



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 : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.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 DE LORRAINE

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

Par **Fatima Ezzahra LAYDI**

Effet de la nature des biomatériaux sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses

Soutenue le 5 Décembre 2013

Membres du jury :

Rapporteurs :

M. René SANTUS

PU, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris

M. Daniel ISABEY

DR CNRS, UMR 955 INSERM, IMRB, Créteil

Examineurs :

M. Jean-François STOLTZ

PU-PH, UMR CNRS 7365-UL, Nancy, directeur de thèse

Mme Natalia de ISLA

MCU, UMR CNRS 7365-UL, Nancy, co-encadrante

M. Rachid RAHOUADJ

PU, UMR CNRS 7563-UL, Nancy

Mme Nadia BENKIRANE-JESSEL

DR. UMR INSERM 977-Université de Strasbourg

Avant-propos et remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique au sein du laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), UMR 7365 CNRS – Université de Lorraine 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, pour ses encouragements, pour sa gentillesse, et pour son aide tout au long de ces 4 années.

Je souhaiterais aussi remercier Monsieur **Jacques Magdalou**, directeur de l'UMR 7365, pour m'avoir acceptée dans l'unité de recherche, pour sa gentillesse, et pour son soutien.

Je tiens à remercier Madame le Docteur **Natalia de Isla**, ma co-encadrante de thèse, pour son implication, son aide, son soutien, et sa patience au cours de ces 4 années. Pour ses nombreux conseils scientifiques. Je la remercie plus spécialement pour la patience et le courage dont elle a témoigné lors de la correction de ce manuscrit.

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

Je voudrais remercier les stagiaires **Camille** et **Yueying** pour avoir fait leur stage de Master sur ce travail et pour leur contribution.

Je tiens à remercier également Mesdames **Ghislaine Cauchois**, **Monique Gentils**, **Brigitte Guerber** pour leur gentillesse à mon égard et leur soutien constant. Je leur exprime ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont également vers mes chers collègues et amis du laboratoire pour m'avoir encouragé et supporté durant ces années : **Talar**, **Hajare**, **Nasser**, **Hassan**, **Chaza**, **Reine**, **Loic**, **Yueying**.

Enfin, je tiens à remercier **mes parents** pour m'avoir permis de faire des études universitaires à l'étranger, et qui étaient toujours là pour moi dans les moments de la vie les plus dures, **ma famille** pour leur soutien et surtout **Youness** et **Houda**, leur soutien quotidien au cours de ces années qui n'ont pas été toujours du repos. Je voudrais aussi remercier mes amis qui m'ont soutenue et aidé : Haifa, Amira, Hanane, Mouna, Ilham, Saad, Youssef.

Liste des communications, posters et publications

Publications internationales avec un comité de lecture (PI)

- **PI 01:** F. Laydi, R. Rahouadj, G. Cauchois, J.-F. Stoltz, N. de Isla Hydroxyapatite incorporated into collagen gels for mesenchymal stem cell culture, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2013, **23**, 311-315.
- **PI 02 :** F. Laydi, Natalia de Isla, Ghislaine Cauchois, Jean-François Schmitt, Jean-François Stoltz, Rachid Rahouadj. Influence of constituents on the mechanical properties of a hydrogel alginate for osteoarticular engineering. En préparation.

Communication dans des congrès internationaux avec acte publié (ACT)

- **ACT 01 :** C. Alexandre, F. Laydi, N. Charif, J.-F. Stoltz, N. Benkirane-Jessel, N. de Isla. Hydroxyapatite incorporated into collagen gels for mesenchymal stem cell culture for osteoarticular tissue engineering applications, OARSI 2010, Bruxelles, Belgique, du 23-26 septembre 2010. **Publié** dans *Osteoarthritis & Cartilage*, 2010, **18**, Suppl.2 S238–S239.
- **ACT 02:** F. Laydi, G. Cauchois, J.-F. Stoltz, N. de Isla. The effect of hydroxyapatite microparticles on the differentiation of mesenchymal stem cells seeded into collagen gels, OARSI 2011, San Diego, USA, du 15-18 septembre 2011. **Publié** dans *Osteoarthritis & Cartilage*, 2011, 19, Suppl.1 S223.

Communication dans des congrès internationaux sans acte publiés (COM)

- **COM 01:** F. Laydi, R. Rahouadj, G. Cauchois, J.-F. Stoltz, N. de Isla Study of mechanical behavior of alginate-based gel: Statistical approach (design experiments) The 4th China-France Biotherapy and Regenerative Medicine International Symposium, 18-19 June 2011.

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : Etudes bibliographiques	4
1. Ingénierie des tissus squelettiques.....	4
1.1 Ingénierie du cartilage articulaire	5
1.2 Ingénierie du tissu osseux.....	12
2. Les cellules souches	16
2.1 . Définition des cellules souches.....	16
2.2 . Les différentes cellules souches (CS).....	16
2.3 Les cellules souches adultes (CSa).....	18
3. Les biomatériaux	23
3.1 Définition d'un biomatériau	23
3.2 Différents types de biomatériaux.....	24
3.3 Propriétés mécaniques des biomatériaux.....	31
4. Influence de la matrice de culture sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses.....	35
4.1 Forme de la cellule.....	37
4.1 L'élasticité de la matrice extracellulaire.....	38
4.2 La topographie de la matrice extracellulaire	39
Chapitre 2: Matériel et méthodes	48
1. Culture cellulaire	48
1.1 Réactifs	48
1.2 Méthodes	48
2. Fabrication des biomatériaux tridimensionnels (Alginate, collagène).....	51
2.1 Construction de biomatériau à base d'alginate de sodium	51
2.2 Construction de biomatériau à base de collagène de type I.....	53
3. Mesure des propriétés mécaniques des biomatériaux	54

3.1	Les propriétés mécaniques du biomatériau à base de collagène de type I.....	54
3.2	Les propriétés mécaniques du biomatériau à base d'alginate.....	55
3.3	Choix du plan d'expériences statistique fractionnaire.....	56
4.	Métabolisme cellulaire	60
4.1	Principe.....	60
4.2	Réactifs	61
4.3	Méthodes	61
4.4	Dosage d'ADN	61
5.	Cytométrie en flux.....	62
5.1	Analyse de l'expression de marqueurs de surface cellulaire.....	63
6.	Microscopie confocale	65
6.1	Principe.....	65
6.2	Analyse de la viabilité cellulaire	66
6.3	Visualisation du cytosquelette	66
6.4	Marquage du noyau	67
7.	RT-PCR.....	67
7.1	Principe.....	67
7.2	Extraction d'ARN.....	69
7.3	Rétrotranscription des ARNm (RT)	69
7.4	PCR Semi-Quantitative	70
7.5	Electrophorèse des produits de PCR semi quantitative	72
7.6	PCR quantitative.....	73
8.	Histologie-Immunohistologie.....	75
8.1	Principe.....	75
8.2	Réactifs :.....	76
8.3	Méthodes	77
8.4	Principe d'immunohistologie	78
9.	Analyse Statistique.....	80

Chapitre 3 : Résultats et discussions	82
1. Contrôle de qualité des CSM utilisées dans cette étude.....	82
2. Comportement des CSM au sein d'un hydrogel de collagène de type I supplémenté par des microparticules d'hydroxapatite (HAP)	85
2.1 Mise au point de l'obtention des hydrogels de collagène.....	85
2.2 Propriétés mécaniques de l'hydrogel de collagène de type I.....	87
2.3 Etude biologique : Suivi du comportement cellulaire dans les hydrogels de collagène I/HAP	88
3. Discussion	99
4. Comportement des CSM au sein d'un hydrogel à base d'alginate	102
4.1 Propriétés mécaniques de l'hydrogel d'alginate (plan d'expériences).....	102
4.2 Etude biologique.....	110
4.3 Discussion.....	120
Conclusion et perspectives	124
Références bibliographiques	127

Liste des figures

Figure 1: Les étapes de l'ingénierie tissulaire.....	4
Figure 2: L'homéostasie du cartilage	6
Figure 3: Assemblage des fibres de collagènes de type II, IX et XI	7
Figure 4: Représentation schématique d'une coupe transversale de cartilage articulaire	8
Figure 5: Schéma de l'environnement mécanique <i>in vivo</i> du cartilage articulaire	9
Figure 6: Mésengénèse.....	19
Figure 7: Moelle osseuse et cellules souches	20
Figure 8: Différenciation terminale des cellules mésenchymateuses vers le chondrocyte	23
Figure 9: <i>Macrocystis pyrifera</i> (a), <i>Laminaria hyperborea</i> (b) et <i>Laminaria digitaria</i> (c).....	28
Figure 10: a) monomères mannuronate M et guluronate G ; b) poly-guluronate GG et polymannuronate MM; c) exemple d'enchaînement des blocs GG, blocs MM ou blocs alternés MG dans une chaîne d'alginate.....	29
Figure 11 : Représentation schématique de la formation d'egg-box	30
Figure 12: Facteurs régulant la différenciation cellulaire	35
Figure 13: Régulation du comportement des cellules souches par des facteurs mécaniques ..	37
Figure 14: L'influence de la topographie du MEC sur les cellules souches	40
Figure 15: Structure des chaînes d'alginate de sodium	51
Figure 16 : Technique de moulage	53
Figure 17: Dispositif de compression uniaxiale en immersion	55
Figure 18: Représentation schématique du protocole expérimental comportant des séquences de charge, décharge et recharge	56
Figure 19: plan d'expériences du type $L_{27} 3^{13}$,	57
Figure 20: Principe de la cytométrie en flux	63
Figure 21: Principe de la technique de PCR	68
Figure 22: Exemple de caractérisation par phénotypage des CSM.....	82
Figure 23 : Le test des CFU	83
Figure 24: Aspect d'un hydrogel de collagène de type I supplémenté en HAP.....	86

Figure 25: Influence de l'ajout des microparticules de HAP sur le comportement mécanique des hydrogels de collagène de type I.....	87
Figure 26: Etude de la viabilité à J3 des CSM au sein des hydrogels de collagène de type I..	89
Figure 27: Etude de la viabilité à J21 des CSM au sein des hydrogels de collagène de type I	90
Figure 28: Observation de la morphologie et la distribution cellulaire à J3.	91
Figure 29: Etude de la contraction des hydrogels au cours du temps.	92
Figure 30: Evolution de la quantité d'ADN.	94
Figure 31: Etude du métabolisme cellulaire des CSM.....	95
Figure 32: Analyse par RT-PCR de l'expression génique de l'ARNm de facteurs de transcription.....	96
Figure 33:Analyse par RT-PCR de l'expression génique de l'ARNm de facteurs de transcription à J21.	96
Figure 34: Analyse par RT-PCR de l'expression génique de L'ARNm de protéines de la matrice à J21.....	97
Figure 35: Etude de la synthèse de protéines d'intérêt.....	98
Figure 36 : Effet des différents facteurs de composition sur la déformation à rupture du biomatériau alginate/HA	103
Figure 37: Effet des différents facteurs de composition sur la contrainte maximale du biomatériau alginate/HA	104
Figure 38: Effet des différents facteurs de composition sur l'élasticité du biomatériau alginate/HA	105
Figure 39: Effet des différents facteurs de composition sur la déformation maximale du biomatériau alginate/HAP.....	106
Figure 40: Effets des différents facteurs de composition sur la contrainte maximale du biomatériau alginate/HAP.....	107
Figure 41: Effets des différents facteurs de composition sur l'élasticité du biomatériau alginate/HAP.....	108
Figure 42: Etude de la viabilité à J28 des CSM au sein des hydrogels d'alginate.....	110
Figure 43: Observation de la morphologie et de la distribution cellulaire à J3.	111
Figure 44: Evolution de la quantité d'ADN.....	112
Figure 45: Evolution de l'activité métabolique des CSM au sein des hydrogels à base d'alginate.....	112

Figure 46: Influence de la nature du biomatériau sur l'expression génique de facteur de transcription Sox9	114
Figure 47: Influence de la nature du biomatériau sur l'expression génique de facteur de transcription Runx2	114
Figure 48: Influence de la nature du biomatériau sur l'expression génique de protéine matricielle Col2a	115
Figure 49: Influence de la nature du biomatériau sur l'expression génique de protéines de la MEC	115
Figure 50: Effet de la nature du biomatériau sur la synthèse des collagènes et de GAG par les CSM ensemencées dans des hydrogels d'alginate-HA	116
Figure 51: Effet de la nature du biomatériau sur la synthèse des collagènes et des GAG par les CSM ensemencées dans des hydrogels d'alginate-HAP	117
Figure 52: Effet de la nature du biomatériau sur la synthèse de collagène de type 10	118
Figure 53: Influence de la nature du biomatériau sur la synthèse de la protéine Sox9	119

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractérisation des CSM par immunomarquage en cytométrie de flux.....	21
Tableau 2: Famille de polymères et leur utilisation	25
Tableau 3: Exemples de biomatériaux d'origine végétale	26
Tableau 4: Exemples de biomatériaux d'origine animale.....	26
Tableau 5: Avantages et inconvénients de l'utilisation du collagène pour l'ingénierie tissulaire	27
Tableau 6: Elasticités de substrats naturels ou synthétiques	32
Tableau 7: Les différentes études effectuées sur les propriétés mécaniques de l'alginate	33
Tableau 8: Les différents effets de la matrice extracellulaire sur le comportement des cellules souches	42
Tableau 9: Courbe étalon d'ADN	62
Tableau 10: Anticorps utilisés pour le phénotypage des CSM	64
Tableau 11: Amorces des gènes de PCR.....	71
Tableau 12: Liste des réactifs utilisés pour le mélange d'amplification	72
Tableau 13: Liste des amorces utilisées pour la q PCR	74
Tableau 14: Protocoles de coloration d'histologie	78
Tableau 15: Pourcentages de CFU obtenus pour les différents prélèvements et passages	84
Tableau 16: Conditions testées pour l'obtention d'un hydrogel de collagène	85
Tableau 17: Différents facteurs à différents niveaux des deux plan d'expériences	102

Liste des abréviations

3D : tridimensionnel

ϵ_{\max} : Déformation maximale

σ_{\max} : Contrainte maximale

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

CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses

DMEM : Dubelcco's Modified Eagle Medium

DMSO : Diméthyl Sulfoxyde

E: Module Apparent (module de Young)

EDTA : Acide éthylènedinitrilotétraacétique

F: Facteur

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

IF : Intensité de Fluorescence

IGF : Insulin Growth Factor

IMF : Intensité Moyenne de Fluorescence

IP : Iodure de Propidium

kPa : KiloPascal

M : Acide Mannuronique
MEC : Matrice extracellulaire
MMP : Métalloprotéinase
min : Minute
mL : Millilitre
mm : Millimètre
OARSI : Osteoarthritis Research Society International
ON : Ouverture numérique
PBS : Phosphate Buffer Saline
PE : Phycoérythrine
PFA : Paraformaldéhyde
PG : Protéoglycannes
PMT : Photomultiplicateur
P/S : Penicilline/Streptomycine
PS : Phosphatidylsérine
Px : Passage x (x=nombre de passage)
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
RT : Rétrotranscription
SEM : Standard Error of the Mean 9
SSC : Side Scatter
SVF : Sérum de Veau Foetal
TGF : Transforming Growth Factor
UV : Ultraviolet

Introduction générale

Introduction générale

Certains tissus de l'organisme comme le foie et l'épiderme, se régénèrent spontanément suite à une lésion, d'autres plus nombreux comme le cartilage ont un potentiel de régénération limité, provoquant alors l'apparition de pathologies handicapantes.

Depuis quelques années une alternative thérapeutique prometteuse a été mise en évidence : c'est l'ingénierie tissulaire. Elle a pour objectif de développer un nouveau tissu ou un organe qui sera implanté au niveau de la blessure. Cette forme de thérapie diffère de celle des traitements standards qui reposent sur le remplacement définitif du tissu ou de l'organe défectueux par une prothèse ou une greffe ; elle propose donc une solution durable à une multitude de problèmes cliniques.

Les pathologies ostéo-articulaires associent des troubles des principaux tissus qui les composent : le cartilage et l'os.

Le cartilage présente une faible capacité de réparation, le traitement de ses lésions demeure un problème d'actualité en clinique. En absence de thérapies pharmacologiques efficaces, de nombreuses techniques chirurgicales ont été développées afin de réparer ces lésions : stimulation de l'os sous-chondral, greffes de périoste ou transplantation de chondrocytes autologues. Malgré des résultats encourageants, ces procédés ont montré certains inconvénients. L'application clinique de ces techniques chirurgicales est limitée par leur coût élevé, une mise en œuvre difficile et un nombre insuffisant de laboratoires agréés. De plus, aucune n'aboutit à la synthèse d'un tissu fonctionnel proche du tissu natif lésé.

L'os possède des capacités de régénération spontanée plus importantes que le cartilage. Cependant, pour des lésions de grande taille ou des déformations congénitales, des traitements spécifiques comme la greffe ou les substituts osseux sont employés. Mais ces techniques montrent également leurs limites. Les greffes impliquent de se préoccuper de rejets éventuels et produisent un tissu de mauvaise qualité avec de faibles propriétés mécaniques et ses propriétés ostéoconductibles mais non ostéoinductibles, ce qui limite leur potentiel de réparation.

L'ingénierie tissulaire dont l'objectif thérapeutique est de recréer, régénérer ou restaurer la fonction d'un tissu lésé, est la coalescence de trois éléments : un biomatériau d'origine synthétique ou biologique, dégradable ou non, des cellules réparatrices et des facteurs de croissance. La composante cellulaire de l'ingénierie tissulaire est majoritairement représentée par les cellules souches, au premier rang desquelles les cellules souches

mésenchymateuses adultes prélevées à partir de la moelle osseuse. Ces dernières années, des progrès ont été accomplis dans la compréhension des mécanismes biologiques qui régissent la différenciation des cellules souches et dans le développement de biomatériaux aux propriétés biologiques et physicochimiques contrôlées.

L'objectif de ce travail est d'étudier le comportement des cellules souches mésenchymateuses (CSM) en fonction de la nature et des propriétés mécaniques des biomatériaux support afin de guider la différenciation cellulaire, et ceci en absence de facteurs de croissance en vue de faciliter l'application thérapeutique.

La première partie de ce travail consistera à étudier l'effet d'un biomatériau de nature protéinique. collagène de type I supplémenté par des microparticules d'hydroxyapatite (HAP) sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM).

Dans la seconde partie du travail, nous allons étudier l'influence d'un autre type de biomatériau : l'alginate (supplémenté en acide hyaluronique (HA) ou en microparticules d'hydroxyapatite (HAP)), ainsi que l'effet des propriétés mécaniques de ce dernier sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM). Les principaux paramètres biologiques étudiés dans les différentes parties de notre travail seront, la viabilité, le métabolisme cellulaire, la synthèse matricielle, l'expression des gènes d'intérêt et l'expression de protéines d'intérêt.

Chapitre 1 : Etudes bibliographiques

Chapitre 1 : Etudes bibliographiques

1. Ingénierie des tissus squelettiques

L'ingénierie tissulaire est une discipline dont l'objectif est de développer des substituts biologiques capables de restaurer, maintenir ou améliorer la fonction des tissus lésés. Pour cela, elle associe les principes de l'ingénierie des matériaux et des sciences de la vie (cellules réparatrices et signaux biologiques, biochimiques ou biophysiques) (figure 1).

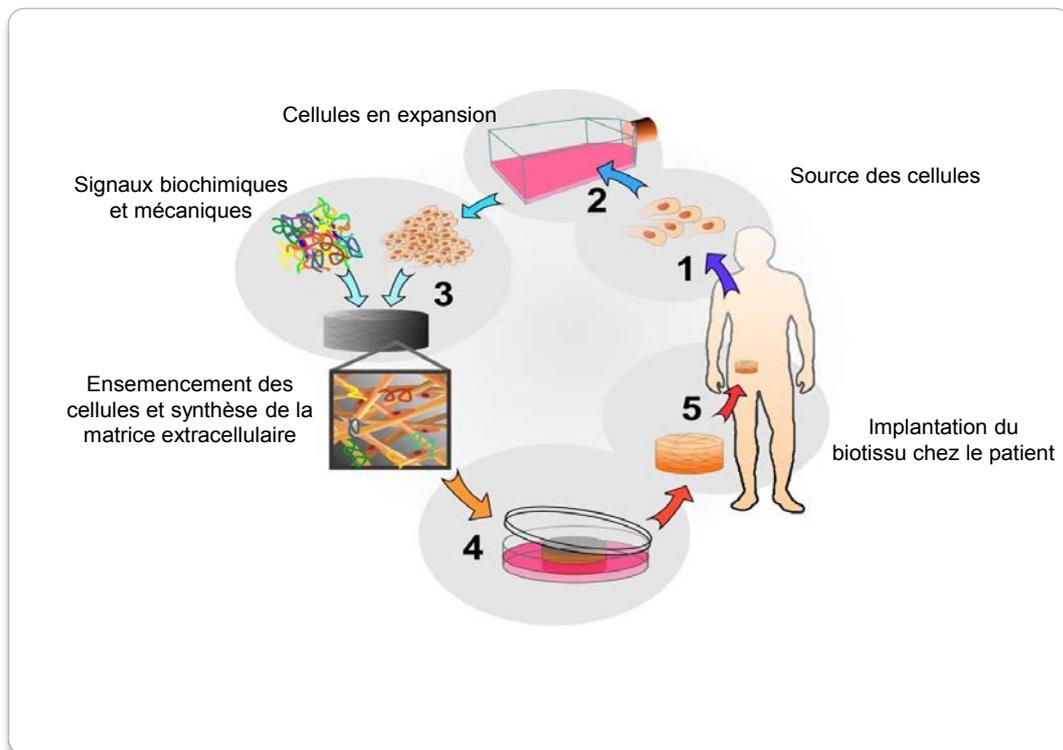


Figure 1: Les étapes de l'ingénierie tissulaire

Les cellules du patient sont prélevées, puis isolées et amplifiées in vitro. Elles sont ensuite ensemencées dans une matrice et cultivées dans des conditions contrôlées (milieu spécifique, facteurs de croissance, contraintes mécaniques). Le biotissu sera ensuite implanté chez le patient (Van Blitterswijk, 2008)

La médecine régénératrice des tissus squelettiques (os, cartilage) a bénéficié des progrès de l'ingénierie tissulaire pour faire son entrée en clinique humaine. Concernant les matériaux, et en fonction de la nature du tissu à régénérer, ceux-ci doivent présenter des propriétés physicochimiques (composition, élasticité,) différentes (Engler *et al.*, 2006), adaptées aux propriétés biologiques, mais également les propriétés biomécaniques des tissus cibles. Les cellules réparatrices utilisées en ingénierie tissulaire sont majoritairement représentées par les cellules souches et en particulier les cellules souches mésenchymateuses (CSM) adultes prélevées à partir de différents tissus : moelle osseuse (Kassem and Abdallah, 2008) sang de cordon, sang adulte, cordon ombilical, périoste, muscle, tissu adipeux (Gomillion and Burg, 2006), membrane synoviale. Cependant, au vu de la diversité des applications cliniques de l'ingénierie tissulaire, l'identification des cellules les mieux adaptées est toujours source de débat au sein de la communauté scientifique : cellules autologues ou allogéniques, cellules souches adultes ou embryonnaires, cellules de moelle osseuse ou de tissu adipeux....

Cette étude a pour objectif d'étudier l'effet de la matrice extracellulaire (MEC) sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM).

1.1 Ingénierie du cartilage articulaire

1.1.1 Généralités sur le cartilage articulaire

1.1.1.1 Composition du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif hautement spécialisé situé à l'extrémité des os longs. Il est constitué de chondrocytes, ainsi que d'une matrice extracellulaire.

-Les chondrocytes

Ils constituent le seul type cellulaire du cartilage articulaire (Heath and Magari, 1996). Les chondrocytes synthétisent tous les composants de la matrice extracellulaire, ainsi que les enzymes de dégradation de cette matrice, afin d'assurer une homéostasie.

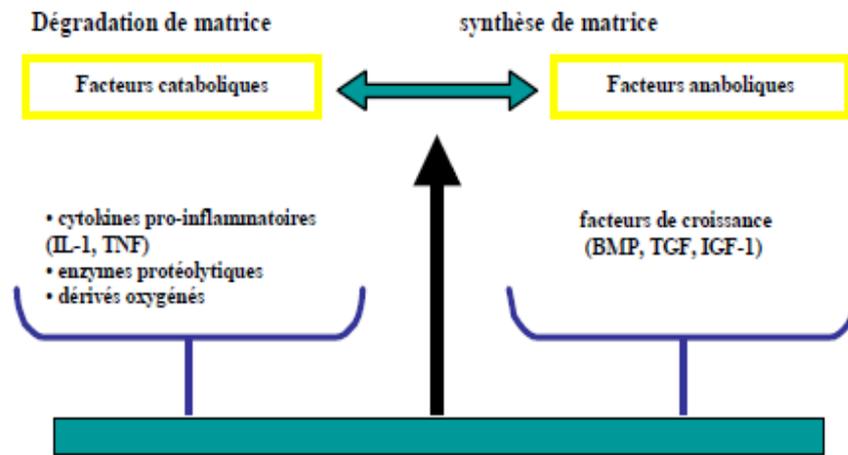


Figure 2: L'homéostasie du cartilage

Elle est régulée par une balance entre dégradation et synthèse de matrice. La synthèse de la matrice est induite par des facteurs anaboliques : facteurs de croissance (BMP, TGF, IGF-1). Les facteurs cataboliques induisent la dégradation de la matrice : cytokines pro inflammatoires (IL-1, TNF), enzymes protéolytiques, et dérivés oxygénés. Lors de l'inflammation et de l'arthrose, la balance penche vers la dégradation.

L'homéostasie du cartilage est régulée par une balance entre dégradation et synthèse de matrice. La synthèse de la matrice est activée par des facteurs anaboliques : facteurs de croissance (BMP, TGF, IGF-1). Les cellules peuvent aussi produire des cytokines pro-inflammatoires provoquant la destruction du cartilage par augmentation de la synthèse et de l'activité des métalloprotéinases (Shlopov *et al.*, 1997), des hyaluronidases et des agrécanases. Dans des cas pathologiques, la balance penche vers la dégradation.

Les chondrocytes sont séparés de la matrice extracellulaire par un espace péricellulaire particulier. Le métabolisme des chondrocytes est influencé par les conditions physico-chimiques définies dans cet espace péricellulaire (Wilkins and Williams, 1995), qui entraînent des modifications du pH, et ont des incidences sur la forme et la déformabilité du chondrocyte.

-La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est principalement constituée d'eau (60%-80%), de fibres de collagènes et de protéoglycanes.

1-Réseau du collagène : au niveau du cartilage articulaire, sept types principaux de collagènes (II, IX, XI, X, V, VI et VII) ont été identifiés. Ces collagènes confèrent à ce tissu ses propriétés mécaniques d'élasticité (figure 3).

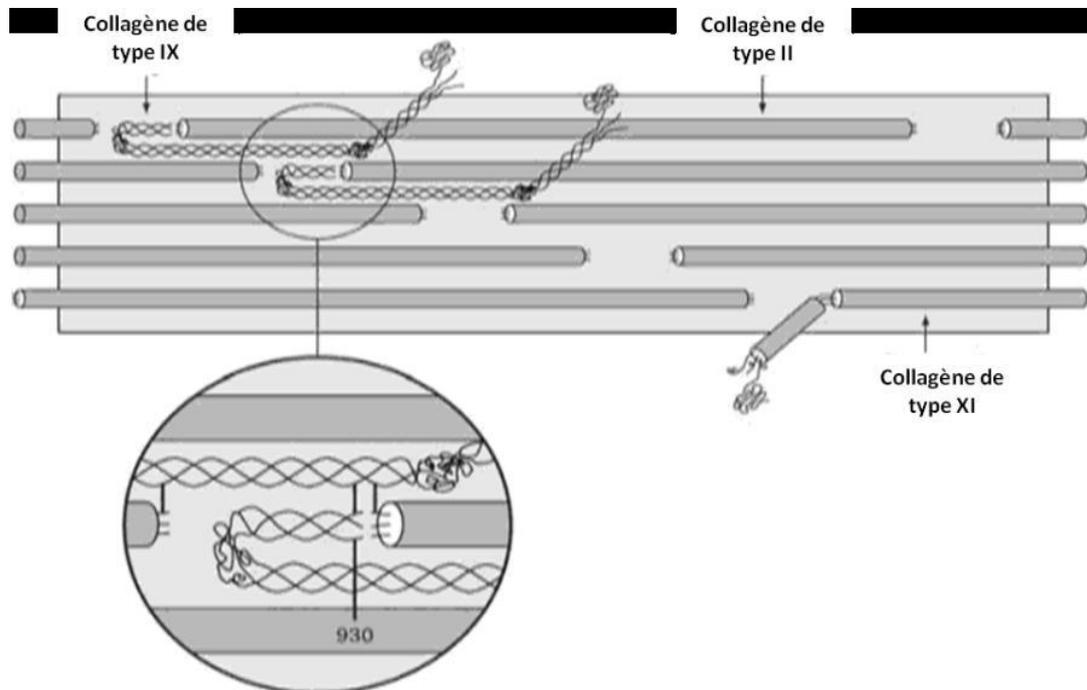


Figure 3: Assemblage des fibres de collagènes de type II, IX et XI

Le collagène de type II est la protéine collagénique la plus abondante trouvée dans le cartilage et constitue 80 à 85 % du contenu en collagènes. Il est spécifique du cartilage articulaire et très résistant aux attaques protéolytiques (Cremer *et al.*, 1998). Il est composé de trois chaînes de type $\alpha 1$ (II). 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).

2-Les protéoglycanes

Les protéoglycanes constituent la substance fondamentale, située entre les cellules et les fibres. Ce sont des macromolécules formées par une protéine axiale sur laquelle se branchent une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs). Les principaux protéoglycanes du cartilage sont **l'aggrécane** et **le versican**.

Les GAGs jouent un rôle important dans les propriétés mécaniques du cartilage. En effet, comme l'ont montré Jin *et al.*, les interactions électrostatiques entre les GAGs et les

électrolytes présents dans le liquide interstitiel sont fortement impliqués dans l'élasticité du cartilage (Jin *et al.*, 2001).

1.1.1.2 Structure du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est constitué de quatre couches successives : la couche superficielle (5 à 10 % de la hauteur totale du cartilage), la couche moyenne (40 à 45 %), la couche profonde (40 à 45 %) puis la couche basale (5 à 10 %). Les chondrocytes et les constituants de la matrice extracellulaire sont organisés différemment suivant la couche considérée. Par ailleurs, les contraintes mécaniques ne sont pas ressenties de la même manière selon la couche.

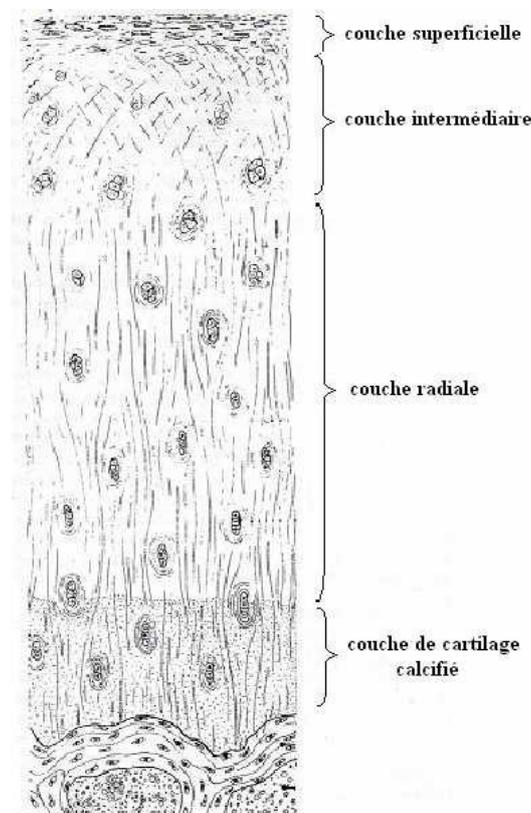


Figure 4: Représentation schématique d'une coupe transversale de cartilage articulaire

La couche superficielle est constituée de fibres de collagènes tassées entre elles et parallèles à la surface articulaire, peu de protéoglycanes, alors que la couche moyenne est formé de fibres de collagène entrecroisées obliquement en un réseau non orienté, la couche profonde quant à elle, contient des fibres de collagènes perpendiculaires à la surface articulaire, chondrocytes alignés verticalement en colonnes, zone la plus riche en

protéoglycanes, et enfin, la couche basale ou intermédiaire en contact avec la plaque osseuse sous-chondrale, cartilage en voie de calcification.

1.1.1.3 Propriétés mécaniques du cartilage

Le cartilage est soumis en permanence à plusieurs contraintes mécaniques. La contrainte principale est la compression qui engendre d'autres contraintes telles que des contraintes de cisaillement, des pressions hydrostatiques et des forces de tension et d'étirement (Kerin *et al.*, 2002). La capacité du cartilage articulaire à exercer sa fonction physiologique dépend de l'interaction sensible des constituants du cartilage et de l'écoulement du fluide interstitiel à travers la matrice perméable (Hasler *et al.*, 1999).

La couche superficielle du cartilage est la couche la plus déformée du tissu. Elle est en contact direct avec le liquide synovial et le cartilage opposé de l'articulation, cette couche subit de fortes forces de frottement, des mouvements de liquide interstitiel et des compressions qui induisent une grande déformation de la couche. Dans les couches situées plus en bas, les forces de frottement sont nulles (Wong and Carter, 2003) (Figure 5).

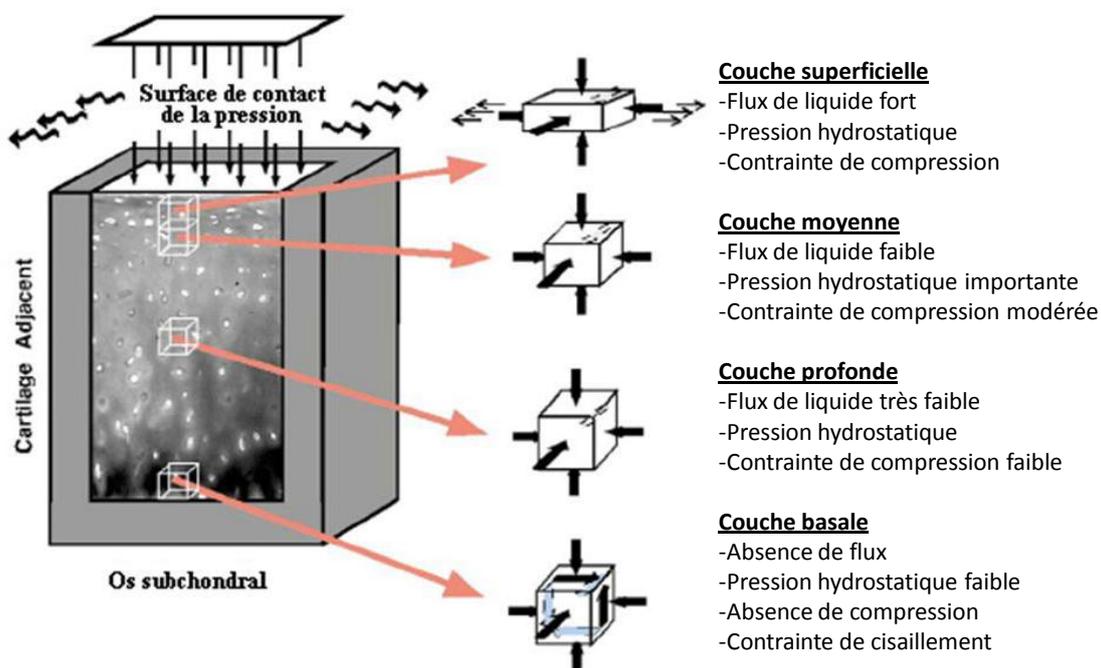


Figure 5: Schéma de l'environnement mécanique *in vivo* du cartilage articulaire Adapté de (Wong and Carter, 2003)

Dans les différentes couches du cartilage, les contraintes mécaniques sont ressenties par les chondrocytes et activent des voies de mécano-transduction qui induisent la synthèse de la matrice extracellulaire spécifique pour résister aux différentes contraintes auxquelles elles sont soumises, elles peuvent induire aussi une dégradation de la MEC et la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires, (Wong and Carter, 2003). La couche superficielle est composée de collagène qui permet de résister aux étirements, et les couches moyennes et profondes sont constituées essentiellement de GAGs qui retiennent de l'eau et permettent de résister à la compression.

1.1.2 Différents éléments impliqués dans l'ingénierie tissulaire du cartilage

Lorsque le cartilage articulaire est endommagé, il ne se régénère pas en raison principalement d'absence de vascularisation. Il a été proposé de tenter d'initier la réparation du tissu (microfracture, la technique de Brittberg (Brittberg *et al.*, 1994), de restaurer l'intégrité du cartilage (mosaïcoplastie) ou de remplacer l'ensemble du cartilage articulaire de l'articulation (pose de prothèse). Cependant, à ce jour, aucune méthode n'est disponible pour produire de manière reproductible et fiable du cartilage pleinement fonctionnel. Une nouvelle génération de traitement a vu le jour récemment : l'ingénierie tissulaire

Cette technique repose sur trois éléments :

- Les cellules.
- Les signaux biologiques, biochimiques, biophysiques.
- Les biomatériaux.

1.1.2.1 Les cellules

Différents équipes ont utilisé les chondrocytes pour l'ingénierie tissulaire du cartilage, étant donné que ces cellules sont le seul type cellulaire du tissu natif (Brodkin *et al.*, 2004; Chung and Burdick, 2008; Wang *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2001) . Cependant, les limites de ce type de cellules (faible rendement d'amplification, dédifférenciation en cellules fibroblastes-like, méthode invasive (cellules prélevées du patient lui-même)) ont initié l'utilisation de cellules souches de différentes origines.

-Les cellules souches

Les cellules souches peuvent être d'origines différentes et extraites à différents stades de maturation d'un organisme. Nous allons détailler les différents types de cellules souches par la suite (dans la partie (2. Cellules souches)).

Parmi ces cellules, il y a les cellules souches mésenchymateuses (CSM) adultes qui semblent être de bonnes candidates pour l'ingénierie tissulaire du cartilage, elles sont capables de se différencier vers le lignage chondrogénique ou ostéogénique (Johnstone *et al.*, 1998).

1.1.2.2 Les signaux biologiques, biochimiques et biophysiques

-Facteurs de croissance et de différenciation

Les facteurs de croissance interviennent à des stades précis de la chondrogenèse pour stimuler les différentes voies de signalisation. 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 et ostéocytaire de cellules souches, ou pour conserver le phénotype des cellules natives et augmenter 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 inclus dans des microsphères pour être aussi relargués progressivement.

- Signaux biophysiques

Des signaux biophysiques impliqués dans l'homéostasie articulaire influencent également la différenciation chondrogénique des CSM. Parmi ceux-ci : une faible tension en oxygène (Merceron *et al.*, 2010b), les contraintes mécaniques (Terraciano *et al.*, 2007) et la culture en 3D ont été largement étudiées. La différenciation chondrogénique des CSM, comme dans l'ossification endochondrale, ne s'arrête pas au stade du chondrocyte mature mais se poursuit vers l'hypertrophie du chondrocyte, la minéralisation de la matrice extracellulaire et la formation d'os (Pelttari *et al.*, 2006). Afin de prévenir le risque de formation d'un tissu minéralisé notamment *in vivo*, il semble cependant possible de contrôler ce processus en cocultivant les CSM avec des chondrocytes articulaires. Par ailleurs,

l'hypoxie, outre son action stimulatrice sur la différenciation chondrogénique précoce des CSM, pourrait également être utilisée pour prévenir l'apparition de marqueurs du stade terminal de différenciation chondrogénique (Merceron *et al.*, 2010a).

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 (Kisiday *et al.*, 2009; Mouw *et al.*, 2007), et des pressions hydrostatiques (Miyanishi *et al.*, 2006a). 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 (Miyanishi *et al.*, 2006b).

1.1.2.3 Les biomatériaux

Les biomatériaux utilisés en ingénierie du cartilage ont pour objectif, non seulement de permettre la transplantation par une voie non invasive des cellules sur le site de la lésion, mais aussi d'être des supports tridimensionnels (3D) permettant la différenciation chondrogénique des CSM (Caplan *et al.*, 1998). Ces biomatériaux sont à base de protéines, de polysaccharides ou synthétiques (Dawson *et al.*, 2008). Parmi ces biomatériaux, les hydrogels reçoivent une attention particulière. Ils sont composés de polymères visqueux synthétiques ou naturels qui possèdent la particularité de former des réseaux 3D après réticulation physique, ionique ou covalente. Ces hydrogels ont une teneur en eau proche de celle du cartilage, ce qui leur permet de mimer l'environnement 3D physiologique des cellules.

