



**HAL**  
open science

# Le vieillissement des fibrocartilages : évaluation de la thérapie cellulaire régénérative appliquée aux lésions de l'enthèse

Geoffroy Nourissat

► **To cite this version:**

Geoffroy Nourissat. Le vieillissement des fibrocartilages : évaluation de la thérapie cellulaire régénérative appliquée aux lésions de l'enthèse. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT : 2011PA066374 . tel-00825606

**HAL Id: tel-00825606**

**<https://theses.hal.science/tel-00825606>**

Submitted on 24 May 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

**Physiopathologie cellulaire et moléculaire**

Présentée par

**Geoffroy NOURISSAT**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

**Le vieillissement des fibrocartilages : évaluation de la  
thérapie cellulaire régénérative appliquée aux lésions de  
l'enthèse.**

soutenue le 6 Octobre 2011

Devant le jury composé de :

**Monsieur le Professeur Philippe Hardy : Président du jury**  
**Madame le Docteur Danièle Noël : Rapporteur**  
**Monsieur le Docteur Hervé Petite : Rapporteur**  
**Madame le Docteur Delphine Duprez : Examineur**  
**Monsieur le Docteur Frédéric Mallein-Gerin : Examineur**  
**Monsieur le Professeur Francis Berenbaum, Directeur de thèse**

**THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

**Physiopathologie cellulaire et moléculaire**

Présentée par

**Geoffroy NOURISSAT**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

**Le vieillissement des fibrocartilages : évaluation de la  
thérapie cellulaire régénérative appliquée aux lésions de  
l'enthèse.**

soutenue le 6 Octobre 2011

Devant le jury composé de :

**Monsieur le Professeur Philippe Hardy : Président du jury**  
**Madame le Docteur Danièle Noël : Rapporteur**  
**Monsieur le Docteur Hervé Petite : Rapporteur**  
**Madame le Docteur Delphine Duprez : Examineur**  
**Monsieur le Docteur Frédéric Mallein-Gerin : Examineur**  
**Monsieur le Professeur Francis Berenbaum, Directeur de thèse**

# Remerciements

Un grand merci à Karine qui m'a soutenu et aidé dans la rédaction de cette thèse. Son amour, sa patience et sa compréhension m'ont aidé à finaliser ce travail.

Merci à Baptiste, Constance et Agathe, qui ont accepté d'attendre un peu avant de jouer de nombreux week-end, et qui connaissent bien les travers de leur père.

Merci à mes parents pour l'éducation qu'ils m'ont offerte, et l'enseignement de la recherche de l'excellence.

Merci à mes amis et à ma famille pour leur soutien permanent.

Merci au **Professeur Francis Berenbaum** de m'avoir fait confiance, de m'avoir laissé construire mon projet, loin de ses premiers sujets de recherche, et qu'il trouve dans ce travail, une base pour de nouvelles aventures scientifiques.

Merci au **Professeur Philippe Hardy** de m'avoir ouvert les yeux sur la chirurgie arthroscopique et le monde de la médecine du sport. Il est pour de nombreux d'entre-nous un père fidèle en chirurgie. L'honneur qu'il nous fait en présidant ce jury, est encore une marque de sa fidélité, et j'espère qu'il verra à travers ce travail, une marque de reconnaissance pour son enseignement.

Je remercie le **Docteur Danièle Noel** et le **Docteur Hervé Petite** d'avoir accepté la fonction de rapporteur malgré leur emploi du temps chargé. Je les remercie de leur intérêt pour nos travaux.

Je remercie sincèrement le **Docteur Delphine Duprez** et le **Docteur Frédéric Mallein-Gérin** d'avoir examiné ce travail. Je les remercie d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit.

Un grand merci à **Colette** pour ces nombreuses heures passées à opérer les animaux, puis à les disséquer et ces longues matinées de lendemain de garde devant les paillasses, bravant le repos de sécurité pour sauver les cellules...

Je remercie très sincèrement **Marjolaine et Xavier** pour leur encadrement et leur aide riche et complémentaire qui m'a permis de construire et faire aboutir ce travail de thèse. Je les remercie de m'avoir fait partager leurs connaissances, leur expérience et leurs compétences scientifiques.

Je remercie toute l'équipe de l'UR4, **Sabrina, Audrey, Claire, Carole, Zvezdana, et Jérémie** pour leur bonne humeur infaillible et leur soutien.

Je remercie **Nathalie Maurel** et **Amadou Diop** et leurs étudiants pour leur sympathie et la qualité du travail qu'ils ont fourni afin de mener à bien, au sein de l'ENSAM, l'ensemble du travail de recherche biomécanique.

Merci à **Monsieur Mark Randolph**, Daddy Randolph, de m'avoir fait découvrir le monde du laboratoire et de la recherche, et mes premières expériences de thérapie cellulaire.

Merci à **Sylvie** pour son aide en histologie et à **Christine** qui a sut jongler avec des problèmes d'animalerie.

Merci à Sylvie de Saint Antoine pour son aide précieuse.

## Résumé

### **Le vieillissement des fibrocartilages : évaluation de la thérapie cellulaire régénérative appliquée aux lésions de l'enthèse.**

Les fibrocartilages sont des tissus répartis largement dans l'organisme dont la structure histologique est étroitement liée à la fonction. Ils jouent un rôle fondamental dans la transmission des forces de compression ou de traction et sont un composant majeur de l'appareil musculo-squelettique.

Parmi les différents fibrocartilages se dégage l'enthèse qui vient attacher les tendons autour des articulations et dont le vieillissement aboutit à un arrachement des tendons.

Afin d'étudier les possibilités thérapeutiques, nous avons développé chez le petit animal, un modèle de lésion de l'enthèse qui se veut proche du vieillissement, afin de recréer un modèle translationnel le plus proche possible de la réalité clinique, ce modèle nous permettant d'évaluer le taux global de cicatrisation.

Le modèle que nous avons développé nous a permis d'obtenir un taux de cicatrisation, après réparation chirurgicale d'une lésion de l'enthèse du tendon de rat, un taux de cicatrisation proche de celui obtenu en pratique clinique.

En injectant, lors des réparations chirurgicales, des chondrocytes dans un groupe, et des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse dans l'autre nous avons montré une différence statistiquement significative en terme de taux global de cicatrisation, de résistance à l'arrachement, et de régénération histologique de l'enthèse à 45 jours.

**Mots clés :** chondrocytes, cellules souches mésenchymateuses, vieillissement, enthèse, fibrocartilage, médecine régénérative, cicatrisation

**Intitulé et adresse du laboratoire :** UR 4 Physiologie et Physiopathologie, Université Paris VI/ Bat A, 5<sup>ème</sup> étage, case courrier 256, 7 quai Saint-Bernard, 75252 Paris Cedex 5.

## Résumé en anglais

### **Fibrocartilages ageing: evaluation of regenerative cell therapy for enthesis lesions.**

Fibrocartilages are located in many places in the body, and there is a direct correlation between this location and their histology. They act as a stress load junction organ and, thereby, play a fundamental role in the musculoskeletal system.

In between several types of fibrocartilages, one specific is called enthesis, which function is to fix tendons around the joint. Its natural ageing leads to the tearing of the tendon, decreasing range of motion.

In order to evaluate the effect of several therapies on a « aged » enthesis, we first validate, in a small animal model, of enthesis lesion close to natural ageing. This model needed to provide limited healing and possibilities of assessing the healing rate after surgical repair.

The model we validate in adult wistar rat, allows us to assess the global healing rate, after surgical repair of the tendon to the bone, following the mechanical destruction of the enthesis. This rate is close to human natural healing rate.

By injecting, during surgical repair, chondrocytes in one group, Bone Marrow Derived Stem Cells in the other one, we demonstrate a statistically significant difference regarding global healing rate, load to failure, and histological regeneration at 45 days.

**Key words:** chondrocytes, Stem Cells, ageing, enthesis, fibrocartilage, regenerative medicine, healing

**Intitulé et adresse du laboratoire :** UR 4 Physiologie et Physiopathologie, Université Paris VI/ Bat A, 5<sup>ème</sup> étage, case courrier 256, 7 quai Saint-Bernard, 75252 Paris Cedex 5.

