during progression of inflammatory and degenerative arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63, 917–922.
- Grigolo B., Roseti L., Fiorini M., Fini M., Giavaresi G., Aldini N.N., Giardino R. & Facchini A., Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (hyaff-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials*, 2001, 22, 2417–2424.
- Huch K., Kleffner S., Stove J., Puhl W., Gunther K.P. & Brenner R.E., PTHrP, PTHr, and FGFR3 are involved in the process of endochondral ossification in human osteophytes. *Histochem Cell Biol*, 2003, 119, 281–287.
- Hunziker E.B., Quinn T.M. & Hauselmann H.J., Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002, 10, 564–572.
- Im G.I., Shin Y.W. & Lee K.B., Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*, 2005, 13, 845–853.
- Kafenah W., Mistry S., Dickinson S.C., Sims T.J., Learmonth I. & Hollander A.P., Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum*, 2007, 56, 177–187.
- Kawamura S., Wakitani S., Kimura T., Maeda A., Caplan A.I., Shino K. & Ochi T., Articular cartilage repair. Rabbit experiments with a collagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it. *Acta Orthop Scand*, 1998, 69, 56–62.
- Knutsen G., Drogset J.O., Engebretsen L., Grontvedt T., Isaksen V., Ludvigsen T.C., Roberts S., Solheim E., Strand T. & Johansen O., A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am*, 2007, 89, 2105–2112.
- Kobayashi T. & Kronenberg H., Minireview : transcriptional regulation in development of bone. *Endocrinology*, 2005, 146, 1012–1017.



- Krampera M., Pizzolo G., Aprili G. & Franchini M., Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*, 2006, 39, 678–683.
- Lefebvre V., Huang W., Harley V.R., Goodfellow P.N. & de Crombrughe B., SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol*, 1997, 17, 2336–2346.
- Lindenhayn K., Perka C., Spitzer R., Heilmann H., Pommerening K., Mennicke J. & Sittinger M., Retention of hyaluronic acid in alginate beads : aspects for in vitro cartilage engineering. *J Biomed Mater Res*, 1999, 44, 149–155.
- Luyten F.P., Dell'Accio F. & De Bari C., Skeletal tissue engineering : opportunities and challenges. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2001, 15, 759–769.
- Montebault A., Tahiri K., Korwin-Zmijowska C., Chevalier X., Corvol M.T. & Domard A., A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels : application to cartilage tissue engineering. *Biochimie*, 2006, 88, 551–564.
- Noth U., Osyczka A.M., Tuli R., Hickok N.J., Danielson K.G. & Tuan R.S., Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res*, 2002, 20, 1060–1069.
- Pacifici M., Koyama E., Iwamoto M. & Gentili C., Development of articular cartilage : what do we know about it and how may it occur? *Connect Tissue Res*, 2000, 41, 175–184.
- Pelttari K., Winter A., Steck E., Goetzke K., Hennig T., Ochs B.G., Aigner T. & Richter W., Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum*, 2006, 54, 3254–3266.
- 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. & Marshak D.R., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284, 143–147.
- Quinn T.M., Schmid P., Hunziker E.B. & Grodzinsky A.J., Proteoglycan deposition around chondrocytes in agarose culture : construction of a physical and biological interface for mechanotransduction in cartilage. *Biorheology*, 2002, 39, 27–37.
- Ringe J., Kaps C., Schmitt B., Buscher K., Bartel J., Smolian H., Schultz O., Burmester G.R., Haupl T. & Sittinger M., Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res*, 2002, 307, 321–327.
- Sandell L.J. & Aigner T., Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction : cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res*, 2001, 3, 107–113.
- Tahiri K., Korwin-Zmijowska C., Richette P., Heraud F., Chevalier X., Savouret J.F. & Corvol M.T., Natural chondroitin sulphates increase aggregation of proteoglycan complexes and decrease ADAMTS-5 expression in interleukin 1 beta-treated chondrocytes. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67, 696–702.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K. & Yamanaka S., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131, 861–872.
- Tamamura Y., Otani T., Kanatani N., Koyama E., Kitagaki J., Komori T., Yamada Y., Costantini F., Wakisaka S., Pacifici M., Iwamoto M. & Enomoto-Iwamoto M., Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem*, 2005, 280, 19185–19195.
- Temenoff J.S. & Mikos A.G., Review : tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 2000, 21, 431–440.
- Terkeltaub R., Lotz M., Johnson K., Deng D., Hashimoto S., Goldring M.B., Burton D. & Deftos L.J., Parathyroid hormone-related proteins is abundant in osteoarthritic cartilage, and the parathyroid hormone-related protein 1-173 isoform is selectively induced by transforming growth factor beta in articular chondrocytes and suppresses generation of extracellular inorganic pyrophosphate. *Arthritis Rheum*, 1998, 41, 2152–2164.
- Van Damme A., Vanden Driessche T., Collen D. & Chuah M.K., Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2002, 2, 195–209.
- Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J. & Campbell K.H., Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385, 810–813.
- Wilson A. & Radtke F., Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and cancer. *FEBS Lett*, 2006, 580, 2860–2868.
- Yamane S., Iwasaki N., Majima T., Funakoshi T., Masuko T., Harada K., Minami A., Monde K. & Nishimura S., Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 2005, 26, 611–619.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I. & Thomson J.A., Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318, 1917–1920.
- Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P. & Hedrick M.H., Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 2002, 13, 4279–4295.
- Zuscik M.J., Baden J.F., Wu Q., Sheu T.J., Schwarz E.M., Drissi H., O'Keefe R.J., Puzas J.E. & Rosier R.N., 5-azacytidine alters TGF-beta and BMP signaling and induces maturation in articular chondrocytes. *J Cell Biochem*, 2004, 92, 316–331.