1.2 Ingénierie du tissu osseux

1.2.1 Généralités sur l'os

Le tissu osseux est un composite organo-minéral. C'est un tissu conjonctif composé de cellules (5%) et de constituants extracellulaires (95%) qui a la particularité de se calcifier. Les ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes et cellules bordantes constituent les principales cellules du tissu osseux.

- Les ostéoblastes

Ces cellules sont chargées de la synthèse de la matrice osseuse et du contrôle de la calcification. Elles sont issues de progéniteurs mésenchymateux localisés dans le stroma médullaire de la diaphyse et dans les membranes conjonctives du périoste et de l'endoste. Ces cellules progénitrices sont indifférenciées et pluripotentes et donnent naissance, sous l'action de facteurs de transcriptions spécifiques, à la fois aux ostéoblastes mais également aux chondroblastes (cellules du cartilage), aux adipocytes et aux myoblastes (cellules musculaires striées) (Katagiri *et al.*, 2002)

- Les ostéocytes

Lorsque les ostéoblastes sont progressivement entourés de tissu osseux, ils subissent des modifications structurelles et deviennent des ostéocytes. Leur rôle exact est encore méconnu. Pendant la résorption ostéocalcique cependant, les ostéocytes sont phagocytés et digérés avec les autres composants osseux.

- Les ostéoclastes

Ce sont des cellules géantes (diamètre = 100 μm) plurinucléées. Ces cellules sont chargées de la résorption du tissu osseux calcifié. Les précurseurs mononucléés des ostéoclastes circulent dans le système sanguin et à la surface de l'os. Tout comme l'ostéoblaste, la régulation de l'activité de ces cellules dépend d'hormones, de cytokines et de facteurs de croissance. Il faut noter que les ostéoblastes sécrètent des facteurs qui régulent la résorption osseuse faite par les ostéoclastes.

- Les cellules bordantes

La plupart des surfaces osseuses non impliquées dans une activité de remodelage sont couvertes par une couche de cellules bordantes. Ces cellules sont des cellules ostéoblastiques au repos. De ce fait, les facteurs régulateurs de l'ostéoblaste mature agissent également sur les cellules bordantes. Les constituants extra-cellulaires correspondent d'une part à la matrice organique, et d'autre part à la substance minérale.

- La matrice organique

La protéine de base de la matrice osseuse est le collagène de type I qui représente 80 à 90% des protéines totales de l'os, et qui forme un réseau de fibrilles collagéniques. Les 10 à 20% complémentaires sont constitués par des protéines non collagéniques (ostéopontine, ostéocalcine).

- La substance minérale

La phase minérale des tissus osseux est composée à 85% d'un phosphate de calcium cristallisé sous forme d'hydroxyapatite organisée grossièrement en plaques hexagonales, de formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Les 15% restant sont des carbonates de calcium, phosphates de magnésium, fluorures de calcium, de la silice et des sels alcalins.

1.2.2 Différents éléments impliqués dans l'ingénierie du tissu osseux

Un déséquilibre entre la résorption et la formation osseuse peut conduire à des pathologies osseuses comme l'ostéoporose et a pour conséquence des modifications importantes de la masse et de l'architecture osseuse. Celles-ci peuvent être à l'origine de fractures et de pertes massives de tissu osseux, difficiles à réparer sans stratégie de régénération tissulaire. Ces stratégies doivent tenir compte de la physiologie de ce tissu minéralisé, vascularisé et innervé et de sa fonction mécanique.

Les techniques d'ingénierie du tissu osseux sont à ce jour très prometteuses, notamment pour la régénération des pertes massives de tissu osseux. Ces techniques associent des cellules réparatrices qui doivent s'orienter vers le lignage ostéoblastique sous l'action de différents facteurs biochimiques, matriciels et mécaniques.

Comme pour l'ingénierie tissulaire du cartilage, l'ingénierie du tissu osseux repose sur 3 éléments : composante cellulaire, composante matricielle et le microenvironnement.

1.2.2.1 Les cellules souches utilisées dans l'ingénierie du tissu osseux

De nombreuses sources cellulaires peuvent être utilisées pour des applications en ingénierie du tissu osseux. Compte tenu des limites des cultures primaires de cellules humaines différenciées autologues obtenues à partir d'os trabéculaire ou alvéolaire (Xiao *et al.*, 2003) (quantité limitée de cellules, faible capacité de prolifération et de différenciation), les recherches se sont orientées rapidement vers l'utilisation de sources alternatives de cellules utilisables en clinique. Les cellules embryonnaires offrent d'intéressantes caractéristiques, en particulier leur pluripotence. La littérature décrit les nombreux stimuli (addition de facteurs ostéogènes, culture en micromasse) utilisés pour engager leur différenciation vers le lignage ostéoblastique (Jukes *et al.*, 2008) mais leur application dans le domaine de l'ingénierie tissulaire soulève des problèmes réglementaires et éthiques. Les cellules souches pluripotentes induites (iPS) devraient offrir dans les années à venir un potentiel considérable pour la médecine régénératrice. Leur orientation vers le lignage

ostéoblastique a été montrée récemment (Li *et al.*, 2010). Mais de nombreux obstacles technologiques doivent être levés pour une utilisation en ingénierie tissulaire. A ce jour, l'utilisation de CSM adultes semble être encore la plus prometteuse pour des applications cliniques (Kassem and Abdallah, 2008).

1.2.2.2 Les facteurs impliqués dans la différenciation ostéogénique

De nombreux facteurs environnementaux gouvernent la différenciation des CSM vers le lignage ostéoblastique (Reddi, 2000). En effet, une des caractéristiques du tissu osseux est d'arbitrer la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse contenant les cellules souches hématopoïétiques nichées dans un tissu stromal composé de CSM et de nombreuses autres cellules (fibroblastes, cellules endothéliales, adipocytes...). Les activités de ces cellules hématopoïétiques et stromales sont étroitement liées par des interactions cellule/cellule ou cellule/matrice extracellulaire et par l'intermédiaire de facteurs locaux (facteurs de croissance, morphogènes et cytokines) et hormonaux. De plus, ce tissu est en permanence soumis à des sollicitations mécaniques. Ce microenvironnement cellulaire, biochimique, matriciel et mécanique dans lequel se trouvent ces CSM peut être en partie mimé *in vitro* dans des modèles de culture en deux et trois dimensions, par l'addition de facteurs biochimiques, par l'utilisation de bioréacteurs mimant des contraintes mécaniques, ou encore par des support matriciels comme structures d'hébergement de ces cellules qui peuvent orienter la différenciation de ces CSM.

Dans des modèles de culture en 2D, les étapes de la différenciation ostéoblastique sont bien identifiées et sont sous le contrôle de différents facteurs de transcription (cbfa1, runx2, osterix, Dlx5) (Marie 2001). Dans des structures 3D, les mécanismes sont beaucoup moins bien connus. Ces CSM peuvent être induites *in vitro* vers le lignage ostéogénique sous l'action de différents facteurs, tels que des facteurs ostéo-inducteurs (Reddi, 2000) (addition de BMP (bone morphogenic protein)-2 ou BMP-7).

1.2.2.3 Biomatériaux et contraintes mécaniques

Parmi les biomatériaux les plus utilisés en ingénierie du tissu osseux, nous citerons les matériaux macroporeux à base de phosphate de calcium, les polymères synthétiques, naturels et composites qui donnent des résultats très prometteurs sur la différenciation des CSM, surtout dans des conditions dynamiques de culture (Datta *et al.*, 2006).

En effet, le tissu osseux étant un tissu continuellement soumis à plusieurs types et niveaux de sollicitations mécaniques, différents dispositifs sont développés pour mimer *in vitro* ces contraintes. Pendant de nombreuses années, seuls les ostéocytes étaient considérés comme des cellules mécanosensibles, mais la réponse de CSM à différents types de contraintes (compression, étirement, cisaillement) est à ce jour identifiée d'où l'intérêt de la culture en bioréacteur, la mission de bioréacteur consiste à assurer la perfusion des matrices 3D, l'apport de nutriments aux CSM et l'élimination des déchets. Cette culture dynamique peut avoir des conséquences importantes sur la différenciation des CSM puis la formation osseuse (Scherberich *et al.*, 2007).

2. Les cellules souches

2.1 . Définition des cellules souches

Les cellules souches sont des cellules immatures indifférenciées, caractérisées par leur capacité de s'autorenouveler sur une très longue durée et de se différencier en cellules spécifiques d'organe (Coulombel, 2007). Le terme de cellules souches recouvre en effet plusieurs sous-types cellulaires présentant d'importantes différences biologiques et fonctionnelles. Les cellules souches peuvent être classées selon leur potentiel de différenciation ou leur origine.

2.2 . Les différentes cellules souches (CS)

On distingue quatre types de cellules souches classées selon leur potentiel de différenciation :

- **Totipotentes** : Premières cellules embryonnaires directement issues du zygote, du premier au quatrième jour, elles sont à l'origine de toutes les cellules de l'organisme issues des trois feuilletts embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme ainsi que des annexes extra-embryonnaires. Donc une cellule souche totipotente peut conduire au développement d'un organisme entier.
- **Pluripotentes** : Peuvent se différencier en n'importe quel tissu , mais ne peuvent pas reproduire un être humain en entier, car elles ne régénèrent pas des tissus extra-embryonnaires (cellules souches embryonnaires du blastocyste, cellules germinales embryonnaires).

- **Multipotentes** : Peuvent se différencier en plusieurs lignées cellulaires différentes (cellules souches hématopoïétiques, cellules souches mésenchymateuses).
- **Unipotentes** : Ne peuvent se différencier que vers un seul tissu spécifique (kératinocytes, oligodendrocytes immatures).

Selon l'origine des CS, on distingue : les cellules souches embryonnaires, fœtales, et adultes.

2.2.1 Les cellules souches embryonnaires (CSE)

Les cellules souches embryonnaires sont extraites de la masse interne du blastocyste, qui représente au quatrième jour suivant la fertilisation, le premier stade de l'embryon. *In vivo*, lors de l'implantation intra-utérine de l'œuf à partir du septième jour, les CSE vont s'engager dans la formation du tissu germinale et de trois feuillets embryonnaires somatiques : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Elles sont donc pluripotentes. Elles conservent aussi leur état indifférencié lors d'une culture prolongée *in vitro*, ce qui leur permet de s'autorenouveler (Boyer *et al.*, 2006).

Ces cellules sont rarement utilisées en ingénierie tissulaire, (Hwang *et al.*, 2006). Plusieurs problèmes devront être résolus avant d'arriver à l'application clinique des ces cellules. L'obstacle majeur au développement de la recherche sur les CSE reste d'ordre éthique. Les lois d'éthique de 2004 et 2011 interdisent les activités de recherche sur l'embryon humain, ce qui limite l'utilisation de ces cellules en ingénierie tissulaire.

2.2.2 Les cellules souches fœtales

Les cellules souches d'origine fœtales peuvent être extraites de la gelée de Wartthorn 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 (Baksh *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2004) Ces cellules sont moins utilisées dans l'ingénierie tissulaire, elles nécessitent d'être mieux caractérisées. En effet, Wang *et al.*, ont comparé la différenciation de ces cellules avec des CSM 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)

2.3 Les cellules souches adultes (CSa)

Ces cellules se retrouvent dans les tissus adultes humains où elles participent au maintien d'un organe ou d'un tissu dans un état physiologique. Cela se fait grâce à leur capacité à se multiplier à l'identique et à se différencier pour acquérir les caractéristiques du tissu à réparer. Les CS dans la moelle osseuse répondant à cette définition sont donc considérées comme CSa. Elles sont multipotentes.

Il existe deux types de cellules souches adultes dans la moelle osseuse : les cellules souches mésenchymateuses CSM et les cellules souches hématopoïétiques CSH. Nous allons nous concentrer sur les cellules souches mésenchymateuses qui font l'objet de la présente étude.

2.3.1 Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules souches tissulaires, adultes, multipotentes à l'origine des lignages ostéoblastiques, chondroblastiques, adipocytaires stromales et tendinoblastiques. De façon plus contestée, elles donneraient également naissance aux cellules musculaires striées squelettiques et cardiaques (figure 6) (Pittenger *et al.*, 1999) voire à des cellules d'origine non mésodermique, tels que les hépatocytes ou les cellules neurales (Caplan, 1991; Pittenger *et al.*, 1999)

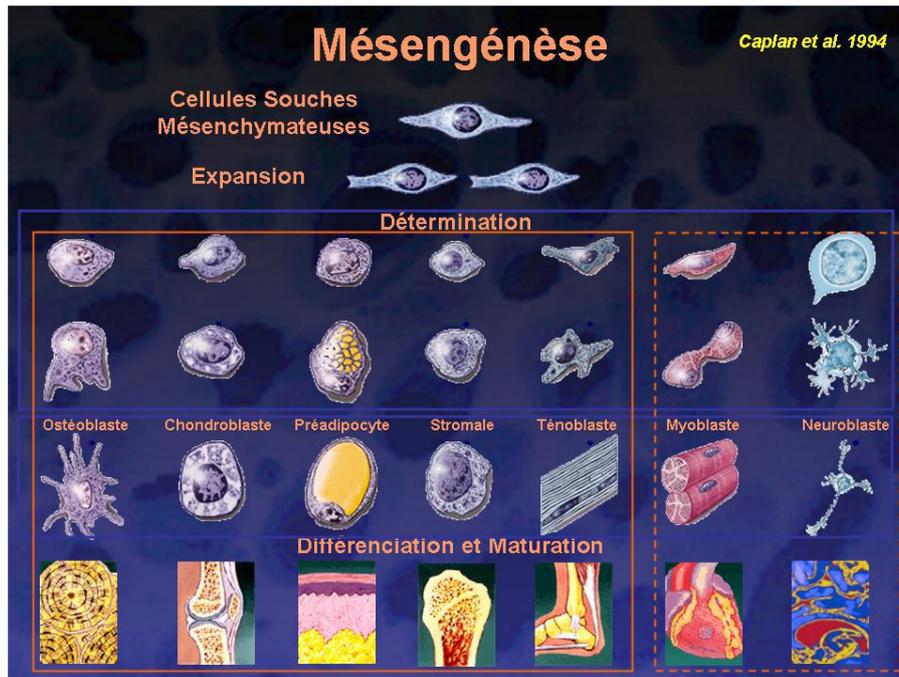


Figure 6: Mésengénèse

2.3.2 Identification et localisation des CSM

Les CSM ont été identifiées et isolées pour la première fois à partir de la moelle osseuse par l'équipe de Friedenstein (Friedenstein *et al.*, 1976). En cultivant des cellules stromales issues de la moelle osseuse de rongeurs ou de lapins, il a été observé l'apparition de colonies de cellules adhérentes au plastique et d'apparence fibroblastique. De plus, il a été montré que ces colonies étaient des clones provenant d'une cellule, la Colony-Forming Unit-Fibroblasts (CFU-F) et pouvaient se différencier en ostéoblastes. Par la suite, de nouvelles études ont révélé que ces cellules possédaient un pouvoir d'autorenouvellement et de différenciation important, caractéristique des cellules souches (Owen, 1988); (Friedenstein *et al.*, 1987); (Ashton *et al.*, 1980). Caplan a donné le nom de CSM à ces cellules en 1991, pour caractériser cette population non homogène de cellules à l'origine notamment du stroma médullaire, de l'os, du cartilage et des fibroblastes (Caplan, 1991).

Les CSM sont plus nombreuses au sein de la moelle osseuse, elles participent à la création du microenvironnement nécessaire à l'hématopoïèse. Elles sont dix fois moins abondantes que les cellules souches hématopoïétiques (Pittenger *et al.*, 1999).

Trois autres types de cellules souches ont également pu être isolés au sein de la moelle osseuse : les cellules souches hématopoïétiques à l'origine des cellules de la lignée sanguine, les MAPCs (Multipotent Adult Progenitor Cells) et les cellules progénitrices endothéliales (figure 7).

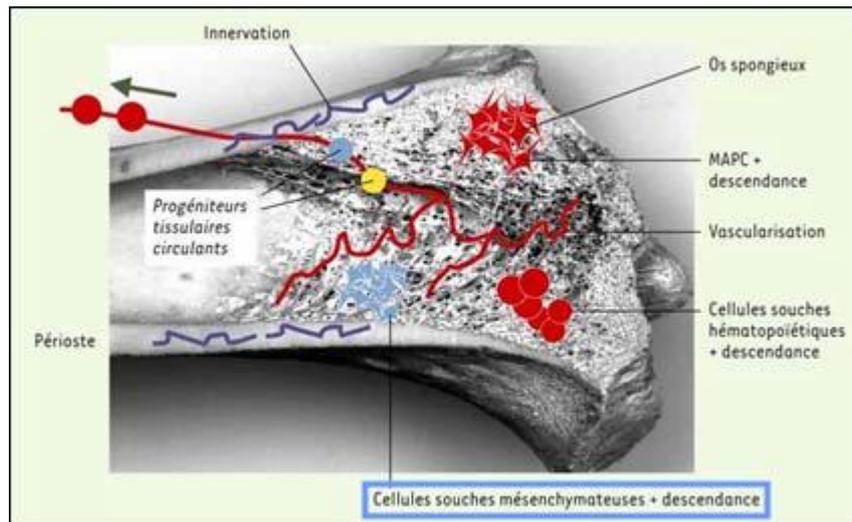


Figure 7: Moelle osseuse et cellules souches (Coulombel, 2003)

D'autres études montrent que les CSM peuvent aussi être isolées à partir d'autres tissus comme le tissu adipeux (Zuk *et al.*, 2002), le placenta (In 't Anker *et al.*, 2004), le cordon ombilical (Bieback and Kluter, 2007), gelée de Wharton (Margossian *et al.*, 2012), les tendons (Salingarnboriboon *et al.*, 2003), les muscles (Zhang *et al.*, 2003), le cartilage (Alsalameh *et al.*, 2004) ou le sang menstruel (Musina *et al.*, 2008)

2.3.3 Phénotype des CSM

Les CSM sont des cellules d'apparence fibroblastique qui présentent de nombreux antigènes de surface. La caractérisation précise des CSM n'est pourtant pas évidente puisque plusieurs de ces épitopes sont également portés par les cellules souches hématopoïétiques et les cellules issues de la lignée mésodermique. De plus, il a été montré que les CSM de différentes espèces n'expriment pas toujours les mêmes antigènes. Le comité de l'ISCT (International Society for Cellular Therapy) a proposé des standards de caractérisation des CSM (Dominici *et al.*, 2006).

Cette définition des CSM comprend :

- L'adhérence cellulaire au plastique dans des conditions de culture standards,
- Un phénotype cellulaire défini en cytométrie de flux par un panel d'antigènes de surface dont l'expression est positive et un panel d'antigènes dont l'expression est négative (tableau 1).

Tableau 1: Caractérisation des CSM par immunomarquage en cytométrie de flux

Antigènes exprimés par les CSM	Antigènes non exprimés par les CSM
CD13, CD29, CD44, CD49, CD51, CD54, CD58, CD71, CD73, CD90, CD102, CD105, CD106, CDw119, CD120a, CD120b, CD123, CD124, CD126, CD127, CD140a, CD166, P75, TGFβIR, TGFβIIR, HLA-A, B, C, SSEA-3, SSEA-4, D7, CD271.	CD3, CD4, CD6, CD9, CD10, CD11a, CD14, CD15, CD18, CD21, CD25, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD50, CD62E,L,S, CD80, CD86, CD95, CD117, CD133, SSEA-1, HLA-DR

- un potentiel de différenciation multipotent *in vitro* dans des conditions standards et vers les trois voies mésenchymateuses : ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes.

2.3.4 Différenciation des CSM en chondrocytes

Le développement du squelette est défini par plusieurs étapes qui impliquent : le recrutement des CSM et leur migration, la condensation des progéniteurs, la différenciation et la maturation des chondrocytes aboutissant à la formation du cartilage puis de l'os suite à l'ossification endochondrale (Goldring *et al.*, 2006).

La chondrogenèse débute par la condensation de cellules mésenchymateuses grâce à des facteurs paracrines tels que le FGF (Fibroblast Growth Factor), (figure 8). 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 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.

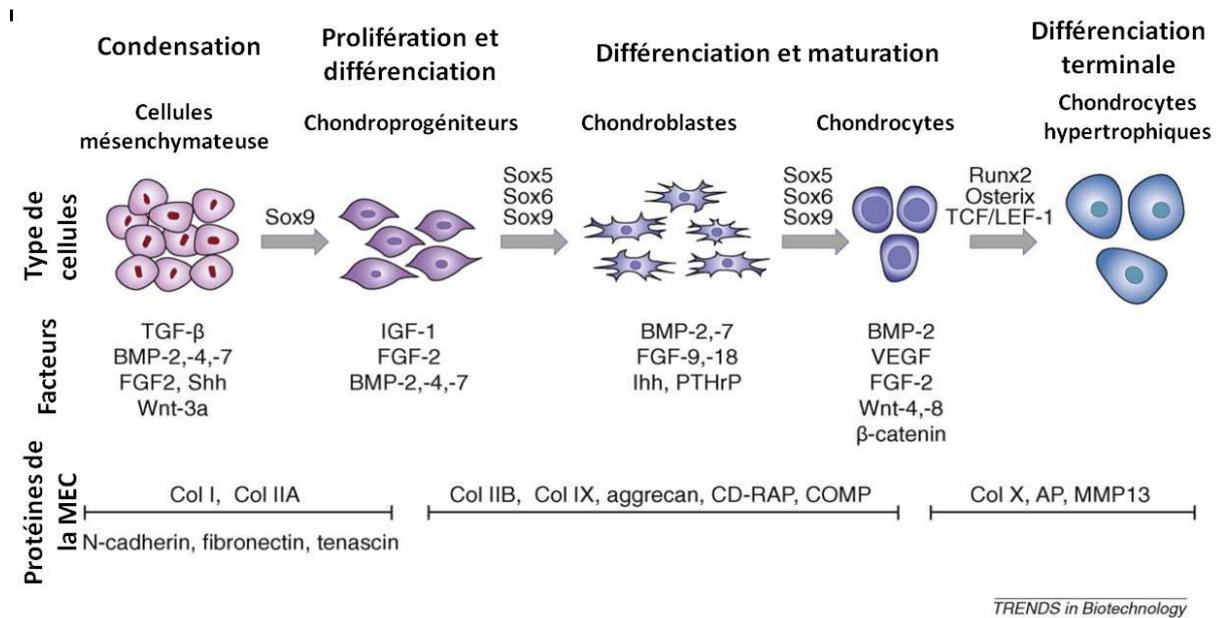


Figure 8: Différenciation terminale des cellules mésenchymateuses vers le chondrocyte

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, aggrecanne), 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. Les biomatériaux

3.1 Définition d'un biomatériau

La Conférence de Chester de la Société Européenne des Biomateriaux, dite conférence du consensus a, en 1986 puis en 1991 retenu la définition suivante pour les biomatériaux : "matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques"(Williams, 1991).

Au-delà de toute définition formelle, la notion des biomatériaux réside dans la nécessaire prise en compte du contact de ces matériaux avec des tissus ou cellules vivantes.

Après introduction dans l'organisme, un biomatériau, quelle que soit sa qualité, reste un corps étranger qui entraîne une réaction plus ou moins importante du tissu environnant. D'où la notion de **biocompatibilité** selon laquelle le matériau ne doit pas induire de repos inflammatoire et ne doit pas présenter de toxicité vis-à-vis le tissu biologique.

Il faut également prendre en compte la **durée du contact** avec les tissus vivants, même si cette durée peut varier beaucoup suivant les cas. Pour que l'on puisse parler de biomatériaux, on admet généralement que le contact avec le vivant doit dépasser quelques heures.

3.2 Différents types de biomatériaux

Les biomatériaux peuvent être divisés en quatre catégories:

- Les métaux et alliages métalliques
- Les céramiques au sens large
- Les polymères et la matière molle
- Les matériaux d'origine naturelle

3.2.1 Les métaux et alliages métalliques

Ce sont en quelque sorte les "ancêtres" des biomatériaux puisque ce sont les premiers à avoir été utilisés pour faire des implants.

Le plus important par les volumes est sans doute l'acier inoxydable, largement utilisé en chirurgie orthopédique. L'intérêt de l'acier inoxydable dans ce domaine réside dans ses propriétés mécaniques. Il faut également mentionner particulièrement le titane, qui est utilisé principalement en chirurgie orthopédique et pour réaliser des implants dentaires. On le trouve également dans les stimulateurs cardiaques et les pompes implantables. L'un des avantages principaux du titane est sa bonne biocompatibilité : l'os adhère spontanément au titane. Les alliages à mémoire de forme sont une variante intéressante de cette catégorie. On utilise également des alliages cobalt, chrome, molybdène, tantale, etc.

3.2.2 Les céramiques

Les céramiques se caractérisent par une température de fusion élevée et un comportement fragile, qui déterminent leurs domaines d'application.

Elles incluent des oxydes, des sulfures, des borures, des nitrures, des carbures, des composés intermétalliques, ...

Dans le domaine des biomatériaux, on rencontre principalement l'alumine et la zircone utilisées dans les têtes de prothèses de hanche, ainsi qu'en odontologie pour les implants dentaires.

Il faut signaler aussi l'utilisation et le développement d'une céramique à base de phosphate de calcium : **l'hydroxyapatite (HAP)**.

-Hydroxyapatite (HAP) : est un minéral dont la formule chimique est $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Ce composé est naturellement présent dans le tissu osseux. C'est le principal composant de l'émail dentaire, de la dentine et de l'os. Très utilisé dans l'ingénierie de l'os, il possède une excellente biocompatibilité et bioactivité et améliore les propriétés mécaniques des matrices (Lee *et al.*, 2010).

3.2.3 Les polymères et autres matières molles

Les utilisations de polymères dans le domaine des biomatériaux sont extrêmement nombreuses. Le tableau 2 en fournit un résumé des principales catégories de polymères ainsi que leur utilisation :

Tableau 2: Famille de polymères et leur utilisation

Famille de polymers	Utilisation
Elastomères : Caoutchoucs naturels, silicones	Ventricules artificiels, lentilles de contact, Encapsulation cardiaques.
Polyesters : Poly (téréphtalate d'éthylène), Polyesters insaturés UP, Polycarbonate PC	Greffes vasculaires, matériel prothétique.
Cellulosiques : Acétate de cellulose CA, Acétobutyrate de cellulose	Montures de lunettes.
Polyépoxydes	Montures de lunettes, stimulateurs cardiaques, matériel d'assistance.
Polyéthers : Poly (oxyméthylène) POM, Poly (oxyphénylène) PPO	Valves cardiaques.

3.2.4 Matériaux d'origine naturelle

Le souci de biocompatibilité a orienté les chercheurs vers des matériaux logiquement biocompatibles puisque d'origine naturelle. Ils se distinguent en biomatériaux d'origine végétale et biomatériaux d'origine animale. Les tableaux 3 et 4 montrent des exemples de chacun de ces biomatériaux et leurs utilisations.

Tableau 3: Exemples de biomatériaux d'origine végétale

Biomatériaux d'origine végétale	Utilisation
Les fucanes : polysaccharides extraits des algues marines.	Anticoagulants, anti complémentaires.
La cellulose : dérivée des parois cellulaires.	Utilisée pour les membranes de dialyse ou comme ciment de prothèse de hanche.
Les dextrans : préparés par transformation de saccharose par des bactéries.	Agroalimentaire.
Les alginates de sodium	Ingénierie tissulaire, agroalimentaire.

Tableau 4: Exemples de biomatériaux d'origine animale

Biomatériaux d'origine animale	Utilisation
La chitine : polysaccharide extrait des carapaces de crustacés.	Utilisée pour les fils de suture, la chirurgie reconstructive et la peau artificielle.
Le corail : extrait des madréporaires.	Utilisé en chirurgie orthopédie et maxillo-faciale.
Le collagène : extrait de la peau ou du placenta humain	- la cosmétologie et la chirurgie esthétique - les pansements et éponges homéostatiques - les implants oculaires et pansements ophtalmologiques - la reconstitution de tissus moux et durs à l'aide de mélanges collagène-facteurs de croissance-hydroxyapatite

3.2.4.1 Collagène de type I

Le collagène de type I est une protéine ubiquitaire dans l'organisme et constitue 90% de la matrice organique de l'os. Elle est également très répandue dans le règne animal, les

homologies de séquences entre espèces de mammifères sont fortes (Boot-Handford and Tuckwell, 2003) ce qui rend cette protéine faiblement immunogène (Lynn *et al.*, 2004)

Les matériaux à base de collagène sont cependant très faiblement utilisés pour la reconstruction osseuse (Giannoudis and Pountos, 2005). Ils sont décrits comme ayant des propriétés mécaniques faibles et, à ce titre, non compatibles avec les exigences du tissu osseux (tableau 5).

Tableau 5: Avantages et inconvénients de l'utilisation du collagène pour l'ingénierie tissulaire (Lee *et al.*, 2001)

Avantages

- Disponible et facile à purifier à partir des organismes vivants (constitue 90% de la matrice organiques de l'os).
- Faiblement immunogène.
- Biodégradable.
- Non toxique et biocompatible.
- Compatible avec des polymères synthétiques.
- Résistance à la traction.
- Favorise la coagulation du sang.

Inconvénients

- Coûts élevés de la purification.
- Variabilité de l'isolation du collagène
- Manipulation complexe
- Minéralisation

Les matériaux à base de collagène pour la reconstruction tissulaire se présentent essentiellement sous la forme de solutions acido solubles lyophilisées connues sous le nom d'éponges de collagène. Ces matériaux ont de très bons résultats pour la reconstruction de peau (derme et épiderme) chez les grands brûlés mais restent largement cantonnés aux rôles de compresses hémostatiques ou de transporteurs de molécules favorisant la réparation de défauts osseux de taille réduite (Geiger *et al.*, 2003) ou comme adjuvant associé aux thérapies des défauts plus larges (Kuklo *et al.*, 2008).

Le collagène est également formulé en hydrogels faiblement concentrés qui sont utilisés comme supports tridimensionnels pour la culture de cellules *in vitro* (Grinnell, 2003) mais comme avec les éponges, leurs faibles propriétés mécaniques limitent leur utilisation dans la reconstruction de l'os (Mizuno *et al.*, 1998).

L'origine naturelle de ces polymères les rendent disponibles en grande quantité et à moindre coût. Cependant des réserves sont émises par les autorités sanitaires quant aux agents pathogènes qu'ils peuvent transporter (virus, prions...) et leur fragilité quant aux procédés de stérilisation (O'Grady and Bordon, 2003). Le développement de molécules biologiques fournies par le génie génétique pourrait limiter les risques d'infection mais augmenterait les coûts de production.

3.2.4.2 Alginate de sodium

Les alginates représentent l'ensemble des polysaccharides appartenant à la famille des copolymères constitués des résidus de l'acide D-mannuronique et de l'acide L-guluronique, dans des proportions et des arrangements séquentiels différents. L'alginate de sodium est un polysaccharide linéaire, polyanionique, naturel, extrait des algues brunes.

Au niveau industriel, il est essentiellement issu de certaines espèces d'algues brunes : *Macrocystis pyrifera* aux Etats-Unis, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* ou encore *Ascophyllum nodosum* en Europe. L'alginate est le polysaccharide le plus abondant de ces organismes, constituant plus de 40% de leur poids sec.



Figure 9: De gauche à droite : *Macrocystis pyrifera* (a), *Laminaria hyperborea* (b) et *Laminaria digitaria* (c)

(Illustrations : sites internet *oceanlight*, *lebrusc*, *sb-roscoff*)

Des bactéries telles que la bactérie aérobique fixatrice d'azote *Azotobacter vinelandii* et la bactérie pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* produisent également de l'alginate.

Cependant, seules les bactéries *A. vinelandii* produisent des alginates présentant des structures de type copolymères en blocs. Généralement, le prix de l'alginate issu des algues brunes est inférieur à celui d'origine bactérienne mais la production du premier est soumise

aux conditions climatiques et à la pollution, c'est pourquoi la commercialisation d'alginate bactérien issu d'*A. vinelandii* se développe (Saude *et al.*, 2001). Par ailleurs, certaines applications requièrent une parfaite maîtrise de la structure de la chaîne polymère, qui a été rendue possible par les récents progrès en génomique sur les bactéries *A. vinelandii* (Ertesvag *et al.*, 1998a).

A. Composition chimique de l'alginate

L'acide alginique est un polysaccharide constitué de deux unités acides uroniques (Martinsen *et al.*, 1989) : l'acide D-mannuronique (M) et son épimère en C5, l'acide L-gulonique (G) liés par des liaisons glycosidiques α -(1-4) et β -(1-4), selon un enchaînement régulier de trois types de blocs (Ertesvag *et al.*, 1998b): figure 10.

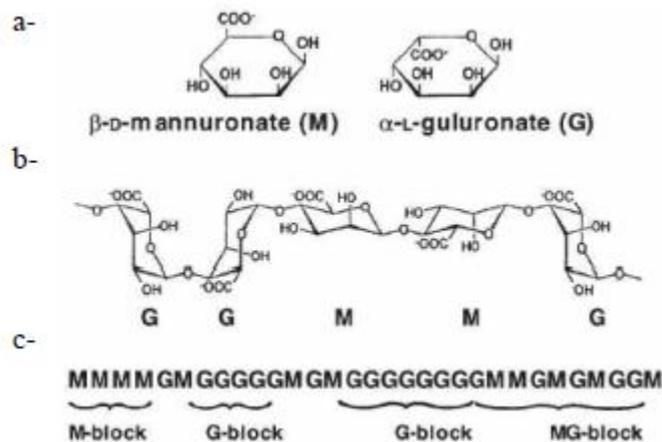


Figure 10: a) monomères mannuronate M et guluronate G ; b) poly-guluronate GG et polymannuronate MM; c) exemple d'enchaînement des blocs GG, blocs MM ou blocs alternés MG dans une chaîne d'alginate (Jorgensen *et al.*, 2007)

- 1-Blocs homopolymères de résidus d'acide mannuronique, notés –M-M-M-
- 2-Blocs homopolymères de résidus d'acide guluronique, notés –G-G-G-
- 3-Blocs de résidus d'acides mannuronique et guluronique, notés –M-G-M-G-

La présence et la teneur en unités uroniques sont déterminées par l'origine des algues dont l'alginate est extrait (Saude *et al.*, 2001). Le ratio M/G peut être modifié par un traitement à l'épimérase (Haug and Larsen, 1971).

B. Formation d'hydrogel d'alginate : techniques de gélification

L'alginate est un polysaccharide chargé négativement, ayant la capacité de former un hydrogel en présence de cations divalents ou trivalents. Cette méthode de gélification, met en jeu des interactions entre les charges des cations et les fonctions carboxylates portées par les monomères M ou G des chaînes d'alginate. Généralement, le cation divalent le plus souvent utilisé pour la gélification de l'alginate est le chlorure de calcium qui est très soluble dans l'eau et qui offre une bonne disponibilité des ions calcium. Il a été montré que 90% des ions sodium contenus dans une solution d'alginate de sodium peuvent être facilement déplacés par des ions calcium (Seely and Hart, 1974). Cette gélification est induite par un processus dans lequel sont impliqués les blocs de résidus guluroniques (poly-G). Un réseau tridimensionnel se forme, du fait des enchaînements réguliers de type « egg-box » reliés entre eux par des segments poly-M ou poly-M-G- (figure 11).

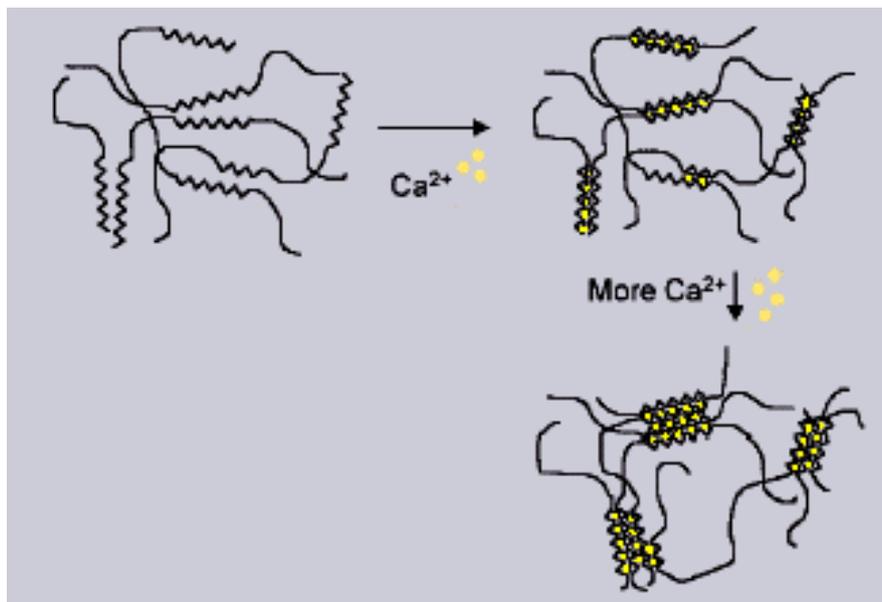


Figure 11 : Représentation schématique de la formation d'egg-box
(illustration : site internetfmcbiopolymers)

Deux types de mécanismes de gélification sont possibles : la gélification par diffusion ou par dialyse et la gélification interne (Neiser, 1999).

Dans le cas de la gélification par diffusion, les ions calcium diffusent au sein de la solution d'alginate ou bien à travers une membrane à dialyse (cette dernière voie est notamment appliquée pour la mise en forme de gels de plus grande taille). La gélification par diffusion est utilisée pour l'obtention de billes, fibres et films d'alginate, lorsque le gel est

employé dans l'immobilisation cellulaire ou dans des applications liées à la restructuration des aliments.

La gélification interne est, quant à elle, fréquemment employée dans l'industrie alimentaire ou pour la réalisation de milieux de culture de cellules végétales. Une forme inactive de l'ion calcium est mélangée à la solution d'alginate, ainsi qu'un agent retardateur à partir duquel la libération d'ions H⁺ conduit à l'activation du cation chélatant au sein même du mélange de polymère, d'où l'appellation gélification interne (Draget *et al.*, 1997).

3.2.4.3 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, et joue un rôle important dans la résistance à la compression du cartilage en permettant la fixation de protéoglycannes. 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 and Loeser, 2002). Il est souvent utilisé comme un adjuvant à un autre biomatériau.

3.3 Propriétés mécaniques des biomatériaux

3.3.1 Propriétés mécaniques des substrats synthétiques

Les substrats synthétiques offrent de plus grandes possibilités d'étudier la réponse cellulaire dans des conditions mécaniques contrôlées. Notamment, l'élasticité du substrat qui est l'un des paramètres mécaniques qui influencent la réponse cellulaire. L'exemple de biomatériau synthétique le plus utilisé pour étudier une réponse cellulaire : les gels de polyacrylamide (PA). L'une des principales propriétés des gels PA consiste en leur rigidité contrôlée de manière linéaire en faisant varier la fraction de bisacrylamide dimérique (agent réticulant des chaînes de PA) tout en maintenant constante la concentration en polymère. Les gels de PA présentent ainsi l'avantage de séparer la contribution de chimie de surface par les cellules, de la contribution correspondante aux signaux mécaniques (Engler *et al.*, 2006) (tableau 6).

Le tableau ci-dessous donne les élasticités de substrats naturels ou synthétiques :

Tableau 6: Elasticités de substrats naturels ou synthétiques

Matériel	Origine	Elasticité (KPa)
Polyacrylamide (PA)	Synthétique	0.1-100
PDMS	Synthétique	10-1000
Collagène	Naturelle	0.001-1
Fibronectine	Naturelle	0.001-1
Martigel	Naturelle	≤1
Alginate	Naturelle	0.1-150
Acide hyaluronique	Naturelle	0.1-150

3.3.2 Propriétés mécaniques des substrats naturels

Des substrats naturels ont été conçus pour étudier *in vitro* diverses réponses cellulaires dans des contextes plus physiologiques. Par exemple des matrices extracellulaires fabriquées ou modifiées à partir d'alginate, de fibrine, de fibronectine, de fibronogène, de collagène, ou un mélange connu sous le nom de Martigel (composé de collagène, de laminine et de facteurs de croissance) peuvent fournir des conditions de culture proches de l'élasticité physiologique (Wells, 2008).

Alginate de sodium

Les propriétés mécaniques de l'alginate peuvent être influencées par plusieurs facteurs. La rapport G/M, la concentration de l'alginate ainsi que les cations bivalents (Ca²⁺, Br²⁺, Sr²⁺..) utilisés pour la gélification de ce biomatériau (Kuo and Ma, 2001; Rowley *et al.*, 1999).

Le tableau suivant récapitule les études effectuées sur les propriétés mécaniques de l'alginate.