## Liste des abréviations

**aa** : acides aminés  
 **$\alpha$ -MEM** : Alpha- Minimum Essential Medium  
**AINS** : anti-inflammatoires non stéroïdiens  
**ARNm** : acide ribonucleique messenger  
**bFGF** : basic Fibroblast Growth Factor  
**BMP**: Bone Morphogenetic Protein  
**Ca**: Calcium  
**CFU-f**: Colony Forming Unit-fibroblastic  
**CMV**: cytomégalovirus  
**COMP**: Cartilage oligomeric matrix protein  
**CRLR**: Calcitonin Receptor-like Receptor  
**CS**: Cellules Sousches  
**CSM**: Cellules Sousches Mésenchymateuses  
**CTGF** : Connective Tissue Growth Factor  
**EDAX**: Energy Dispersive x-ray Analysis  
**EGF** : Endothelial Growth Factor  
**EGR** : Early Growth Response  
**ESC**: Embryonic Stem Cell  
**FACIT** : fibril-associated collagene with interrupted triple hélice  
**FGF** : Fibroblast Growth Factor  
**FM**: fibrocartilage minéralisé  
**FNM** : fibrocartilage non minéralisé  
**GAG** : glycosaminoglycanes  
**Hz**: Herz  
**IGF** : Insulin Like Growth Factor  
**Ihh** : Indian Hedgehog  
**IL** : interleukin  
**iPSC** : Induced pluripotent stem cell  
**LCA**: Ligament Croisé Antérieur  
**MMP** : métalloprotéases matricielles  
**MACI** : Matrix-induced chondrocyte implantation  
**NK1** : neurokinin 1 receptor  
**P** : Phosphore  
**PDGF $\beta$**  : Le Platelet-Derived Growth Factor  $\beta$   
**PG**: protéoglycane  
**Pg** : prostaglandine



**PRELP** : Proline arginine-rich, end leucine-rich repeat proteine

**PRP** : Platelet-rich Plasma

**PTH r P** : Peptide Relié à la parathormone

**RAMPs**: Receptor Activity Modifying Proteins

**SLRPs** : Small, leucine-rich PG

**Scr**: Scléroxis

**TGF**: Transforming Growth Factor

**TIMP** : Tissue inhibitors of metalloproteinase

**TNF** : tumor necrosis factor

**TGF $\beta$** : Transforming Growth Factor Béta

**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor

## Illustrations

Figure 1 : Les trois types de cartilage de l'organisme.....	17
Figure 2 : Schéma théorique de la loi de Wolff des tissus mous.....	19
Figure 3 : Aspect histologique d'un fibrocartilage de l'enthèse du tendon d'Achille chez l'homme.....	20
Figure 4 : Aspect histologique du disque intervertébral de la queue de la souris.....	20
Figure 5 : Aspect histologique du ménisque humain.....	20
Figure 6: Amas de cellules fibrocartilagineuses.....	21
Figure 7: Composition et agencement de la matrice extracellulaire autour des chondrocytes au sein du fibrocartilage.....	23
Figure 8 : La matrice extracellulaire est le composant majoritaire du cartilage.....	24
Figure 9: Organisation d'une molécule de collagène.....	25
Figure 10 : Organisation d'une molécule d'agrécan et sa ramification sur l'acide hyaluronique.....	28
Figure 11 : Modification en fonction de l'âge du contenu en ADN dans les disques inter-vertébraux humain.....	32
Figure 12: Modification en fonction de l'âge du contenu en Collagène dans les disques inter-vertébraux humain. ....	32
Figure 13: Modification en fonction de l'âge du contenu en Protéoglycanes dans les disques inter-vertébraux humain. ....	32
Figure 14: Répartition des enthèses dans l'organisme.....	33
Figure 15 : Différents modes de fixations du tendon sur l'os.....	34
Figure 16 Différences de propriétés mécaniques en fonction du type de fibrocartilage de la zone d'insertion.....	38
Figure 17 : Relation structure-fonction au niveau de l'enthèse de LCA bovin.....	38
Figure 18 : Présence minérale et localisation à l'insertion du LCA bovin. ....	39
Figure 19 : Croissance de l'enthèse perinatale.....	42
Figure 20 : Expression du collagène de type X lors de développement.....	43
Figure 21 : Expression des facteurs de croissance au cours du développement.....	43
Figure 22 : Expression des collagènes de type I et II au cours du développement.....	44
Figure 23 : Différents facteurs influençant le développement de l'enthèse.....	46
Figure 24: Influence des stimuli mécaniques sur le développement de l'enthèse.....	48
Figure 25 : Modifications liées à l'âge dans l'organisation matricielle et cellulaire de l'enthèse.....	50
Figure 26: Organisation des fibres de collagène I en fonction de l'âge.....	51
Figure 27 : Modification avec l'âge de l'organisation des protéoglycanes à travers l'enthèse.....	52
Figure 28 : Physiopathologie de l'inflammation secondaire dans les lésions de l'enthèse micro et macro traumatiques.....	55
Figure 29: Histologie d'une enthèse de spondylarthropathie au stade précoce.....	57
Figure 30 : Affections métaboliques associées à des enthésopathies.....	59
Figure 31 : Les expressions des ARNm et des protéines des collagènes I et III lors de la cicatrisation.....	63

Figure 32 : Cinétique des TGFβ lors de la cicatrisation.....	64
Figure 33 : Expression de différents facteurs de croissance de la cicatrisation os-tendon après réparation chez le lapin.....	66
Figure 34 : Expression de différents facteurs de croissance de la cicatrisation os-tendon après réparation chez le rat.....	66
Figure 35: Influence du stimulus mécanique sur le volume de la cicatrice après réparation d'une lésion du supraspinatus de rat. ....	68
Figure 36: Le phénomène de cicatrisation de la peau.....	70
Figure 37 : Prométhée, Nicolas-Sébastien Adam, 1762, Musée du Louvre.....	71
Figure 38 : Nombre de cellules souches mésenchymateuses dans le corps humain.....	75
Figure 39 : Les différents type de différenciation des CSM.....	76
Figure 40 : La plasticité cellulaire des CSM.....	77
Figure 41: Activité paracrine des CSM.....	77
Figure 42 : Obtention des ESc.....	79
Figure 43 : Principes de la thérapie cellulaire du cartilage à partir de chondrocytes autologues.....	80
Figure 44 : Aspect osseux et macroscopique d'une épaule humaine, de rat et de chien.....	83
Figure 45: Aspect de néo tendon après échec de réparation du tendon du supra-épineux sur l'humérus de chien.....	85
Figure 46: Aspect macroscopique du tendon et de la zone d'insertion du tendon sur le Calcaneum de rat wistar 3 mois.....	88
Figure 47 : Le tendon d'Achille de rat. ....	89
Figure 48 : Coupe histologique de la zone d'insertion du tendon sur l'os.....	89
Figure 49: Aspect histologique du tendon du calcanéum après destruction mécanique de l'enthèse.....	90
Figure 50 : Aspect classique du tendon d'Achille avec, juste à ses côtés, le tendon péronier latéral.....	91
Figure 51: Technique chirurgicale de réparation du tendon d'Achille de rat.....	92
Figure 52 : Aspect macroscopiques du tendon après réparation.....	93
Figure 53: Echelle histologique de caractérisation de l'enthèse.....	95
Figure 54 : Tests biomécaniques.....	97
Figure 55 : Technique de culture primaire de chondrocytes articulaires de rats.....	99
Figure 56 : Phénotypage des chondrocytes de rats.....	100
Figure 57 : Phénotypage des chondrocytes et cellules souches mésenchymateuses.....	103
Figure 58 : Technique chirurgicale de réinsertion tendineuse, avec injection cellulaire.....	104/105
Figure 59 : Résultat de l'influence de la thérapie cellulaire sur le taux global de cicatrisation.....	106
Figure 60: Données biomécaniques de résistance à l'arrachement.....	108
Figure 61: Etude histologique de l'apparition de l'enthèse après injection cellulaire.....	109
Figure 62 : Etude histologique de l'aspect de l'enthèse à 45 jours (comparaison native, cicatrisation seule, cicatrisation après injection de chondrocytes et de CSM).....	110
Figure 63: Etude statistique du score histologique des différentes enthèses.....	111
Figure 64 : Utilisation des chondrocytes pour cicatriser une lésion méniscale en zone avasculaire.....	112

Figure 65: Etude histologique de la thérapie cellulaire de l'enthèse par agrégat chondrocytaire.....	113
Figure 66: Influence de l'injection de CSM autologues sur la production de collagène de type II chez le lapin.....	114
Figure 67 : Aspect de cicatrisation du tendon dans l'os avec injection de CSM autologues, dans les reconstruction du LCA de lapin.....	115
Figure 68 : Etude biomécanique de l'influence de l'injection de CSM autologues dans les reconstruction du LCA de lapin.....	115
Figure 69 : Concentration locale des CSM au site de réparation, évolution avec le temps.....	116
Figure 70 : intérêt histologique de la transfection des CSM par MT1MMP pour induire de manière précoce un fibrocartilage chez le rat.....	117
Figure 71: Intérêt de la transfection des CSM par Scx pour induire de manière précoce un fibrocartilage chez le rat.....	118
Figure 72: Etudes impliquant l'utilisation de cellules souches dans la cicatrisation du tendon sur l'os. ....	119
Figure 73 : Réparation de coiffe de lapin, avec renfort recouvert de cellules.....	123
Figure 74 : Utilisation de facteurs de croissance pour réparer la coiffe (modèle ovin).....	124
Figure 75 : Application clinique du PRP injecté lors de réparation de coiffe des rotateurs humaines.....	125
Figure 76 : Technique de greffe de chondrocytes de Brittberg.....	127
Figure 77. Etudes cliniques étudiant l'injection de CSM chez l'homme en orthopédie.....	130
Figure 78 : Calcification et formation osseuse intra cardiaque après injection de CSM.....	136

# Table des matières

## INTRODUCTION GENERALE – CONTEXTE DE NOS RECHERCHES

<b>1 PRESENTATION DES FIBROCARILAGES.....</b>	<b>17</b>
1.1 Particularisme.....	17
1.2 Propriétés générales des fibrocartilages et de leurs cellules.....	18
1.2.1 Définition.....	18
1.2.2 Localisation des fibrocartilages.....	19
1.2.3 Le caractère avasculaire des fibrocartilages.....	20
1.3 Propriétés histologiques communes des fibrocartilages.....	21
1.3.1 Les cellules fibrocartilagineuses.....	21
1.3.2 Synthèse de la matrice extracellulaire fibrocartilagineuses.....	23
1.3.2.1 Les collagènes.....	24
1.3.2.2 Les protéoglycanes.....	26
1.3.2.2.1 Les agrécanes.....	27
1.3.2.2.2 Les SLRP's.....	28
1.3.2.3 Les protéines non collagéniques et les glycoprotéines.....	29
1.3.2.3.1 La tenascine C.....	29
1.3.2.3.2 L'élastine.....	29
1.3.2.3.3 La lamiline.....	30
1.3.3 Le fibrocartilage calcifié.....	30
1.4 Développement des fibrocartilages.....	30
1.5 Vieillessement des fibrocartilages.....	31
<b>2 L'ENTHESE.....</b>	<b>33</b>
2.1 Définition des enthèses.....	33
2.2 Histologie.....	34
2.2.1 Relation structure fonction.....	35
2.2.1.1 Le tendon.....	35
2.2.1.2 Le fibrocartilage non calcifié et calcifié.....	35
2.2.1.3 Tidemark.....	36
2.2.1.4 La plaque osseuse sous-chondrale.....	37
2.2.2 Composition en minéraux.....	39
2.3 Développement de l'enthèse.....	40
2.3.1 Prénatal.....	40
2.3.2 Post-natal.....	41

2.3.2.1 Facteurs biologiques.....	41
2.3.2.2 Facteurs biomécaniques.....	47
2.4 Vieillessement de l'enthèse.....	48
2.5 Pathologies de l'enthèse.....	54
2.5.1 Pathologie microtraumatique.....	54
2.5.1.1 Données épidémiologiques.....	54
2.5.1.2 Données physiopathologiques.....	54
2.5.2 Pathologie calcifiante.....	55
2.5.3 Pathologie inflammatoire.....	56
2.5.3.1 Histologie des lésions d'enthésite dans la spondylarthrite ankylosante.....	56
2.5.3.2 Physiopathogénie.....	57
3 CICATRISATION DU TENDON SUR L'OS.....	60
3.1 Données cliniques.....	60
3.2 Données fondamentales.....	61
3.2.1 Facteurs biologiques.....	61
3.2.1.1 Composante cellulaire de la cicatrisation.....	61
3.2.1.2 Les TGFβ.....	63
3.2.1.3 Les BMPs.....	65
3.2.1.4 Le bFGF.....	65
3.2.1.5 L'IGF-1.....	65
3.2.1.6 Le PDGFβ.....	66
3.2.1.7 Le COMP.....	66
3.2.1.8 Le CTGF.....	66
3.2.2 Facteurs mécaniques.....	67
3.2.2.1 Stimuli répétitifs.....	67
3.2.2.2 Transduction mécano-biologique.....	67
3.2.2.3 L'immobilisation.....	68
3.2.2.4 La mobilisation.....	69
4 MEDECINE REGENERATIVE : PRINCIPES ET MOYENS.....	71
4.1 Histoire et mythologie de la médecine régénérative.....	71
4.2 Moyens.....	72
4.2.1 Principes de la thérapie cellulaire.....	72
4.2.1.1 Cellules souches mésenchymateuses Humaines.....	74
4.2.1.1.1 Nombre de CSM.....	74
4.2.1.1.2 Les niches des CSM.....	75
4.2.1.1.3 Différenciation des CSM.....	75
4.2.1.1.4 Plasticité des CSM.....	76
4.2.1.1.5 Activité trophique des CSM.....	77

4.2.1.1.6	Activité immunorégulatrice des CSM.....	78
4.2.1.2	iPSCs.....	78
4.2.1.3	Cellules Souches Somatiques.....	78
4.2.1.4	Cellules souches fœtales.....	79
4.2.1.5	Cellules souches embryonnaires.....	79
4.2.1.6	Chondrocytes.....	80
4.2.2	Scaffolds.....	81
4.3	Modèles animaux et médecine régénérative.....	81
4.3.1	Principes généraux.....	81
4.3.2	Modèles animaux pour la coiffe des rotateurs.....	82
4.3.2.1	Problématique clinique.....	82
4.3.2.2	Modèles actuels.....	84
4.3.2.2.1	Le rat.....	84
4.3.2.2.2	Les gros animaux.....	85

## **OBJECTIFS ET RESULTATS DU TRAVAIL**

<b>5</b>	<b>VALIDATION D'UN MODELE DE LESION DEGENERATIVE DE L'ENTHESE.....</b>	<b>87</b>
----------	--	-----------

5.1	Objectifs.....	87
-----	----------------	----

5.2	Matériels et méthodes.....	88
-----	----------------------------	----

5.2.1	Etudes préliminaires.....	88
-------	---------------------------	----

5.2.2	Technique chirurgicale.....	91
-------	-----------------------------	----

5.2.3	Validation des critères objectifs de cicatrisation.....	93
-------	---	----

5.2.4	Validation de l'échelle histologique de gradation de l'enthèse.....	94
-------	---	----

5.2.5	Validation des tests biomécaniques.....	96
-------	---	----

<b>6</b>	<b>ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA THERAPIE CELLULAIRE SUR LA REGENERESCENCE DE L'ENTHESE.....</b>	<b>98</b>
----------	---	-----------

6.1	Objectifs.....	98
-----	----------------	----

6.2	Matériels et Méthode.....	98
-----	---------------------------	----

6.2.1	Isolement et culture cellulaire des chondrocytes.....	98
-------	---	----

6.2.1.1	Isolement cellulaire.....	98
---------	---------------------------	----

6.2.1.2	Caractérisation phénotypique des cellules.....	100
---------	--	-----

6.2.1.3	Culture.....	101
---------	--------------	-----

6.2.2	Isolement et culture cellulaire des cellules souches mésenchymateuses.....	101
-------	--	-----

6.2.2.1	Isolement cellulaire.....	101
---------	---------------------------	-----

6.2.2.2	Caractérisation phénotypique des cellules.....	101
---------	--	-----

6.2.2.3	Culture.....	103
---------	--------------	-----

6.2.3	Technique d'injection cellulaire lors de la réparation.....	104
-------	---	-----

<b>6.3 Résultats.....</b>	<b>105</b>
<b>6.3.1 Taux global de cicatrisation.....</b>	<b>105</b>
<b>6.3.2 Résistance à l'arrachement.....</b>	<b>106</b>
<b>6.3.3 Données histologiques.....</b>	<b>108</b>
<b>6.3.3.1 Evolution de la zone de jonction.....</b>	<b>108</b>
<b>6.3.3.2 Etude morphologique de l'enthèse à 45 jours.....</b>	<b>110</b>
<b>7- DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>112</b>
<b>7.1 Thérapie cellulaire des fibrocartilages par les chondrocytes.....</b>	<b>112</b>
<b>7.1.1 Cicatrisation du ménisque.....</b>	<b>112</b>
<b>7.1.2 Cicatrisation des enthèses.....</b>	<b>113</b>
<b>7.2 Thérapie cellulaire de l'enthèse par CSM.....</b>	<b>114</b>
<b>7.3 L'utilisation de la fibrine.....</b>	<b>119</b>
<b>7.4 Voies de recherches actuelles.....</b>	<b>120</b>
<b>7.4.1 Utilisation de renforts tendineux à composants cellulaires.....</b>	<b>120</b>
<b>7.4.2 Les renforts par matrice extracellulaire.....</b>	<b>121</b>
<b>7.4.3 Renforts artificiels.....</b>	<b>122</b>
<b>7.4.4 L'utilisation de facteurs de croissance.....</b>	<b>123</b>
<b>7.5 Limites actuelles à l'utilisation clinique de la thérapie cellulaire.....</b>	<b>126</b>
<b>7.5.1 Les chondrocytes.....</b>	<b>126</b>
<b>7.5.1.1 Utilisation des chondrocytes dans la réparation du cartilage.....</b>	<b>126</b>
<b>7.5.2 Les cellules souches.....</b>	<b>129</b>
<b>7.5.2.1 Utilisation des CSM en clinique orthopédique.....</b>	<b>129</b>
<b>7.5.2.2 Limites de l'utilisation des CSM.....</b>	<b>130</b>
<b>7.5.2.2.1 Le mode d'injection.....</b>	<b>130</b>
<b>7.5.2.2.2 Le risque tumoral.....</b>	<b>132</b>
<b>7.5.2.2.3 Effet tumoral périphérique.....</b>	<b>132</b>
<b>7.5.2.2.4 Effet de la réponse immunitaire.....</b>	<b>133</b>
<b>7.5.2.2.5 La fixation ectopique.....</b>	<b>133</b>
<b>7.5.2.3 Limites de l'utilisation des CSM cultivées.....</b>	<b>134</b>
<b>7.5.2.3.1 Le risque tumoral.....</b>	<b>134</b>
<b>7.5.2.3.2 Les conditions de culture in vitro.....</b>	<b>134</b>
<b>7.5.2.3.3 Modifications génétiques.....</b>	<b>135</b>
<b>7.5.2.3.4 Risque lié au milieu de culture.....</b>	<b>135</b>
<b>7.5.2.3.5 Différenciation ou dédifférenciation non désirée.....</b>	<b>136</b>
<b>8 - PERSPECTIVES ET CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>137</b>

Annexe 1

Annexe 2

### III REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES





## INTRODUCTION GENERALE – CONTEXTE DE NOS RECHERCHES

### I PRESENTATION DES FIBROCARTILAGES

#### 1.1 Particularisme

De nombreux organes sont constitués de fibrocartilage, et pourtant il est assez rare de trouver des revues s'intéressant aux fibrocartilages en général car les organes concernés ont des localisations diverses dans l'organisme et sont souvent pris en charge médicalement par différents spécialistes. Les fibrocartilages incluent les ménisques, les disques intervertébraux, la partie terminale des tendons et ligaments, mais aussi l'articulation temporo-mandibulaire. Cependant ces organes, répartis dans tout le corps, avec des fonctions parfois différentes, ont la particularité d'avoir en commun des caractéristiques spécifiques de leur contenu cellulaire et de la matrice extracellulaire les réunissant dans le groupe des fibrocartilages. Un des caractères communs à tous ces fibrocartilages est leur particulière résistance aux stress mécaniques et cela se traduit très clairement dans leur matrice extracellulaire. Il n'est pas possible de présenter de manière spécifique les spécificités de chaque fibrocartilage, et nous présenterons dans cette partie l'ensemble des éléments constituant la matrice extracellulaire communes à chaque fibrocartilage. Les cartilages de l'organisme sont, par ordre de fréquence, le cartilage hyalin, le cartilage élastique et le cartilage fibreux.