Tableau 7: Les différentes études effectuées sur les propriétés mécaniques de l'alginate

Références	Type d'alginate	Autres composants	Méthode utilisée pour mesurer les propriétés mécaniques	Résultats
(Edwards-Levy and Levy, 1999)	Alginate (Manuacol DH) à 1% Propylène glycol alginate (PGA) à 2%	CaC ₂ à 10%, NaOH, HSA à 5%	Compression à une vitesse de 1mm/s	La déformation à rupture améliore en fonction de la concentration de NaOH.
(Kuo and Ma, 2001)	Alginate hight viscosité	CaCl ₂ .2H ₂ O, CaCo ₃ , Caso ₄ . 2H ₂ O,GDL	Compression uniaxiale à une de vitesse 4,8mm/min	Le module de compression augmente en fonction de la concentration d'alginate, calcium, poids moléculaire d'alginate et taux d'acide guluronique dans l'alginate.
(Banerjee <i>et al.</i> , 2009)	Alginate de sodium	2 aminoethyl méthacrylate.	Compression uniaxial à une vitesse de déformation de 5%/s	Diminution de l'élasticité à 86% après 3 semaines de culture.

(Russo <i>et al.</i> , 2010)	Films d'alginate de sodium	Hydroxyethylcellulose (HEC) Polyglycérol (PG)	Extension à une vitesse de 2mm/min pour déterminer le module de young et 10mm/min pour déterminer les courbes contrainte/déformation	L'ajout de polyglycérol entraîne la diminution du module de young et la contrainte.
(Chan <i>et al.</i> , 2011)	Manugel GHB Manucol DH Concentration : 5 à 50 g/L	CaCl ₂ , BaCl ₂ , AlCl ₃ , CuCl ₂ , SrCl ₂ , KCl, LiCl, NH ₄ Cl	Compression uniaxiale, déformation à 60%, à une vitesse de 40mm/min.	Les billes d'alginate avec un taux élevé d'acide guluronique et des cations à grande affinité chimique sont plus élastiques. L'augmentation de la concentration d'alginate et des ions a le même effet.

4. Influence de la matrice de culture sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses

L'élaboration de biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire est confrontée à la grande complexité de l'environnement extracellulaire naturel. La matrice extracellulaire naturelle est un réseau très complexe composée des fibres et des espaces contenant de nombreux signaux biochimiques, tels que les facteurs solubles d'une grande diversité chimique. Cet environnement comprend également une grande variabilité de propriétés physiques ; comme la topographie, l'élasticité ou la rigidité (figure 12).

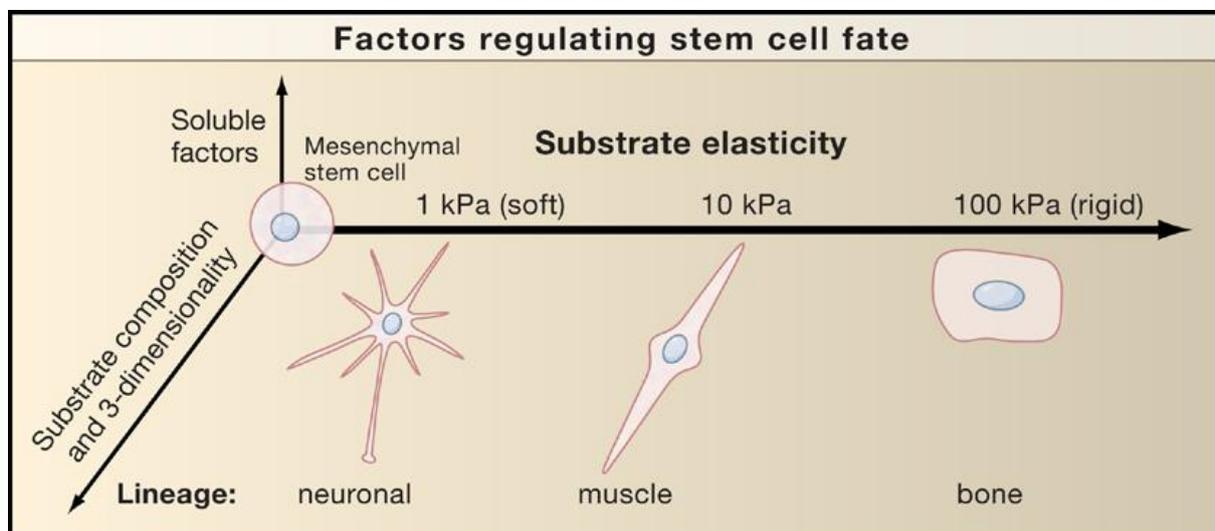


Figure 12: Facteurs régulant la différenciation cellulaire (Even-Ram *et al.*, 2006)

Un défi majeur dans la recherche sur les cellules souches est de pouvoir diriger la différenciation cellulaire vers un phénotype particulier. Engler *et al.*, 2006 ont identifié un nouveau facteur de régulation de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines : l'élasticité de la matrice. En changeant la rigidité du substrat, les CSM humaines peuvent se différencier vers des lignées neuronales, musculaires ou bien osseuses (Engler *et al.*, 2006).

Plusieurs facteurs environnementaux contribuent au contrôle de l'activité des cellules souches. Les données récentes se concentrent sur l'influence de la matrice extracellulaire

(MEC), en particulier, les interactions physiques avec les cellules telles que : la forme de la cellule, la topographie de la matrice extracellulaire, les propriétés mécaniques de MEC.

4.1 Forme de la cellule

La forme des cellules joue un rôle de régulateur puissant dans la prolifération cellulaire, la physiologie des cellules (Folkman and Moscona, 1978), ainsi que le développement embryonnaire et la différenciation des cellules souches. Manaseket *et al.*, 1972 ont montré que le changement de la forme des cellules est impliqué dans la régulation de développement du myocarde. En 1991, Ingber a montré que le changement de la forme des cellules endothéliales induit par la matrice extracellulaire (MEC), a un effet sur la prolifération et la différenciation de ses cellules (Ingber, 1991). Pour ce qui concerne les cellules souches (CS), un certain nombre d'études a montré que le destin des cellules souches peut être influencé grâce à un contrôle de leur forme par la MEC. En plus du contrôle physique de la forme, les interactions entre de nombreux facteurs extrinsèques et intrinsèques qui influencent la forme des cellules sont variées et complexes et peuvent impliquer à long terme les interactions avec le microenvironnement cellulaire, ainsi que des changements plus aigus dus à des facteurs physiques tels que le stress mécanique ou osmotique ((Ingber, 2004);(Lecuit and Lenne, 2007);(McBride and Knothe Tate, 2008)) (figure 13).

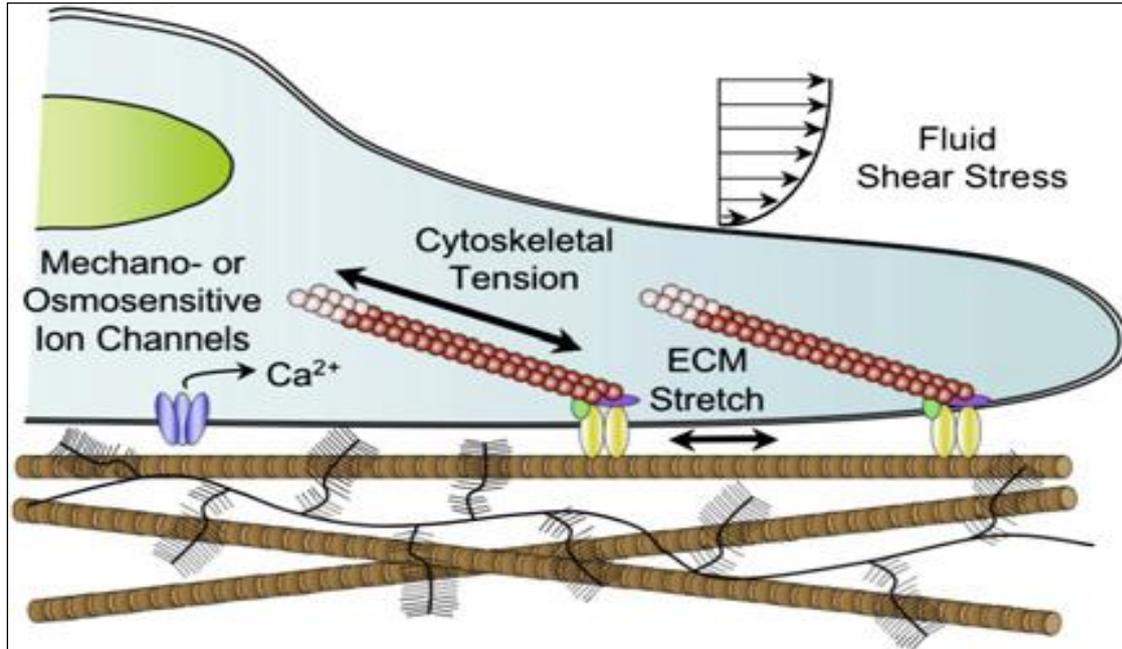


Figure 13: Régulation du comportement des cellules souches par des facteurs mécaniques

Au cours du développement, les CS peuvent être exposées à une variété de signaux physiques (compression, cisaillement, contraintes osmotiques liés à des interactions biomécaniques avec leur MEC).

La mise au point des systèmes de culture en 3D peut être un bon exemple de l'influence de la forme des cellules sur la différenciation. La culture des chondrocytes en 2D conduit à une dédifférenciation (un passage d'un phénotype chondrocytaire à un phénotype fibroblastique), tandis que la culture des chondrocytes en 3D soit dans des biomatériaux à base d'alginate ou d'agarose ou bien sous forme de pellets, permet la conservation du phénotype (Benya and Shaffer, 1982).

Un certain nombre d'études a montré que la différenciation des cellules souches adultes ou embryonnaires vers un phénotype chondrocytaire nécessite une forme arrondie des cellules, soit par le biais de pellets ou en utilisant un système d'encapsulation (Hoben *et al.*, 2008). En effet, la comparaison de la forme du noyau des CSM dérivées de la moelle osseuse montre que l'expression des marqueurs moléculaires de la chondrogenèse augmente dans des CSM avec des noyaux plus arrondis (McBride and Knothe Tate, 2008). De même, pour les CSM dérivées du tissu adipeux qui se différencient en chondrocytes lorsqu'elles sont cultivées en 3D dans des biomatériaux à base d'agarose ou d'alginate, et cela grâce au maintien de la forme arrondie dans ces systèmes. Cependant, ces cellules présentent un phénotype fibrochondrogénique en utilisant de la fibronectine ou de la gélatine comme système d'encapsulation (Awad *et al.*, 2004).

Les cellules souches embryonnaires murines cultivées en 3D dans des hydrogels de polyéthylèneglycol, expriment plus les marqueurs du cartilage par rapport à un système de culture en monocouche. L'influence de la culture des CSM en 3D peut être modifiée par la présence du facteur de croissance TGF β 1, ou par des interactions entre les récepteurs de surface cellulaire et les molécules de la MEC (Hwang *et al.*, 2006).

4.1 L'élasticité de la matrice extracellulaire

En plus de l'influence de la matrice extracellulaire (MEC) sur la forme des cellules, la rigidité mécanique ou l'élasticité de la MEC peuvent aussi avoir une influence sur le comportement cellulaire, tel que, la migration (Guo *et al.*, 2006), l'apoptose, et la prolifération (Hadjipanayi *et al.*, 2009).

Des études récentes ont été en mesure de tester directement l'hypothèse selon laquelle la différenciation des CSM peut être déterminée par les propriétés mécaniques de la MEC.

Des CSM ont été cultivées sur des gels de polyacrylamide de différentes élasticités. Les cellulesensemencées sur des substrats souples dont les propriétés mécaniques proches du tissu cérébral, expriment le facteur de transcription $\beta 3$ tubuline, et cellesensemencées sur des substrats dont l'élasticité est proche du tissu osseux expriment le facteur de transcription $CBF\alpha 1$ (Engler *et al.*, 2006).

De même Saha *et al.*, 2008 ont montré que la rigidité de la MEC a un effet sur la différenciation des cellules souches neuronales, en utilisant un système de culture synthétique avec une élasticité qui varie entre 10 et 10000 Pa. L'allongement cellulaire et la différenciation ont été inhibées sur les substrats souples (10Pa), alors que ces cellules se multiplient sur des substrats avec une élasticité de 100 Pa ou plus.

Dans d'autres études, il a été constaté que les CSM humaines pourraient être maintenues au repos en les cultivant sur des substrats de polyacrylamide qui ont les mêmes propriétés mécaniques que la moelle (Winer *et al.*, 2009). Les CSMensemencées à faible densité sur ces gels restent en repos et pourraient être amenées à entrer dans le cycle cellulaire une fois cultivées sur un substrat rigide. Ces cellules pourraient aussi entrer dans des voies de différenciation adipogéniques ou ostéogéniques, lorsqu'elles sont cultivées dans le milieu de différenciation approprié, ce qui montre que la MEC souple proche de l'élasticité de la moelle peut maintenir les CSM dans un état de repos, tout en préservant leur potentiel de différenciation. Cette étude montre que l'élasticité de la MEC peut servir comme un facteur dans la niche de la moelle osseuse pour maintenir les cellules souches mésenchymateuses pendant une longue durée (Winer *et al.*, 2009).

Une mise en garde sur ces études est le fait que de nombreux tissus peuvent avoir des élasticités semblables, et donc, il peut ne pas être possible de définir une différenciation unique des cellules souches par un ensemble unique de propriétés mécaniques. Ce point souligne en outre la complexité potentielle des interactions entre les propriétés intrinsèques et extrinsèques des cellules souches et de leur environnement dans la détermination de leur destin (Watt and Hogan, 2000).

4.2 La topographie de la matrice extracellulaire

Comme indiqué précédemment, la forme des cellules peut être un puissant régulateur de la croissance et de la différenciation. En plus des changements macroscopiques dans la forme des cellules, ces dernières ont la capacité de détecter les indices géométriques de leur microenvironnement. Ces indices peuvent représenter des différences dans la conformation

moléculaire, la topographie de la surface ou la rugosité, ou d'autres paramètres. La croissance des neurites issues de la différenciation neurogéniques des cellules souches a été significativement améliorée, lorsque ces cellules sont cultivées dans des matrices poreuses de polystyrène en 3D, par rapport à la culture sur une surface plane (Hayman *et al.*, 2005). Ces résultats montrent que la topographie en 3D du substrat et la composition de la matrice peuvent faciliter la différenciation neuronale et l'alignement des neurites.

Des cellules progénitrices neuronales semblent avoir des réponses similaires à des fibres électrofilées avec des propriétés nanométriques déterminées. Des cellules souches neuronales adultes du rat ont été cultivées sur des maillages électrofilées de laminine revêtus de fibres de polyéthersulfure, allant de 283 nm à 1452 nm de diamètre, la prolifération et la différenciation de ces cellules dépendent de manière significative du diamètre des fibres du substrat utilisé (Christopherson *et al.*, 2009).

Les mécanismes par lesquels les indices topographiques influencent la prolifération et la différenciation des cellules souches ne sont pas bien étudiés, mais semblent impliquer des changements dans l'organisation du cytosquelette, ainsi, les changements de la taille de la MEC peuvent influencer sur le regroupement des intégrines et autres molécules d'adhésion cellulaire, ce qui modifie le nombre et la distribution des adhésions focales (figure 14 A).

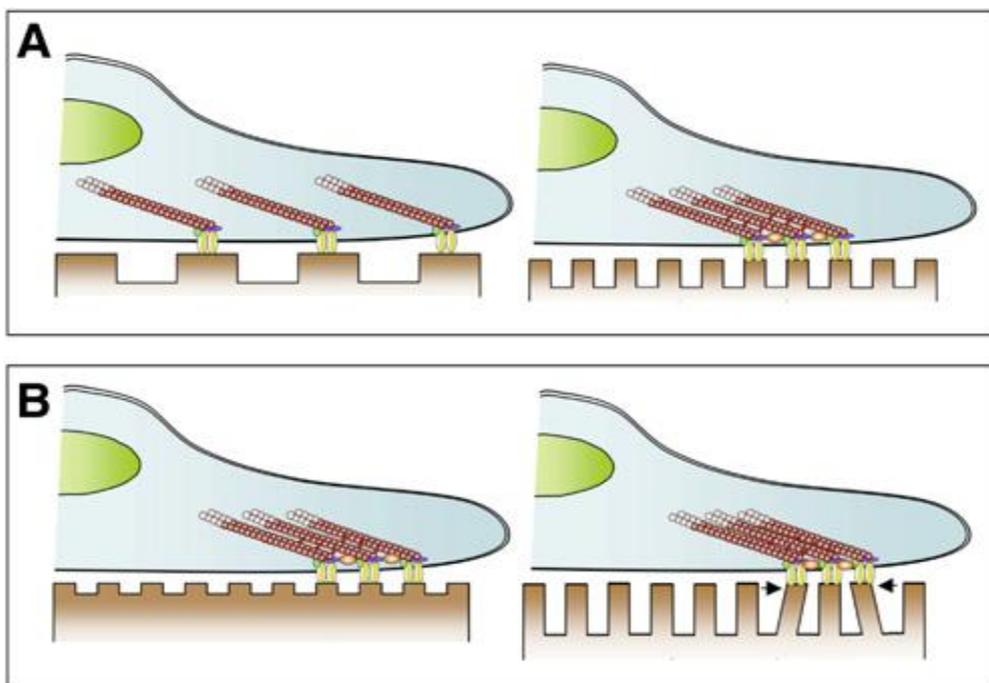


Figure 14: L'influence de la topographie du MEC sur les cellules souches
(Christopherson *et al.*, 2009)

La géométrie et la taille de la MEC peuvent avoir des effets sur un certain nombre de propriétés cellulaires, telles que l'attachement / adhésion, la migration et la prolifération.

Des études ont montré que l'espacement précis entre les îles d'adhésion sur un substrat peut moduler le regroupement d'intégrines, l'adhésion focale et l'organisation des fibres d'actine et par conséquent le contrôle de l'adhésion et l'étalement des cellules (Arnold *et al.*, 2004). Ainsi, il a été établi que les caractéristiques topographiques de la MEC modifient la morphologie et la prolifération des cellules souches embryonnaires humaines par le biais du cytosquelette. Le polydiméthylsiloxane (PDMS) avec caillebotis de 600 nm d'espacement a été trouvé pour induire l'alignement et l'allongement des cellules souches embryonnaires (Gerecht *et al.*, 2007).

Cette étude a permis de montrer que les indices topographiques modifient l'organisation de divers composants du cytosquelette, y compris les F-actine, vimentine, γ -tubuline, α -tubuline. L'influence de la topographie de la MEC peut être médiée par des effets secondaires tels que, les altérations de l'élasticité du substrat perçue par la cellule (figure 14 B) ou les différences dans l'adsorption des protéines causées par caractéristiques structurales de la MEC.

Le tableau suivant (tableau 8) récapitule les travaux effectués sur l'effet de la matrice extracellulaire (MEC) sur le comportement des cellules souches selon le type de biomatériaux étudié et le type de cellules. Ceci permettra de mettre en évidence les différences et les similitudes des résultats obtenus sur cette étude.

Tableau 8: Les différents effets de la matrice extracellulaire sur le comportement des cellules souches

Références	Type de biomatériaux	Type de cellules	Résultats
(Engler <i>et al.</i> , 2006)	Hydrogels de polyacrylamide	Cellules souches mésenchymateuses humaines	<ul style="list-style-type: none"> - Les cellules cultivées sur des substrats à élasticité proche du tissu cérébral expriment le facteur de transcription $\beta 3$ tubuline. - Les cellules cultivées sur des substrats à élasticité proche du tissu osseux expriment le facteur de transcription $CBF\alpha 1$.
(Wang <i>et al.</i>)	Hydrogels de gélatine –acide hydroxyphénylpropionique	Cellules souches mésenchymateuses humaines	<ul style="list-style-type: none"> - les cellules cultivées sur un hydrogel doux (600 Pa) expriment des marqueurs protéiques neurogéniques, tandis que celles cultivées sur un hydrogel rigide (12000 pa) ont montré une régulation de marqueurs protéiques myogéniques.
(Wang <i>et al.</i> , 2010)	<ul style="list-style-type: none"> - Films de chitosane - Chitosane poreux 	Cellules souches neurales murines	<ul style="list-style-type: none"> - Les cellules cultivées sur des films de chitosane se différencient en astrocytes, celles cultivées sur les multimicrotubules

	- Multimicrotubules conduits de chitosane		conduits de chitosane montrent une augmentation significative de différenciation neurogénique , tandis que le chitosane poreux promeut la différenciation vers des neuroes.
(Serpooshan <i>et al.</i> , 2010)	Hydrogels de collagène de type I	Cellules souches mésenchymateuses murines	- Différenciation différente en fonction de l'élasticité de l'hydrogel
(Zhang <i>et al.</i> , 2010)	Hydrogels de fibrine et polyéthylène glycol	Cellules souches mésenchymateuses humaines	- Les phénotypes vasculaires sont en corrélation avec les propriétés mécaniques mesurées et le diamètre des fibres des matrices de fibrine – polyéthylène glycol.

(Mooney <i>et al.</i> , 2010)	Hydrogels d'alginate	Cellules souches mésenchymateuses humaines et murines	- Changement de la morphologie des cellules en fonction de l'élasticité de biomatériau.
(Pek <i>et al.</i> , 2010)	Hydrogels de polyéthylène glycol silica	Cellules souches mésenchymateuses humaines	- Augmentation d'expression de facteurs de transcription neurogéniques, myogéniques, et ostéogéniques a été obtenue pour les gels avec un stress de liquéfaction, d'ordre de 7, 25 et 75 pa respectivement.
(Ayala <i>et al.</i> , 2011)	Hydrogels d'acrylamide + acide amino acyloyl	Cellules souches mésenchymateuses humaines	- Les propriétés interfaciales des biomatériaux jouent un rôle important dans l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire.
(Wingate <i>et al.</i> , 2012)	Hydrogels des nanofibres de polyéthylène glycol diméthacrylate	Cellules souches mésenchymateuses murines	- 95% des CSM cultivées dans des matrices avec une élasticité de 3 kPa expriment les marqueurs endothéliaux Flk-1 dans les 24 h, alors que seulement 20% de CSM cultivées sur des matrices

			<p>avec une élasticité > 8 kPa expriment ces marqueurs.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 80% de CSM cultivées dans des matrices avec une élasticité > 8 kPa expriment le marqueur du muscle lisse α-actine dans les 24 h, alors que moins de 10% de CSM cultivées dans des matrices avec une élasticité <5 kPa expriment ce marqueur.
(Shreya <i>et al.</i> , 2013)	Poly-lysine, collagène de type I et collagène de type IV supplémenté laminine	Cellules souches neuronales	<ul style="list-style-type: none"> - Une vaste différenciation gliale, et une minime différenciation neuronale pour les cellulesensemencées sur les polylysine. - La supplémentation en laminine pour le collagène I ou IV favorise la différenciation neuronale et gliale.
(Dicesare <i>et al.</i> , 2013)	Polyuréthane	Cellules souches mésenchymateuses	<ul style="list-style-type: none"> - La modification de la composition de polyuréthane a un effet sur la

		humaines	morphologie des CSM.
(Her <i>et al.</i> , 2013)	Collagène de type I poreux L'acide hyaluronique (HA)	Cellules souches mésenchymateuses humaines	- Les biomatériaux d'élasticité de 1 Kpa conduisent à une différenciation neuronale des CSM, alors que les biomatériaux d'élasticité de 10Kpa conduisent à une différenciation gliale.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Chapitre 2: Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire

Durant cette étude, les cellules utilisées sont des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) issues de la moelle osseuse.

1.1 Réactifs

- Alpha MEM Eagle (α -MEM) (réf. BE12-169F, Lonza, France)
- DMEM sans rouge de phénol (réf. 11880, Gibco, France)
- Boîte de culture ventilée, avec un bouchon à filtre (CC7682-4875, CytoOne)
- Antibiotiques :
 - Pénicilline (réf. 15070, Gibco, France) utilisée à une concentration de 10 mU/mL
 - Amphotéricine B (réf. 15290, Gibco, France) utilisée à une concentration de 2,5 μ g/mL
- L-Glutamine (réf. G7513, Sigma, France) utilisée à une concentration de 2mM
- Sérum de veau foetal (SVF, Sigma, France) décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C
- Tampon HBSS (Hank's Balanced Salts Solution) (Réf. H2387, Sigma, France) sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ stérile
- Trypsine-EDTA à 0,05% (réf. 25300, Sigma, France) diluée dans du HBSS à 0,025%.
- Phosphate Buffered Saline (PBS, réf. 14190, invitrogen, France)
- DMSO (diméthyl sulfoxyde, réf. D5879, Sigma Aldrich, France)
- Milieu de culture complet pour la culture des CSMs : α -MEM + SVF à 10%+ Glutamine + Antibiotiques
- Solution de congélation des cellules : DMSO dilué à 10% (v/v) dans du SVF
- Solution de Cristal violet (réf. HT90132, Sigma Aldrich, France)

1.2 Méthodes

1.2.1 Isolation de cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse

Dans cette étude, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) utilisées sont isolées à partir de prélèvements de moelle osseuse humaine. Celle-ci est ponctionnée sur des pièces fémorales à la suite de pose de prothèses de hanche (Professeur Mainard D., Département de Chirurgie orthopédique et traumatologique, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy) ou de ponction crête iliaque (UTCT).

Le prélèvement contient plusieurs types de cellules. 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 absence des globules rouges qui sont lysées par cette solution. Les cellules sont comptées au moyen d'une cellule de Thoma et le culot de cellules est suspendu dans le milieu de culture, puis transféré dans les boîtes de culture à la densité désirée et les cellules sont ensuite incubées en atmosphère humide à 37°C avec 5% CO₂. Après 72h de culture, le milieu de culture est changé pour la première fois afin d'enlever les débris cellulaires en suspension dans le milieu et les cellules non adhérentes à la boîte de culture.

L'entretien de la culture se fait deux fois par semaine jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire à sub-confluence (90%).

1.2.2 Comptage des cellules

Le dénombrement des cellules est réalisé à l'aide d'une chambre de Thoma (réf. A4500T, Bioblock, France). Nous mélangeons 50 μL de suspension cellulaire avec 50 μL de bleu trypan. Le bleu trypan va pénétrer et donc colorer en bleu les cellules mortes. Nous pouvons compter les cellules vivantes, non colorées, à l'intérieur du quadrillage de la chambre de Thoma. Le nombre total de cellules est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$N = n * 10^4 * fd$$

N= nombre total de cellules

n= nombre de cellules au sein de la chambre

fd= facteur de dilution

1.1.1. Comptage des CFU-Fs

Ce type de culture permet de refléter le nombre de cellules capable de générer une colonie dans un échantillon.

Pour le comptage des CFU-Fs, les cellules sont cultivées dans des boîtes de Petri de 58cm² à une densité de 100 cellules par plaque pour les passages 1,2 et 3. Le comptage des CFU-Fs dans les plaques est réalisé à l'aide d'une solution de cristal violet. Après 3 rinçages avec du PBS à 37°C, 2 mL de cristal violet sont ajoutés et les plaques sont laissées sous agitation douce pendant 15 minutes. Ensuite, les plaques sont rincées avec de l'eau distillée

jusqu'à ce que le fond des plaques devienne blanc et les colonies restent violettes. Ensuite les colonies sont comptées sur chaque boîte et un pourcentage est calculé par rapport à la densité ensemencée au début.

1.2.3 Passage et congélation des cellules

1.1.1 Passage des cellules

Lorsque les cellules de P0 (cellules ensemencées pour la première fois sur des boîtes de culture) sont arrivées à 90% de confluence, elles sont trypsinées et réensemencées. Elles sont alors au passage P1.

Les cellules sont lavées 2 fois avec du tampon HBSS afin d'éliminer tout le sérum qui contient $\alpha 1$ antitrypsine. 3 mL de trypsine-EDTA sont ensuite ajoutés dans chaque boîte de 75 cm² contenant des cellules et les boîtes sont incubées pendant 5-10 minutes à 37°C avec 5% CO₂ afin de favoriser l'action de l'enzyme et de décoller les cellules. 6 mL de milieu de culture sont ajoutés dans chaque boîte de culture afin d'inhiber l'action de la trypsine et les cellules en suspension sont récupérées par centrifugation à 300g pendant 10 minutes.

Enfin, les cellules sont ensemencées au premier passage (P1) avec une densité de 1000/cm².

Les passages suivants (P2, P3...) sont réalisés selon le même protocole.

1.1.2 Congélation, décongélation des cellules

Le culot cellulaire obtenu après la digestion est suspendu à 10⁶ cellules/mL dans du milieu de congélation, puis réparti dans des cryotubes (réf. C23954, Fisher, France). Après une incubation à 4°C pendant 1h, à -20°C pendant 30min et enfin à -80°C. Pour une conservation plus longue (supérieure à un mois), les cellules sont définitivement conservées dans l'azote liquide.

Pour la décongélation, les cellules placées dans les cryotubes sont remises à 37°C en les mélangeant avec du milieu de culture à cette même température jusqu'à la fonte totale du contenu du cryotube. Après centrifugation à 300g pendant 10 min pour éliminer le DMSO, les cellules sont ensemencées dans des boîtes de culture de 75 cm² et cultivées jusqu'à sub-confluence.

2. Fabrication des biomatériaux tridimensionnels (Alginate, collagène)

2.1 Construction de biomatériau à base d'alginate de sodium

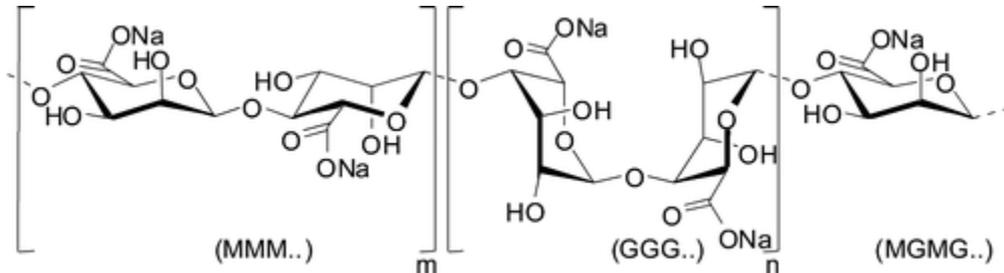


Figure 15: Structure des chaînes d'alginate de sodium

Pour former un gel, la poudre d'alginate est mélangé 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 dont la polymérisation avec des ions bivalents.

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 comme les ions de Ca^{2+} pour former des structures appelées "boîtes à œuf". Ainsi, les liaisons ioniques permettent de solidifier le gel et de créer différentes formes comme des billes, des hydrogels cylindriques à l'aide de moules ou d'autres formes (Chung et al. 2008).

Dans cette étude, la méthode de moulage a été utilisée pour avoir des hydrogels cylindriques à base d'alginate (Wong et al., 2001).

2.1.1 Réactifs

- Alginate de sodium : de viscosité moyenne, issue de l'algue *Macrocystis Pyrifera* (A-2033, Sigma-Aldrich, France), poudre autoclavée 50 min à 120°C pour la stérilisation, utilisé à différents concentrations : 1%, 1,5% et 2% ; p/v dans une solution de NaCl à 0,9%.
- Acide hyaluronique (HA, réf. 25177, Accros, France), utilisé à différentes concentrations : 0,5% et 1% ; p/v dans une solution de NaCl à 0,9%.

- Particules d'hydroxyapatite (HAP) de différentes tailles (0-30 μ m, 30-80 μ m, 80-120 μ m) et à différentes concentrations (HAP1 : 1mg/mL, HAP2 : 2mg/mL, HAP3 : 3mg/mL) (Lot n°525-090601, Science Applications Industries, Lyon, France).
- Solution de polymérisation : chlorure de calcium stérile (CaCl₂) (réf. C4901, Sigma-Aldrich, France) (50, 75, 102 mM) dissous dans de l'eau distillée.
- Solution de rinçage : chlorure de sodium (NaCl) à 0,9% dissous dans de l'eau distillée.

2.1.2 Méthodes

La méthode de moulage est couramment employée avec l'alginate de sodium pour construire des hydrogels ensemencés ou non avec des CSM. Pour fabriquer des cylindres, la solution d'alginate/HA ou alginate/HAP, avec (cellules homogénéisés avec le gel d'alginate à une densité de 3 millions cellules/mL) ou sans cellules est injectée dans des moules à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille. Ce moule est ensuite immergé dans une solution de CaCl₂ pendant 15 minutes, pour la polymérisation de l'alginate. Ensuite, le cylindre est lavé deux fois pendant 10 min dans une solution de NaCl à 0,9% pour éliminer le CaCl₂ résiduel. Puis, des poinçons stériles (diamètre intérieur 5 mm) (réf. 505, Stiefel, Allemagne) sont utilisés pour créer des petits cylindres d'alginate afin de les mettre en culture dans des plaques de 48 puits. Les cylindres sont cultivés dans du milieu α -MEM complet.



Figure 16 : Technique de moulage (Image à gauche), moule pour la formation des cylindres alginate/HA ou alginate/HAP

Pour obtenir un hydrogel alginate/HA ou alginate/HAP, le gel (avec ou sans cellules) a été injecté dans un moule puis ce dernier est plongé dans un bain de CaCl_2 pour polymériser le gel.

2.2 Construction de biomatériau à base de collagène de type I

2.2.1 Réactifs

- Solution de collagène de type I : Rat Tail Collagen type I, BD Biosciences, USA
- Milieu α -MEM complet 10X
- Eau stérile
- Particules d'hydroxyapatite (HAP) de différentes tailles (0-30 μm , 30-80 μm , 80-120 μm) (Lot n°525-090601, Science Applications Industries, Lyon, France).
- Solution de NaOH 1N, Sigma Aldrich, France.

2.2.2 Méthodes

Après avoir déterminé le volume final de solution de collagène et la concentration finale de collagène (3mg/mL) souhaités, le volume de chaque composant se calcule de la façon suivante :

- Volume α MEM complet 10X = volume final/10.

- Volume collagène de type I = (volume final x concentration initiale de collagène)/concentration finale de collagène.
- Volume NaOH = volume de collagène de type I x 0,025
- Volume H₂O stérile = volume final - (volume PBS + volume collagène + volume NaOH)

Dans un tube stérile sur la glace, α MEM complet 10X, NaOH, eau stérile sont mélangés puis le collagène est ajouté délicatement. Le NaOH est ajouté dans le but d'avoir une solution de pH entre 6,5 et 7,5 (pH convenable pour la formation du gel).

La solution est ajoutée au culot cellulaire à une densité de 500 000 cellules/mL et l'ensemble est déposé dans des plaques de culture 48 ou 96 puits (un volume de 300 μ L et 150 μ L respectivement dans chaque puits). Les biomatériaux sont incubés à 37°C pendant 60 minutes jusqu'à la formation du gel, puis le milieu de culture est ajouté dans chaque puits.

3. Mesure des propriétés mécaniques des biomatériaux

3.1 Les propriétés mécaniques du biomatériau à base de collagène de type I

Ce biomatériau est constitué de collagène de type I supplémenté des particules d'HAP en présence de cellules. Les propriétés mesurées émanent d'essais de compression uniaxiale en immersion, à température contrôlée. Le dispositif est illustré figure 17. Les propriétés mesurées sont les suivantes :

- La déformation maximale
- La contrainte maximale correspondant à la rupture, à une vitesse de 1mm/min et à un niveau de déformation de 50%.

Les essais se font dans des conditions optimales pour garder les cellules vivantes au sein du biomatériau (PBS à 37°). L'hydrogel est placé entre les deux céramiques poreuses avec du PBS.

Le calcul de la déformation maximale et de la contrainte maximale se fait comme décrit sur la figure 18.

3.2 Les propriétés mécaniques du biomatériau à base d'alginate

Ce gel est constitué de trois composantes dont le dosage est à maîtriser, en particulier lorsque nous visons certaines caractéristiques rhéologiques après polymérisation. Il s'agit des concentrations d'alginate, acide hyaluronique (HA) et de CaCl_2 .

Cela représente donc trois facteurs indépendants pouvant varier dans une certaine marge, laquelle résulte d'un compromis entre la consistance du matériau obtenu et son interaction avec les cellules souches qui y seront intégrées et qui doivent pouvoir s'y développer. Nous souhaitons caractériser ce gel du point de vue des propriétés mécaniques qui sont susceptibles d'avoir une incidence sur le comportement cellulaire. Parmi ces trois facteurs, il est probable qu'il y ait des interactions significatives ; nous ne considérerons que deux interactions : Interaction Alginate / HA et Interaction Alginate / CaCl_2 . Les propriétés mesurées émanent d'essais de compression uniaxiale en immersion, à température contrôlée. Le dispositif est illustré figure 17. Les propriétés mesurées sont les suivantes :

[Y1] : la déformation maximale, correspondant à la rupture

[Y2] : le module d'élasticité moyen apparent, estimé à partir de trois cycles de décharge – recharge

[Y3] : la contrainte maximale, correspondant à la rupture (figure 18)

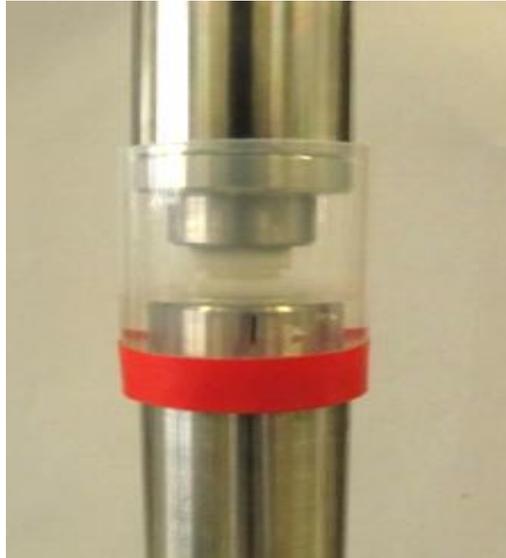


Figure 17: Dispositif de compression uniaxiale en immersion

Les plateaux de compression sont constitués de plaquettes de céramique (poreuse)

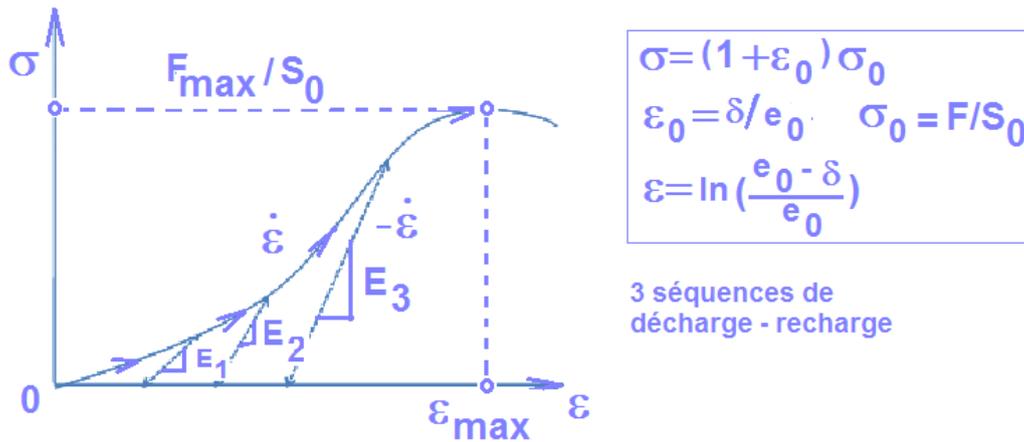


Figure 18: Représentation schématique du protocole expérimental comportant des séquences de charge, décharge et recharge

$E1, E2$ et $E3$ représentent les modules apparents mesurés au cours des cycles de décharge-recharge. σ = Contrainte, ϵ = Déformation, e = Epaisseur de l'échantillon, δ = Déplacement.

Tous les essais sont conduits à la même vitesse de déformation (1mm/min); les phases de décharge – recharge sont également menées à cette vitesse. La température du PBS est maintenue constante, tout le long de la campagne d'essais. Les échantillons sont découpés à l'emporte-pièce puis mesurés au micromètre, le diamètre des échantillons est de 10mm et l'épaisseur varie de 1,2 à 2,5mm. Les niveaux d'écrasement correspondant aux séquences de décharge – recharge sont calculés pour chaque éprouvette, compte tenu de leur épaisseur, et de sorte qu'ils correspondent à des niveaux de déformation de 20%,40% et 60%.

3.3 Choix du plan d'expériences statistique fractionnaire

Nous avons donc opté pour la technique des plans d'expériences fractionnaires, permettant à partir d'un nombre considérablement réduit d'essais d'arriver quasiment aux mêmes résultats qu'avec un plan complet (3^5). Notre choix s'est porté sur un plan du type L27 3^{13} , qui exige la conduite de seulement 27 expériences, pour 13 paramètres (facteurs+interactions) variant sur trois niveaux (figure 19).

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Y1	Y2	Y3
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Y1 1	Y2 1	Y3 1
2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Y1 2	Y2 2	Y3 2
3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	3	3
5	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	1	1	1			
6	1	2	2	2	3	3	3	1	1	1	2	2	2			
7	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3	2	2	2			
8	1	3	3	3	2	2	2	1	1	1	3	3	3			
9	1	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1			
10	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
11	2	1	2	3	2	3	1	2	3	1	2	3	1			
12	2	1	2	3	3	1	2	3	1	2	3	1	2			
13	2	2	3	1	1	2	3	2	3	1	3	1	2			
14	2	2	3	1	2	3	1	3	1	2	1	2	3			
15	2	2	3	1	3	1	2	1	2	3	2	3	1			
16	2	3	1	2	1	2	3	3	1	2	2	3	1			
17	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	3	1	2			
18	2	3	1	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3			
19	3	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3	2			
20	3	1	3	2	2	1	3	2	1	3	2	1	3			
21	3	1	3	2	3	2	1	3	2	1	3	2	1			
22	3	2	1	3	1	3	2	2	1	3	3	2	1			
23	3	2	1	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2			
24	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	2	1	3			
25	3	3	2	1	1	3	2	3	2	1	2	1	3			
26	3	3	2	1	2	1	3	1	3	2	3	2	1			
27	3	3	2	1	3	2	1	2	1	3	1	3	2	Y1 27	Y2 27	Y3 27

Figure 19: plan d'expériences du type $L_{27} 3^{13}$,

Les facteurs sont [F1], la concentration d'alginate; [F2] la concentration de HA, et [F3] le dosage de CaCl₂.

Les facteurs sont notés :

[F1] : concentration d'alginate;

[F2] : concentration HA,

[F3] : dosage CaCl2.

Les trois équations du plan d'expériences, exprimant les réponses Y1, Y2 et Y3 en fonction des facteurs [F1], [F2] et [F3] et de leurs interactions [F1]-[F2] et [F1]-[F3], sont écrites sous la forme générique suivante :

$$Y_i = M_i + [a]_i \cdot [F1] + [b]_i \cdot [F2] + [c]_i \cdot [F3] + [F1].[ab]_i \cdot [F2] + [F1].[ac]_i \cdot [F3]$$

$i = 1,2,3$

Mi représente la moyenne de l'ensemble des résultats de la réponse Yi ; i=1,2,3. La notation [...] désigne un vecteur ou une matrice. [a]i est une constante (vectorielle) portant l'effet de [F1] : facteur « concentration d'alginate », grandeur vectorielle à trois composantes F11, F12, F13 correspondant aux trois niveaux de variation ;

De même, [b]i, et [c]i traduisent les effets de [F2] et de [F3], qui comportent trois niveaux notés respectivement : F21, F22, F23, et F31, F32 et F33.

[ab]i et [ac]i désignent des matrices 3x3 traduisant respectivement l'effet de l'interaction de [F1] et de [F2], et de l'interaction de [F1] et de [F3].

Les réponses Yi ; i=1,2,3, correspondent au module apparent, à la déformation maximale et à la contrainte maximale notés respectivement E , ϵ_{max} , et σ_{max} .

Le modèle ci-dessus s'écrit plus explicitement de la façon suivante :

$$Y_i = M_i + \begin{bmatrix} a_1 \\ a_2 \\ a_3 \end{bmatrix}_i \begin{bmatrix} F11 \\ F12 \\ F13 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ b_3 \end{bmatrix}_i \begin{bmatrix} F21 \\ F22 \\ F23 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} c_1 \\ c_2 \\ c_3 \end{bmatrix}_i \begin{bmatrix} F31 \\ F32 \\ F33 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} F11 \\ F12 \\ F13 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} ab_{11} & ab_{12} & ab_{13} \\ ab_{21} & ab_{22} & ab_{23} \\ ab_{31} & ab_{32} & ab_{33} \end{bmatrix}_i \begin{bmatrix} F21 \\ F22 \\ F23 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} F11 \\ F12 \\ F13 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} ac_{11} & ac_{12} & ac_{13} \\ ac_{21} & ac_{22} & ac_{23} \\ ac_{31} & ac_{32} & ac_{33} \end{bmatrix}_i \begin{bmatrix} F31 \\ F32 \\ F33 \end{bmatrix}$$

$i = 1,2,3$

Les matrices des coefficients vérifient les expressions ci-dessous.

Pour la moyenne des réponses Y_i , nous avons :

$$\begin{bmatrix} M_1 = \sum_{i=1}^{27} \frac{Y_{1i}}{27} \\ M_2 = \sum_{i=1}^{27} \frac{Y_{2i}}{27} \\ M_3 = \sum_{i=1}^{27} \frac{Y_{3i}}{27} \end{bmatrix}$$

Les matrices des coefficients sont telles que :

$$\begin{bmatrix} a_1 = \sum_{i=1}^9 \frac{Y_{1i}}{9} - M_1 \\ a_2 = \sum_{i=10}^{18} \frac{Y_{1i}}{9} - M_1 \\ a_3 = \sum_{i=19}^{27} \frac{Y_{1i}}{9} - M_1 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} b_1 = \frac{1}{9}[Y_{1,1} + Y_{1,2} + Y_{1,3} + Y_{1,10} + Y_{1,11} + Y_{1,12} + Y_{1,19} + Y_{1,20} + Y_{1,21}] - M_1 \\ b_2 = \frac{1}{9}[Y_{1,4} + Y_{1,5} + Y_{1,6} + Y_{1,13} + Y_{1,14} + Y_{1,15} + Y_{1,22} + Y_{1,23} + Y_{1,24}] - M_1 \\ b_3 = \frac{1}{9}[Y_{1,7} + Y_{1,8} + Y_{1,9} + Y_{1,16} + Y_{1,17} + Y_{1,18} + Y_{1,25} + Y_{1,26} + Y_{1,27}] - M_1 \end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix} c_1 = \frac{1}{9}[Y_{1,1} + Y_{1,4} + Y_{1,7} + Y_{1,10} + Y_{1,13} + Y_{1,16} + Y_{1,19} + Y_{1,22} + Y_{1,25}] - M_1 \\ c_2 = \frac{1}{9}[Y_{1,2} + Y_{1,5} + Y_{1,8} + Y_{1,11} + Y_{1,14} + Y_{1,17} + Y_{1,20} + Y_{1,23} + Y_{1,26}] - M_1 \\ c_3 = \frac{1}{9}[Y_{1,3} + Y_{1,6} + Y_{1,9} + Y_{1,12} + Y_{1,15} + Y_{1,18} + Y_{1,21} + Y_{1,24} + Y_{1,27}] - M_1 \end{bmatrix}$$

Les coefficients des matrices des interactions sont déterminés de la façon suivante :

$$\begin{bmatrix} ab_{11} = \frac{1}{3}[Y_{1,1} + Y_{1,2} + Y_{1,3}] - a_1 - b_1 - M_1 \\ ab_{12} = \frac{1}{3}[Y_{1,4} + Y_{1,5} + Y_{1,6}] - a_1 - b_2 - M_1 \\ ab_{21} = \frac{1}{3}[Y_{1,10} + Y_{1,11} + Y_{1,12}] - a_2 - b_1 - M_1 \\ ab_{23} = \frac{1}{3}[Y_{1,16} + Y_{1,17} + Y_{1,18}] - a_2 - b_3 - M_1 \\ ab_{33} = \frac{1}{3}[Y_{1,25} + Y_{1,26} + Y_{1,27}] - a_3 - b_3 - M_1 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} ac_{11} = \frac{1}{3}[Y_{1,1} + Y_{1,4} + Y_{1,7}] - a_1 - c_1 - M_1 \\ ac_{12} = \frac{1}{3}[Y_{1,2} + Y_{1,5} + Y_{1,8}] - a_1 - c_2 - M_1 \\ ac_{21} = \frac{1}{3}[Y_{1,10} + Y_{1,13} + Y_{1,16}] - a_2 - c_1 - M_1 \\ ac_{33} = \frac{1}{3}[Y_{1,21} + Y_{1,24} + Y_{1,27}] - a_3 - c_3 - M_1 \end{bmatrix}$$

Tous les autres coefficients sont déterminés de la même façon.

4. Métabolisme cellulaire

La mesure de l'activité métabolique des cellules cultivées dans les hydrogels d'alginate ou de collagène a été réalisée par le test d'Alamar Blue. L'activité métabolique a été rapportée à la quantité d'ADN mesurée en microgrammes (μg).

4.1 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.

L'Alamar Blue est composé d'un indicateur Rédox qui change de couleur en fonction de la réduction chimique du milieu de culture, c'est un indicateur colorimétrique sensible à l'activité métabolique cellulaire. L'Alamar Blue, n'a pas d'effet toxique pour les cellules, et la lyse cellulaire n'est pas nécessaire, ce qui permet de suivre l'évolution du signal en fonction du temps.

Des cellules saines et/ou en prolifération produisent des composés réducteurs tels que FADH_2 , NADH , NADPH et ont une activité cytochromique maintenue qui contribue à réduire l'Alamar Blue. La mesure de l'activité cellulaire est donc basée sur le taux d'oxydo/réduction de l'Alamar Blue déterminé par la mesure densitométrique à 570 nm (A_{570} , absorbance du composé réduit) et à 600 nm (A_{600} , absorbance du composé oxydé). Le pourcentage de réduction reflétant l'activité métabolique, est alors déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ réduction} = \frac{(\epsilon_{\text{ox}\lambda_2}) (A\lambda_1) - (\epsilon_{\text{ox}\lambda_1}) (A\lambda_2)}{(\epsilon_{\text{red}\lambda_1}) (A'\lambda_2) - (\epsilon_{\text{red}\lambda_2}) (A'\lambda_1)} \times 100$$

$\epsilon_{\text{red}\lambda_1}$: 155,677 (coefficient d'extinction molaire de AB réduit à 570 nm)

$\epsilon_{\text{red}\lambda_2}$: 14,652 (coefficient d'extinction molaire de AB réduit à 600nm)

$\epsilon_{\text{ox}\lambda_1}$: 80,586 (coefficient d'extinction molaire de AB oxydé à 570 nm)

$\epsilon_{\text{ox}\lambda_2}$: 117,216 (coefficient d'extinction molaire de AB oxydé à 600 nm)

$A\lambda_1$: Absorbance de l'échantillon à 570 nm

$A_{\lambda 2}$: Absorbance de l'échantillon à 600 nm

$A'_{\lambda 1}$: Absorbance du puits contrôle contenant de l'AB sans cellule à 570 nm

$A'_{\lambda 2}$: Absorbance du puits contrôle contenant de l'AB sans cellule à 600 nm

4.2 Réactifs

- DMEM sans rouge de phénol (réf. 11880, Gibco, France).
- Alamar Blue (réf. DAL1100, Invitrogen, France) utilisé à 10% (v/v dans du DMEM sans rouge de phénol).

4.3 Méthodes

Les hydrogels d'alginate ou de collagène contenant des cellules (CSM) sont lavés deux fois 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 dans un puits d'une plaque de 48 puits contenant 500 μ L de la solution d'Alamar Blue à 10%. Les gels sont incubés à 37°C, 5% CO₂ pendant 4h. Un contrôle sans cylindre sera incubé dans les mêmes conditions précédentes. La lecture de l'absorbance est faite à $\lambda=570$ nm et $\lambda=600$ nm.

4.4 Dosage d'ADN

Réactifs

- Solution de citrate-EDTA à 55mM, dans l'eau distillée (réf ; 54641, et 8418, Merck, France)
- Solution de Hoechst : Hoechst 33258 (réf. H3569, Invitrogène, France) à 0,1 μ g/mL dans un tampon de Hoechst (10mM de tris, 1mM d'EDTA et 0,1mM de NaCl à un pH de 7,4)
- ADN de thymus de veau (réf. D3664, Sigma, France)

Méthodes

Pour chaque test d'Alamar blue, les échantillons d'ADN contenant de l'ADN des cellules présentes dans les cylindres d'hydrogel d'alginate ou de collagène sont conservés afin de pondérer la réduction de l'Alamar blue à la quantité d'ADN et d'obtenir une information relative au métabolisme cellulaire. Chaque cylindre d'alginate est dissous dans 500 μ L de solution de citrate-EDTA pendant 10 min dans un tube Eppendorf « DNase et RNase Free », et chaque cylindre de collagène est dissous dans 500 μ L de collagène B pendant 1 heure à

37°C. Après centrifugation à 300g pendant 5 min, le culot cellulaire est conservé à -80°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 µg/mL (Tableau X). Les échantillons permettant d'obtenir les différents points de la gamme sont traités de la même façon que les échantillons cellulaires, dès 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 à un bain marie 37°C. 900 µL de solution de Hoeschst 33258 un intercalent de l'ADN bicaténaire qui émet dans la partie ultra violet du spectre, sont ajoutés. Ainsi, l'intensité de fluorescence (IF) est lue avec un spectrofluorimètre (Varioskan Thermoscientific) à une $\lambda_{\text{excitation}} = 365$ nm et une $\lambda_{\text{émission}} = 458$ nm. La quantité d'ADN présente dans les échantillons est obtenue à partir de l'équation $IF=f(\text{ADN})$. Les résultats sont exprimés en µg/mL. Le pourcentage de réduction d'Alamar Blue est rapporté à la quantité d'ADN pour obtenir l'activité métabolique des cellules.

Tableau 9: Courbe étalon d'ADN

Concentration finale d'ADN (en µg/mL)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0,05	0
Volume de solution d'ADN à 100 µg/ml (en µL)	100	80	60	40	20	10	5	0
Volume d'eau (en µL)	0	20	40	60	80	90	95	100

5. Cytométrie en flux

La technique de cytométrie en flux permet l'analyse rapide d'un grand nombre de particules de manière individuelle. La caractérisation des particules est réalisée à l'aide d'un appareil qui comprend, outre une source lumineuse (laser), une chambre de prélèvement et un système optique précédant des photomultiplicateurs qui convertissent des signaux lumineux en impulsions électriques analogues digitalisées, analysées et mémorisées par un ordinateur. Les particules étudiées sont propulsées dans un flux de liquide appelé "liquide de gaine". Elles sont alors entraînées une à une dans une cellule de lecture (cuvette) où elles passent dans le faisceau lumineux émis par la source. Une analyse simultanée de la lumière diffractée à 90° [FSC (forward scatter detector)] et aux petits angles [SSC (side scatter detector)] fournit des

données sur la taille et la structure des éléments étudiés. La mesure aux petits angles est principalement influencée par la taille des particules, tandis que la détection à 90° reflète plutôt la structure.

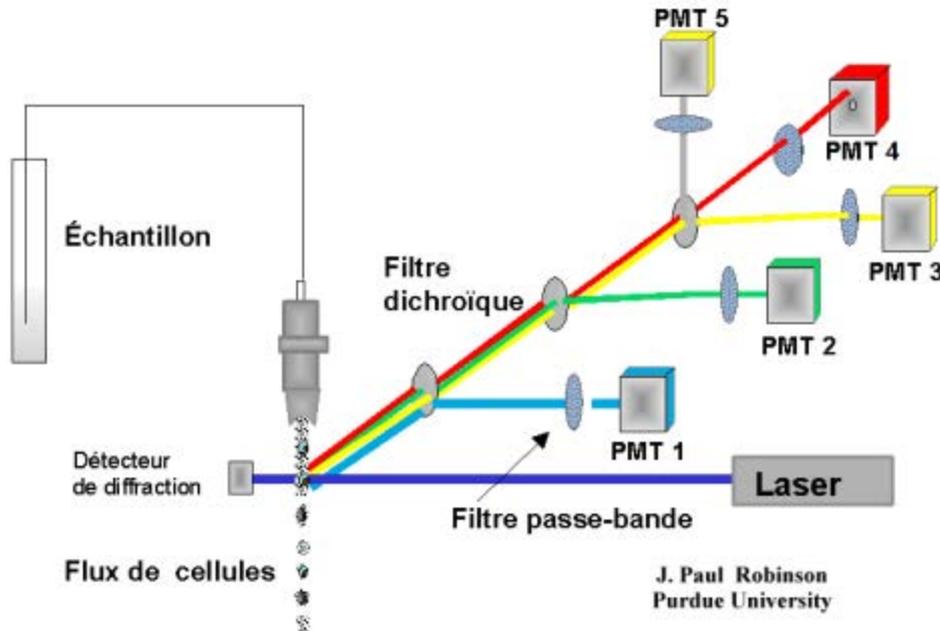


Figure 20: Principe de la cytométrie en flux

5.1 Analyse de l'expression de marqueurs de surface cellulaire

Pour identifier le phénotype des CSMs avant l'ensemencement dans les biomatériaux, nous avons étudié l'expression de certains marqueurs de surface cellulaire par immunomarquage direct.

5.1.1 Marquage par immunofluorescence directe

1.1.1 Principe

Les récepteurs exprimés à la surface des cellules sont reconnus spécifiquement par un anticorps directement couplé à un fluorochrome.

1.1.2 Réactifs

- DMEM sans rouge de phénol.
- Solution de blocage : albumine de sérum bovin (BSA, réf. A-9667, Sigma Aldrich, France) dissoute dans du DMEM sans rouge de phénol à 0,5% (p/v)

- Solution d'immunomarquage : anticorps dilués dans la solution de blocage afin d'obtenir une concentration finale appropriée (tableau 10).

Tableau 10: Anticorps utilisés pour le phénotypage des CSM

Marqueur de surface	Fluorochrome	Volume de solution par tube	Référence
CD34	PE	2 μ L/tube	BD Pharmigen (555822)
CD45	FITC	5 μ L/tube	DakoCytomation (F0861)
CD73	PE	2 μ L/tube	BD Pharmigen (550275)
CD90	PE	2 μ L/tube	BD (555596)
CD105	PE	5 μ L/tube	Bekman Coulter (IOTest, A22361)
HLA-DR	FITC	2 μ L/tube	Bekman Coulter (IOTest, IM0463U)
Contrôle isotipique PE	PE	5 μ L/tube	DakoCytomation (X0927)
Contrôle isotipique FITC	FITC	5 μ L/tube	DakoCytomation (X0928)

1.1.3 Méthodes

Les CSMs suspendues dans la solution de blocage, sont réparties à raison de 100 000 cellules par tube. Après 20 minutes d'incubation, elles sont lavées par centrifugation (300 g,

5 min) et les culots cellulaires sont resuspendus dans 100 μ L de solution d'immunomarquage incluant soit différents anticorps, soit IgG-PE/FITC (contrôle isotopique) ou dans 100 μ L de la solution de blocage (contrôle négatif). A l'issue d'une incubation pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, 0,5 mL de DMEM sans rouge de phénol sont ajoutés dans chaque tube, puis une centrifugation (300 g, 5 min) est faite

afin d'éliminer les anticorps en excès. Le culot cellulaire est alors repris dans 300 μ L de DMEM sans rouge de phénol avant d'être analysé au cytomètre (BD FACScanto (BD, France)).

1.1.4 Analyse des échantillons

Un minimum de 10000 évènements a été collecté lors de chaque analyse. La population cellulaire est repérée sur le scattogramme en fonction de la taille et de la granulosité de cellules (voir résultats, partie 1). Une fenêtre prenant en compte uniquement cette population est dessinée afin d'éliminer les débris cellulaires, ou les doublets et triplets de cellules. Ainsi, les valeurs de SSC (Side Scatter) et de FSC (Forward Scatter) sont réglées de façon à bien visualiser la population cellulaire.

Sur l'histogramme de fluorescence, la tension du photomultiplicateur (PMT) est réglée de manière à ce que les cellules non marquées (le contrôle négatif qui permet de s'affranchir de l'autofluorescence des cellules) ainsi que les cellules incubées en présence d'immunoglobulines non spécifiques (le contrôle isotipique qui permet de s'affranchir de la fluorescence du marquage aspécifique) apparaissent négatives. La tension du PMT ne doit plus être touchée après ce réglage afin de ne pas faire d'erreur sur la lecture des intensités de fluorescence des échantillons analysés.

6. Microscopie confocale

6.1 Principe

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. Elle permet d'observer, avec une bonne résolution, la position de protéines ou molécules marquées 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.

Dans le microscope utilisé dans cette étude (SP2 AOBS-MP, Leica), 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.

6.2 Analyse de la viabilité cellulaire

6.2.1 Réactifs

- Kit Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit for mamalian cells (Invitrogen, France).
- PBS (réf. 14190, invitrogen, France)

6.2.2 Méthodes

Cette analyse est réalisée à J3 et J21 pour les biomatériaux à base de collagène, à J3 et J28 pour les biomatériaux à base d'alginate pour chaque condition grâce au kit Live /Dead. Ce kit est constitué de calcéine AM (λ ex/em : 494/517 nm) et d'éthidium homodimère-1 (EthD-1, λ ex/em : 517/617). La calcéine est convertie par les estérases intracellulaires des cellules vivantes et émet une fluorescence verte tandis que l'EthD-1 pénètre à l'intérieur des cellules mortes par leur membrane plasmique endommagée et fluoresce en rouge.

Les biomatériaux sont lavés deux fois pour éliminer le rouge phénol, 150 μ L d'une solution de PBS, EthD-1 à 4 μ M et de calcéine AM à 2 μ M sont ajoutés dans chaque puits. Après 45 minutes d'incubation à 37°C, les échantillons sont lavés deux fois avec du PBS et ils sont conservés jusqu'à l'observation de la fluorescence en microscopie confocale.

6.3 Visualisation du cytosquelette

6.3.1 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 CaCl₂ dissous dans de l'eau distillée à pH 7,4
- Solution de lavage : PBS (réf. 14190, invitrogen, France)
- Solution de perméabilisation : Triton X100 préparé dans du PBS à 0,5% (v/v).
- Solution de dilution : albumine de sérum bovin (BSA, réf. A-9667, Sigma Aldrich,

France) dissoute dans 0,1% de Triton X100.

6.3.2 Méthodes

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 fixé au préalable avec une solution de fixation est placé dans un puits d'une plaque 48 puits, puis lavé avec 500 μ L de PBS deux fois. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec 200 μ L de solution de Triton à 0,5% pendant 15 min. Puis, 200 μ L de la solution Phalloïdine-Alexa 488 sont ajoutés et incubés pendant 30 min. Les échantillons sont lavés deux fois dans du PBS pendant 5 min et conservés à +4°C et à l'abri de la lumière, jusqu'à l'observation de la fluorescence à l'aide du microscope confocal.

6.4 Marquage du noyau

Après le marquage de cytosquelette, le noyau des cellules est marqué avec PO-PROTM-3 dilué à 10 μ M dans de la solution de Triton à 0,1%. Après 30 min, les échantillons sont lavés dans du DMEM sans rouge de phénol et conservés à 4°C jusqu'à l'observation en microscopie confocale.

7. RT-PCR

7.1 Principe

La technique de PCR permet l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. La technique de RT-PCR quant à elle, permet l'amplification d'un fragment d'ADN qui est complémentaire à une molécule d'ARN donnée. Pour cela il est nécessaire d'extraire les ARNs messagers (ARNm) des cellules et de rétro transcrire les ARN en ADNc. Ces ADNc vont servir de matrice à la technique de PCR pour connaître l'expression des gènes à étudier à l'aide d'amorces spécifiques. La réaction de PCR se déroule en trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation (figure 20). Grâce à l'utilisation des enzymes thermorésistantes et à des cycles de température, cette technique permettra l'amplification d'un fragment d'ADNc choisi.

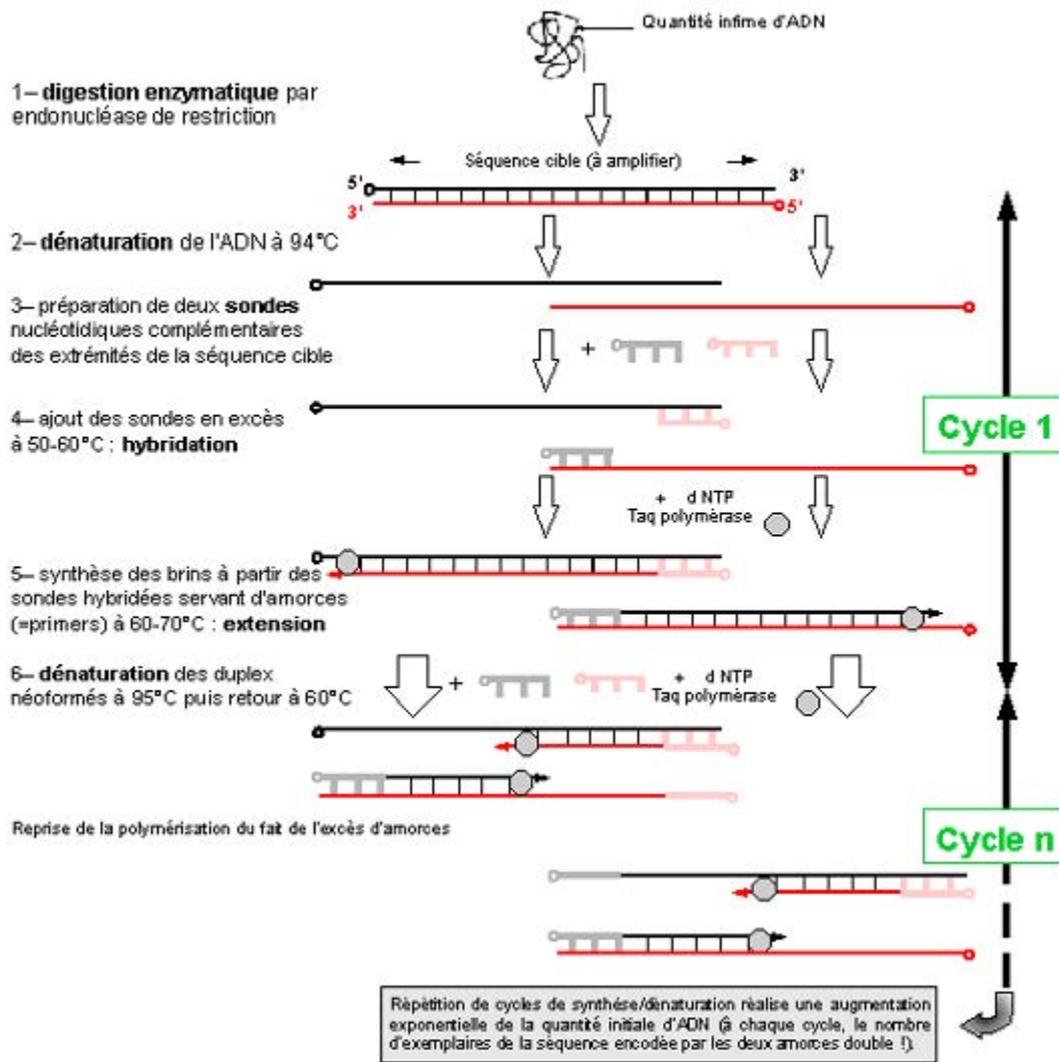


Figure 21: Principe de la technique de PCR

7.2 Extraction d'ARN

7.2.1 Réactifs

- RNeasy® mini kit (réf. 74104, Qiagen, France)
- Ethanol absolu (réf.32221, Sigma, France) utilisé à 75% (v/v dans de l'eau sans nucléase)

7.2.2 Protocole

Les cellules sont rincées avec du tampon PBS à 37°C, puis, l'extraction d'ARN s'effectue selon les recommandations du kit d'extraction des ARNs, RNeasy mini kit. Brièvement, les cellules sont lysées avec 350 µL de tampon RLT (pour moins de $5 \cdot 10^6$ 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. Le dosage des ARNs est réalisé par spectrophotomètre (Thermo Scientific nanodrop 1000, USA), par la lecture de la DO aux longueurs d'onde de 260nm et 280nm. La longueur d'onde à 260 nm permet de détecter les acides nucléiques et la longueur d'onde à 280 nm permet de détecter 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.

7.3 Rétrotranscription des ARNm (RT)

7.3.1 Réactifs

- iScript™ cDNA Synthesis Kit (réf. 170-8891, Bio-Rad, France).
- Eau DEPC (réf. 750024, Invitrogen, France).

7.3.2 Protocole

L'ADNc est obtenu à partir d'une quantité inférieure à 1µg d'ARN par transcription inverse en utilisant des amorces de polydT se fixant sur la séquence poly-Adénylée des ARNm. La RT est réalisée dans un mélange final de 20 µL, dont 4µL de iScript Reaction Mix 5x et 1µL de iScript Reverse Transcriptase. Le mélange complet de la réaction est incubé 5 minutes à 25°C, puis 30 minutes à 42°C. Après une incubation de 5 minutes à 85°C, il est maintenu à 4°C. La réaction est exécutée dans un MyCycler™ (Bio-Rad, USA). Les ADNc peuvent être gardés à -80°C jusqu'à la réalisation de PCR.

7.4 PCR Semi-Quantitative

7.4.1 Réactifs

- Solution de dNTP Mix 10mM (réf. 18427-013, Invitrogen, France).
- Taq DNA Polymérase (réf. 10966-034, Invitrogen, France).
- Tampon de PCR 10x (sans MgCl₂) (réf. y02028, Invitrogen, France)
- Solution de MgCl₂ 10mM (réf. y02018, Invitrogen, France)
- Amorces des gènes (Tableau 11) : (MWG-Biotech AG France)

Tableau 11: Amorces des gènes de PCR

Gène	Séquence (5'-3')	Tm (°C)	Produit prévu (bp)
Sox 9	Forward: CCGATCTGAAGAAGGAGAGCGA Reversed: TCGCTTCAGGTCAGCCTTGC	58	590
Collagen II	Forward: ACTTGCCTCTACCCCAATCC Reversed: ACAGTCTTGCCCCACTTACC	58	383
Collagen I	Forward: ATGATGAGAAATCAACCGGA Reversed: CCAGTAGCACCATCATTTC	55	155
GAPDH	Forward: AATCCCATCACCATCTTCCAGG Reversed: AGAGGCAGGGATGATGTTCTGG	58	417
Runx2	Forward: AACTTCCTGTGCTCGGTGCTG Reversed: GGGGAGGATTTGTGAAGACGG	58	268
PPAR γ	Forward: GGAGAAGCTGTTGGCGGAGA Reversed: TCAAGGAGGCCAGCATTGTG	58	431

7.4.2 Protocole

La phase d'amplification est réalisée dans un mélange final de 50 μ L (tableau 12).

Tableau 12: Liste des réactifs utilisés pour le mélange d'amplification

Réactif	Volume par μL
Tampon de PCR10x	5
MgCl ₂ 50mM	1,5
dNTPs Mix 10 mM	1
Amorce de forward 10 μM	1
Amorce de reverse 10 μM	1
Taq Polymérase	0,4
ADNc	2
Eau Rnase Free	38,1

Après une étape de dénaturation à 94°C pendant 3 minutes, l'amplification jusqu'à saturation de l'ADNc se fait selon 30 cycles dans le MyCycler. Le schéma d'un cycle est le suivant :

- 30 secondes de dénaturation à 94°C
- 60 secondes d'hybridation des amorces à 58°C
- 60 secondes d'élongation à 72°C

Ce cycle est répété plusieurs fois, puis les échantillons sont soumis à 10 minutes d'élongation à 72°C. Ensuite ils sont maintenus à 4°C. Les ADN peuvent être gardés à -80°C jusqu'à la réalisation de l'électrophorèse.

7.5 Electrophorèse des produits de PCR semi quantitative

7.5.1 Réactifs

- Tampon de charge 5x : (réf, 161-0767, Bio-Rad, France)
- Agarose (réf. H070928, Euromedex, France) utilisé à 1% (dans un tampon d'électrophorèse TBE 0,5x)
- Tampon d'électrophorèse TBE 10x : acide borique 0,89 M, EDTA 20 mM, Tris 0,89M (réf. 161-0733, Bio-Rad, France) utilisé à une concentration de travail de TBE 0,5x (v/v dans l'eau distillée)
- Marqueur de taille d'ADN de 100pb (réf. 15628-019, Invitrogen, France)

- Gel red

7.5.2 Protocole

Préparation du gel

1 g d'agarose est dissous dans 100 mL de tampon d'électrophorèse TBE 0.5x, puis le tout est chauffé jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Ensuite, nous laissons reposer la solution de gel jusqu'à l'obtention d'une température environ de 60°C. La solution de gel est alors transférée dans une cuve dans laquelle est placé un peigne. Lorsque le gel est polymérisé, le peigne est retiré formant ainsi des puits pour déposer les échantillons d'ADN.

Migration

8 µL d'échantillon d'ADN sont mélangés avec 2 µL de tampon de charge 5x, 0,8µL de marqueur de taille avec 0,2µL de tampon de charge 5x, sont déposés parallèlement, puis déposés dans les puits de gel. La migration est réalisée à un voltage de 100V pendant 45 minutes environ dans du tampon TBE 0.5x. Puis le gel est coloré au gel red. Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés sous rayonnement ultra-violet et photographiés. La taille des fragments est comparée à un marqueur de taille. L'analyse densitométrique est alors réalisée avec le logiciel d'image (Image J).

7.6 PCR quantitative

7.6.1 Réactifs

- Capillaire qPCR (réf.04 929 292 001, Roche applied Science)
- Quantitect SYBER Green PCR Kit (réf.204145, Qiagen, France)
- Solutions d'amorces forward et reverse à 10 µM pour chaque gène testé (voir tableau X) (Eurogentech, France)
- Solution mère d'ADN de chaque gène à 1ng/µL
- Quiaquick PCR purification kit (réf.28104, Qiagen, France)
 - ✓ Colonne QIAquick Spin
 - ✓ Tampon PB
 - ✓ Tampon PE
 - ✓ Tampon EB
 - ✓ Tubes pour effluents (2mL)

Tableau 13: Liste des amorces utilisées pour la q PCR

Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')		Tm
Collagène 2A	Reverse	ATCTCAGGGCTGAGGCAGT	62°C
	Forward	GCAGGATGGGCAGAGGTAT	
Sox 9	Reverse	CCTGGGATTGCCCGA	55°C
	Forward	GAGCAGACGCACATCTC	
Collagène X	Reverse	CTCCAGGATCACCTTTTGGGA	62°C
	Forward	GCTAAGGGTGAAAGGGGTTC	
Runx 2	Reverse	CGTTACCCGCCATGACAGTA	59°C
	Forward	CCCGTGGCCTTCAAGGT	
Collagène I	Reverse	GGACCACTTTCACCCTTGT	62°C
	Forward	AGGTGCTGATGGCTCTCCT	
RP 29	Reverse	AGACGCGGCAAGAGCGAGAA	60°C
	Forward	AAGATGGGTCACCAGCAGCTCTACTG	

7.6.2 Protocole

La q PCR se réalise avec l'appareil Light Cycler (Roche Applied Science) permettant de faire la réaction sur 32 capillaires simultanément. Dans chaque capillaire sont ajoutés : 10µL de la solution de Quantitect SYBER Green PCR, 1µL de solution d'amorces reverse, 1µL de solution d'amorces forward et 6µL d'eau Rnase free. 2µL d'eau Rnase free sont ajoutés dans le premier capillaire qui sert comme blanc (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 (Voir ci-après). 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 q PCR, 45 cycles de dénaturation, d'amorçage, et d'extension sont faits. 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 du 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 de référence.

Préparation de la 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 : [ADN] (en µg/mL) $DO_{260\text{ nm}} \times \text{dilution} \times 50$.

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.

8. Histologie-Immunohistologie

8.1 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 réalisées pour colorer spécifiquement des protéines par exemple 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.

Le Bleu Alcian permet de mettre en évidence les mucopolysaccharides. A un pH acide pour l'alginate et basique pour le collagène, 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.

8.2 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 CaCl₂ 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'Hématoxyline : 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)

8.3 Méthodes

A différents temps de culture (3, 7, 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. Les blocs sont alors découpés de manière transversale en tranches 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 décrit succinctement dans le tableau 14. Les échantillons seront colorés avec du Bleu Alcian à un Ph basique pour les échantillons de collagène et un pH acide pour ceux d'alginate, du Rouge Sirius et l'HES. Après la coloration, les lames histologiques sont montées avec une résine synthétique PERTEX pour permettre l'observation des colorations avec un microscope optique.

Tableau 14: Protocoles de coloration d'histologie

HES		Bleu Alcian		Rouge Sirius	
Réactifs	Temps (min)	Réactifs	Temps (min)	Réactifs	Temps (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 à 95°	3	Tissue clear	5		
Alcool à 100°	3	Fin			
Safran	5				
Alcool à 100°	5				
Tissue Clear	5				
Fin					

8.4 Principe d'immunohistologie

La technique d'immunohistologie est née à la fin des années 1930, elle permet de localiser des antigènes dans du matériel vivant. Le réactif principal est un anticorps dirigé contre un antigène d'intérêt. Des traceurs fixés directement ou indirectement sur cet anticorps permettent de révéler cette interaction antigène-anticorps.

Une immunoréaction se compose de trois éléments :

1. La préparation des tissus, cellules, organites, virus..., contenant l'antigène à étudier.
2. un anticorps dirigé contre l'antigène recherché

3. le système révélateur (ou traceur) qui permet de visualiser l'immunoréaction.

8.4.1 Réactifs

- Solution de restauration antigénique : tampon citrate pH : 6 à diluer au 1/10^{ème} (Dako, réf : S1699).
- Eau oxygénée à 10 volumes (30%) : diluer la solution mère au 1/10^{ème} dans l'eau stérile.
- Kit Impress (Vector/Vectastain) MP7500
- Solution de dilution (Dako) S3022
- Chromogène : AEC (Diagomics) ZUCo54-200
- Hémalum de Mater (Sigma) MHS-16
- Carbonate de lithium (Sigma) L-4283 : diluer quelques grammes de carbonate de lithium dans de l'eau
- Anticorps primaire : Diluer l'anticorps (sox9) dans la solution de dilution (Dako)

8.4.2 Méthodes

A différents temps de culture (3et 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.

Les blocs sont alors découpés de manière transversale en tranches 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 marqués immunologiquement sur plusieurs étapes :

- Incubation des échantillons dans l'eau oxygénée à 3% pendant 10 minutes.
- Rinçage des échantillons dans plusieurs bains d'eau.

- Dépôt des échantillons dans la chambre humide, mettre sur chaque échantillon 3 à 4 gouttes de sérum bloquant et les incuber pendant 20 min.
- Après élimination du sérum bloquant, mettre 200 μ L d'anticorps primaire Sox9 dilué à 1/100, incubation une nuit à 4°C.
- Après rinçage deux fois avec du PBS, mettre 3 à 4 gouttes d'anticorps secondaire, incubation pendant 30 min.
- Après deux rinçage avec du PBS, mettre le chromogène, incubation pendant 10 à 20 min.
- Après rinçages dans plusieurs bains d'eau, réaliser une contre coloration avec de l'hémalum de Mayer pendant 10 à 15 secondes.
- Après rinçage à l'eau, puis à de l'eau lithinée 10 à 20 secondes, déshydratation dans des bains croissant d'alcool.

Les lames histologiques sont montées avec une résine synthétique PERTEX pour permettre l'observation des colorations avec un microscope optique.

9. Analyse Statistique

Les données sont présentées selon la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les différences statistiques entre les groupes d'expériences sont analysées par une analyse de variance (ANOVA) à deux directions, à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Un test de Boneferri est effectué *à posteriori* et les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives statistiquement.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Contrôle de qualité des CSM utilisées dans cette étude

Avant leur incorporation dans les matrices, la nature des CSM est vérifiée *via* l'analyse du phénotype et de leur capacité à former des colonies :

-L'analyse du phénotype est réalisée par l'étude de l'expression de marqueurs de surface cellulaire (CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 et HLA DR) par cytométrie en flux après immunomarquage direct à l'aide des anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes (FITC ou PE). La figure 22 montre un exemple de phénotypage des CSM utilisées dans cette étude. L'étude du phénotypage indique l'absence des marqueurs de surface CD45 et CD34, caractéristiques des CSH, l'absence de HLA DR ainsi que la présence de CD90, CD105 et CD73.