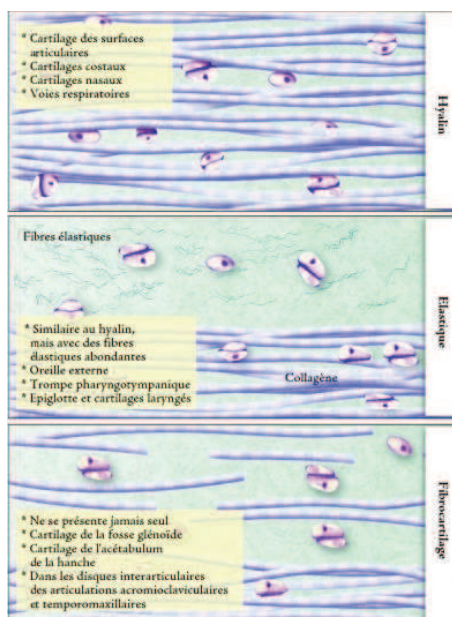


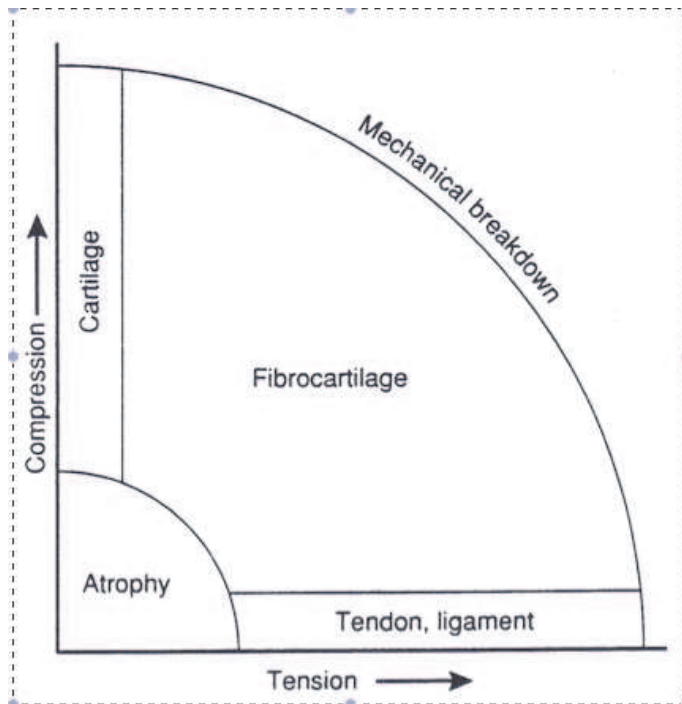
Figure 1 : Les trois types de cartilage de l'organisme : le cartilage hyalin, le cartilage élastique et le cartilage fibreux.

## 1.2 Propriétés générales des fibrocartilages et de leurs cellules

### 1.2.1 Définition

D'un point de vue histologique, un fibrocartilage typique est un tissu avasculaire, non innervé, contenant une matrice extracellulaire riche en fibres de collagène et d'élastine, qui entoure des cellules arrondies, larges ou ovales. Cependant, à la différence de simples tissus connectifs fibreux, il existe des zones de matrice péri-cellulaire amorphe qui sont colorées au toluène bleu en zone métachromatiques. Contrairement au cartilage hyalin qui a une matrice plus dense, les fibres sont visibles directement. (Stockwell, 1979). Tout comme pour le cartilage hyalin, le fibrocartilage se caractérise par la présence de collagène de type II. (Benjamin, 1998)

Si tous les fibrocartilages ont une matrice faite des mêmes éléments, leur quantité relative est très variable ce qui rend la définition histologique précise assez difficile. Ainsi, le ménisque du genou contient très peu de collagène de type II (moins de 10%), quand le disque intervertébral en contient une très importante quantité (50%) (Eyre, 2002). Leur différence avec un tissu conjonctif ou avec des tissus cartilagineux est donc parfois difficile. Ainsi le cartilage hyalin qui couvre la tête humérale, lorsqu'il s'approche de la zone d'insertion des tendons de la coiffe, ou bien le cartilage rotulien, lorsqu'il se termine vers la pointe d'insertion du tendon rotulien, se transforme en fibrocartilage. C'est par cette "zone de transition", par sa localisation très précise dans l'organisme, étroitement liée à la fonction que le fibrocartilage va pouvoir se définir. Comme de nombreux autres tissus de l'appareil musculosquelettique, cette ubiquité de localisation et cette hétérogénéité histologique rendent le phénotypage cellulaire difficile. Le nom le plus classiquement utilisé pour définir cette population cellulaire est simplement celui de cellules fibrocartilagineuses. Cependant, et en fonction de la localisation et de la fonction du fibrocartilage, d'autres appellations ont été utilisées: fibrochondrocytes (Agarwal, 2001) fibroblastes ou chondrocytes.



**Figure 2 : Schéma théorique de la loi de Wolff des tissus mous. (Amadio, 1992)**

### 1.2.2 Localisation des fibrocartilages

La localisation des fibrocartilages est très variable, avec des zones dont l'atteinte très fréquente en fait un sujet de recherche et d'enjeu clinique majeur. En premier lieu il faut noter l'anneau fibreux ou annulus fibrosus du disque intervertébral, puis le ménisque du genou, celui de l'articulation temporo-mandibulaire, et les zones d'insertions tendineuses appelées enthèses. Pour les tendons et les ligaments on retrouve aussi des fibrocartilages aux zones où le tendon est comprimé sur l'os ou bien passe dans des poulies pour pouvoir changer de direction et coulisser. Lorsque le tendon vient se fixer sur l'os il va venir se coller par une zone de transition qui est toujours un fibrocartilage. Mais lorsque les forces sont relativement faibles la jonction se fait par une enthèse fibreuse, c'est le cas lorsque le tendon se finit sur la diaphyse. Lorsque les forces sont importantes, on parle alors d'un organe enthèse, véritable fibrocartilage qui fixent les tendons sur les épiphyses. Ce terme d'enthèse organe a été décrit par Benjamin et Mc Gonagle en 2001 (Benjamin, 2001).

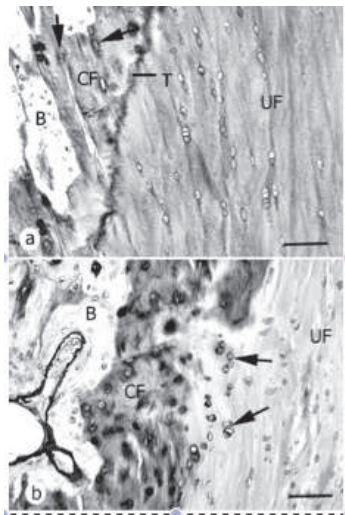


Figure 3 : Aspect histologique d'un fibrocartilage de l'enthèse du tendon d'Achille chez l'homme. A : l'enthèse fibrocartilagineuse est attachée au calcanéum. Les cellules du fibrocartilage, alignées en colonnes, sont localisées dans le fibrocartilage non minéralisé (UF), mais aussi dans la zone calcifiée (flèches), entre la tidemark (T) et l'os (B) (bar : 1000  $\mu$ m, toluène bleu, (Benjamin, 2004)

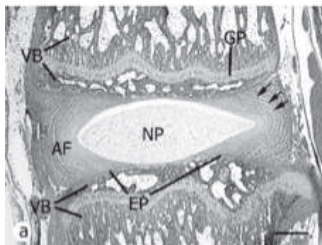


Figure 4 : Aspect histologique du disque intervertébral de la queue de la souris, montrant la localisation de l'annulus fibrosus (AF) par rapport aux corps vertébraux de part et d'autre. Au centre du disque se trouve le nucleus pulposus (NP). L'annulus contient de nombreuses lamelles de collagène (flèches) et comme tous les fibrocartilages il est peu vascularisé, sa nutrition se faisant par à partir des zones de jonction avec les vertèbres (EP) barre 0,5mm, H&E. (Benjamin, 2004)

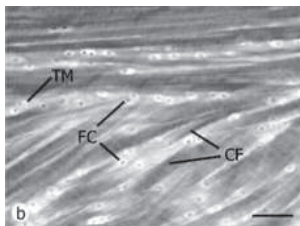


Figure 5 : Aspect histologique du ménisque humain. Les cellules fibrocartilagineuses (FC) sont entourées de matrice extracellulaire (TM) bien différenciée des fibres de collagène organisées en dense réseau (C). Barre : 50 $\mu$ m, H&E (Benjamin, 2004)

### 1.2.3 Le caractère avasculaire des fibrocartilages

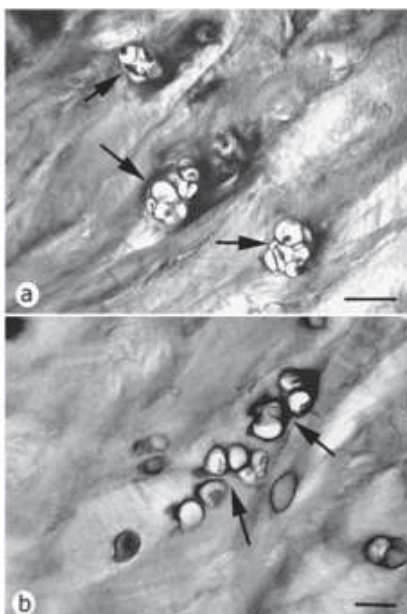
Le fibrocartilage est un tissu avasculaire. Cette absence de vaisseau sanguin est liée à la très haute pression qui s'exerce sur cet organe, qui serait responsable d'une fermeture systématique de la lumière des vaisseaux. Par ailleurs cette absence de vascularisation a d'autres explications. Il existe dans la matrice différents facteurs anti-angiogéniques sécrétés et notamment la chondromoduline 1. Ce médiateur, connue comme facteur anti vasculaire

(Hiraki, 1997) dans le cartilage hyalin, a été détecté dans l'annulus fibrosus du disque intervertébral. (Takao, 2000). La sécrétion de VEGF, promoteur de la prolifération vasculaire, est inhibée dans les fibrocartilages enserrant certains tendons (Petersen et al, 2002). Les TIMPs (Tissue Inhibitor of matrix metalloprotéases)( Kapila,1998) et la thrombospondine ont aussi été identifiés dans les ménisques ( Miller, 1991). Les TIMPs 1 et 2 sont connues pour avoir des propriétés anti-angiogéniques dans d'autres tissus (Brew et al, 2000). Du fait de ce manque de vascularisation, la nutrition cellulaire va se faire par diffusion depuis les tissus environnants, cette faible capacité de nutrition étant liée au caractère faiblement cellulaire des fibrocartilages.

### 1.3 Propriétés histologiques communes des fibrocartilages

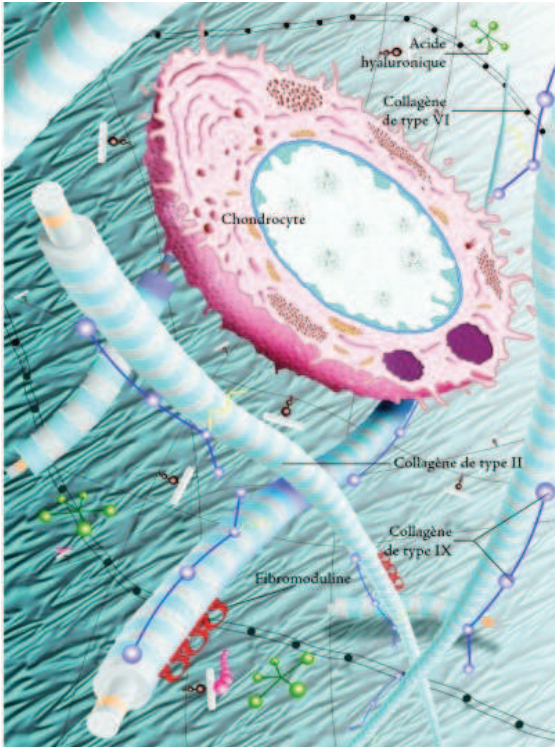
#### 1.3.1 Les cellules fibrocartilagineuses

Les cellules fibrocartilagineuses se regroupent généralement en grappes, qui semblent être en fait des artefacts de découpe liés à une mauvaise préparation histologique. Les cellules de l'enthèse des fibrocartilages, comme les chondrocytes, sont des cellules rondes ou ovales, isolées dans leur matrice extracellulaire, et qui n'ont que peu ou pas du tout de contact entre elles. Il a ainsi bien été montré qu'il existe une communication étroite entre les ostéocytes d'un côté, et les fibroblastes tendineux de l'autre, alors qu'aucune communication n'existe entre les cellules fibrocartilagineuses.



**Figure 6: Amas de cellules fibrocartilagineuses (flèches) provenant de tendon d'Achille humain (a) et de l'insertion du biceps distal. Cette organisation classique rappelle celle du cartilage aux stades précoces de l'arthrose. Barre (a) 50  $\mu$ m, (b) 20  $\mu$ m, Toluène bleu. (Benjamin, 2004)**

D'un point de vue de l'ultrastructure, les cellules des fibrocartilages des tendons ou du périoste ont de nombreuses particularités proches des chondrocytes des cartilages hyalins (un réticulum endoplasmique dilaté, des granules de glycogène, des gouttes lipidiques et de nombreux filaments intermédiaires). Dans les tissus pathologiques, il arrive que les cellules s'organisent en grappes, comme retrouvées aux stades précoces de l'arthrose. Ces colonnes ont été décrites dans de nombreuses enthèses (Kumai, 2002), dans les disques intervertébraux (Johnson et al 2001) et les ménisques (Le Graverand 2001). Le Graverand propose un mécanisme de formation de ces grappes au niveau de ménisques de lapins après section du ligament croisé antérieur. La désorganisation du réseau cellulaire des cellules du ménisque par apoptose isole des groupes cellulaires au sein de la matrice. Ainsi les cellules prennent un phénotype plus chondrocytaire, se divisent, et forment ces grappes caractéristiques. Il a été mis en évidence, au sein du disque intervertébral, de connexions inter cellulaires par des gap junctions contenant des connexines 43 (Le Graverand 2001) alors qu'au niveau de l'enthèse, les cellules sont séparées les unes des autres au sein de la matrice extracellulaire (Ralph et al 1998). Contrairement au disque intervertébral et au ménisque, il n'existe pas, pour l'enthèse, de modèle dégénératif. Il n'est pas, de fait, possible de connaître son évolution dégénérative, mais il semble que celle-ci se fasse par modification du contenu cellulaire fibroblastique en phénotype fibrocartilagineux, car les grappes cellulaires apparaissent essentiellement dans les zones initialement fibrocartilagineuses (Rufai, 1995). L'expression très importante de collagène de type X autour des grappes cellulaires méniscales suggère, comme dans l'arthrose, une calcification matricielle. (Le Graverand, 2001). L'apparition de cette calcification se ferait parallèlement à la dégradation des agrécanes, du fait de la forte corrélation entre les enzymes (Chubinskaya, 1998) de dégradation de ces dernières et des grappes cellulaires. Cependant cette dégradation n'est pas le seul élément intervenant puisqu'il a été mis en évidence une diminution de l'expression des gènes des agrécanes lors de la calcification (Eanes, 1992). Si la production d'agrécanes est étroitement liée au phénomène de calcification, on ne sait pas pour l'instant qui intervient en premier, et il est possible que les agrécanes, stimulent, plus qu'inhibent, la calcification tissulaire. (Mwale 1992).



**Figure 7: Composition et agencement de la matrice extracellulaire autour des chondrocytes au sein du fibrocartilage**

Les chondrocytes sont enchâssés dans une matrice extracellulaire abondante composée de fibres de collagène, de protéoglycanes et de glycoprotéines et protéines non collagéniques. Les protéoglycanes, et avant tout l'agrécane, sont chargés négativement et captent des ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ . Un gradient osmotique se crée attirant les molécules d'eau dans la matrice du cartilage. La richesse en collagène de type II et en agrécane confère ses propriétés de résistance et d'amortissement des contraintes mécaniques au cartilage.

### 1.3.2 Synthèse de Matrice extracellulaire fibrocartilagineuse.

Les cellules du fibrocartilage synthétisent, au cours du développement comme au cours de leur état de différenciation mature, de nombreuses molécules constituant la matrice extracellulaire. Cette synthèse est modulée par le fait que le fibrocartilage est un tissu répondant à différents stimuli, que ce soient des facteurs mécaniques ou des changements de concentration en cytokines (Robbins, 1997). La matrice extracellulaire contient bien sûr du collagène et des protéoglycanes, mais aussi d'autres protéines non-collagéniques qui vont piéger dans leurs maillages différents facteurs de croissances, dont la concentration et l'activité vont permettre au fibrocartilage de garder son phénotype.