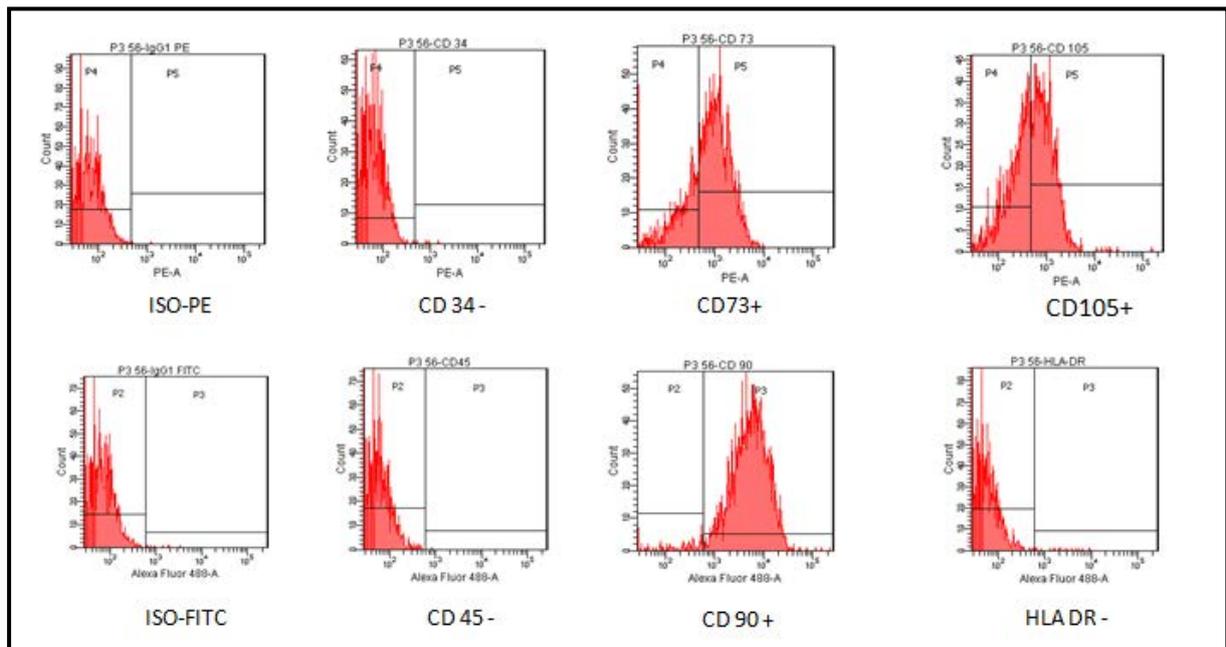


Figure 22: Exemple de caractérisation par phénotypage des CSM utilisées dans ce travail avant leur incorporation dans les biomatériaux.

Le phénotypage vérifie l'absence ou la présence de marqueurs de surface cellulaires par la technique de cytométrie en flux.

La capacité à former des colonies (CFU) est une des caractéristiques des cellules souches. En effet toutes les cellules d'une colonie sont issues d'une seule cellule et forment ainsi un clone. De ce fait, la qualité de l'échantillon sera déterminée entre autre, par le nombre de colonies obtenues en culture dite clonogénique. Nous avons réalisé des essais clonogéniques avec 1000 cellules par boîte de Pétri lors des passages P1, P2 et P3 (figure 23).

Le tableau 15 montre que le pourcentage de CFU diminue en fonction des passages, et nous remarquons une forte diminution de passage 2 au passage 3 pour tous les prélèvements.

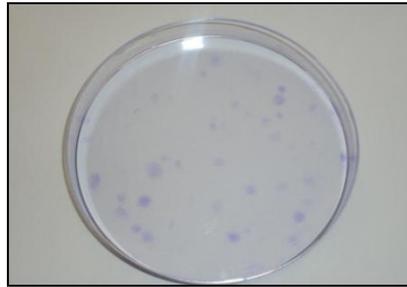


Figure 23 : Le test des CFU indiquant le potentiel des CSM à former des colonies grâce à la coloration au cristal violet

Tableau 15: Pourcentages de CFU obtenus pour les différents prélèvements et passages (*étude concernant les cellules)

Prélèvement (Age)	Etude*	Nombre de colonies (CFU) en %
55ans	Collagène de type I	P1: 60,6% P2: 60% P3: 50%
35 ans	Collagène de type I	P1: 20% P2: 14% P3: 10%
30 ans	Alginate	P1: 55% P2: 52,3% P3: 25%
27 ans	Alginate	P1: 45% P2: 44% P3: 42,6%
17ans	Collagène de type I	P1: 47,2% P2: 43% P3: 40%

2. Comportement des CSM au sein d'un hydrogel de collagène de type I supplémenté par des microparticules d'hydroxapatite (HAP)

2.1 Mise au point de l'obtention des hydrogels de collagène

Plusieurs protocoles concernant la fabrication des hydrogels de collagène de type I ont été décrits dans la littérature ((Angele *et al.*, 2004) ; (Noth *et al.*, 2007) ; (Schneider *et al.*, 2010)). Le principe repose sur la préparation d'une solution de collagène à pH 6,5-7,4 qui sera déposée dans un puits d'une plaque de culture et amenée à polymériser par augmentation de la température. Les cellules ou des molécules d'intérêt seront ajoutées à la solution avant l'induction de la polymérisation. Ainsi, dans notre étude, différentes conditions ont été testées afin d'optimiser l'obtention d'hydrogels. Les paramètres étudiés ont été la concentration de collagène, la concentration de HAP, la concentration cellulaire ainsi que le volume du mélange déposé (tableau 16).

Tableau 16: Conditions testées pour l'obtention d'un hydrogel de collagène

Constituants	Conditions testées
Collagène de type I	2mg/mL ; 2,5mg/mL ; 3mg/mL
Hydroxyapatite	1mg/mL; 2mg/mL; 3mg/mL
Cellules souches mésenchymateuses humaines	1.10 ⁶ cellules/mL; 5.10 ⁵ cellules/mL, 8.10 ⁵ cellules/mL
Volume de gel	Plaque 48 puits : 0,250mL ; 0,300mL ; 0,350mL Plaque 96 puits : 0,100mL ; 0,150mL ; 0,200mL

Pour la plupart des conditions testées, il est apparu un problème de formation des hydrogels : leur prise en masse était faible sans aboutir à la formation d'un hydrogel manipulable. Les résultats obtenus montrent que cette prise en masse des hydrogels nécessite la présence de cellules. En leur absence, il n'y a pas de formation de gels manipulables. La présence des particules d'HAP favorise également l'obtention d'un hydrogel manipulable. Les gels restent adhérents jusqu'au deuxième jour de culture, c'est-à-dire qu'ils occupent toute la surface du puits dans lequel ils sont fabriqués. Ensuite, ils

se contractent et deviennent flottants ; leur diamètre diminue et ils n'ont plus de contact avec la surface de puits, les gels ne sont donc manipulables qu'à partir de J3.

Après avoir testé les différents paramètres, des conditions optimales à la fabrication des hydrogels ont pu être établies :

- Collagène de type I (COLI) à une concentration de 3mg/mL
- Cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) à une densité de 5.10^5 cellules/mL
- Volume de gel par puits de plaque de 48 puits : 0,350mL
- Volume de gel par puits de plaque de 96 puits : 0,150mL
- HAP à 3 concentrations et 3 tailles de microparticules (PT : 0-30 μ m ; MT : 30-80 μ m ; GT : 80-120 μ m).

La figure 24 montre un gel obtenu après 14 jours de culture dans les conditions optimales citées ci-dessus.



Figure 24: Aspect d'un hydrogel de collagène de type I supplémenté en HAP à J14 de culture.

La fabrication s'est déroulée dans les conditions optimales établies préalablement : ensemencement à 5.10^5 cellules/mL, HAP utilisé à 2mg/mL (taille moyenne), COLI utilisé à 3mg/mL et culture dans un puits de plaque de 48 puits.

2.2 Propriétés mécaniques de l'hydrogel de collagène de type I

Des tests de compression uniaxiale ont été réalisés à une vitesse de déformation de 1mm/min et à un pourcentage de déformation de 50% sur des échantillons d'hydrogels de collagène de type I, supplémentés en microparticules d'hydroxyapatite (HAP), contenant des cellules à une densité de 500.000 cellules/mL après 14 jours de culture.

La figure 25 représente les courbes de contrainte en fonction de la déformation à une vitesse de 1mm/min. Nous pouvons observer que la présence d'HAP augmente la résistance mécanique des hydrogels de collagène. De plus, en augmentant la concentration de HAP, la résistance mécanique des hydrogels devient plus importante.

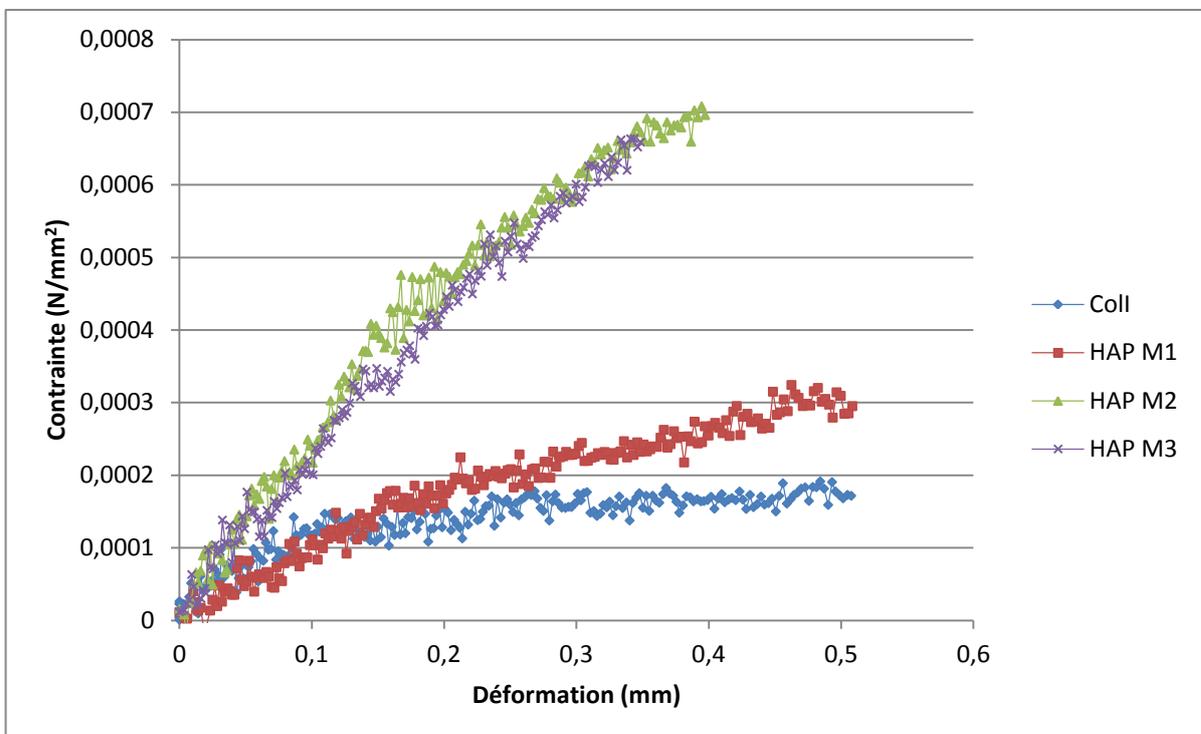


Figure 25: Influence de l'ajout de microparticules de HAP sur le comportement mécanique des hydrogels de collagène de type I.

Des échantillons d'hydrogel de collagène de type I (Coll) avec ou sans HAP de taille moyenne à différentes concentrations (HAP M1, HAP M2, HAP M3) ont été soumis à des tests de compression uniaxiale à une vitesse de 1mm/min et à un pourcentage de déformation de 50%.

2.3 Etude biologique : Suivi du comportement cellulaire dans les hydrogels de collagène I/HAP

Les hydrogels ont été fabriqués selon les conditions établies précédemment (partie 2.1). Afin d'en déterminer l'impact des constituants sur le comportement cellulaire (viabilité, métabolisme, prolifération, différenciation), deux paramètres ont été étudiés : la taille des particules de HAP et leur concentration au sein des hydrogels. Ainsi, la concentration de COLI utilisée est identique pour tous les hydrogels (3 mg/mL) tandis que les tailles de particules de HAP sont : PT : 0-30 μ m ; MT : 30-80 μ m ; GT : 80-120 μ m, et les concentrations de HAP sont : HAP1 : 1mg/mL ; HAP2 : 2mg/mL ; HAP3 : 3mg/mL.

2.3.1 Effet de la taille et de la concentration de particules de HAP sur la viabilité cellulaire

Les CSM sont cultivées dans des hydrogels de collagène I contenant ou non du HAP à différentes tailles et concentrations. Leur viabilité est déterminée après 3 (J3) et 21 (J21) jours de culture par microscopie confocale à l'aide du Kit de viabilité Live/Dead. Les CSM vivantes sont marquées en vert tandis que les mortes sont marquées en rouge.

Nous n'avons remarquées qu'un nombre faible de cellules mortes par rapport à la population totale de cellules et ce pour toutes les conditions et tous les temps (figure 26 et 27).

2.3.2 Effet de la taille et de la concentration de particules de HAP sur la morphologie et la distribution cellulaire

La morphologie des CSM cultivées dans des hydrogels a été observée en microscopie confocale (figure 28) grâce au marquage Live/Dead ainsi qu'en microscopie optique (figure 26) par une coloration à l'HES. Nous remarquons une distribution homogène des cellules au sein des hydrogels. Par ailleurs, nous observons qu'il existe deux populations cellulaires distinctes l'une à la morphologie arrondie et l'autre à la morphologie allongée. Les cellules allongées sembleraient être nombreuses en présence de HAP de petite et moyenne taille.

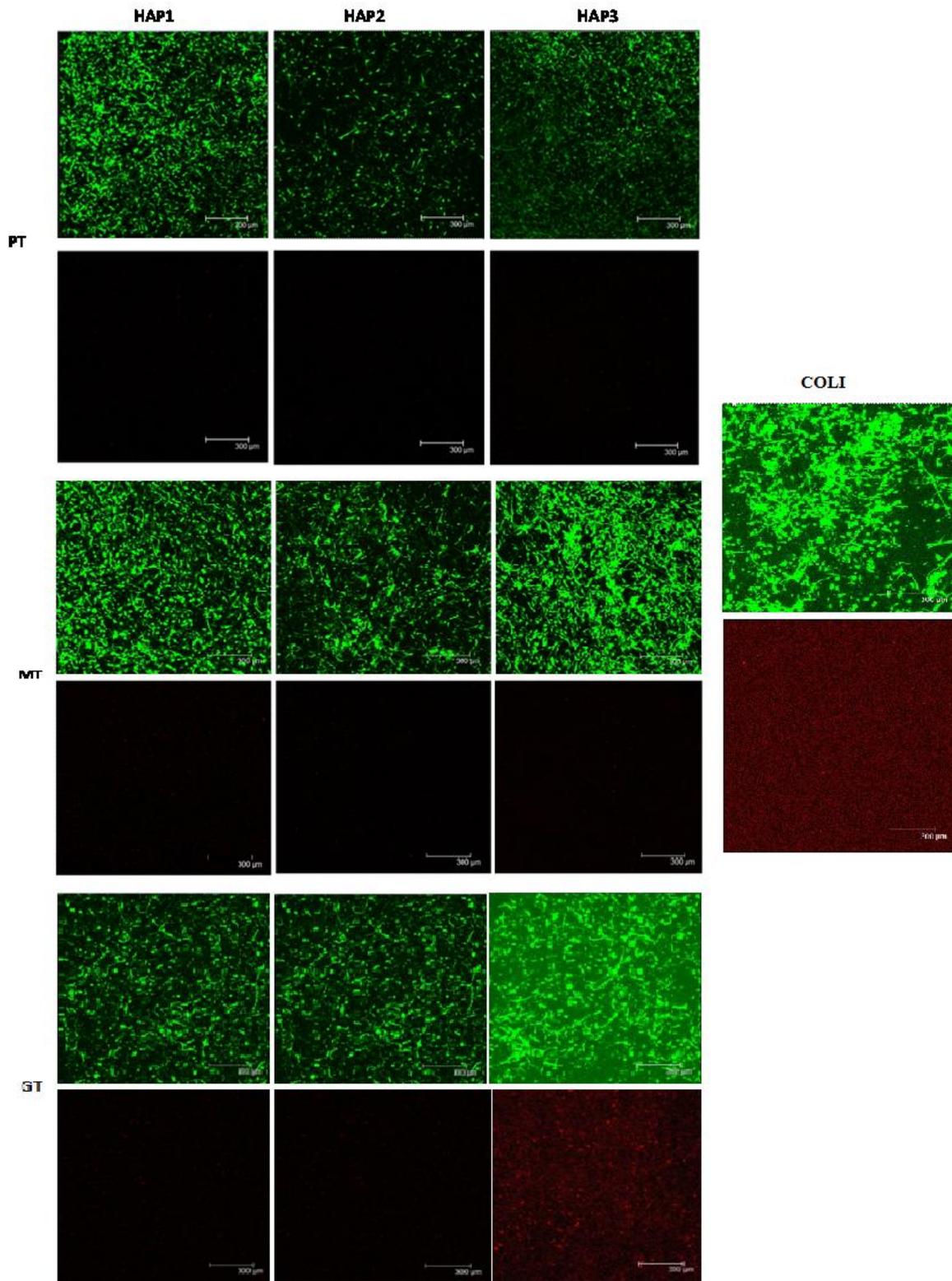


Figure 26: Etude de la viabilité à J3 des CSM au sein des hydrogels de collagène de type I contenant ou non des particules de HAP.

Marquage Live/Dead (Vert : calceine AM, ex/em : 494nm/517nm, marqueur de cellules vivantes ; rouge : EthD-1, ex/em : 517nm/617nm, marqueur de cellules mortes), microscope confocale SP2, objectif x10, ON : 0,8).

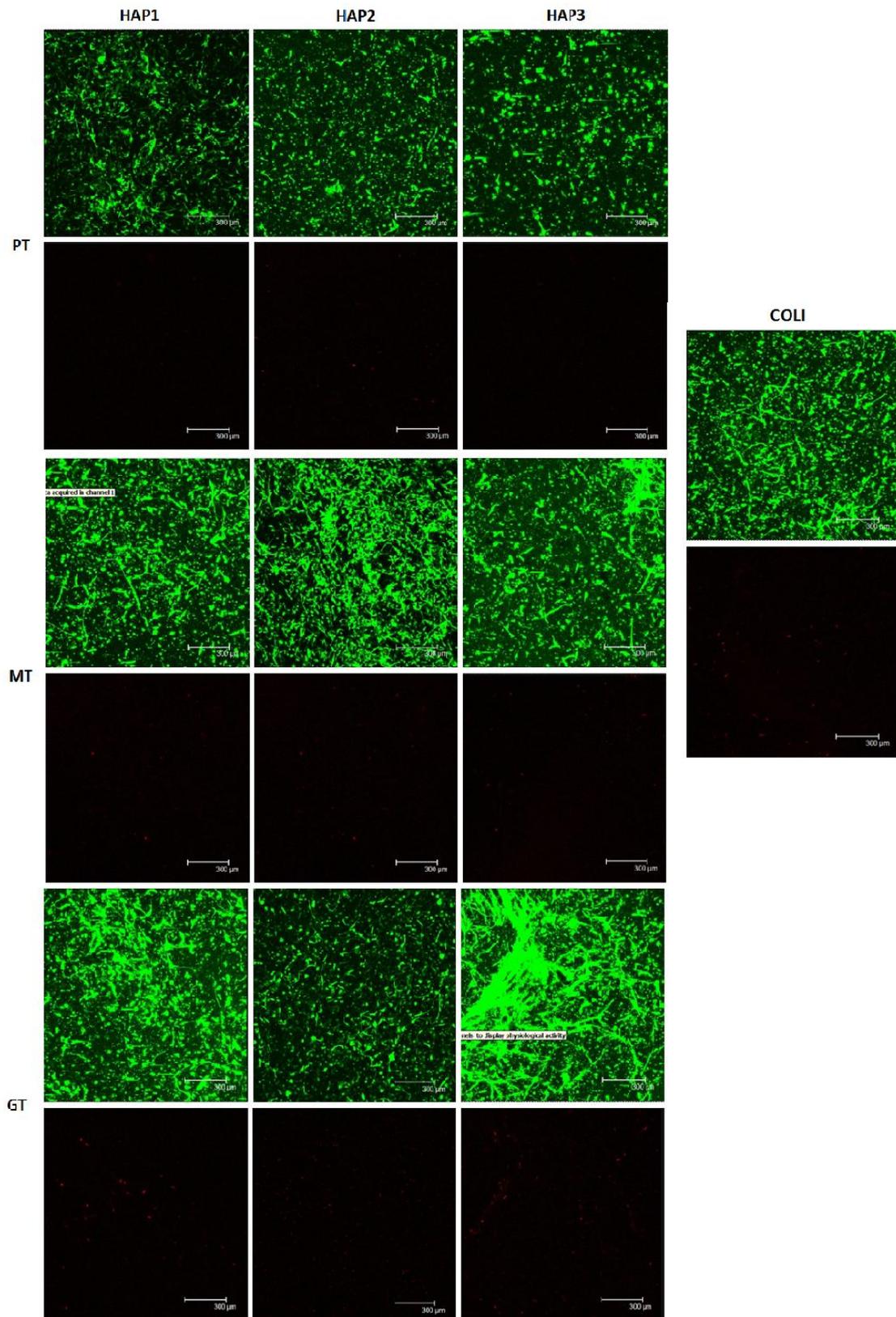


Figure 27: Etude de la viabilité à J21 des CSM au sein des hydrogels de collagène de type I contenant ou pas des particules de HAP

Marquage Live/Dead (Vert :calceine AM, ex/em : 494nm/517nm, qui marque les cellules vivantes et rouge : EthD-1, ex/em : 517nm/617nm, qui marque les cellules mortes en rouge), microscopie confocale SP2, objectif x10, ON : 0,8).

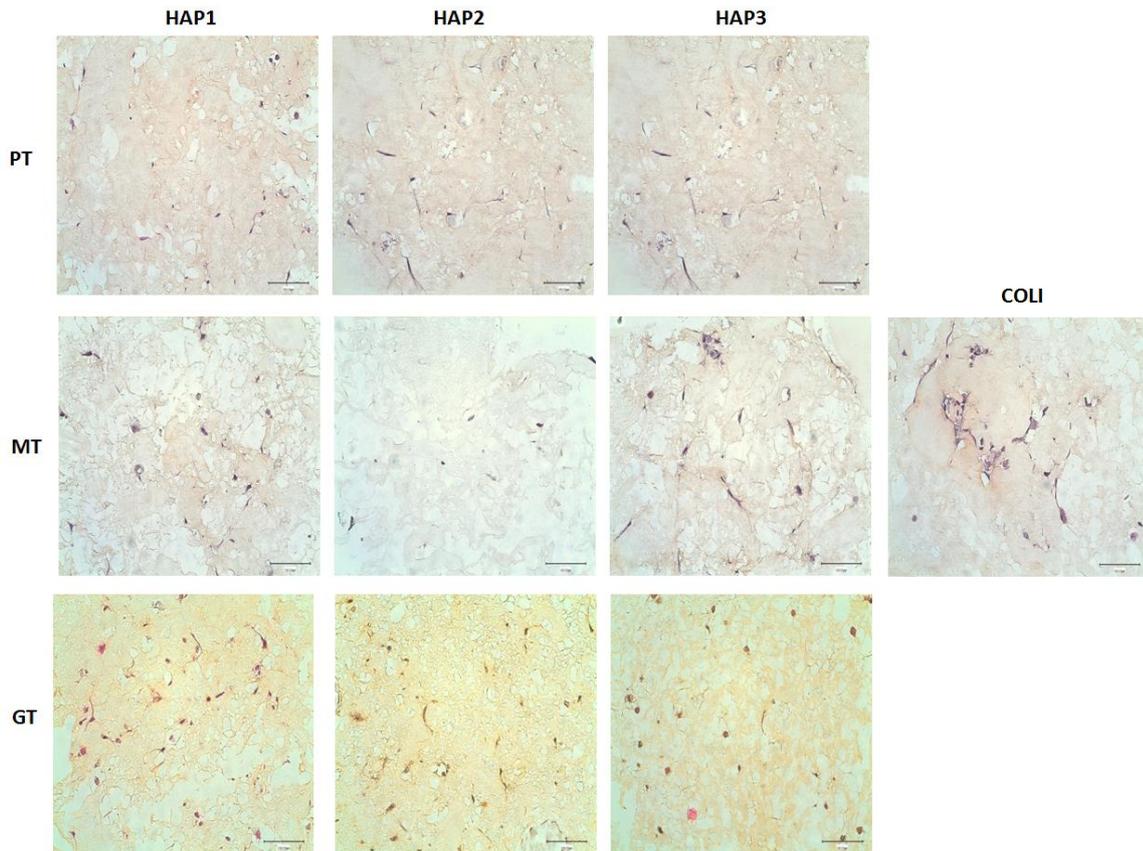


Figure 28: Observation de la morphologie et la distribution cellulaire à J3.

Coloration à l'HES (hématoxyline, éosine, safran) microscopie optique (objectif x20). Coloration des noyaux en violet (hématoxyline), du cytoplasme (éosine) et du collagène en jaune (safran).

2.3.3 Effet de la taille et la concentration de particules de HAP sur la contraction des hydrogels

Par analyse d'images à partir des photographies des hydrogels, nous avons quantifié la diminution de la taille, qui est une mesure du degré de contraction. A partir de ces résultats, nous avons observé que la contraction des hydrogels débute rapidement dès le détachement de l'hydrogel des parois du puits ; en effet une contraction de 30% dès après trois jours de culture (J3) a été remarquée (figure 29). A partir de 7 jours de culture (J7), nous observons une augmentation significative de la contraction des gels puis ce phénomène tend à se stabiliser et cela pour toutes les conditions étudiées. Après 21 jours de culture (J21), les hydrogels apparaissent très denses. Une légère diminution dans la vitesse de contraction des hydrogels a été observée en présence de particules d'hydroxyapatite par rapport à des hydrogels de collagène. Ce phénomène est plus important soit quand la quantité de particules augmente, soit quand leur taille augmente.

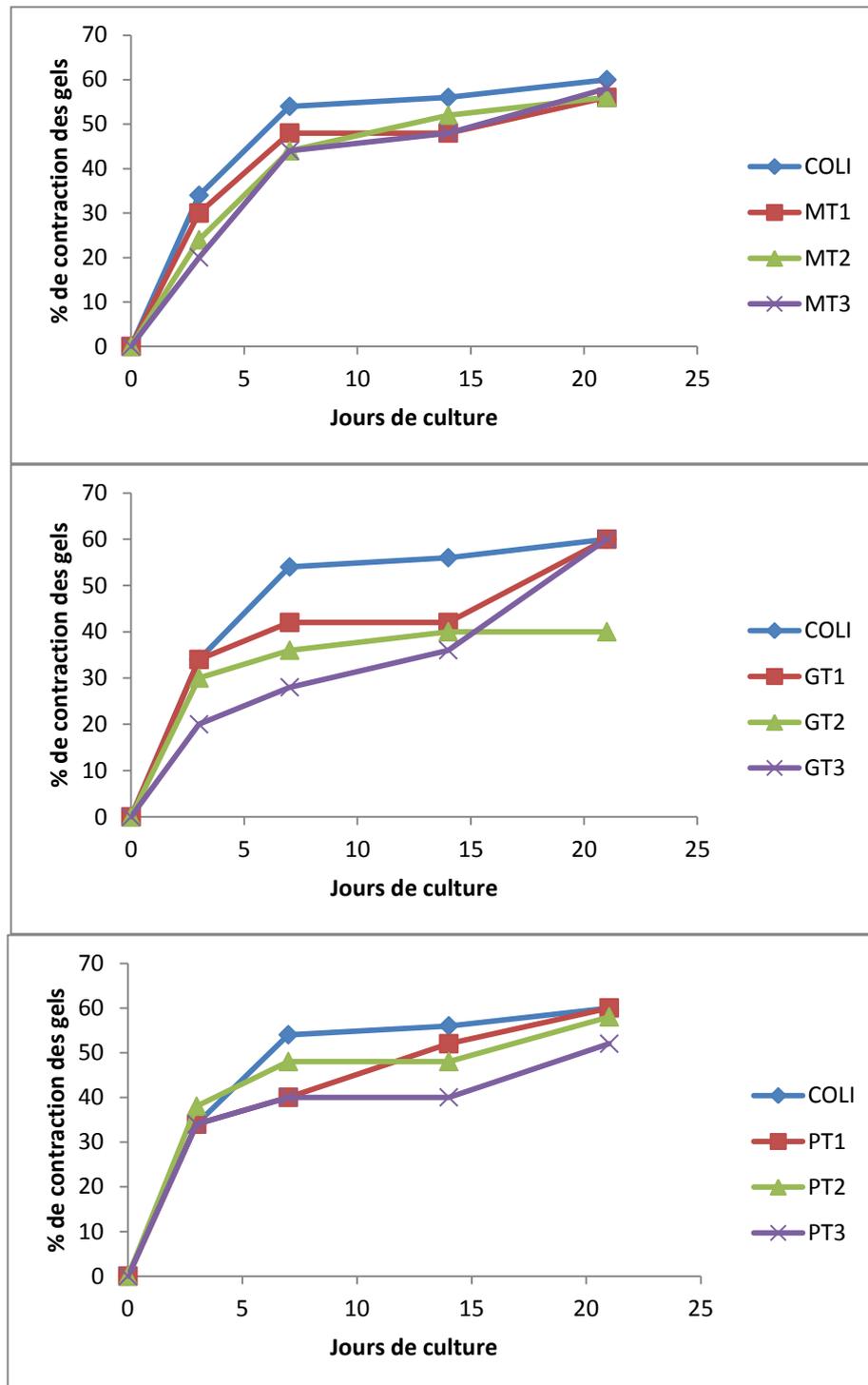


Figure 29: Etude de la contraction des hydrogels au cours du temps.

Cinétique de la formation des hydrogels à partir des images prises avec un appareil photo numérique, le pourcentage de contraction est calculé à partir du diamètre du gel et en prenant comme référence le diamètre d'un puits d'une plaque 48 puits.

2.3.4 Effet de la taille et de la concentration de particules de HAP sur la prolifération et le métabolisme cellulaire

La prolifération cellulaire est exprimée par la quantité d'ADN en μg . De J3 à J7, la quantité d'ADN augmente légèrement pour toutes les conditions puis diminue progressivement de J7 à J21. Le pic de prolifération est atteint à J7 pour toutes les conditions. La présence de HAP n'inhiberait pas la prolifération par rapport à du collagène seul ; HAP G3 peut être considéré comme la condition la plus favorable à cette augmentation (figure 30).

L'activité métabolique cellulaire, représentée sur la figure 31, a été calculée grâce au pourcentage de réduction de l'Alamar Blue rapporté à la quantité d'ADN dans un échantillon. De J3 à J14, le métabolisme des CSM au sein des hydrogels augmente significativement, on remarque un pic métabolique à J14 pour toutes les conditions (figure 31). De J14 à J21, il diminue pour toutes les conditions.

2.3.5 Effet de la taille et de la concentration de particules de HAP sur la différenciation cellulaire

1.1.1 Expression des facteurs de transcription

Les figures 32 et 33 représentent l'évolution de l'expression génique des facteurs de transcriptions par les CSMensemencées dans des hydrogels à base de collagène de type I avec ou sans HAP à différentes tailles et concentrations.

Les résultats indiquent que le facteur de transcription Sox-9 caractéristique de la chondrogenèse est exprimé surtout en présence de HAP à J7 (HAP P2, HAP M2, HAP G2) et J21 (HAP P1, HAP M1 et HAP G1). En effet, une augmentation significative de l'expression de Sox-9 est observée quand les cellules sont cultivées dans des gels contenant du HAP et collagène du type I par rapport aux CSM cultivées en monocouche. L'expression du Runx-2 caractéristique de l'ostéogenèse et des CSM ostéo-chondro progéniteurs est observée pour toutes les conditions. Enfin, PPAR γ facteur de transcription adipocytaire est exprimé par les cellules cultivées dans les différents hydrogels.

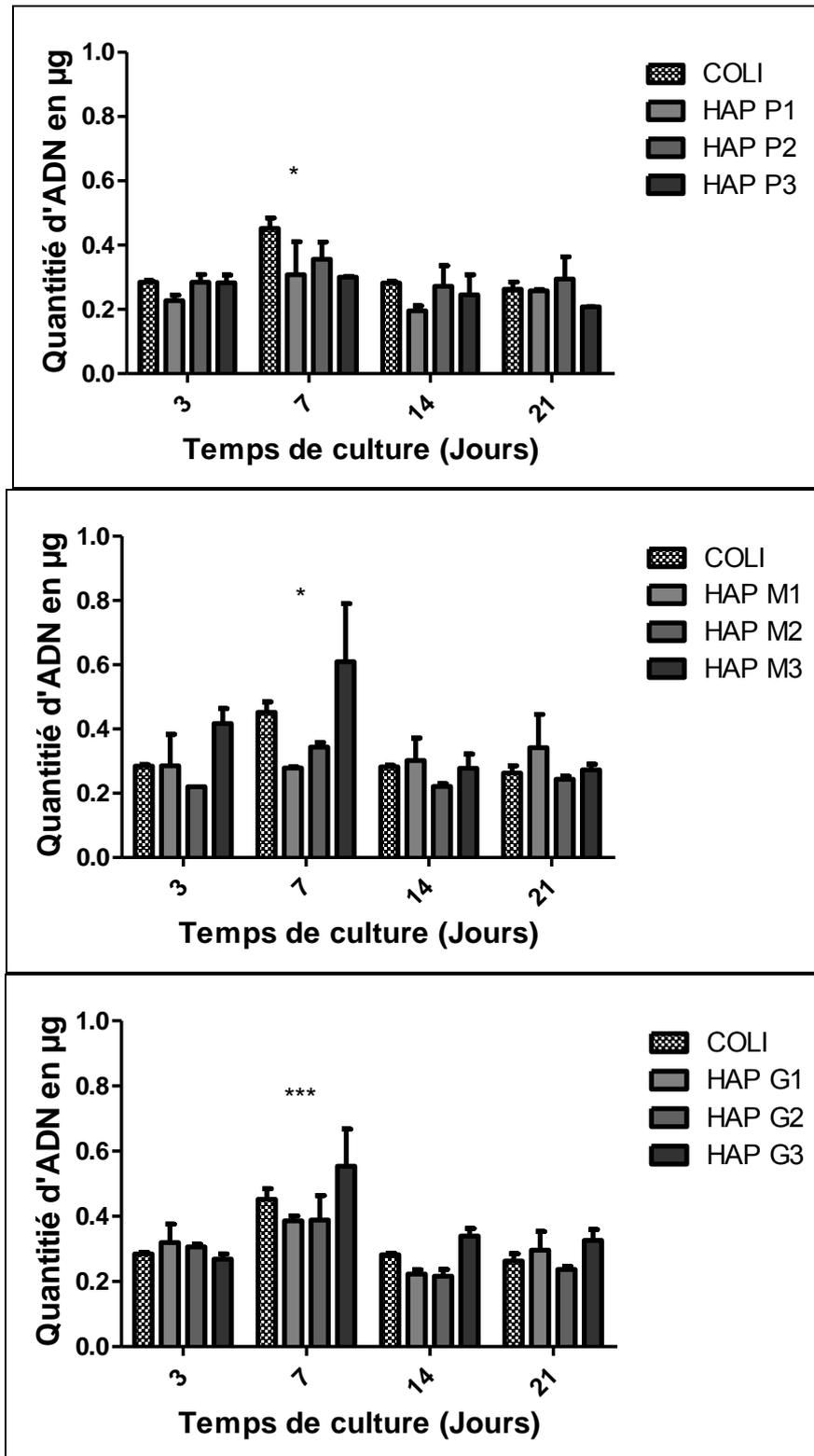


Figure 30: Evolution de la quantité d'ADN (en µg).

*Du tampon Hoescht contenant l'agent intercalent d'ADN Hoescht 33258 (ex/em : 356nm/458nm) est ajouté aux échantillons. Leur fluorescence (ex/em : 356/458) est ensuite mesurée par spectrofluorométrie, * $p < 0,05$ par rapport aux autres temps, *** $p < 0,001$ par rapport aux autres temps, $n = 3$.*

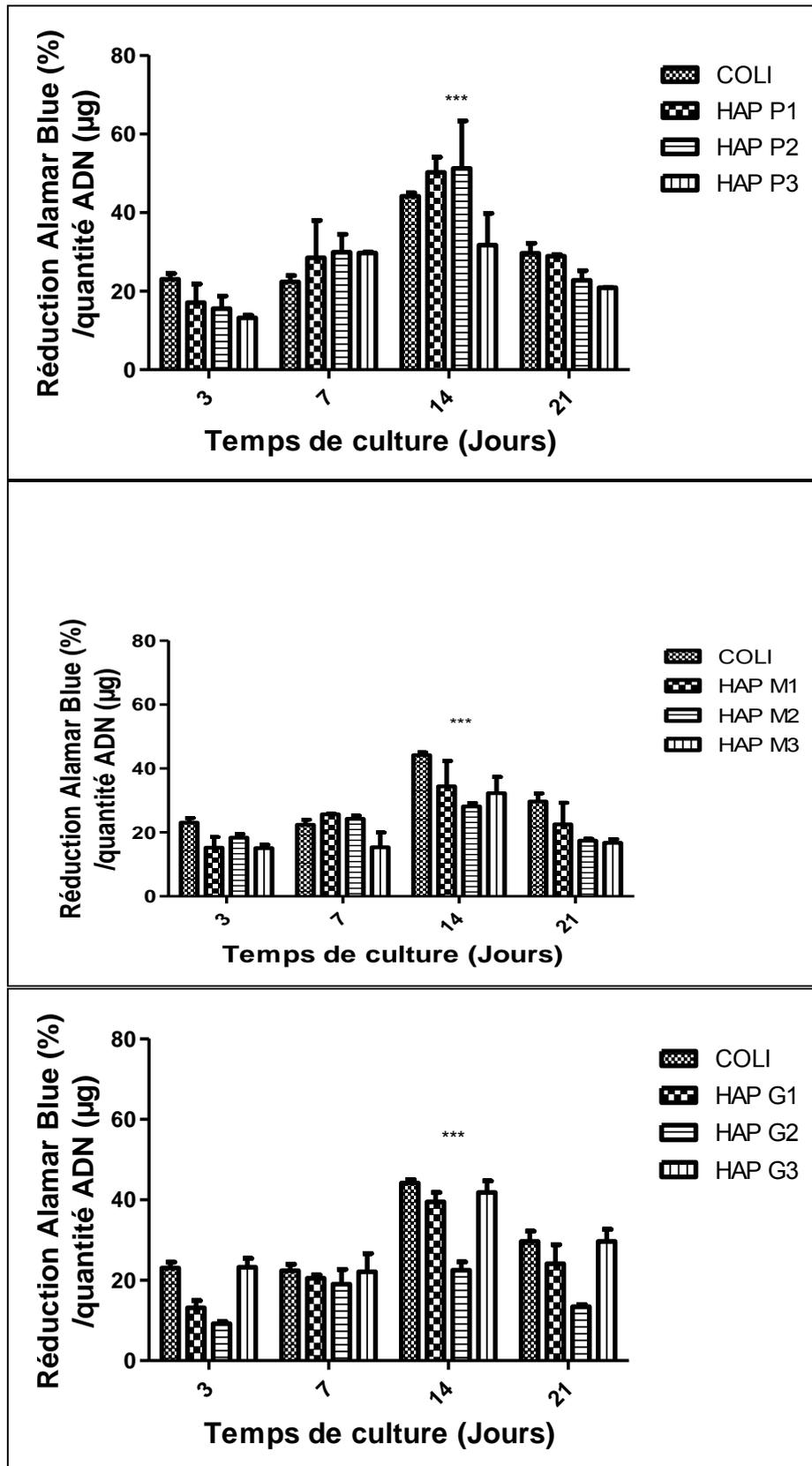


Figure 31: Etude du métabolisme cellulaire des CSM cultivées dans les différents hydrogels. Le métabolisme cellulaire correspond au rapport de la réduction d'Alamar Blue en % sur la quantité d'ADN en µg. *** $p < 0,0001$ par rapport à J3, $n=3$.