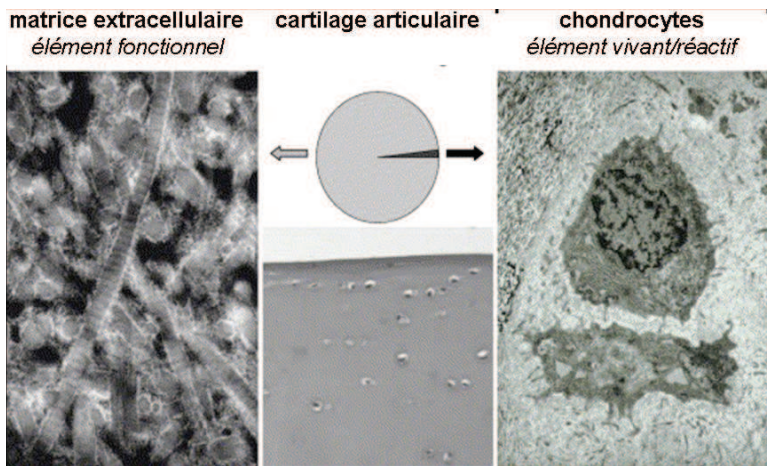
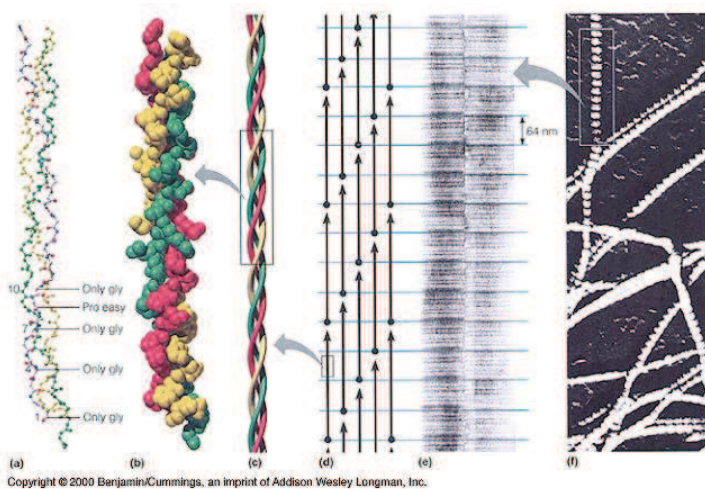


Figure 8 : La matrice extracellulaire est le composant majoritaire du cartilage. Le cartilage articulaire est principalement constitué de matrice extracellulaire (90 à 95 % du volume du tissu). Au sein de cette matrice sont nichées les cellules du cartilage, les chondrocytes, élément vivant du cartilage (Aigner, 2006).

### 1.3.2.1 Les collagènes

Les collagènes sont les composants majeurs des tissus conjonctifs et l'on en dénombre actuellement plus de 20 types, produits sous l'impulsion de plus de 33 gènes (Myllyharju, 2001). Ils sont caractérisés par leur structure en triple hélice, appelée le domaine COL. Cette hélice est constituée de 3 chaînes de polypeptide  $\alpha$  qui s'enroulent les unes autour des autres. Il existe 2 types de collagènes: les collagènes fibrillaires et non fibrillaires. (Ayad, 1998). Le groupe des collagènes fibrillaires est caractérisé par le fait que ces fibres peuvent s'agréger ensemble pour former des fibres, ce qui n'est pas le cas de l'autre groupe. Les collagènes fibrillaires contiennent les collagènes de type I, II, III, V, et XI. Les types IX, XII, XIV, XVI, XIX et le FACIT (fibril-associated collagene with interrupted triple hélice) sont non fibrillaires. Les collagènes fibrillaires, formant un réseau dense très interconnecté, confèrent à la matrice extracellulaire ses propriétés mécaniques de résistance au stress mécanique. Ils sont synthétisés dans la matrice sous forme de pro-collagène, et sous l'action d'enzymes matricielles perdent leur propeptide terminal pour devenir des collagènes et s'assembler dans la matrice extracellulaire. Dans sa forme la plus classique, le fibrocartilage se compose de ces 2 collagènes fibrillaires que sont le collagène de type I et de type II. Mais leur proportion varie selon les fibrocartilages. Les ménisques du genou contiennent plus de type I que de type II (McDevitt, 1990) alors que l'annulus fibrosus contient globalement une proportion égale de type I et type II (Eyre, 2002). On pense actuellement que ce sont les mêmes cellules qui

produisent les différents type de collagène, et que le niveau de différenciation tissulaire ou de stress tissulaire explique la modulation de la proportion de synthèse de chaque type de collagène. Ainsi les cellules de l'annulus fibrosus produisent en début de développement essentiellement du collagène de type I puis, avec le temps, la production de collagène de type II est augmentée pour égaler celle de type I. (Hayes, 2001).



**Figure 9: Organisation d'une molécule de collagène.**

Chaque molécule de collagène est composée de (a) trois chaînes a polypeptidiques dont l'assemblage forme (b, c) une triple hélice ou fibrille de collagène. Chaque chaîne a est composée de plusieurs domaines collagéniques caractérisés par la répétition d'un triplet d'acides aminés Gly-X-Y (X et Y sont dans un cas sur trois une proline ou une hydroxyproline). Les molécules de collagène s'associent régulièrement entre elles créant une striation périodique (d, e, f) des fibres de collagène observable en microscopie.

Les collagènes non-fibrillaires ont été identifiés dans différents fibrocartilages comme dans les disques intervertébraux (Eyre, 2002), dans les fibrocartilages tendineux et ligamentaires (Milz, 2002) ou les ménisques (Landesberg, 1996). Ils comprennent les FACIT (collagènes de type IX et X) et les collagènes organisant l'architecture (Type VI et X). Le collagène de type VI est un collagène fibrillaire fin, en forme de bille, qui peut parfois s'organiser en réseau hexagonal. On le retrouve en région péri-cellulaire des fibrocartilages tendineux ou du cartilage hyalin (Milz, 2002). Son expression est augmentée dans l'arthrose, (Pullig, 1999), dans la cicatrisation de la peau (Oono, 1993) suggérant qu'il joue un rôle dans le maintien de l'intégrité tissulaire et le remodelage matriciel. Sa maturation ne peut se faire sans la présence de prostaglandines (dermatine et chondroïtine sulfates), et l'on suppose qu'il interviendrait dans l'interaction cellules/ PG (Araujo et al. 2002). Même si le collagène de type IX est peu présent dans les fibrocartilages, son absence est responsable d'anomalies phénotypiques importantes sur les disques intervertébraux, sans que l'on sache par quel mécanisme il agit

(Eyre, 2002). C'est un collagène FACIT qui est aussi considéré comme un PG du fait de son composant GAG. Il vient fixer les hétérofibrilles des collagènes de type II et XI et jouerait un rôle fondamental dans leur stabilisation, les fixant entre elles et aux PG (Buckwalter, 1997). De la même manière, le collagène de type III est impliqué dans les phénomènes de réparation tissulaire, capable de fixer les collagènes de type I et II ensemble (Liu, 1995). Thomopoulos (Thomopoulos, 2002) a montré le rôle important du collagène de type XII lors de la cicatrisation du fibrocartilage de l'enthèse. Il conclut que ce collagène interviendrait dans le renforcement des interactions entre les différentes fibres de collagène de type I, voire entre ces fibres et la matrice extracellulaire.

Le collagène de type X est un collagène à chaîne courte, intervenant dans l'organisation globale du collagène, et typiquement présent au contact des chondrocytes hypertrophiques dans les plaques de croissance épiphysaires et les fibrocartilages articulaires. Son expression se retrouve avant l'apparition de l'ossification enchondrale ce qui suppose son rôle dans ce phénomène, c'est à dire la minéralisation, l'invasion vasculaire, la stabilisation matricielle, ou la création de la moelle osseuse (Jacenko et al. 2002). On le retrouve aussi au niveau de l'enthèse et des ménisques sains et dégénératifs (Fujioka, 1998 ; Le Graverand, 2001). Sa présence à l'enthèse est d'autant plus intéressante que le fonctionnement de l'enthèse a souvent été comparé à un équivalent de plaque de croissance (Gao, 1996). Son expression est augmentée dans le cartilage en cas d'arthrose induite par transection du LCA chez le lapin (Bluteau, 2001).

L'organisation des différents collagènes diffère d'un fibrocartilage à un autre. Il semble que l'association de différents collagènes (par exemple I et II) soit plus le fait de sécrétions et productions différentes dans le développement et la maturation du fibrocartilage que d'une sécrétion concomitante. L'organisation 3D est bien codifiée, que ce soit pour les enthèses ou les ménisques alors que cette organisation semble moins ordonnée, que ce soit dans le condyle mandibulaire ou le fibrocartilage péri tendineux.

### 1.3.2.2 Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont composés de glycosaminoglycanes fixés sur une chaîne centrale protéique. Il en existe deux grands types: les larges et les petits, ou PG riches en leucines (Iozzo et al. 1996). Les mieux connus sont l'agrécan, le versicane, le neurocane et le brévican (Iozzo, 1998 ; Wight, 2002) qui forment le groupe des lecticanes ou hyalectane, ayant en commun la propriété de fixer l'acide hyaluronique et une extrémité lectine C qui fixe

les autres protéines de la matrice extra-cellulaire (Iozzo et al. 1996). Les SLRPs (pour Small, leucine-rich PG) sont une autre famille, caractérisée par la présence d'une protéine centrale faite de répétition de leucine, terminée d'un côté ou de l'autre par une zone riche en cystéine. (Iozzo et al. 1996). Elles incluent les décorine, biglycane, lumican, fibromoduline, kératocane, ostéoadhérine, épiphycane, mimican, asporine, opticine et PRELP (Proline/arginine-rich, end leucine-rich repeat proteine). Tout comme les larges PG, la plupart des SLRPS sont présentes dans les fibrocartilages, où elles jouent de multiples fonctions. (Reardon, 2000).

Les chaînes de GAG composant les PG sont une succession de polysaccharides longs, fixés en branche, constitués d'une succession de disaccharides reliés à un os. Ils sont chargés de groupes sulfates ou carbogène qui retiennent une forte population cationique. De fait, l'osmolarité locale est augmentée, ce qui favorise la rétention d'eau. (Buckwalter, 1997).

#### 1.3.2.2.1 Les agrécane

Le versican et l'agrécane ont été détectés dans différents fibrocartilages (Benjamin, 1998). Ils ont généralement une présence opposée, liée au taux de collagène fibrillaire. Ainsi, dans le développement du disque intervertébral du rat, le versican se retrouve dans les zones marquant le collagène I et l'agrécane le collagène de type II. ((Hayes et al. 2001 et Hayes et al. 1999).