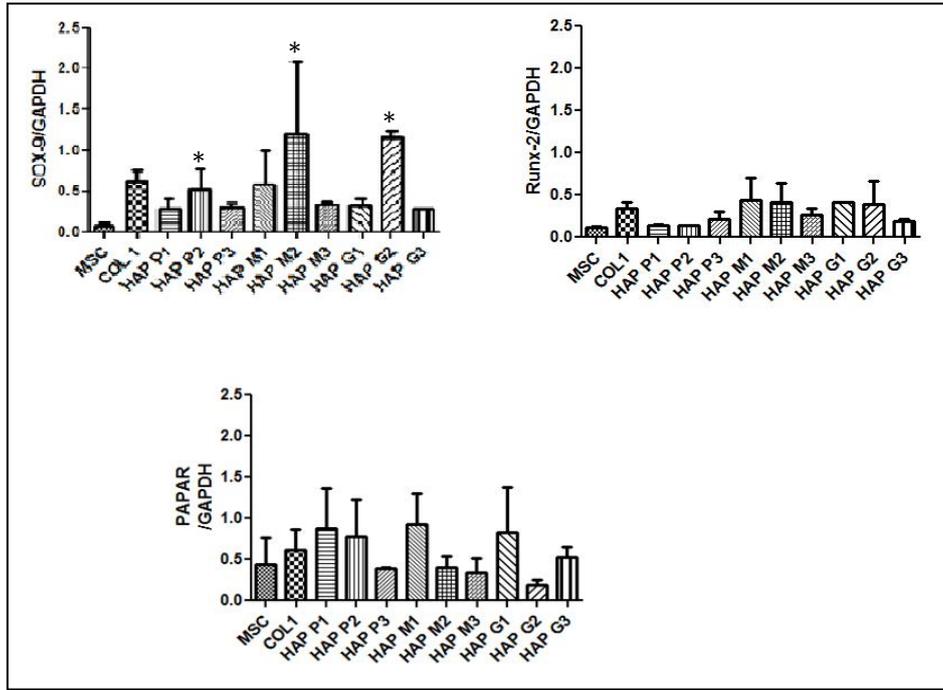


Figure 32: Analyse par RT-PCR de l'expression génique de l'ARNm de facteurs de transcription exprimés par les CSM cultivées dans les différents hydrogels à **J7**. Expression de *sox-9*, *runx-2* et *PPARγ* par rapport au *GAPDH* (témoin utilisé), $*p < 0,05$ par rapport aux autres conditions, $n=3$.

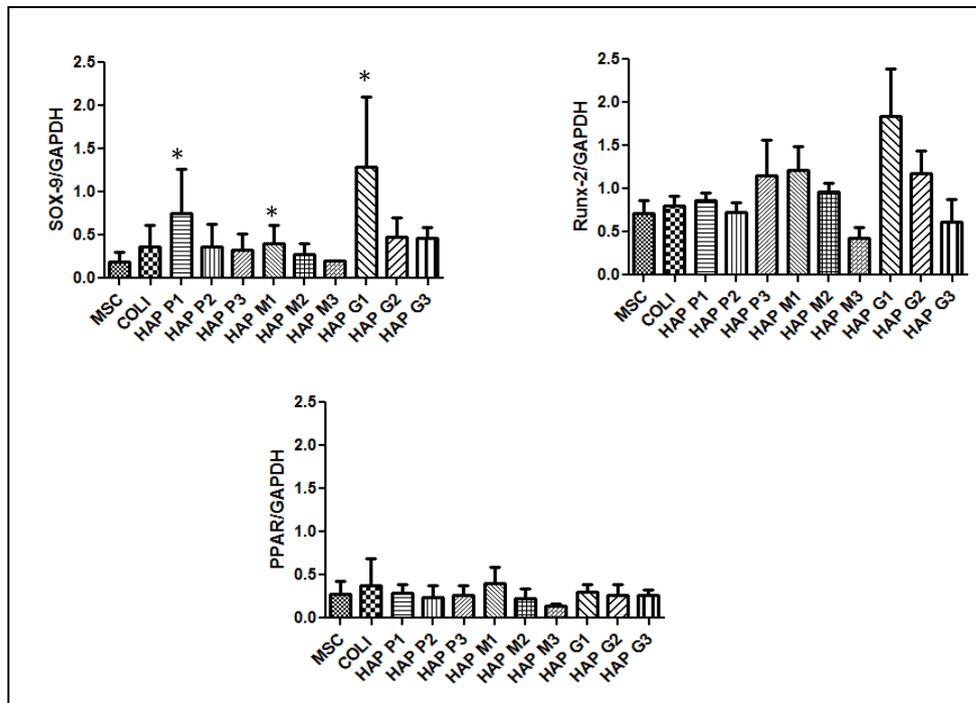


Figure 33: Analyse par RT-PCR de l'expression génique de l'ARNm de facteurs de transcription exprimés par les CSM cultivées dans les différents hydrogels à **J21**. Expression de *sox-9*, *runx-2* et *PPARγ* par rapport au *GAPDH* (témoin utilisé), $*p < 0,05$ par rapport aux autres conditions, $n=3$.

1.1.2 Synthèse matricielle

L'analyse de la synthèse matricielle a été réalisée par RT-PCR, pour quantifier la synthèse de collagène de type I et collagène de type II après 21 jours de culture (figure 33). Les résultats montrent une diminution de collagène de type I par rapport aux cellules cultivées en monocouche, pour la majorité des conditions sauf HAP M1, HAP M3. Le collagène de type II est exprimé par HAP P1, HAP M1 et HAP G1.

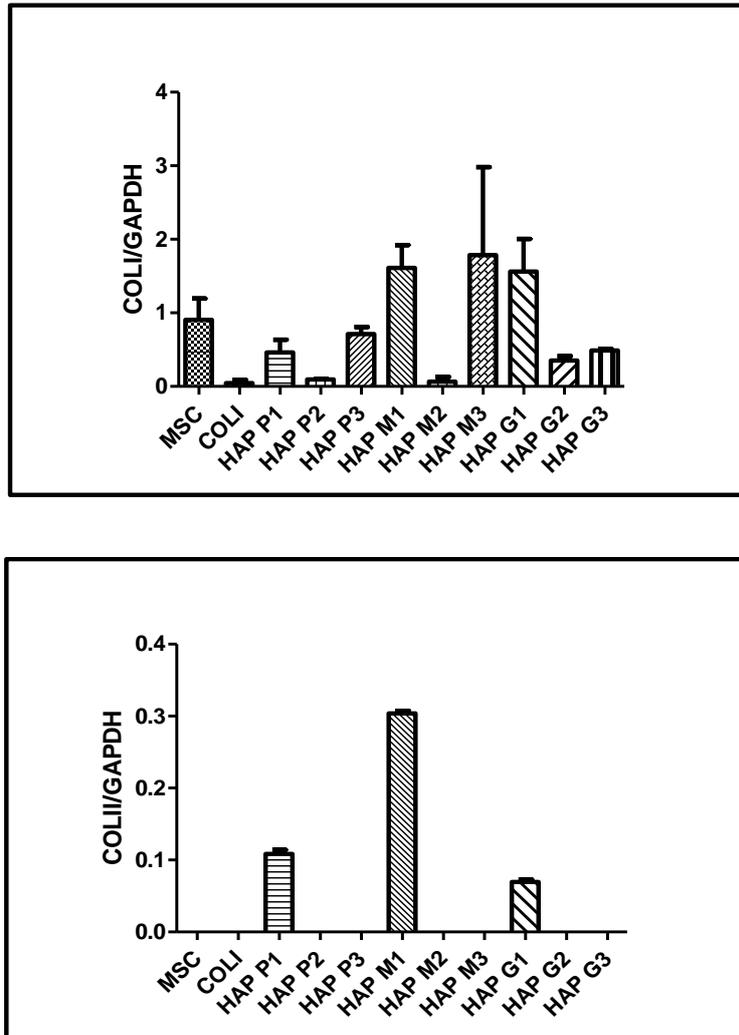


Figure 34: Analyse par RT-PCR de l'expression génique de L'ARNm de protéines de la matrice exprimées par les CSM cultivées dans les différents hydrogels à J21.

Expression de collagène de type I et collagène de type II par rapport au GAPDH (témoin utilisé),

1.1.3 Expression de la protéine d'intérêt (Sox9)

La synthèse de protéine d'intérêt Sox9 a été observée après un marquage immunohistologique à jour 21 de culture (figure 35). Les immunomarquages de Sox9 mettent en évidence une faible synthèse de cette protéine dans tous les biomatériaux testés. Il semblerait que la quantité de Sox9 ne varie pas significativement entre les biomatériaux.

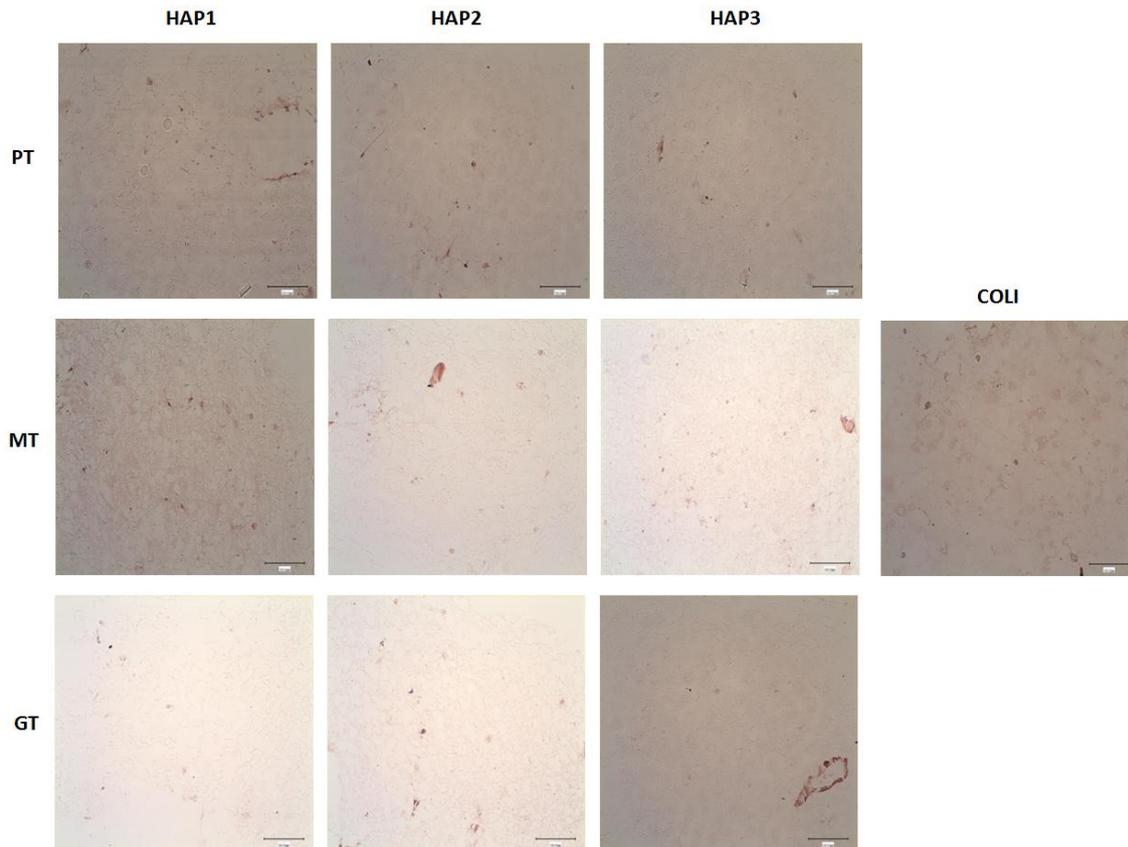


Figure 35: Etude de la synthèse de protéines d'intérêt.

Synthèse de la protéine sox9 à J21 par immunohistologie observée au microscope (objectifx10).

3. Discussion

Au cours de cette partie de notre travail, nous avons procédé en plusieurs étapes. Tout d'abord, nous avons mis au point l'obtention d'un hydrogel de collagène de type I supplémenté en particules d'hydroxyapatite. Par la suite, après l'incorporation de CSM dans ce biomatériau, des essais préliminaires ont été effectués afin de s'assurer de sa biocompatibilité avec les cellules. Enfin, nous avons suivi le devenir des CSM dans ces hydrogels en faisant varier la taille et la concentration de HAP afin de déterminer les effets d'une modulation de la composition de la matrice sur le comportement cellulaire.

Dans un premier temps nous avons étudié l'effet du HAP sur la viabilité cellulaire. Le HAP apparaît comme n'étant pas cytotoxique pour les CSM lorsqu'il est incorporé dans des matrices de collagène de type I. Nos résultats sont en accord avec l'équipe de Liu qui a montré qu'il n'existe pas d'augmentation de la mortalité cellulaire en présence de HAP (Liu and Williams, 2010). En effet, nous ne remarquons qu'un faible nombre de cellules mortes par rapport à la population cellulaire totale et ce pour toutes les conditions et tous les temps (figure 25). Après 21 jours de culture, une faible augmentation de la mortalité cellulaire aux bords du gel est observée (figure 26), due probablement au manque d'espace causé par la contraction intense du gel. Cette même conclusion est apportée par Galois et al. (Galois *et al.*, 2006).

Par ailleurs, nous avons remarqué différentes morphologies pour les CSM en fonction des concentrations de HAP utilisées dans les hydrogels. Deux populations de cellules y sont apparues : l'une de morphologie arrondie et l'autre de morphologie allongée (figure 27). Pour Noth *et al.*, ils remarquent qu'en présence de BMP (facteur de croissance ostéogénique), les CSM cultivées dans des hydrogels de collagène de type I apparaissent allongées (Noth *et al.*, 2007). Enfin, des CSM cultivées dans des matrices de collagène de type I et d'alginate et engagées dans une voie de différenciation chondrocytaire présentent une morphologie ronde (Bosnakovski *et al.*, 2006)

Ainsi, nous avons pu observer une diminution significative du diamètre des hydrogels au cours du temps. En effet, de J0 à J2, les gels occupent toute la surface des puits et sont dits «adhérents» (figure 28). A partir de J2, un phénomène de contraction apparaît et les gels, dits «flottants» se rétractent rapidement, avec une diminution de 30% de leur diamètre en 3 jours ($p < 0,001$). A J21, les matrices apparaissent ainsi très denses. Nos observations sont en

conformité avec les résultats de Galois et al. qui, en cultivant des chondrocytes dans des gels de collagène de type I, constatent à la fin de leurs expérimentations, une densification intense de leurs hydrogels qui varie selon la densité cellulaire. Cependant, dans ces travaux, les gels sont détachés des puits mécaniquement alors que dans notre étude leur détachement se fait naturellement. Ainsi Oh *et al.* ont observé les mêmes résultats avec des CSM de rat que Galois et al., mais sans avoir détaché les gels mécaniquement (Oh *et al.*, 2011).

Peu de travaux de bioingénierie ostéo-articulaire ont été consacrés à l'étude de la culture de CSM dans des hydrogels de collagène de type I supplémenté en HAP. Une de ces études, due à Liu et al., s'intéresse à la régulation par le HAP de la contraction des gels de collagène médiée par les CSM (Liu and Williams, 2010). En effet, un inconvénient de ce collagène ensemencé de CSM, pour certaines applications cliniques, est la contraction médiée par ces cellules. Cette déformation architecturale peut ainsi mener à la cassure des gels une fois qu'ils sont implantés *in vivo* (Liu and Williams, 2010). Les travaux de cette équipe montrent que la présence de HAP diminue la rétraction des gels de manière dose dépendante. Après 16 jours de culture, leur diamètre ne diminue que de 24%. Au sein des gels, les cellules interagissent avec les fibres de collagène en formant des interactions collagène-intégrine-cytosquelette qui provoquent la rétraction de celui-ci. D'après les résultats de cette équipe, les particules de HAP casseraient ces interactions et préviendraient la contraction des gels de collagène de type I par les CSM. Nos résultats montrent seulement une légère diminution dans la vitesse de contraction des hydrogels en présence d'HAP par rapport à des hydrogels de collagène. Cependant, après 21 jours de culture, nous n'avons pas observé de différences significatives dans la contraction des hydrogels en présence ou non d'HAP. Cette différence de résultats, entre Liu et notre étude, pourrait s'expliquer par le fait que dans l'étude de Liu et al., HAP est utilisé sous forme de nanoparticules dont la structure est différente de celle des cristaux de HAP utilisés dans notre cas.

Le métabolisme cellulaire présente globalement la même évolution (figure 31). De J3 à J14, il présente une faible augmentation et ce pour toutes les conditions. De J7 à J14, on remarque une nette augmentation de ce paramètre pour toutes les conditions. Enfin de J14 à J21, nous remarquons une petite diminution de ce paramètre dû peut être à l'entrée des CSM dans une voie de différenciation.

La présence de HAP n'inhibe pas la prolifération. La quantité d'ADN augmente de J3 à J7 puis diminue progressivement de J7 à J21 et ce pour toutes les conditions (figure 30). La

grande taille de HAP et une forte concentration de HAP G3 favoriseraient une augmentation de la prolifération des CSM. Galois et al. constatent que les gels de collagène de type I dits «adhérents» favorisent la prolifération cellulaire (Galois *et al.*, 2006); ce qui correspond dans notre étude à la période J3-J7. Cette augmentation de la prolifération est aussi remarquée dans d'autres études pour des CSM en voie de différenciation chondrocytaire et cultivées dans des gels de collagène de type I (Bosnakovski *et al.*, 2006) ; (Oh *et al.*, 2011).

L'étude de la différenciation cellulaire a été réalisée d'une part via l'expression génique de facteurs de transcription spécifiques et d'autre part via l'expression de composants matriciels

L'étude de l'expression génique de certains facteurs de transcription nous informe de la voie de différenciation dans laquelle se sont engagées les cellules. Sox9, qui est un facteur présent dans la voie de différenciation chondrocytaire, est exprimé surtout en présence de HAP pour la concentration 2mg/mL à J7 et la concentration 1mg/mL à J21. Cependant la taille des microparticules de HAP n'a aucun effet sur l'expression de ce gène. En revanche, Runx2, facteur ostéogénique, s'exprime pour toutes les conditions (figure 32 et 33).

Ces informations nous conduisent à suggérer que la présence de HAP favoriserait un pré-engagement des CSM dans une voie chondrocytaire. Cependant la présence de collagène de type I et Runx2 suggère également un état cellulaire potentiel de pré-différenciation ostéocytaire.

4. Comportement des CSM au sein d'un hydrogel à base d'alginate

La seconde partie de ce travail consiste à étudier le comportement des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (CSM) dans un hydrogel à base d'alginate supplémenté avec de l'acide hyaluronique (HA) ou des microparticules d'hydroxyapatite (HAP). Dans un premier temps, nous avons étudié les propriétés mécaniques de cet hydrogel en utilisant deux plans d'expériences différents (plan statistique), et en faisant varier à chaque fois trois facteurs à trois niveaux :

Tableau 17: Différents facteurs à différents niveaux des deux plans d'expériences

Plan d'expériences 1	Plan d'expériences 2
F1- Concentration d'alginate : 1%, 1,5%, 2%	F1- Concentration d'hydroxyapatite (HAP) : 1mg/mL, 2mg/mL, 3mg/mL
F2- Concentration d'acide hyaluronique (HA) : 0%, 0,5%, 1%	F2- Taille de microparticules de HAP : petite, moyenne, grande
F3- Concentration de CaCl ₂ : 50mM, 75mM, 102mM	F3- Concentration de CaCl ₂ : 50mM, 75mM, 102mM

Ces valeurs ont été choisies compte tenu des conditions habituellement retenues (empiriquement) et supposées optimales pour l'élaboration de ce genre de matériau.

A partir des résultats obtenus sur les deux plans d'expériences, nous avons choisi certains biomatériaux pour la culture avec les CSM, et ceci en fonction des propriétés mécaniques.

4.1 Propriétés mécaniques de l'hydrogel d'alginate (plan d'expériences)

4.1.1 Présentation des résultats du plan d'expériences 1

4.1.2.1 Effet de différents facteurs sur la déformation maximale

Nous considérons que la réponse Y_i correspond à la déformation maximale ϵ_{max} . Des tests de compression simple ont été réalisés à une vitesse de 1mm/min sur des échantillons d'alginate/HA, en absence de cellules.

La figure 36 représente la réponse des échantillons après une sollicitation mécanique à différents niveaux de facteurs de composition. Ainsi, quelque soit le niveau du variation de facteur 2 et 3 (acide hyaluronique et CaCl_2), les hydrogels montrent une déformation maximale similaire. D'autre part, une augmentation de déformation maximale des hydrogels a été observée en variant le niveau de facteur 1(alginate).

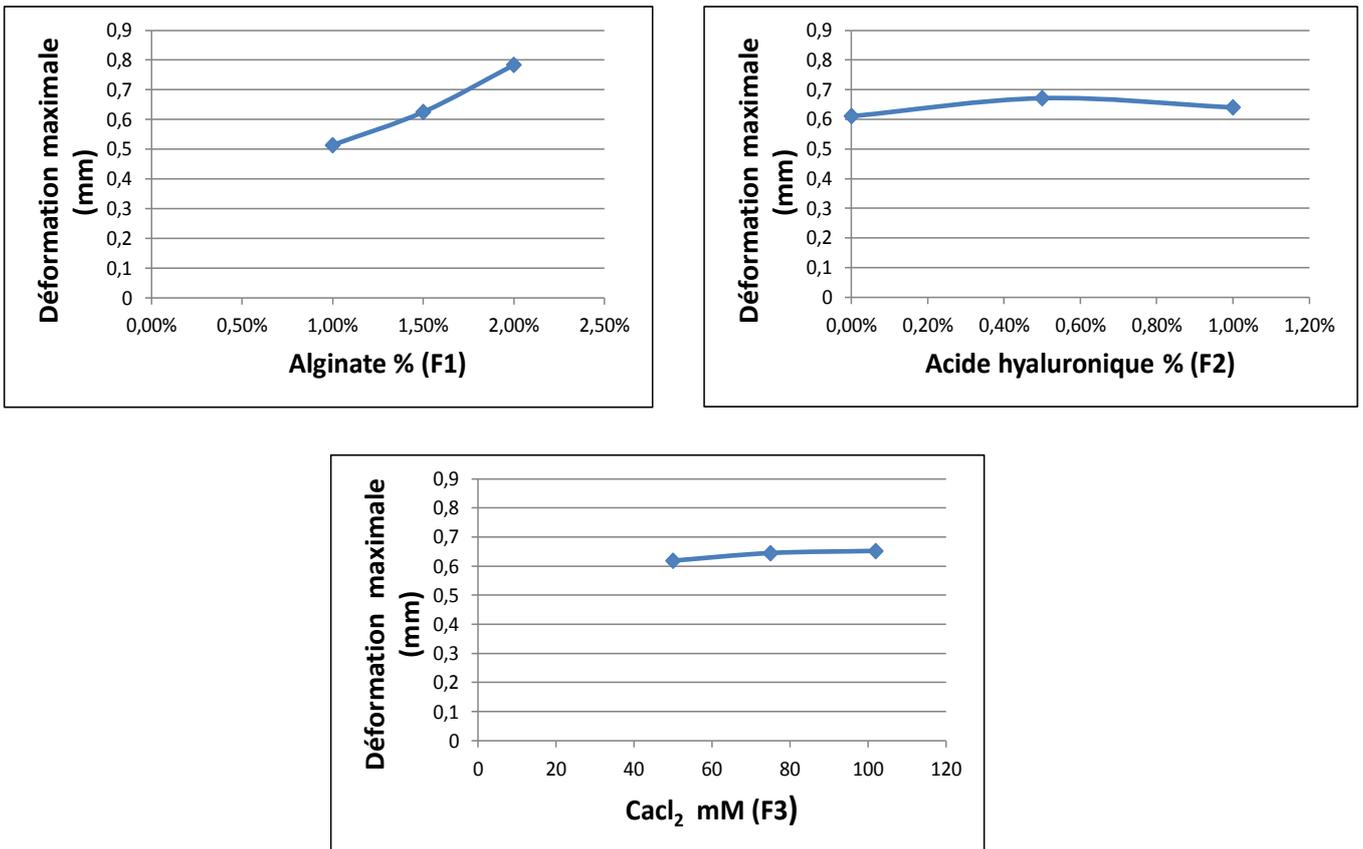


Figure 36 : Effet des différents facteurs de composition sur la déformation à rupture du biomatériau alginate/HA

4.1.2.2 Effet de différents facteurs sur la contrainte maximale

Nous considérons que la réponse Y_i correspond à la contrainte maximale. Des tests de compression simple ont été réalisés à une vitesse de 1mm/min sur des échantillons d'alginate/HA, en absence de cellules.

La figure 37 représente la réponse des échantillons après une sollicitation mécanique à différents niveaux de facteurs de composition. Ainsi, en variant le niveau des facteurs 1 et 3 (alginate et CaCl_2), les hydrogels montrent une augmentation de la contrainte maximale. Une diminution de la contrainte maximale a été observée avec la variation de niveau de facteur 2 (acide hyaluronique).

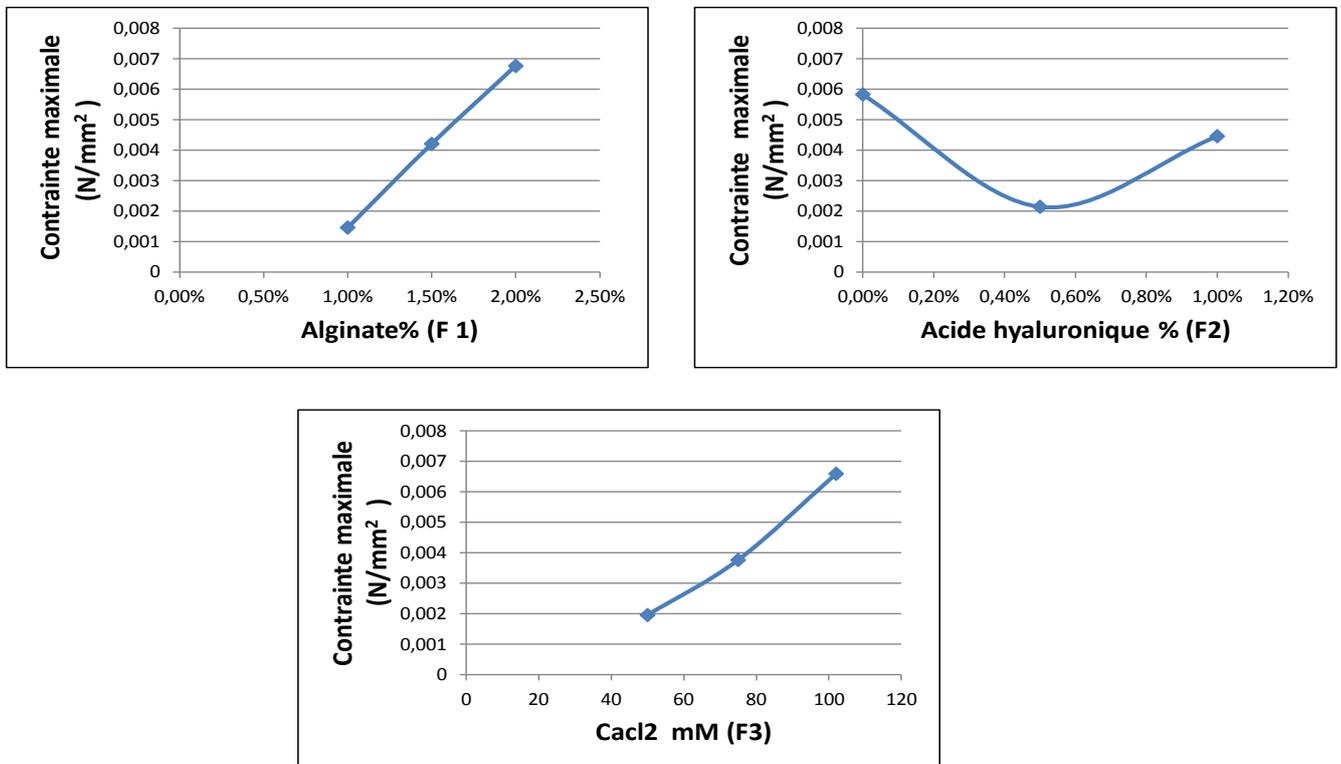


Figure 37: Effet des différents facteurs de composition sur la contrainte maximale du biomatériau alginate/HA

4.1.2.3 Effet des différents facteurs sur l'élasticité

Nous considérons que la réponse Y_i correspond à l'élasticité. Des tests de compression simple ont été réalisés à une vitesse de 1mm/min sur des échantillons d'alginate/HA, en absence de cellules.

La figure 38 représente la réponse des échantillons après une sollicitation mécanique à différents niveaux de facteurs de composition. Ainsi, en variant le niveau des facteurs 1 et 3 (alginate et CaCl_2), les hydrogels montrent une augmentation de l'élasticité. Une faible augmentation de l'élasticité a été observée avec la variation de niveau de facteur 2 (acide hyaluronique).

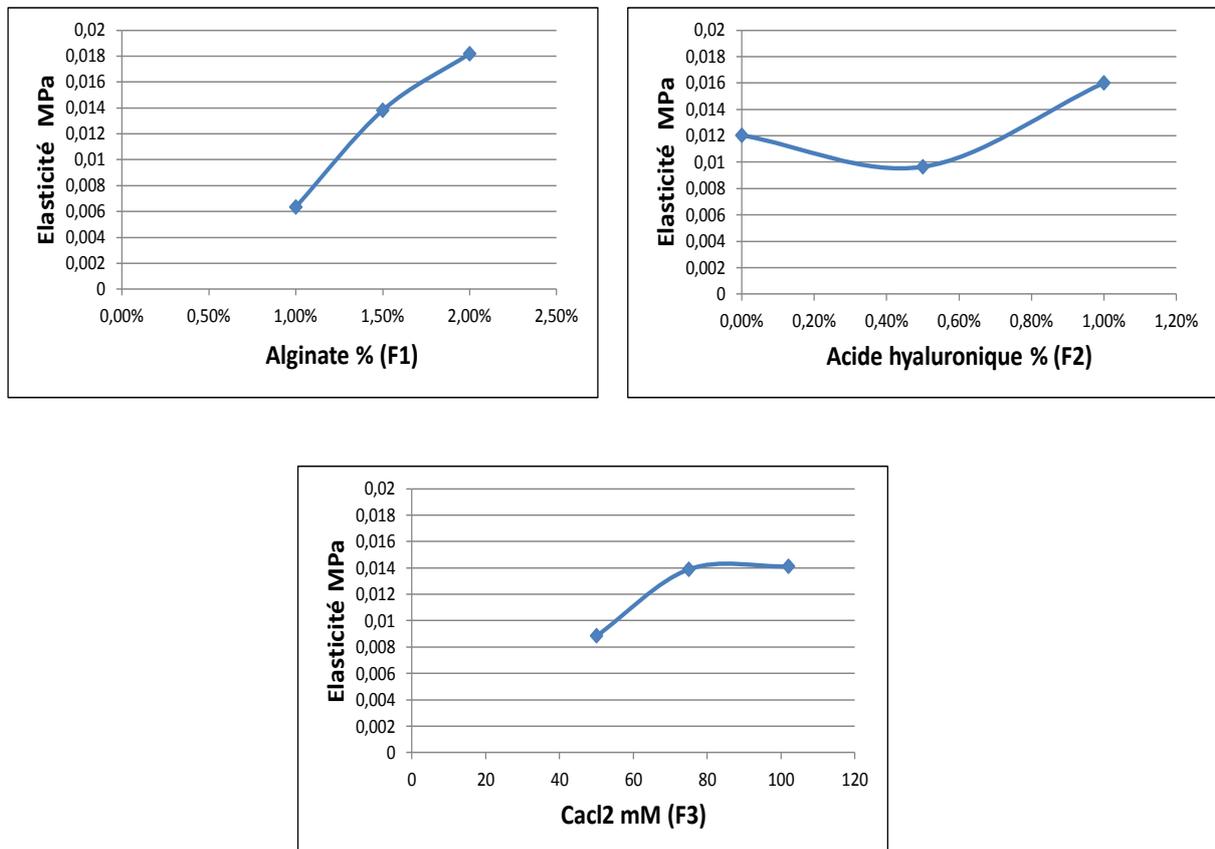


Figure 38: Effet des différents facteurs de composition sur l'élasticité du biomatériau alginate/HA

4.1.2 Présentation des résultats du plan d'expériences 2

4.1.3.1 Effet de différents facteurs sur la déformation maximale

Pour évaluer l'effet de la composition des hydrogels sur les propriétés mécaniques, des tests de compression uniaxiale ont été réalisés sur des échantillons d'alginate/HAP en absence cellules.

La figure 39 représente la réponse des échantillons après une sollicitation mécanique à différents niveaux de facteurs de composition. La variation des niveaux de facteurs de composition (1, 2 et 3) n'a aucun effet sur la déformation maximale des hydrogels.

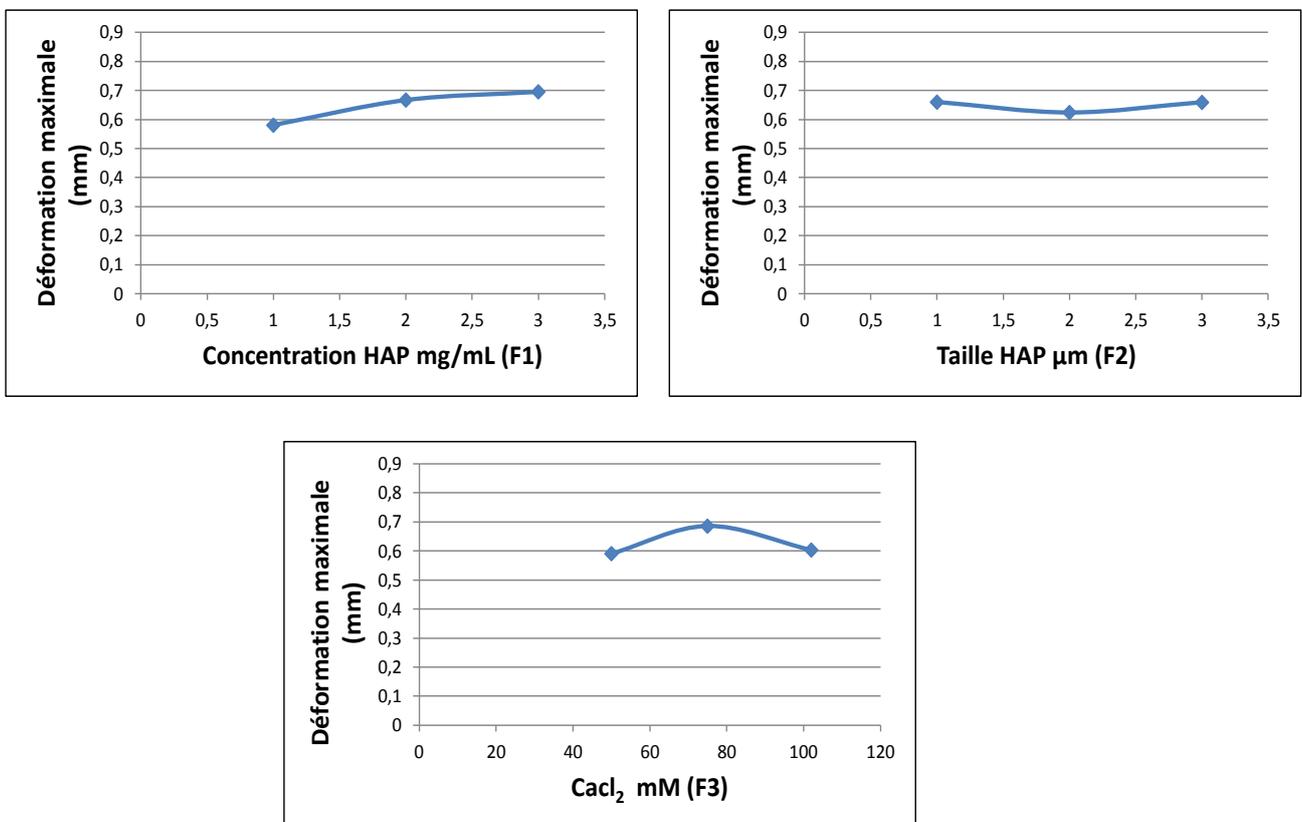


Figure 39: Effet des différents facteurs de composition sur la déformation maximale du biomatériau alginate/HAP

4.1.3.2 Effet de différents facteurs sur la contrainte maximale

La figure 40 représente la réponse (contrainte maximale) des échantillons après une sollicitation mécanique à différents niveaux de facteurs de composition. En variant le niveau de facteur 1 (concentration d'HAP), nous remarquons une augmentation de la contrainte maximale. Cependant, la variation de niveaux des facteurs 2 et 3 n'a aucun effet sur la contrainte maximale des hydrogels.

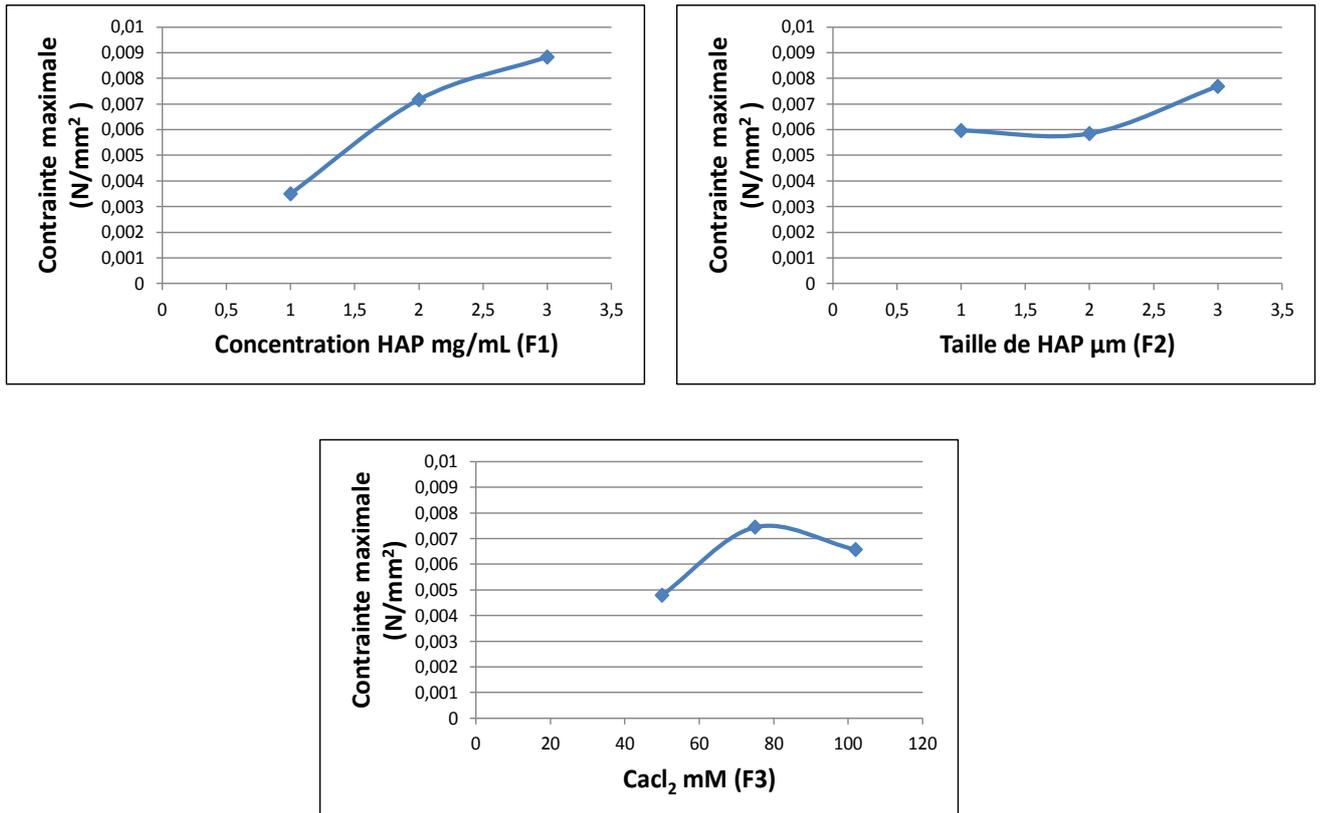


Figure 40: Effets des différents facteurs de composition sur la contrainte maximale du biomatériau alginate/HAP.

4.1.3.3 Effets de différents facteurs sur l'élasticité

La figure 41 représente la réponse d'élasticité des échantillons après une sollicitation mécanique à différents niveaux de facteurs de composition. Ainsi, en variant le niveau de facteur 1 (concentration d'HAP), les hydrogels montrent une augmentation de l'élasticité. La taille des particules d'HAP et la concentration de CaCl_2 n'ont aucun effet sur le module d'élasticité.