L'agrécane joue un rôle fondamental dans la fixation de l'eau dans les cartilages hyalins comme dans les fibrocartilages. Il est bloqué dans la matrice extracellulaire entre les fibres de collagène, résistant à la compression mécanique (Buckwalter, 1997). C'est probablement un des éléments capitaux dans l'adaptabilité des fibrocartilages au stress mécanique, que ce soit à la compression ou à la traction (Benjamin et al 2001). Par ailleurs, comme l'ensemble des protéoglycanes, sa structure gélatineuse lui confère un rôle de matrice 3D permettant de stocker, et probablement réguler, l'action des protéines libérées dans la matrice. Sa production se fait sous forme de monomères de protéoglycanes synthétisés en intracellulaire, libérés dans la matrice extracellulaire, où ils se forment par fixation à une structure protéique.

Le versican est un protéoglycane à tropisme plutôt tendineux ou ligamentaire, sécrété par les fibroblastes. On le retrouve cependant dans les disques intervertébraux, les ménisques et les muscles lisses. Tout comme l'agrécane, il se combine avec l'acide hyaluronique pour fixer l'eau et serait impliqué dans les phénomènes d'œdème tissulaire (Roughley, 1994). Il a la possibilité de stimuler et/ou d'inhiber la prolifération et l'adhésion cellulaire.

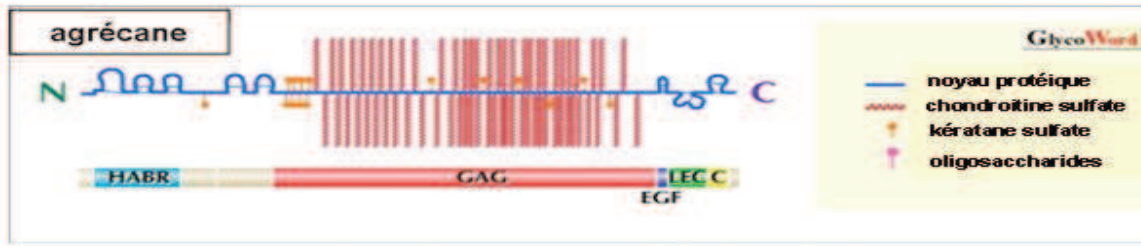
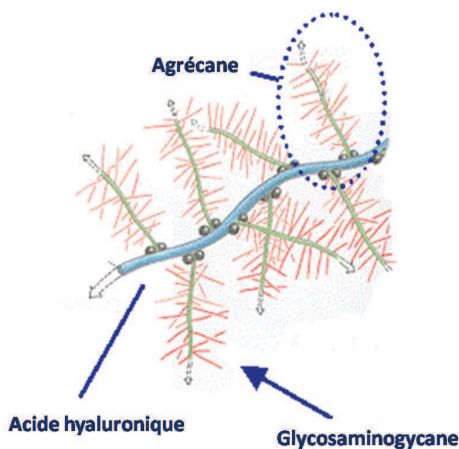


Figure 10 : Organisation d'une molécule d'agrécane et sa ramification sur l'acide hyaluronique.

L'agrécane est organisé en plusieurs domaines parmi lesquels se distinguent le domaine de liaison à l'acide hyaluronique (HABR: hyaluronic acid-binding region) et les domaines d'adhésion aux GAG (glycosaminoglycane). Les agrécane se fixent à l'acide hyaluronique de la matrice par le biais de protéines de liaison. (EGF: epidermal growth factor-like repeat; LEC: C-type lectin-like module; C: complement regulatory protein-like module, source sur <http://www.glycoforum.gr.jp>).



#### 1.3.2.2.2 Les SLRPs

Les SLRPs sont constitués de chaînes de GAG moins nombreuses, plus petites, autour d'une chaîne protéique plus fine, et occupent ainsi un plus petit volume dans la matrice extracellulaire. Elles joueraient peu de rôle mécanique au niveau des fibrocartilages, si ce n'est par l'intermédiaire de leur propriété à fixer les fibres de collagène et ainsi maintenir le réseau collagénique. C'est la structure protéique de ces PG qui fixerait les fibres de collagène alors que la partie GAG interviendrait pour maintenir l'espace entre les fibres matricielles, intervenant de fait dans l'hydratation de la matrice. (Iozzo, 1998). La décorine est généralement stimulée et les biglycane inhibés par le TGF $\beta$  (Iozzo et al. 1997). On suspecte donc leur action de modulation de la biodisponibilité et de la stabilisation des cytokines dans

la matrice. Elles interviendraient en agissant sur les récepteurs aux cytokines et en modulant leur turnover dans la matrice (Iozzo, 1998).

La décorine est synthétisée par les cellules du fibrocartilage aussi bien dans le tendon que dans le disque intervertébral, et semble disparaître avec le vieillissement dans la partie centrale du ménisque du lapin, avec un tropisme plus important pour les tissus fibreux que fibrocartilagineux. En plus de son rôle bien connu dans la maturation, la fixation et l'organisation du collagène de type II dans la matrice, elle pourrait jouer un rôle dans l'angiogenèse, bloquant la calcification tissulaire et bloquant les proliférations tumorales par son action antagoniste sur les récepteurs à l'EGF (Keene 2000, Kavanagh 2001, Melrose 2001; Santra 2002).

Le biglycane est retrouvé dans de nombreux fibrocartilages tendineux, incluant les enveloppes tendineuses, les zones d'insertions du tendon d'Achille ou du supra-épineux de l'homme (Vogel 1993, Waggett 1998, Thomopoulos 2002)

### 1.3.2.3 Les protéines non collagéniques et les glycoprotéines

#### 1.3.2.3.1 La tenascine-C

La tenascine-C est une glycoprotéine extra matricielle volumineuse. Généralement son expression tissulaire se fait pendant le développement embryonnaire, mais peut aussi être exprimée dans le tissu adulte de manière physiologique ou pathologique. Son expression est notamment modulée dans l'enthèse sous l'action du stress mécanique (Jarvinen, 1999). Chez le rat sain, la tenascine est abondamment exprimée à la jonction tissu mou/os, mais si les genoux des animaux sont immobilisés 3 semaines, sa détection devient impossible. Elle réapparaît après un programme intensif de stimuli mécaniques. Martin (Martin, Biorh, 2003) a suggéré qu'elle interviendrait, par ses propriétés anti adhérentes, dans la résistance des tissus à la compression en détachant les cellules de leur matrice extracellulaires autorisant une micromobilité, des glissements évitant de léser les cellules. Sa présence est plus marquée dans les zones de compression que dans les zones de traction.

#### 1.3.2.3.2 L'élastine

L'élastine est très présente dans les tendons et le disque intervertébral

#### 1.3.2.3.3 Laminine

La laminine est une glycoprotéine matricielle associée au contrôle de l'adhésion cellulaire. Elle est détectée dans le disque intervertébral lors de son développement embryonnaire, dans le nucleus comme dans l'anulus (Hayes, 2001)

### 1.3.3 Le fibrocartilage calcifié

La calcification des fibrocartilages est un phénomène pathologique au niveau du genou ou du disque intervertébral, mais est un état physiologique au niveau des enthèses. Nous reviendrons sur sa description exacte lors de l'étude de l'enthèse, mais il nous est apparu nécessaire d'en parler dans cette partie décrivant les fibrocartilages. Typiquement, ce fibrocartilage calcifié est séparé du fibrocartilage non minéralisé par une tidemark. Dans une enthèse saine, le fibrocartilage est avasculaire, la tidemark est droite, et la jonction os-fibrocartilage hautement irrégulière pour augmenter la résistance mécanique au stress induit par les tendons. La plupart des connaissances actuelles sur la tidemark et le fibrocartilage calcifié sont basées sur les observations des phénomènes arthrosiques du cartilage hyalin. Un marquage aux tétracyclines a montré son rôle important dans le turnover de la minéralisation tissulaire. Les cellules restent bien vivantes et actives malgré leur capture dans le tissu minéralisé. (Havelka, 1995). L'épaisseur des zones calcifiées et non calcifiées varie en fonction des sollicitations mécaniques, de l'âge et du vieillissement pathologique (Gao, 1994)

## 1.4 Développement des fibrocartilages

A tous les endroits où les fibrocartilages sont présents, ils se développent de manière relativement tardive, et ils proviennent de la différenciation de cartilage hyalin immature ou de tissus connectifs denses (Benjamin, 2000 ; Benjamin, 2004). Il est intéressant de noter que chez l'adulte, des fibrocartilages peuvent se développer sous forme de métaplasie pathologique comme dans la spondylarthrite. Leur apparition se fait sous le contrôle du peptide relié à la parathormone (PTHrP), l'inducteur hedgehog (Ihh), la Bone Morphogenic Proteine 6, (BMP6) et les récepteurs PTHR (Nakase, 2002)