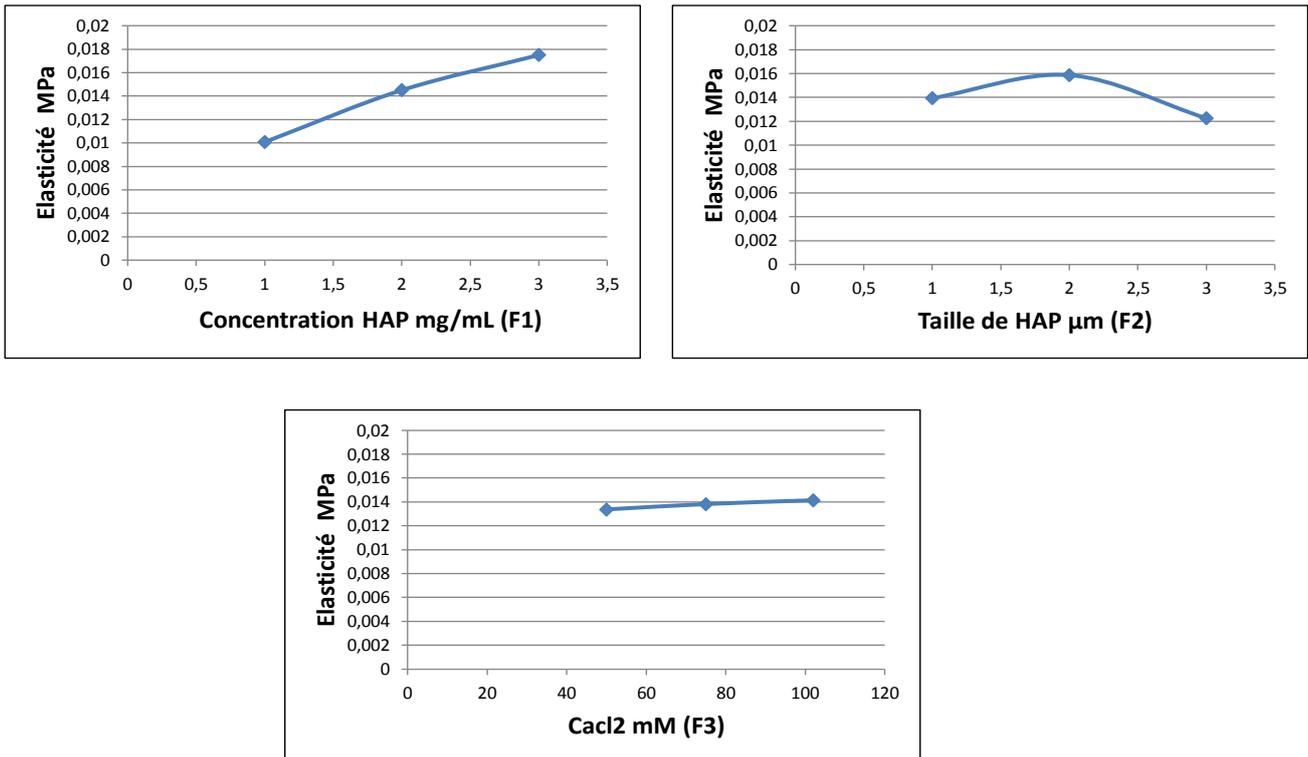


Figure 41: Effets des différents facteurs de composition sur l'élasticité du biomatériau alginate/HAP

Après avoir mesuré les propriétés mécaniques des hydrogels alginate/ HA et alginate/ HAP en utilisant deux plans d'expériences différents, nous avons pu choisir les biomatériaux convenables pour l'étude biologique.

A. Biomatériau alginate/HA

- 1- 1% alginate, 1% HA : E= 9 Kpa
- 2- 1,5% alginate, 1% HA : E= 18 Kpa
- 3- 2% alginate, 1% HA : E= 24 Kpa

B. Biomatériau alginate/HAP

- 1- 2% alginate, 1mg/mL HAP : E= 5 Kpa
- 2- 2% alginate, 2mg/mL HAP : E= 12 Kpa
- 3- 2% alginate, 3mg/mL HAP : E= 20 Kpa

4.2 Etude biologique

4.2.1 Viabilité cellulaire

La figure 41 représente l'évolution de la viabilité cellulaire des CSM ensemencées dans des hydrogels d'Alg/HA et Alg/HAP. La viabilité des CSM est déterminée après 3 et 28 jours de culture, en utilisant le kit Live/ Dead qui permet de distinguer les cellules vivantes marquées en vert et les cellules mortes marquées en rouge.

Après 28 jours de culture, nous remarquons un faible nombre de cellules mortes par rapport à la population totale pour toutes les conditions.

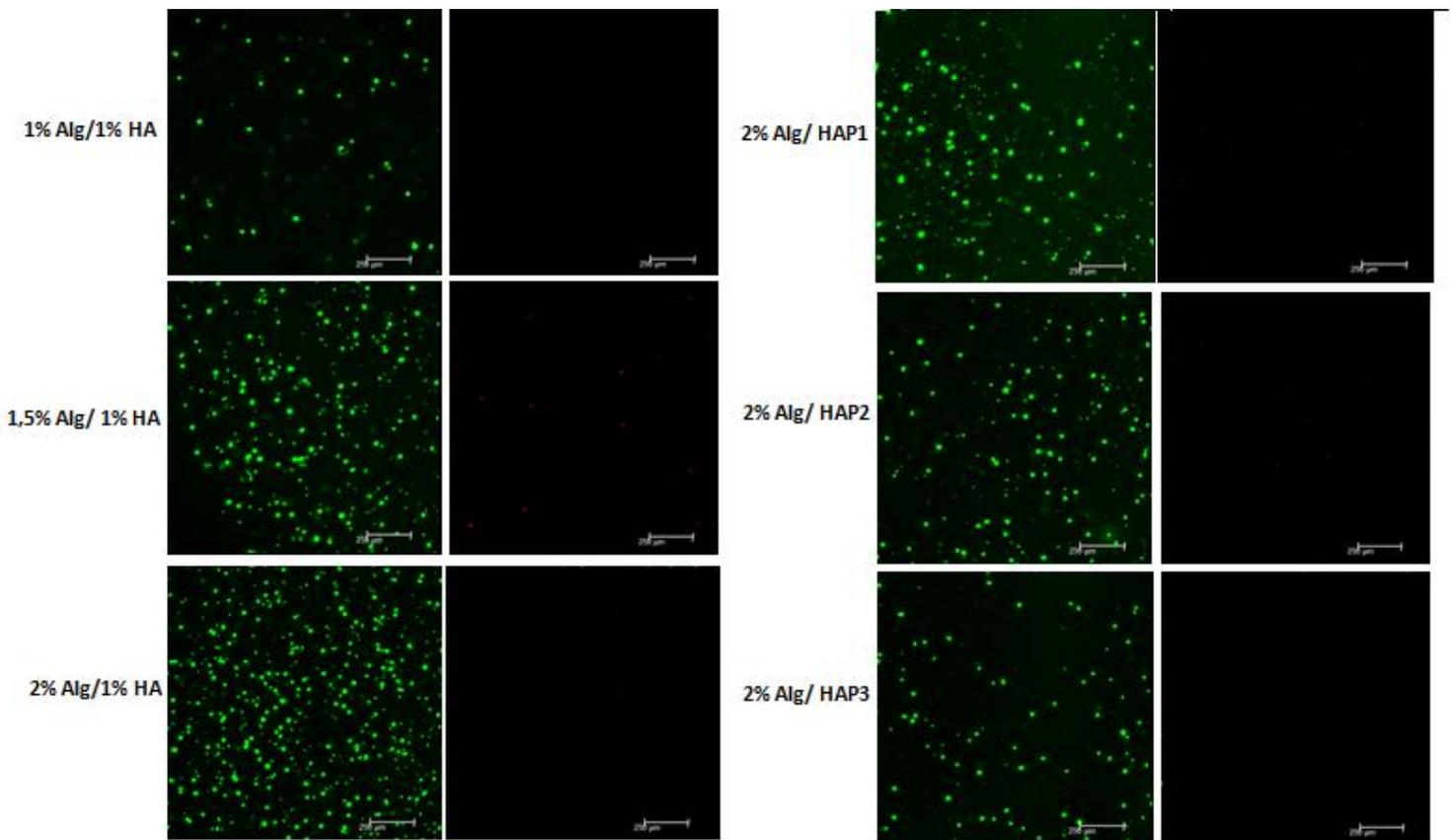


Figure 42: Etude de la viabilité à J28 des CSM au sein des hydrogels d'alginate

Le marquage Live/Dead (calceine AM, ex/em : 494nm/517nm, qui marque les cellules vivantes en vert et EthD-1, ex/em : 517nm/617nm, qui marque les cellules mortes en rouge), microscopie confocale, objectif x10, ON : 0,8).

4.2.2 Morphologie et distribution cellulaire

La morphologie et la distribution des CSM cultivées dans des hydrogels d'Alg/HA et Alg/HAP ont été observées en microscopie optique par une coloration à l'HES.

Quel que soit la composition des hydrogels, la distribution des cellules est restée homogène dans les biomatériaux. Quant à la morphologie des cellules, elle semble être arrondie pour toutes les conditions (figure 43).

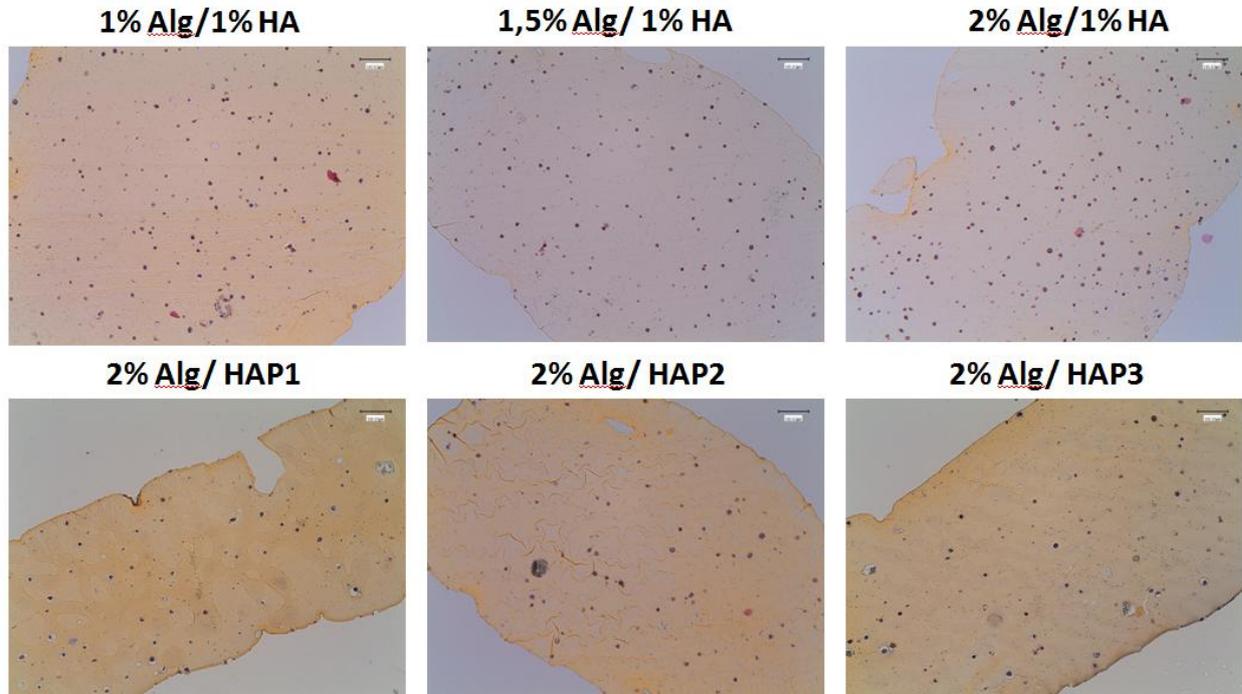


Figure 43: Observation de la morphologie et de la distribution cellulaire à J3. Les différents hydrogels ont été colorés à l'HES. Coloration des noyaux en violet (hématoxyline), du cytoplasme (éosine) et du collagène en jaune (Safran). Les lames sont observées en microscopie optique avec un objectif x20. Les barres d'échelle représentent 100µm.

4.2.3 Métabolisme et prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est exprimée par la quantité d'ADN en µg. Cette quantité d'ADN reste constante pour toutes les conditions de J3 à J28 (Figure 44).

L'activité métabolique représentée sur la figure 45, a été calculée grâce au pourcentage de réduction de l'Alamar Blue rapporté à la quantité d'ADN dans un échantillon. L'activité métabolique des cellules est maintenue constante ($p > 0.05$) sans qu'aucune différence significative ne soit observée par rapport à J3.

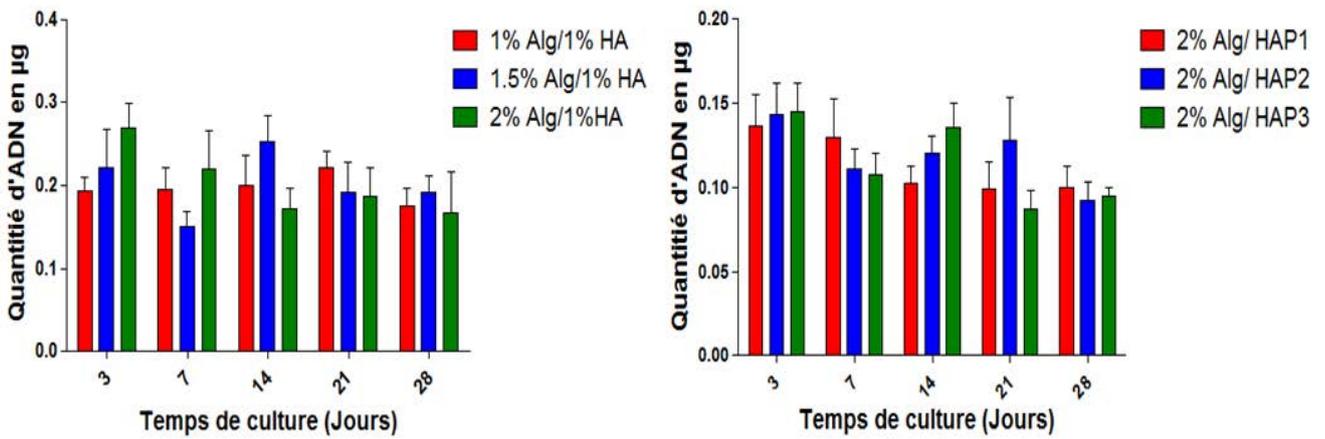


Figure 44: Evolution de la quantité d'ADN (en µg)

Du tampon Hoescht contenant l'intercalent Hoescht 33258 (ex/em : 356nm/458nm) est ajouté aux échantillons. Leur fluorescence (ex/em : 356/458) est ensuite mesurée par spectrofluorométrie. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, N = 3.

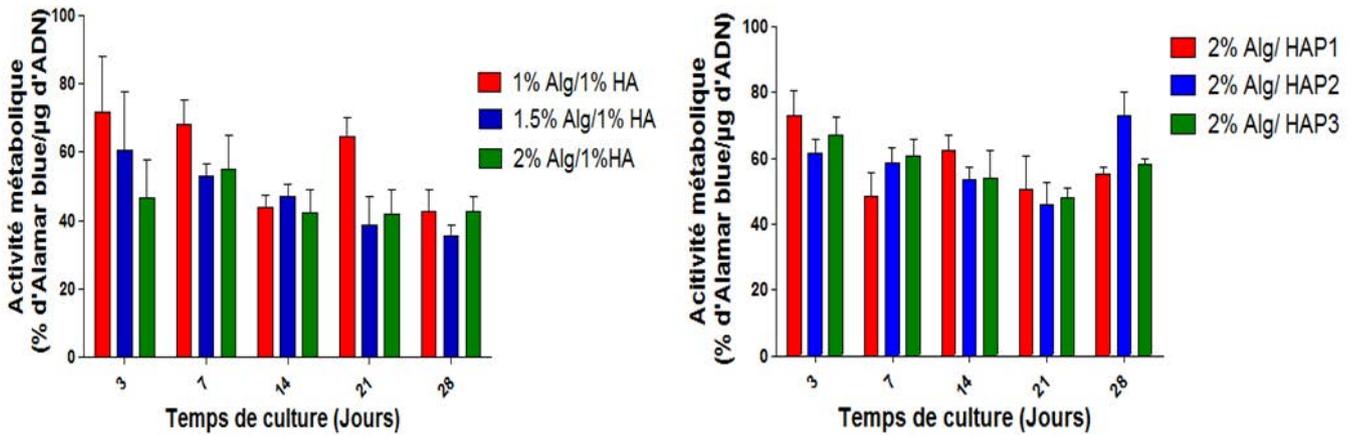


Figure 45: Evolution de l'activité métabolique des CSM au sein des hydrogels à base d'alginate.

L'activité métabolique des CSM ensemencées dans des hydrogels d'Alg/HA et Alg/HAP a été calculée grâce au pourcentage de réduction d'Alamar Blue rapporté à la quantité d'ADN. L'activité métabolique est stable tout au long de la culture. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, N=3

4.2.4 Expression des gènes d'intérêt

L'expression génique des CSM ensemencées dans des hydrogels Alg/HA et des hydrogels Alg/HAP a été étudiée. Cette expression est rapportée à celle des CSM cultivées en monocouche.

L'expression génique des facteurs de transcription Sox9 et Runx2 par les CSM augmente significativement au cours de la culture et selon les conditions testées (figure 46 et 47). A 28 jours de culture, l'expression de Sox9 a augmentée significativement dans l'hydrogel composé de 2% Alg/1% HA par rapport au CSM cultivées en monocouche ($p < 0,001$). Ainsi, nous remarquons une augmentation de l'expression de ce gène dans les hydrogels Alg/HAP dès J7 par rapport au CSM. L'expression de Runx2 augmente significativement dans les hydrogels Alg/HA et Alg/HAP par rapport au CSM cultivées en monocouche, surtout à J28 pour les hydrogels 2% Alg/1% HA et 2% Alg/HAP3.

Après 28 jours de culture, l'expression de col2a a augmenté significativement dans les hydrogels Alg/HA et Alg/HAP par rapport au CSM en monocouche (figure 48). L'expression de col1 diminue significativement par rapport au CSM en monocouche pour les hydrogels Alg/HA, cependant, cette expression augmente significativement pour les hydrogels Alg/HAP à partir de J21 (figure 49). L'expression de col10 n'est pas différente significativement pour les hydrogels Alg/HA entre les différentes conditions, cette expression augmente pour les hydrogels Alg/HAP à partir du jour 7 de culture (figure 49).

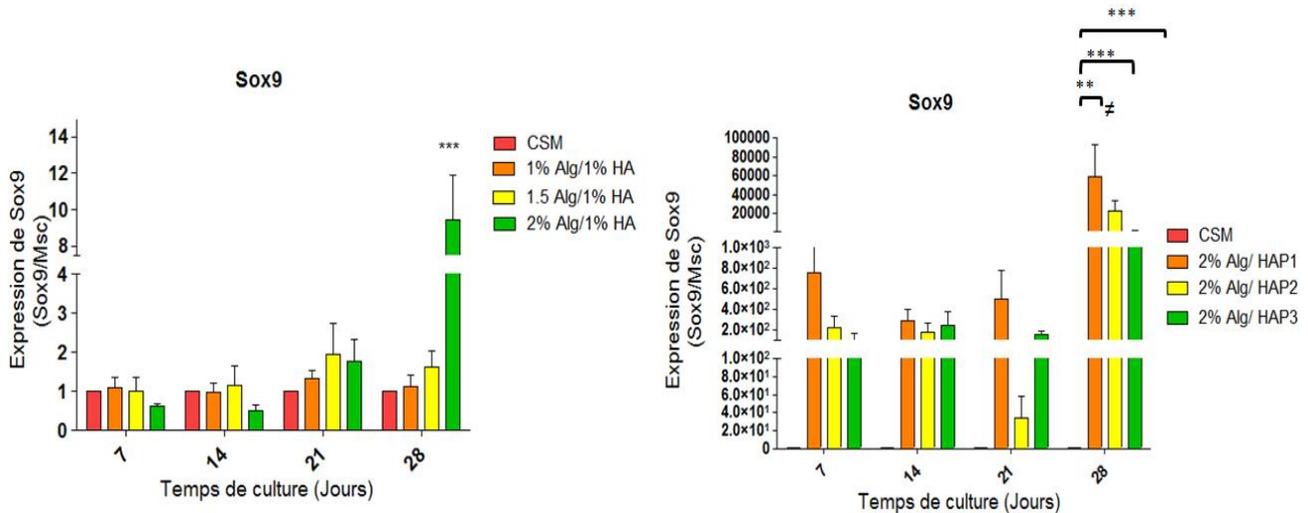


Figure 46: Influence de la nature du biomatériau sur l'expression génique de facteur de transcription Sox9

L'évolution de l'expression de Sox9 par les CSM ensemencées dans des hydrogels à base d'alginate a été étudiée. Six différentes conditions (Alg/HA et Alg/HAP) sont comparées avec des CSM cultivées en monocouche. L'expression de Sox9 par rapport au CSM est significativement différente à J28. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $N = 3$, $** p < 0,01$ et $*** p < 0,001$ pour CSM vs biomatériau et $\neq p < 0,05$ pour 2% Alg/HAP1 vs 2% Alg/HAP3.

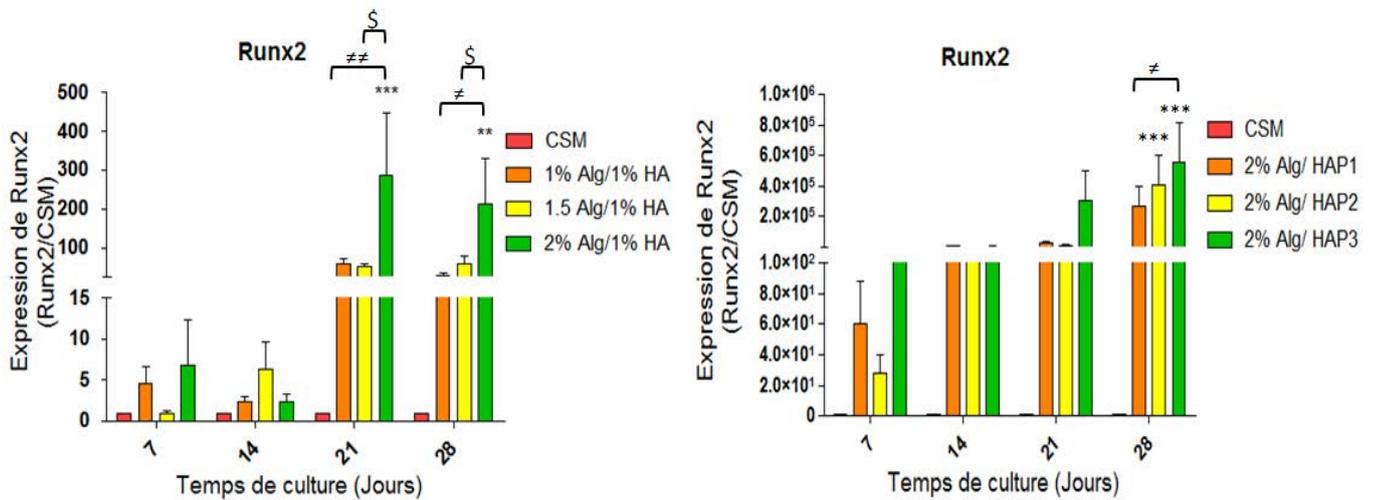


Figure 47: Influence de la nature du biomatériau sur l'expression génique de facteur de transcription Runx2

L'expression de Runx2 par les CSM ensemencées dans des biomatériaux à base d'alginate a été étudiée. Six différentes conditions (Alg/HA et Alg/HAP) sont comparées avec des CSM cultivées en monocouche. L'expression de runx2 est significativement différente à partir de J21 pour les conditions Alg/HA et à J28 pour Alg/HAP. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $N=3$, $** p < 0,01$ et $*** p < 0,001$ pour CSM vs biomatériau, $\neq p < 0,05$ et $\neq p < 0,01$ pour 2% Alg/HAP1 vs 2% Alg/HAP3 et $\$ p < 0,05$ pour 1,5% Alg/1% HA vs 2% Alg/1% HA.

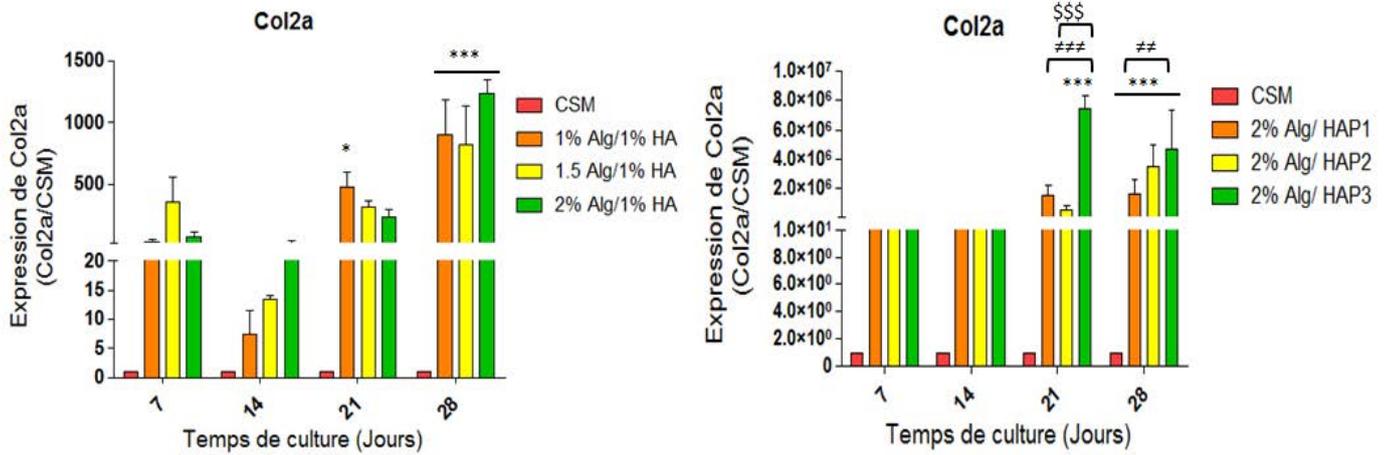


Figure 48: Influence de la nature du biomatériau sur l'expression génique de protéine matricielle Col2a

Pendant 28 jours, l'expression génique de ce composant de la matrice extracellulaire par des CSM ensemencées dans des biomatériaux à base d'alginate a été étudiée. Six différentes conditions (Alg/HA et Alg/HAP) sont comparées avec des CSM cultivées en monocouche. L'expression de Col2a augmente significativement à J21 et J28. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, N=3, Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, N = 3, * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ pour CSM vs biomatériau, ## $p < 0,01$ et ### $p < 0,001$ pour 2% Alg/HAP1 vs 2% Alg/HAP3 et \$\$\$ $p < 0,001$ pour 2% Alg/HAP2 vs 2% Alg/HAP3.

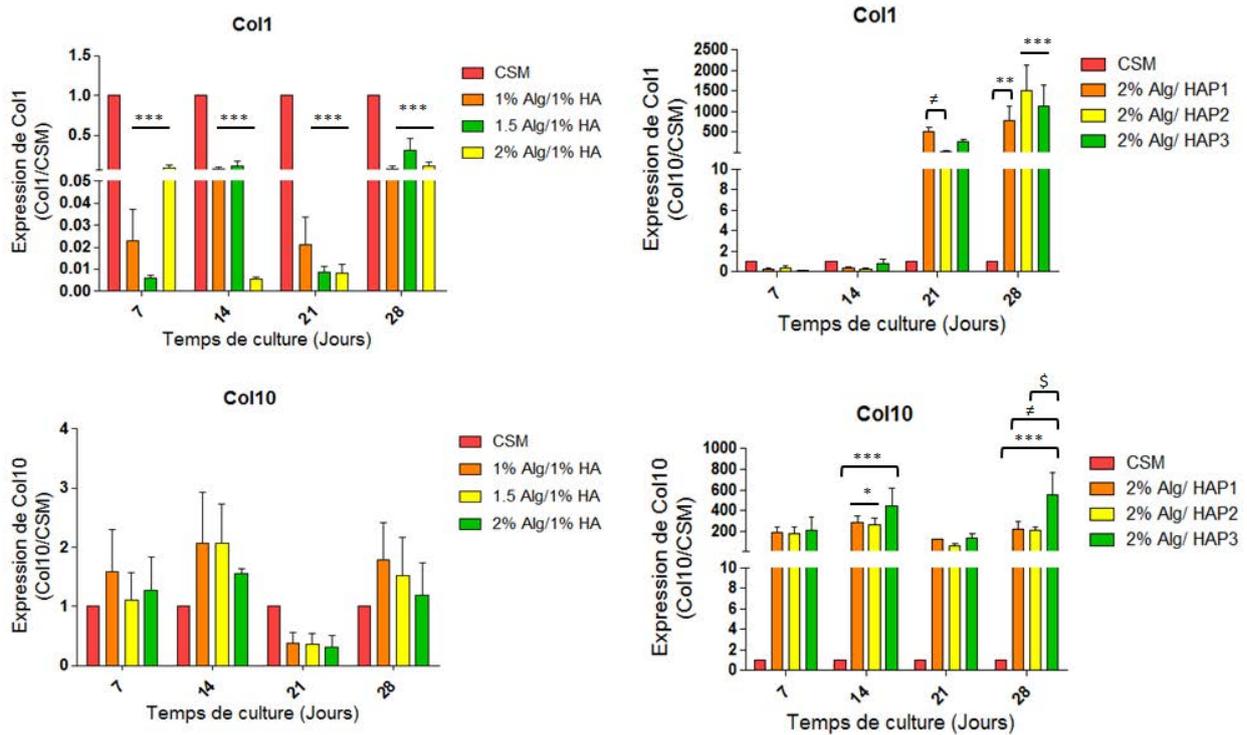


Figure 49: Influence de la nature du biomatériau sur l'expression génique de protéines de la MEC

L'évolution de l'expression de *coll1* et *coll10* par les CSM ensemencées dans des hydrogels à base d'alginate a été étudiée. Six différentes conditions (Alg/HA et Alg/HAP) sont comparées avec des CSM cultivées en monocouche. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, N=3, Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, N = 3, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ pour CSM vs biomatériau, # $p < 0,01$ pour 2% Alg/HAP1 vs 2% Alg/HAP3 et \$ $p < 0,05$ pour 2% Alg/HAP2 vs 2% Alg/HAP3.

4.2.5 Synthèse matricielle

La synthèse de la matrice extracellulaire (MEC) a été observée après les colorations histologiques au Rouge Sirius et au Bleu Alcian, pour mettre en évidence, les collagènes totaux et les GAG après 28 jours de culture (Figure 50 et 51). Un immunomarquage de collagène de type 10 a été réalisé sur des hydrogels d'alginate et la fluorescence émise a été observée par microscopie confocale (Figure 52).

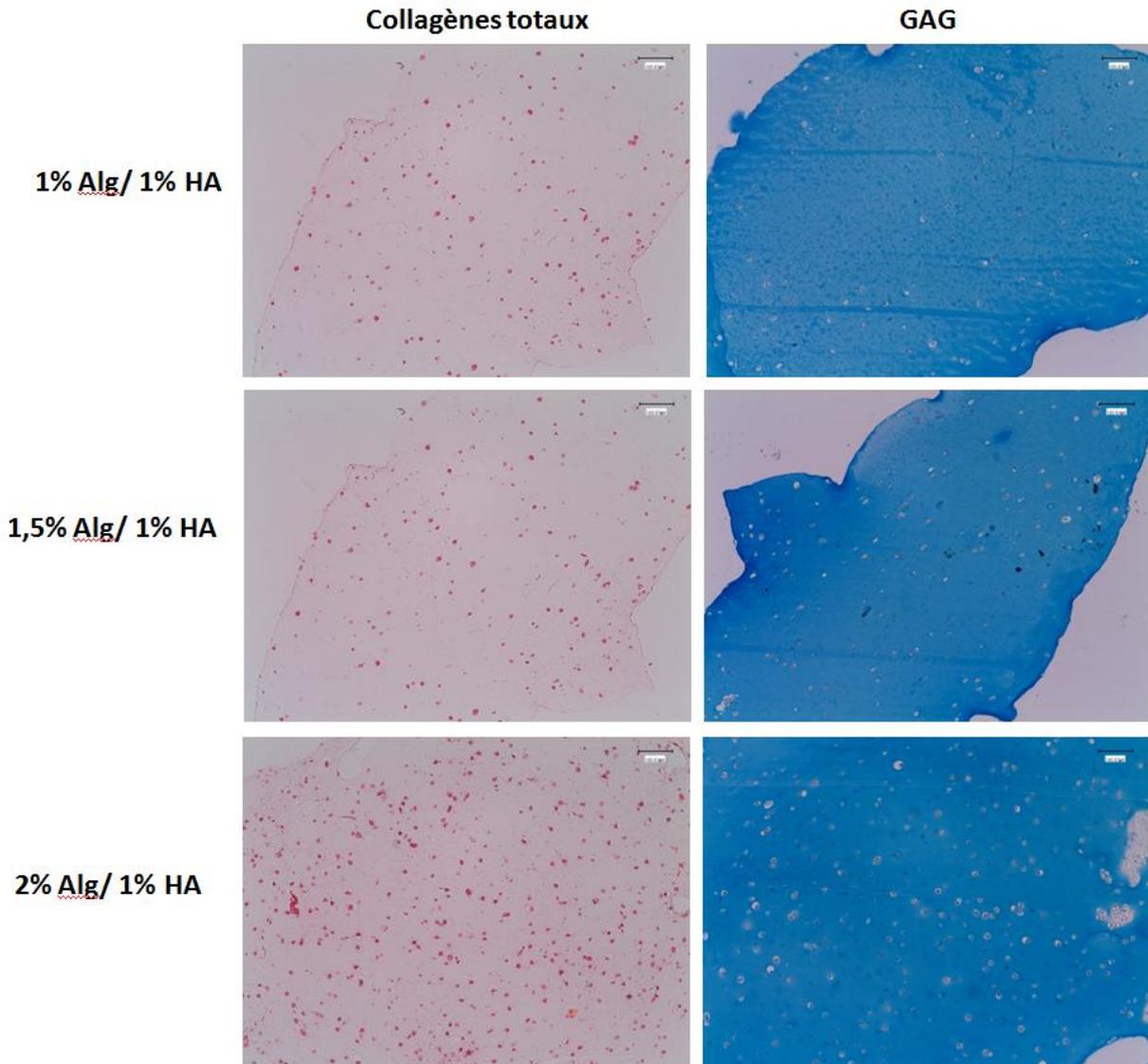


Figure 50: Effet de la nature du biomatériau sur la synthèse des collagènes et de GAG par les CSM ensemencées dans des hydrogels d'alginate-HA

Trois différents types d'hydrogels d'alginate+HA ont été construits et cultivés pendant 28 jours : 1% Alg/1% HA, 1,5% Alg/ 1% HA et 2% Alg/ 1% HA. Après 28 jours, les hydrogels sont colorés avec du Rouge Sirius et du Bleu Alcian pour mettre en évidence la synthèse de collagène et de GAG. A J28, la synthèse de collagène et de GAG semblent similaires dans toutes les conditions. Les lames sont observées en microscopie optique avec un objectif X20. Les barres d'échelle représentent 100 μ m.

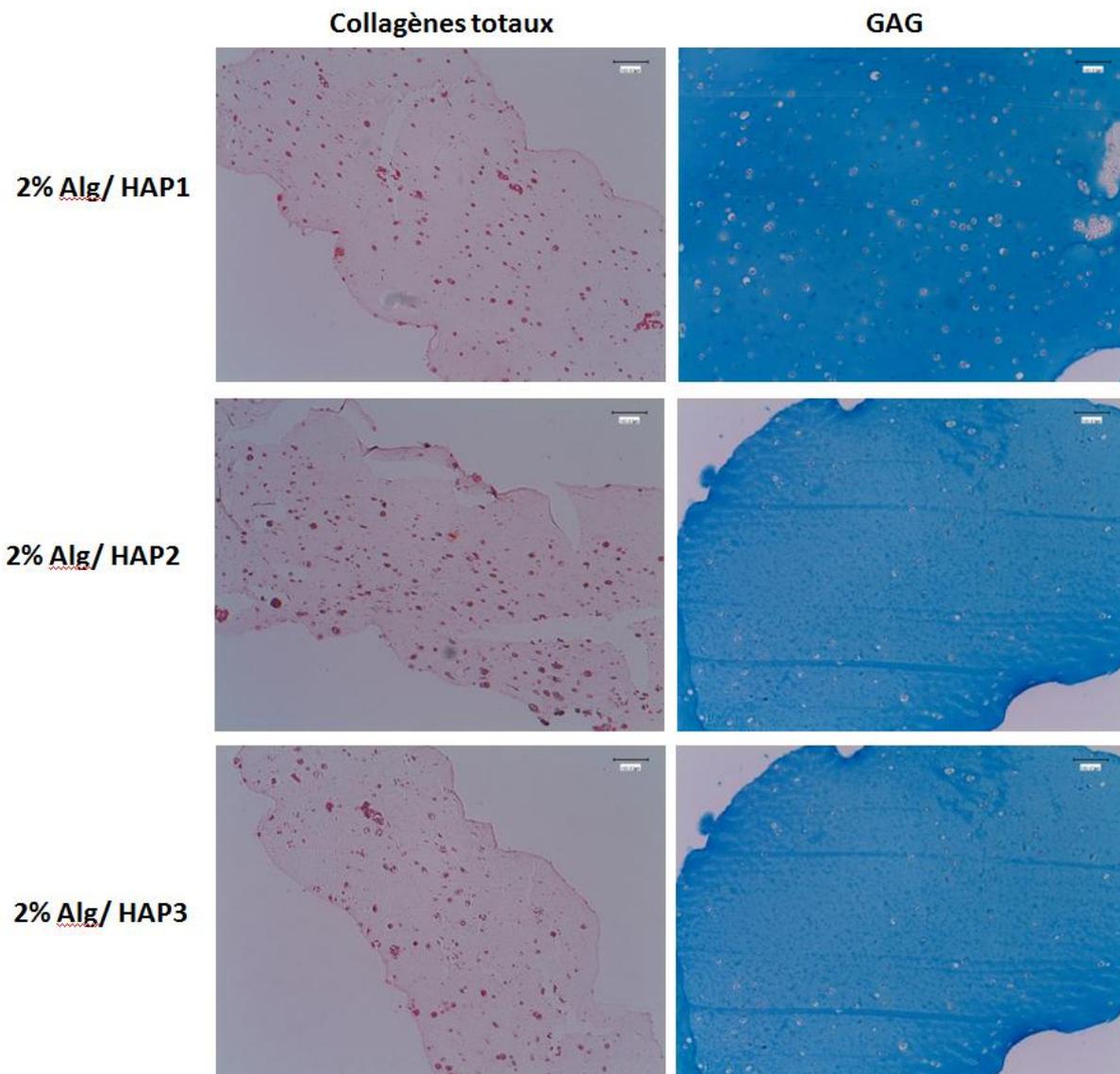


Figure 51: Effet de la nature du biomatériau sur la synthèse des collagènes et des GAG par les CSM ensemencées dans des hydrogels d'alginate-HAP

Trois différents types d'hydrogels d'alginate+HAP ont été construits et cultivés pendant 28 jours : 2% Alg/HAP1, 2% Alg/ HAP2 et 2% Alg/HAP3. Après 28 jours, les hydrogels sont colorés avec du Rouge Sirius et du Bleu Alcian pour mettre en évidence la synthèse de collagène et de GAG. A J28, la synthèse de collagène et de GAG semblent similaires dans toutes les conditions. Les lames sont observées en microscopie optique avec un objectif X20. Les barres d'échelle représentent 100 μ m.

Après 28 jours de culture, la synthèse de collagènes et de GAG reste identique et péri-cellulaire dans les hydrogels Alg /HA, cependant, il semblerait que la production de collagènes soit un peu plus abondante dans les hydrogels d'Alg/HAP. L'immunomarquage de collagène de type 10 mets en évidence une synthèse plus importante pour les hydrogels Alg/HAP, cette synthèse reste péri-cellulaire (Figure52).

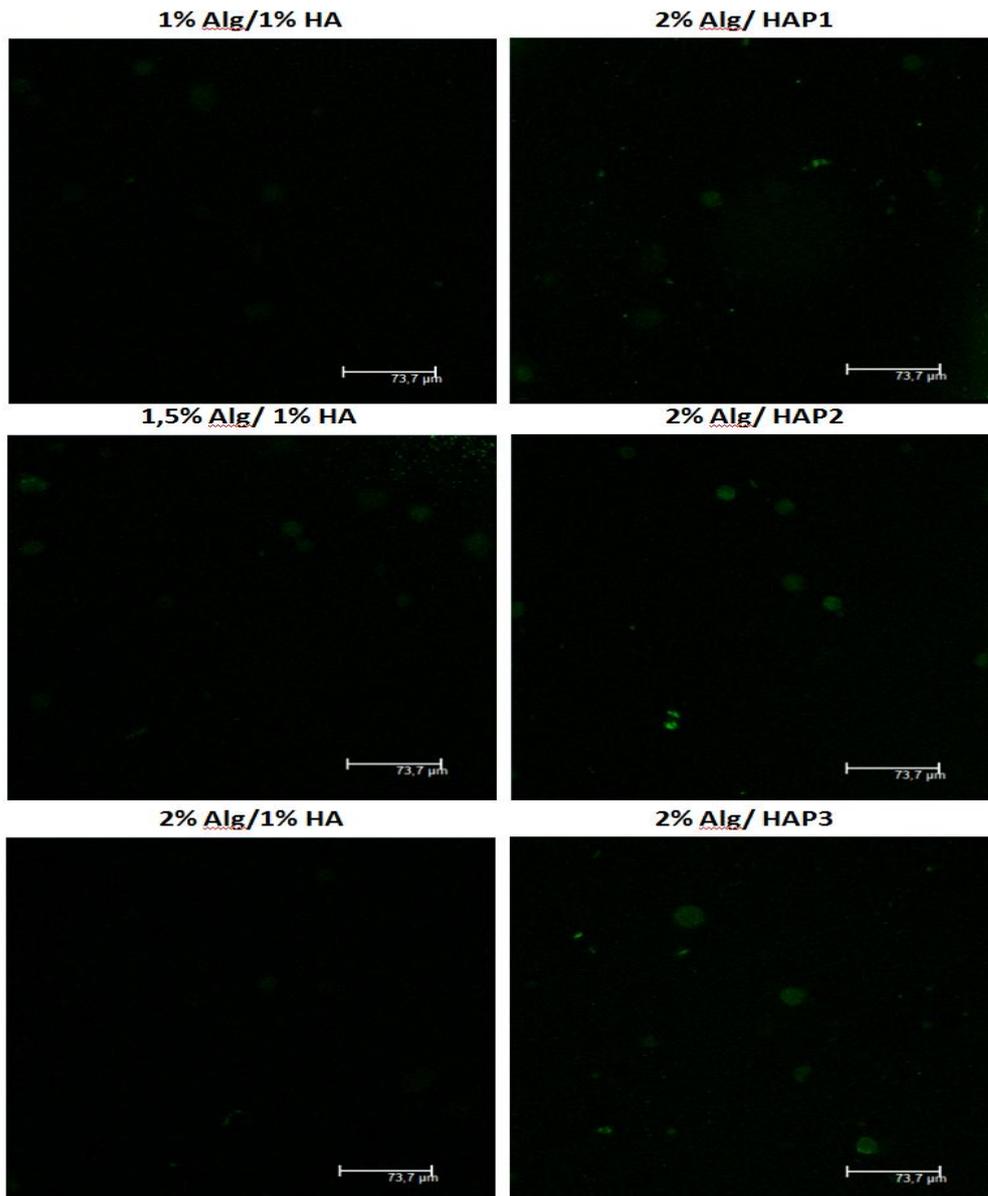


Figure 52: Effet de la nature du biomatériau sur la synthèse de collagène de type 10

Après 28 jours de culture dans six différents biomatériaux : 1% Alg/1% HA, 1,5% Alg/1% HA, 2% Alg/ 1% HA, 2% Alg/HAP1, 2% Alg/HAP2et 2% Alg/ HAP3. Les CSM ont été marquées, et la fluorescence émise a été observée par microscopie confocale (Leica SP5, Objectif x40, ON=0,8). Les barres d'échelle représentent 73,7μm

4.2.6 Expression de la protéine d'intérêt (Sox9)

La figure 53 représente l'influence de la nature du biomatériau sur la synthèse de la protéine Sox9 par les CSM ensemencées dans des hydrogels d'alginate et cultivées dans un milieu de culture sans facteurs de croissance. La synthèse de la protéine Sox9 a été observée après un immunomarquage sur des coupes histologiques après 28 jours de culture (figure 53). Nous observons une synthèse importante de la protéine Sox9 pour les biomatériaux alginate/HAP, En augmentant la concentration de l'HAP, les CSM synthétisent plus la protéine Sox9.

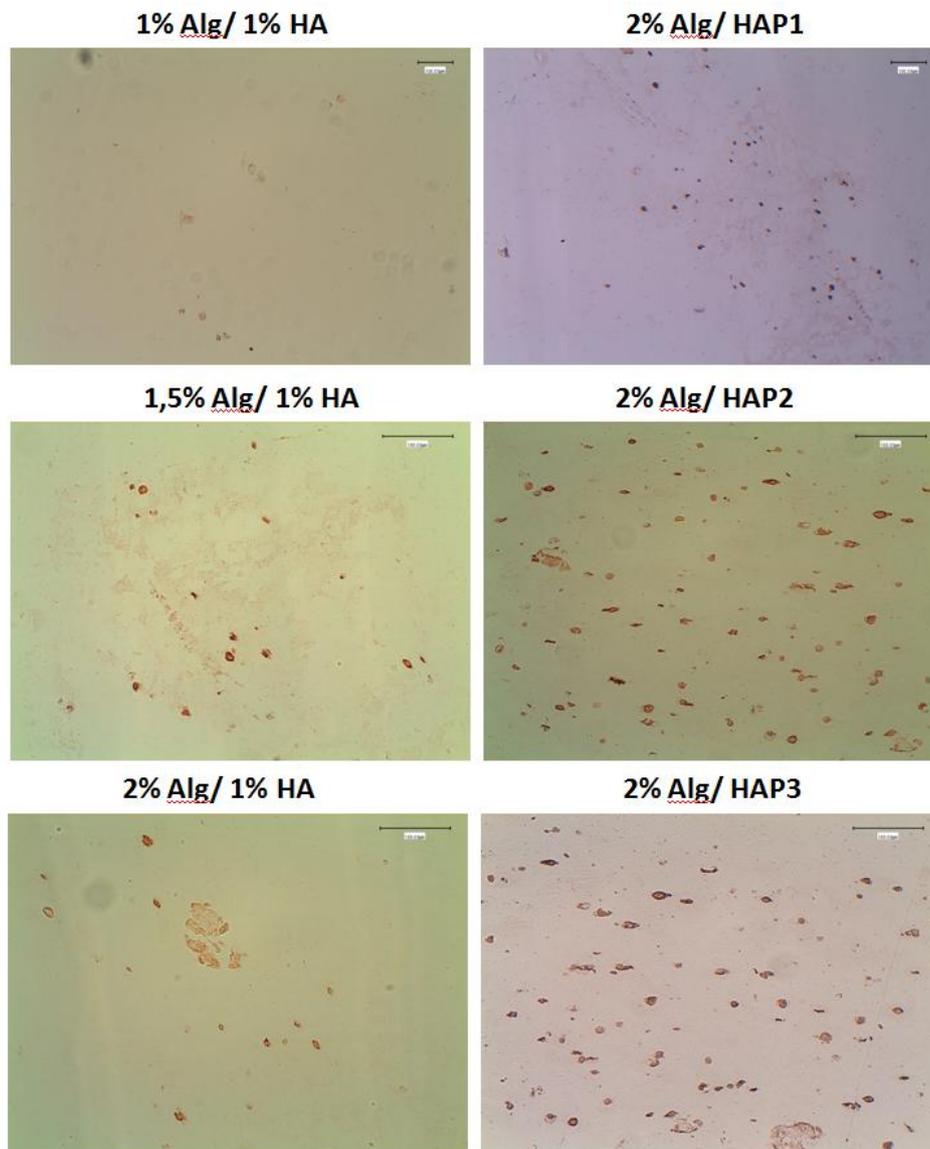


Figure 53: Influence de la nature du biomatériau sur la synthèse de la protéine Sox9

Après 28 jours de culture dans six différents biomatériaux : 1% Alg/1% HA, 1,5% Alg/1% HA, 2% Alg/ 1% HA, 2% Alg/HAP1, 2% Alg/HAP2 et 2% Alg/ HAP3. Les CSM ont été marquées par immunohistologie. Les lames sont observées en microscopie optique avec un objectif X20. Les barres d'échelle représentent 100µm.

4.3 Discussion

L'ingénierie tissulaire est basée sur le fait d'associer un biomatériau biocompatible à des cellules appropriées pour favoriser la différenciation et la maturation cellulaire vers le tissu à régénérer, le tout en présence de facteurs de croissance ou d'inducteurs de la différenciation. Cependant, nous pourrions tenter de limiter l'apport de ces produits afin de faciliter les applications cliniques en ingénierie tissulaire.

Nous nous sommes donc intéressés à une approche particulière qui permettrait d'orienter les CSM vers une voie de différenciation spécifique qui ne nécessiterait pas de recourir à des facteurs de croissance. Cette approche repose sur l'influence de la matrice extracellulaire sur l'engagement des CSM dans des voies de différenciation.

La seconde partie de ce travail a permis d'explorer l'impact de la composition et des propriétés mécaniques des hydrogels d'alginate sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines. Les hydrogels d'alginate ont été cultivés *in vitro* dans un milieu de culture sans facteurs de croissance, après avoir déterminé les propriétés mécaniques des hydrogels d'alginate supplémenté soit par HAP ou HA grâce au plan d'expériences, et choisir les différents biomatériaux par rapport à leur composition, ainsi que leur propriétés élastiques.

Plusieurs facteurs environnementaux contribuent au contrôle de l'activité des cellules souches mésenchymateuses. Les données récentes se concentrent sur l'influence de la matrice extracellulaire (MEC), en particulier les propriétés mécaniques de la MEC (Engler *et al.*, 2006). En conséquence, la variation des propriétés mécaniques de la MEC semble être pertinente, pour diriger la différenciation des CSM. Ainsi, des mesures de propriétés mécaniques des biomatériaux à base d'alginate supplémenté par HA ou HAP ont été réalisées *via* un plan d'expériences, pour pouvoir déterminer les biomatériaux convenables pour l'étude biologique. Les résultats obtenus montrent que la variation de la concentration d'alginate a un effet sur les propriétés mécaniques étudiées (contrainte maximale, déformation maximale et élasticité). Plusieurs études dans la littérature ((Kuo and Ma, 2001), (Banerjee *et al.*, 2009), (Chan *et al.*, 2011)) ont montré le même résultat que nous, soit en modifiant la concentration de l'alginate, le poids moléculaire ou en ajoutant un autre composant.

La supplémentation de l'acide hyaluronique aux hydrogels d'alginate n'a aucun effet sur les propriétés mécaniques, alors que l'ajout de l'hydroxyapatite dans les biomatériaux à base d'alginate améliore la contrainte, la déformation et l'élasticité de ces derniers. Ces

résultats sont similaires à ceux de Lin et al. qui ont montré que l'ajout de l'hydroxyapatite dans un biomatériau de PLA (Poly Lactic Acid) augmente la résistance à la compression et l'élasticité de ce biomatériau (Lin *et al.*, 2007). Par ailleurs, nous avons remarqué que la taille des particules d'hydroxyapatite n'influence pas les propriétés mécaniques des hydrogels d'alginate.

Les études de la viabilité ont montré un nombre faible de cellules mortes par rapport à la population totale à J3. Après 28 jours de culture dans les hydrogels d'alginate, nous ne remarquons plus de cellules mortes. L'alginate est couramment utilisé comme matrice pour l'ingénierie tissulaire. Les études utilisant les CSM dans des hydrogels d'alginate ont montré que cette matrice est biocompatible (Klein *et al.*, 2009); (Jeon *et al.*, 2009). 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 (Cohen et al., 2011). Un biomatériau à base d'alginate est donc un matériau 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).

Ainsi, nous avons remarqué la même morphologie pour les CSMensemencées dans les hydrogels Alg/HA et Alg/HAP à J3 et après 28 jours de culture (figure 43). Les CSM cultivées dans des matrices d'alginate ou d'agarose et engagées dans une voie de différenciation chondrocytaire présentent une morphologie arrondie. Cependant, ces cellules présentent un phénotype fibrochondrogénique en utilisant de la fibronectine ou de la gélatine comme système d'encapsulation (Awad *et al.*, 2004).

Le métabolisme et la prolifération cellulaire présentent la même évolution de J3 à J28 pour toutes les conditions. Ces résultats peuvent être expliqués par l'entrée des CSM dans une voie de différenciation.

Le potentiel de différenciation des CSM cultivées dans des hydrogels d'Alg/HA et Alg/HAP a été étudié par la suite, L'expression de gènes de facteurs de transcription Sox9 et Runx2, caractérisant, respectivement la différenciation chondrocytaire et la différenciation terminale vers le chondrocyte hypertrophique (Vinatier *et al.*, 2009), de plus, Runx2 conduit vers une différenciation ostéoblastique (Deschaseaux *et al.*, 2009). Lorsque les CSM sontensemencées dans une matrice tridimensionnelle, l'expression de gènes de facteurs de transcription augmente après 28 jours de culture pour les hydrogels Alg/HA et à partir de 7

jours de culture pour les hydrogels Alg/HAP, ce qui confirme l'engagement des CSM dans une voie de différenciation particulière en faisant varier la composition du biomatériau ainsi que ses propriétés mécaniques.

Le changement de composition du biomatériau influence la différenciation et la synthèse matricielle des CSM en absence de facteurs de croissance. Dans les hydrogels composés de HAP, une différenciation des CSM est observée, à partir du 7^{ème} jour de culture, L'expression de Runx2, col1 et col10 par les CSM augmente avec la concentration de HAP par rapport aux cellules cultivées en monocouche. L'hydroxyapatite est couramment utilisée pour l'ingénierie ostéochondrale. Des chondrocytesensemencées dans des hydrogels d'alginate HAP expriment du collagène de type II et du col10 lorsque l'on augmente la concentration de l'HAP (Khanarian *et al.*, 2012). L'augmentation de la production de collagène de type 10 suggèrent que les hydrogels contenant de l'hydroxyapatite se différencient plus vers un phénotype chondrocytaire hypertrophique.

L'acide hyaluronique est connu pour ses capacités chondro-inductrices. Il induit une augmentation de l'expression du facteur de transcription sox9 après 28 jours de culture dans des hydrogels d'alginate. Cependant, nous remarquons que cette augmentation est significative pour les hydrogels 2% Alg/1%HA. Nous pouvons conclure alors que cette augmentation est due aux changements de propriétés élastiques des hydrogels en faisant varier la concentration d'alginate. Huesch *et al.*, ont montré que l'élasticité des hydrogels d'alginate a un effet sur la différenciation des CSM humaines (Huesch *et al.*, 2010). Ainsi l'expression de runx2 augmente significativement après 21 jours de culture pour les hydrogels 2% Alg/ 1% HA (élasticité la plus élevée), ce qui peut confirmer que l'engagement des CSMensemencées dans les hydrogels Alg/ HA est plus contrôlé par les propriétés mécaniques des biomatériaux. L'augmentation de l'expression de col2a et la diminution de l'expression de col1 et col10 montrent que les CSM cultivées des des hydrogels Alg/HA se différencient vers un phénotype chondrocytaire.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'objectif de notre étude était d'étudier l'effet de la nature et des propriétés mécaniques de la matrice support de culture sur le comportement des cellules souches mésenchymateuse humaines (CSM) et notamment leur différenciation.

Dans la première partie, nous avons pu mettre en évidence les différents paramètres intervenant dans la préparation d'un hydrogel de collagène/HAP pour la culture des CSM. Ainsi la prise de masse de ce biomatériau n'est possible qu'en présence de cellules et semble favorisée par la présence des microparticules de HAP. D'autre part, nous avons montré que l'hydrogel collagène/HAP préserve l'intégrité des grandes fonctions cellulaires des CSM, et qu'il est donc biocompatible. Après 21 jours de culture et en présence de HAP, certaines cellules semblent s'engager dans une voie de différenciation chondrocytaire, alors que d'autres suivraient un engagement ostéocytaire. Ces informations nous permettent d'émettre l'hypothèse de la présence dans ces gels de progéniteurs ostéo-chondroblastiques. Cependant la taille des microparticules de HAP n'a aucun effet sur la différenciation cellulaire.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons étudié les propriétés mécaniques des hydrogels d'alginate supplémentés par HA ou HAP et leur effet sur le comportement cellulaire des CSM. Il a été démontré que :

- L'augmentation de la concentration d'alginate améliore les propriétés mécaniques des biomatériaux en termes de contrainte, de déformation et d'élasticité.
- L'augmentation de la concentration d'HAP améliore les propriétés mécaniques des biomatériaux en termes de contrainte, de déformation et d'élasticité.
- La taille des particules d'HAP et l'augmentation de la concentration d'HA n'ont aucun effet sur les propriétés mécaniques.
- Les biomatériaux utilisés dans l'étude biologique sont biocompatibles (absence de cellules mortes à J28), ainsi, la modulation des différents composants des biomatériaux n'a pas d'effet néfaste sur les cellules.
- Les composants des biomatériaux ont un effet sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses ; l'ajout de l'acide hyaluronique conduit vers une différenciation chondrogénique qui s'améliore en augmentant la concentration de l'alginate (augmentation de l'élasticité de biomatériau), cependant l'ajout de particules d'hydroxyapatite conduit vers une différenciation ostéogénique.

En conclusion, cette étude a permis de construire un biomatériau à base de collagène de type I supplémenté de particules d'hydroxyapatite, de mesurer ses propriétés mécaniques et d'étudier son effet sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Aussi, nous avons pu mesurer les propriétés mécaniques des biomatériaux alginate/HA et alginate/HAP, en modulant leur composition *via* un plan statistique (plan d'expériences), et étudier l'effet de ces variations sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses.

Des travaux sont en cours pour étudier l'effet de l'âge du donneur sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse. 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 subi 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 montré Payne et al. (Payne *et al.*, 2010)

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.

Le comportement mécanique des biomatériaux a été exploré en absence de cellules pour les biomatériaux à base d'alginate. Le comportement mécanique de ces biomatériaux ensemencés de cellules semble être important, notamment parce qu'il influencerait la différenciation avec des cellules (Discher *et al.*, 2005). 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.

Une autre perspective de ce travail est d'étudier le mécanisme de différenciation par l'analyse des voies de transduction du signal du TGF-beta. Le choix de ces voies de transduction est justifié par le rôle que joue la superfamille du TGF-beta dans la différenciation des CSM. En particulier la protéine Smad3, facteur de transcription activé par TGF- β 1, qui a un rôle d'inhibition dans la myogenèse, l'ostéogenèse et l'adipogenèse, mais un rôle d'activation dans la chondrogenèse.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Alsalameh, S., Amin, R., Gemba, T., and Lotz, M. (2004). Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 50, 1522-1532.

Angele, P., Abke, J., Kujat, R., Faltermeier, H., Schumann, D., Nerlich, M., Kinner, B., Englert, C., Ruszczak, Z., Mehrl, R., and Mueller, R. (2004). Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials* 25, 2831-2841.

Arnold, M., Cavalcanti-Adam, E.A., Glass, R., Blummel, J., Eck, W., Kantlehner, M., Kessler, H., and Spatz, J.P. (2004). Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *Chemphyschem* 5, 383-388.

Ashton, B.A., Allen, T.D., Howlett, C.R., Eaglesom, C.C., Hattori, A., and Owen, M. (1980). Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res*, 294-307.

Awad, H.A., Wickham, M.Q., Leddy, H.A., Gimble, J.M., and Guilak, F. (2004). Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 25, 3211-3222.

Baksh, D., Yao, R., and Tuan, R.S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 25, 1384-1392.

Banerjee, A., Arha, M., Choudhary, S., Ashton, R.S., Bhatia, S.R., Schaffer, D.V., and Kane, R.S. (2009). The influence of hydrogel modulus on the proliferation and differentiation of encapsulated neural stem cells. *Biomaterials* 30, 4695-4699.

Becker, T.A., Kipke, D.R., and Brandon, T. (2001). Calcium alginate gel: a biocompatible and mechanically stable polymer for endovascular embolization. *J Biomed Mater Res* 54, 76-86.

Benya, P.D., and Shaffer, J.D. (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30, 215-224.

Bieback, K., and Kluter, H. (2007). Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Curr Stem Cell Res Ther* 2, 310-323.

Boot-Handford, R.P., and Tuckwell, D.S. (2003). Fibrillar collagen: the key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest. *Bioessays* 25, 142-151.

Bosnakovski, D., Mizuno, M., Kim, G., Takagi, S., Okumura, M., and Fujinaga, T. (2006). 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* 93, 1152-1163.

- Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., Bell, G.W., Otte, A.P., Vidal, M., Gifford, D.K., Young, R.A., and Jaenisch, R. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441, 349-353.
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331, 889-895.
- Brodkin, K.R., Garcia, A.J., and Levenston, M.E. (2004). Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials* 25, 5929-5938.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-650.
- Caplan, A.I., Reuben, D., and Haynesworth, S.E. (1998). Cell-based tissue engineering therapies: the influence of whole body physiology. *Adv Drug Deliv Rev* 33, 3-14.
- Christopherson, G.T., Song, H., and Mao, H.Q. (2009). The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation. *Biomaterials* 30, 556-564.
- Chung, C., and Burdick, J.A. (2008). Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 243-262.
- Cohen, J., Zaleski, K.L., Nourissat, G., Julien, T.P., Randolph, M.A., and Yaremchuk, M.J. (2011). Survival of porcine mesenchymal stem cells over the alginate recovered cellular method. *J Biomed Mater Res A* 96, 93-99.
- Coulombel, L. (2003). [Adult stem cells: seing is not being]. *Med Sci (Paris)* 19, 683-694.
- Coulombel, L. (2007). [Adult stem cells: their scientific interest and therapeutic future]. *Gynecol Obstet Fertil* 35, 806-810.
- Cremer, M.A., Ye, X.J., Terato, K., Griffiths, M.M., Watson, W.C., and Kang, A.H. (1998). Immunity to type IX collagen in rodents: a study of type IX collagen for autoimmune and arthritogenic activities. *Clin Exp Immunol* 112, 375-382.
- Datta, N., Pham, Q.P., Sharma, U., Sikavitsas, V.I., Jansen, J.A., and Mikos, A.G. (2006). In vitro generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2488-2493.
- Dawson, E., Mapili, G., Erickson, K., Taqvi, S., and Roy, K. (2008). Biomaterials for stem cell differentiation. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 215-228.
- Deschaseaux, F., Sensebe, L., and Heymann, D. (2009). Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med* 15, 417-429.
- Dicesare, P., Fox, W.M., Hill, M.J., Krishnan, G.R., Yang, S., and Sarkar, D. (2013). Cell-material interactions on biphasic polyurethane matrix. *J Biomed Mater Res A* 101, 2151-2163.

- Discher, D.E., Janmey, P., and Wang, Y.L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310, 1139-1143.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Draget, K.I., Skjak-Braek, G., and Smidsrod, O. (1997). Alginate based new materials. *Int J Biol Macromol* 21, 47-55.
- Edwards-Levy, F., and Levy, M.C. (1999). Serum albumin-alginate coated beads: mechanical properties and stability. *Biomaterials* 20, 2069-2084.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677-689.
- Ertesvag, H., Erlien, F., Skjak-Braek, G., Rehm, B.H., and Valla, S. (1998a). Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. *J Bacteriol* 180, 3779-3784.
- Ertesvag, H., Hoidal, H.K., Skjak-Braek, G., and Valla, S. (1998b). The *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase AlgE1 consists of two separate catalytic domains. *J Biol Chem* 273, 30927-30932.
- Even-Ram, S., Artym, V., and Yamada, K.M. (2006). Matrix control of stem cell fate. *Cell* 126, 645-647.
- Folkman, J., and Moscona, A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* 273, 345-349.
- Freyria, A.M., Courtes, S., and Mallein-Gerin, F. (2008). [Differentiation of adult human mesenchymal stem cells: chondrogenic effect of BMP-2]. *Pathol Biol (Paris)* 56, 326-333.
- Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., and Gerasimov, U.V. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 20, 263-272.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4, 267-274.
- Galois, L., Hutasse, S., Cortial, D., Rousseau, C.F., Grossin, L., Ronziere, M.C., Herbage, D., and Freyria, A.M. (2006). Bovine chondrocyte behaviour in three-dimensional type I collagen gel in terms of gel contraction, proliferation and gene expression. *Biomaterials* 27, 79-90.
- Geiger, M., Li, R.H., and Friess, W. (2003). Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1613-1629.

- Gerecht, S., Bettinger, C.J., Zhang, Z., Borenstein, J.T., Vunjak-Novakovic, G., and Langer, R. (2007). The effect of actin disrupting agents on contact guidance of human embryonic stem cells. *Biomaterials* 28, 4068-4077.
- Giannoudis, P.V., and Pountos, I. (2005). Tissue regeneration. The past, the present and the future. *Injury* 36 Suppl 4, S2-5.
- Goldring, M.B., Tsuchimochi, K., and Ijiri, K. (2006). The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97, 33-44.
- Gomillion, C.T., and Burg, K.J. (2006). Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials* 27, 6052-6063.
- Grinnell, F. (2003). Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol* 13, 264-269.
- Guo, X., Cai, Z.M., and Gui, Y.T. (2006). [Progress in the research of germ cell from human embryonic stem cells]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 37, 17-21.
- Hadjipanayi, E., Mudera, V., and Brown, R.A. (2009). Guiding cell migration in 3D: a collagen matrix with graded directional stiffness. *Cell Motil Cytoskeleton* 66, 121-128.
- Hasler, E.M., Herzog, W., Wu, J.Z., Muller, W., and Wyss, U. (1999). Articular cartilage biomechanics: theoretical models, material properties, and biosynthetic response. *Crit Rev Biomed Eng* 27, 415-488.
- Haug, A., and Larsen, B. (1971). Biosynthesis of alginate. II. Polymannuronic acid C-5-epimerase from *Azotobacter vinelandii* (Lipman). *Carbohydr Res* 17, 297-308.
- Hayman, M.W., Smith, K.H., Cameron, N.R., and Przyborski, S.A. (2005). Growth of human stem cell-derived neurons on solid three-dimensional polymers. *J Biochem Biophys Methods* 62, 231-240.
- Heath, C.A., and Magari, S.R. (1996). Mini-review: Mechanical factors affecting cartilage regeneration in vitro. *Biotechnol Bioeng* 50, 430-437.
- Hoben, G.M., Koay, E.J., and Athanasiou, K.A. (2008). Fibrochondrogenesis in two embryonic stem cell lines: effects of differentiation timelines. *Stem Cells* 26, 422-430.
- Huebsch, N., Arany, P.R., Mao, A.S., Shvartsman, D., Ali, O.A., Bencherif, S.A., Rivera-Feliciano, J., and Mooney, D.J. (2010). Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nat Mater* 9, 518-526.
- Hwang, N.S., Kim, M.S., Sampattavanich, S., Baek, J.H., Zhang, Z., and Elisseeff, J. (2006). Effects of three-dimensional culture and growth factors on the chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells. *Stem Cells* 24, 284-291.

- In 't Anker, P.S., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G.M., Claas, F.H., Fibbe, W.E., and Kanhai, H.H. (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 22, 1338-1345.
- Indrawattana, N., Chen, G., Tadokoro, M., Shann, L.H., Ohgushi, H., Tateishi, T., Tanaka, J., and Bunyaratvej, A. (2004). Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 914-919.
- Ingber, D. (1991). Extracellular matrix and cell shape: potential control points for inhibition of angiogenesis. *J Cell Biochem* 47, 236-241.
- Ingber, D.E. (2004). The mechanochemical basis of cell and tissue regulation. *Mech Chem Biosyst* 1, 53-68.
- Jeon, O., Bouhadir, K.H., Mansour, J.M., and Alsberg, E. (2009). Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties. *Biomaterials* 30, 2724-2734.
- Jin, M., Frank, E.H., Quinn, T.M., Hunziker, E.B., and Grodzinsky, A.J. (2001). Tissue shear deformation stimulates proteoglycan and protein biosynthesis in bovine cartilage explants. *Arch Biochem Biophys* 395, 41-48.
- Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., and Yoo, J.U. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238, 265-272.
- Jorgensen, T.E., Sletmoen, M., Draget, K.I., and Stokke, B.T. (2007). Influence of oligoguluronates on alginate gelation, kinetics, and polymer organization. *Biomacromolecules* 8, 2388-2397.
- Jukes, J.M., Moroni, L., van Blitterswijk, C.A., and de Boer, J. (2008). Critical Steps toward a tissue-engineered cartilage implant using embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A* 14, 135-147.
- Kassem, M., and Abdallah, B.M. (2008). Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. *Cell Tissue Res* 331, 157-163.
- Katagiri, T., Imada, M., Yanai, T., Suda, T., Takahashi, N., and Kamijo, R. (2002). Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis. *Genes Cells* 7, 949-960.
- Kerin, A., Patwari, P., Kuettner, K., Cole, A., and Grodzinsky, A. (2002). Molecular basis of osteoarthritis: biomechanical aspects. *Cell Mol Life Sci* 59, 27-35.
- Khanarian, N.T., Jiang, J., Wan, L.Q., Mow, V.C., and Lu, H.H. (2012). A hydrogel-mineral composite scaffold for osteochondral interface tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 18, 533-545.

- Kisiday, J.D., Frisbie, D.D., McIlwraith, C.W., and Grodzinsky, A.J. (2009). Dynamic compression stimulates proteoglycan synthesis by mesenchymal stem cells in the absence of chondrogenic cytokines. *Tissue Eng Part A* 15, 2817-2824.
- Klein, T.J., Rizzi, S.C., Reichert, J.C., Georgi, N., Malda, J., Schuurman, W., Crawford, R.W., and Hutmacher, D.W. (2009). Strategies for zonal cartilage repair using hydrogels. *Macromol Biosci* 9, 1049-1058.
- Knudson, W., and Loeser, R.F. (2002). CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 59, 36-44.
- Kuklo, T.R., Groth, A.T., Anderson, R.C., Frisch, H.M., and Islinger, R.B. (2008). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for grade III open segmental tibial fractures from combat injuries in Iraq. *J Bone Joint Surg Br* 90, 1068-1072.
- Kuo, C.K., and Ma, P.X. (2001). Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 22, 511-521.
- Lecuit, T., and Lenne, P.F. (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 633-644.
- Lee, C.H., Singla, A., and Lee, Y. (2001). Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 221, 1-22.
- Lee, J.H., Rim, N.G., Jung, H.S., and Shin, H. (2010). Control of osteogenic differentiation and mineralization of human mesenchymal stem cells on composite nanofibers containing poly[lactic-co-(glycolic acid)] and hydroxyapatite. *Macromol Biosci* 10, 173-182.
- Li, F., Bronson, S., and Niyibizi, C. (2010). Derivation of murine induced pluripotent stem cells (iPS) and assessment of their differentiation toward osteogenic lineage. *J Cell Biochem* 109, 643-652.
- Liu, Y., and Williams, D.J. (2010). Incorporation of hydroxyapatite sol into collagen gel to regulate the contraction mediated by human bone marrow-derived stromal cells. *IEEE Trans Nanobioscience* 9, 1-11.
- Lynn, A.K., Yannas, I.V., and Bonfield, W. (2004). Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 71, 343-354.
- Margossian, T., Reppel, L., Makdissy, N., Stoltz, J.F., Bensoussan, D., and Huselstein, C. (2012). Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: Comparative phenotype analysis between tissue and in vitro expansion. *Biomed Mater Eng* 22, 243-254.
- Martinsen, A., Skjak-Braek, G., and Smidsrod, O. (1989). Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng* 33, 79-89.

- McBride, S.H., and Knothe Tate, M.L. (2008). Modulation of stem cell shape and fate A: the role of density and seeding protocol on nucleus shape and gene expression. *Tissue Eng Part A* 14, 1561-1572.
- Merceron, C., Portron, S., Masson, M., Fellah, B.H., Gauthier, O., Lesoeur, J., Cherel, Y., Weiss, P., Guicheux, J., and Vinatier, C. (2010a). Cartilage tissue engineering: From hydrogel to mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng* 20, 159-166.
- Merceron, C., Vinatier, C., Portron, S., Masson, M., Amiaud, J., Guigand, L., Cherel, Y., Weiss, P., and Guicheux, J. (2010b). Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C355-364.
- Miyaniishi, K., Trindade, M.C., Lindsey, D.P., Beaupre, G.S., Carter, D.R., Goodman, S.B., Schurman, D.J., and Smith, R.L. (2006a). Dose- and time-dependent effects of cyclic hydrostatic pressure on transforming growth factor-beta3-induced chondrogenesis by adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Tissue Eng* 12, 2253-2262.
- Miyaniishi, K., Trindade, M.C., Lindsey, D.P., Beaupre, G.S., Carter, D.R., Goodman, S.B., Schurman, D.J., and Smith, R.L. (2006b). Effects of hydrostatic pressure and transforming growth factor-beta 3 on adult human mesenchymal stem cell chondrogenesis in vitro. *Tissue Eng* 12, 1419-1428.
- Mizuno, A., Amizuka, N., Irie, K., Murakami, A., Fujise, N., Kanno, T., Sato, Y., Nakagawa, N., Yasuda, H., Mochizuki, S., Gomibuchi, T., Yano, K., Shima, N., Washida, N., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., and Ozawa, H. (1998). Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 610-615.
- Mouw, J.K., Connelly, J.T., Wilson, C.G., Michael, K.E., and Levenston, M.E. (2007). Dynamic compression regulates the expression and synthesis of chondrocyte-specific matrix molecules in bone marrow stromal cells. *Stem Cells* 25, 655-663.
- Musina, R.A., Belyavski, A.V., Tarusova, O.V., Solovyova, E.V., and Sukhikh, G.T. (2008). Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. *Bull Exp Biol Med* 145, 539-543.
- Noth, U., Rackwitz, L., Heymer, A., Weber, M., Baumann, B., Steinert, A., Schutze, N., Jakob, F., and Eulert, J. (2007). Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 83, 626-635.
- O'Grady, J.E., and Bordon, D.M. (2003). Global regulatory registration requirements for collagen-based combination products: points to consider. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1699-1721.
- Oh, H.H., Lu, H., Kawazoe, N., and Chen, G. (2011). Spatially Guided Angiogenesis by Three-Dimensional Collagen Scaffolds Micropatterned with Vascular Endothelial Growth Factor. *J Biomater Sci Polym Ed.*
- Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10, 63-76.

- Payne, K.A., Didiano, D.M., and Chu, C.R. (2010). Donor sex and age influence the chondrogenic potential of human femoral bone marrow stem cells. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 705-713.
- Pelttari, K., Winter, A., Steck, E., Goetzke, K., Hennig, T., Ochs, B.G., Aigner, T., and Richter, W. (2006). Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum* 54, 3254-3266.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Puetzer, J.L., Petite, J.N., and Lobo, E.G. (2010). Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng Part B Rev* 16, 435-444.
- Reddi, A.H. (2000). Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng* 6, 351-359.
- Rowley, J.A., Madlambayan, G., and Mooney, D.J. (1999). Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 20, 45-53.
- Salingcarnboriboon, R., Yoshitake, H., Tsuji, K., Obinata, M., Amagasa, T., Nifuji, A., and Noda, M. (2003). Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* 287, 289-300.
- Saude, N., Cheze-Lange, H., Dhulster, P., and Junter, G.A. (2001). Molecular weight characteristics of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in a membrane bioreactor. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet* 66, 321-324.
- Scherberich, A., Galli, R., Jaquiere, C., Farhadi, J., and Martin, I. (2007). Three-dimensional perfusion culture of human adipose tissue-derived endothelial and osteoblastic progenitors generates osteogenic constructs with intrinsic vascularization capacity. *Stem Cells* 25, 1823-1829.
- Schneider, R.K., Puellen, A., Kramann, R., Raupach, K., Bornemann, J., Knuechel, R., Perez-Bouza, A., and Neuss, S. (2010). The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials* 31, 467-480.
- Seely, G.R., and Hart, R.L. (1974). The binding of alkaline earth metal ions to alginate. *Macromolecules* 7, 706-710.
- Serpooshan, V., Julien, M., Nguyen, O., Wang, H., Li, A., Muja, N., Henderson, J.E., and Nazhat, S.N. (2010). Reduced hydraulic permeability of three-dimensional collagen scaffolds attenuates gel contraction and promotes the growth and differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Biomater* 6, 3978-3987.

- Shlopov, B.V., Lie, W.R., Mainardi, C.L., Cole, A.A., Chubinskaya, S., and Hasty, K.A. (1997). Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum* 40, 2065-2074.
- Terraciano, V., Hwang, N., Moroni, L., Park, H.B., Zhang, Z., Mizrahi, J., Seliktar, D., and Elisseff, J. (2007). Differential response of adult and embryonic mesenchymal progenitor cells to mechanical compression in hydrogels. *Stem Cells* 25, 2730-2738.
- Vinatier, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J., and Noel, D. (2009). Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol* 27, 307-314.
- Wang, G., Ao, Q., Gong, K., Wang, A., Zheng, L., Gong, Y., and Zhang, X. (2010). The effect of topology of chitosan biomaterials on the differentiation and proliferation of neural stem cells. *Acta Biomater* 6, 3630-3639.
- 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. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 22, 1330-1337.
- Wang, L., Tran, I., Seshareddy, K., Weiss, M.L., and Detamore, M.S. (2009). A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 15, 2259-2266.
- Wang, L.S., Boulaire, J., Chan, P.P., Chung, J.E., and Kurisawa, M. The role of stiffness of gelatin-hydroxyphenylpropionic acid hydrogels formed by enzyme-mediated crosslinking on the differentiation of human mesenchymal stem cell. *Biomaterials* 31, 8608-8616.
- Wang, Y., de Isla, N., Huselstein, C., Wang, B., Netter, P., Stoltz, J.F., and Muller, S. (2008). Effect of alginate culture and mechanical stimulation on cartilaginous matrix synthesis of rat dedifferentiated chondrocytes. *Biomed Mater Eng* 18, S47-54.
- Wells, R.G. (2008). The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology* 47, 1394-1400.
- Wilkins, M.R., and Williams, K.L. (1995). The extracellular matrix of the Dictyostelium discoideum slug. *Experientia* 51, 1189-1196.
- Williams, D. (1991). Objectivity in the evaluation of biological safety of medical devices and biomaterials. *Med Device Technol* 2, 44-48.
- Winer, J.P., Janmey, P.A., McCormick, M.E., and Funaki, M. (2009). Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells become quiescent on soft substrates but remain responsive to chemical or mechanical stimuli. *Tissue Eng Part A* 15, 147-154.
- Wong, M., and Carter, D.R. (2003). Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* 33, 1-13.

Wong, M., Siegrist, M., Wang, X., and Hunziker, E. (2001). Development of mechanically stable alginate/chondrocyte constructs: effects of guluronic acid content and matrix synthesis. *J Orthop Res* 19, 493-499.

Xiao, Y., Qian, H., Young, W.G., and Bartold, P.M. (2003). Tissue engineering for bone regeneration using differentiated alveolar bone cells in collagen scaffolds. *Tissue Eng* 9, 1167-1177.

Zhang, M.W., Guo, Z.K., Liu, X.D., Wu, Y., Hou, C.M., and Mao, N. (2003). [Development of methodology for isolation and culture of mesenchymal stem cells derived from mouse skeletal muscle]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 11, 538-541.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13, 4279-4295.

RESUME

En ingénierie tissulaire, les biomatériaux, les cellules et l'induction de la différenciation, sont des facteurs à prendre en compte. L'objectif de cette étude est de connaître l'effet de la nature des biomatériaux et leurs propriétés mécaniques sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse. Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet d'un biomatériau de nature protéique (le collagène de type I) supplémenté en microparticules d'hydroxyapatite (HAP). Nous avons constaté que l'ajout d'HAP améliore les propriétés mécaniques de ce biomatériau et engage la différenciation des cellules vers des phénotypes ostéoarticulaires. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet d'un biomatériau à base d'alginate supplémenté par de l'acide hyaluronique ou des microparticules d'HAP, en utilisant un plan d'expériences pour choisir les matrices convenables pour l'étude biologique en fonction de leurs propriétés mécaniques. Nous avons constaté que les composants de ce biomatériau ont un effet sur l'élasticité de ce dernier et sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. En conclusion, cette étude montre que les cellules souches mésenchymateuses sont sensibles à la composition du biomatériau et ses propriétés mécaniques.

Mots clés : Cellules souches mésenchymateuses, biomatériau, différenciation cellulaire, comportement mécanique.

ABSTRACT

In tissue engineering, biomaterials, cells and the induction of cell differentiation are factors to be studied. The aim of this study is to know the effect of biomaterials composition and mechanical properties on the differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow. At first, we studied the effect of a protein biomaterial (collagen type I) supplemented with hydroxyapatite (HAP) particles. We found that the addition of HAP improves the mechanical properties of the biomaterial and conditions cell differentiation towards osteoarticular lineages. In a second step, we studied the effect of biomaterial composed of alginate supplemented with hyaluronic acid or HAP particles, using an experimental design to select suitable matrices for biological study based on their mechanical properties. We found that the components of this biomaterial have an effect on elasticity of the latter and the differentiation of mesenchymal stem cells. In conclusion, this study shows that mesenchymal stem cells are sensitive to the composition of the biomaterial and its mechanical properties.

Keywords: Mesenchymal stem cells, biomaterial, cell differentiation, mechanical behavior.