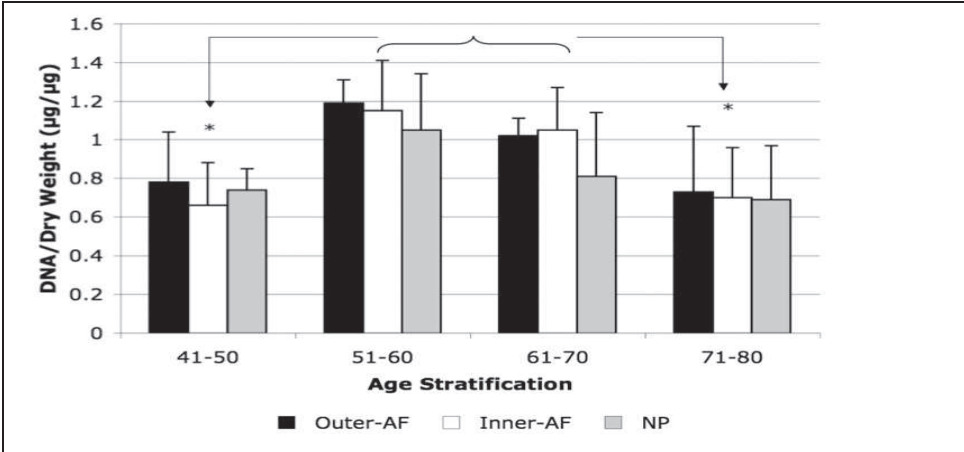
Le rôle fondamental des stimuli mécaniques a été bien montré à différentes localisations. Concernant le fibrocartilage de l'articulation temporo-mandibulaire, les premières cellules apparaissent chez le lapin à 2 semaines de la naissance mais la structure globale n'existe qu'à l'âge adulte, et l'apparition des forces de compression et de mastication est liée à l'augmentation de la production d'agrécan, signant l'importance des forces de compressions

pour la maturation matricielle (Mao, 1998). Les forces de traction et de compression augmentent, lors du développement des tendons et avant l'apparition des fibrocartilages, la production d'agrécan et de biglycane. Cette production serait induite par la sécrétion de TGF $\beta$  qui agit sur la production de protéoglycanes et le phénotypage des fibrocartilages (Robbins, 1997). Le stimulus mécanique est important mais pas indispensable. Ainsi, Benjamin a montré qu'en l'absence de stimulus mécanique, le ménisque se développait quand même chez le lapin en cas d'immobilisation du genou embryonnaire (Benjamin, 2000).

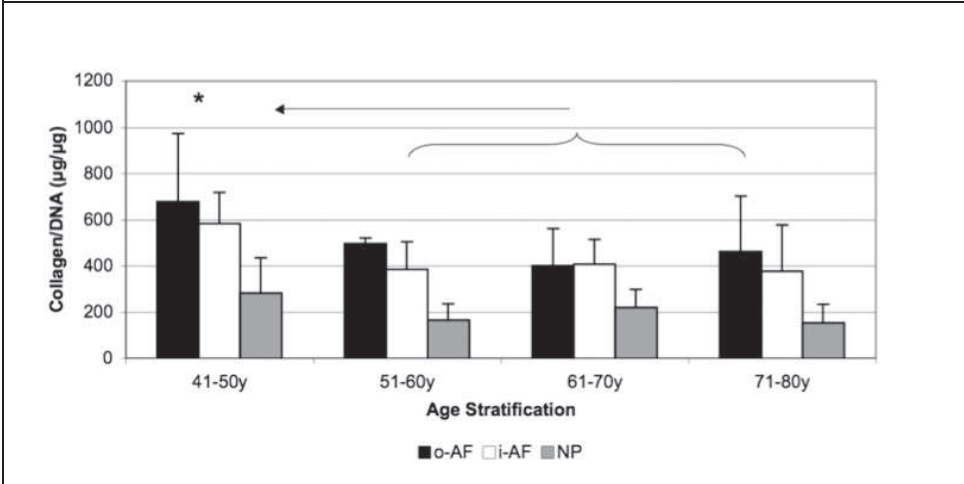
### **1.5 Vieillessement des fibrocartilages**

Aucune étude n'a regroupé les caractères communs au vieillissement des fibrocartilages. Les deux fibrocartilages, dont le vieillissement a un retentissement majeur, sont le disque intervertébral et le ménisque. Chacun a fait l'objet de nombreuses études sur le vieillissement. Vo (Vo, 2010) a étudié les changements du disque intervertébral chez les souris progériques. La sénescence est marquée par une diminution de la hauteur du disque intervertébral avec une désorganisation matricielle comparable à celle d'animaux âgés. Il a été noté dans le modèle progérique une diminution précoce des protéoglycanes contenus dans la matrice extracellulaire, couplée à une diminution de l'hydratation, une diminution de la synthèse des PG, une accélération de la sénescence et une mort cellulaire. Ces données sont bien connues et chez l'homme les modifications de la composition matricielle ont été évaluées. Singh (Singh, 2009) a étudié la composition matricielle de disques intervertébraux par tranche d'âge. Il montre bien que les collagènes et les protéoglycanes sont modulés par l'âge. Si il semble y avoir une diminution globale de l'activité cellulaire avec l'âge et une diminution de leur concentration, il note que plusieurs petits PG s'accumulent dans la matrice, sans diminution. Et même, la production de la fibromoduline et les biglycanes est stimulée par le vieillissement.

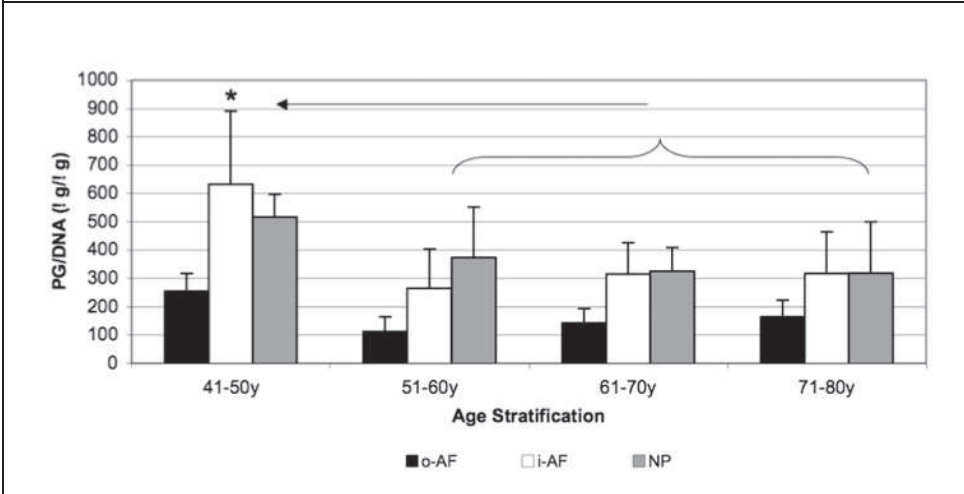




**Figure 11 :** Modification en fonction de l'âge du contenu en ADN dans les disques inter-vertébraux humain.



**Figure 12:** Modification en fonction de l'âge du contenu en Collagène dans les disques inter-vertébraux humain.



**Figure 13:** Modification en fonction de l'âge du contenu en Protéoglycanes dans les disques inter-vertébraux humain.  
 oAF : Anulus fibrosus partie externe, iAF : Anulus Fibrosus partie interne, NP : Nucleus Pulposus. Singh (2009)

## 2 L'ENTHESE

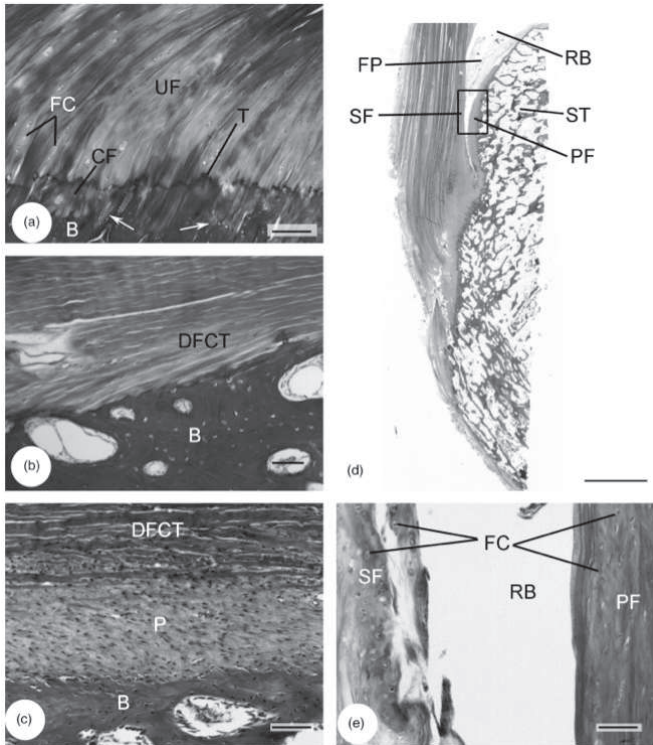
### 2.1 Définition des enthèses

Les enthèses sont des fibrocartilages qui viennent fixer le tendon sur l'os et jouent le rôle de plaque de jonction pour transmettre les mouvements à l'articulation, en adaptant la tension et les forces imposées par le tendon sur l'os, quelque soit sa position dans l'espace. Ce sont de véritables organes complexes, caractérisés par des propriétés mécaniques, histologiques, et physiopathologiques communes. Les enthèses sont présentes dans de nombreuses localisations dans l'organisme à la zone d'insertion de tendons sur les os.



**Figure 14: Répartition des enthèses dans l'organisme : localisation extrêmement diffuse, au zone d'insertion des tendons dans des zones de forte sollicitation biomécanique.**

## 2.2 Histologie



**Figure 15 : Différents modes de fixation du tendon sur l'os.**

Structure histologique de l'enthèse et du concept d'enthèse organe. (a) enthèse d'un tendon d'Achille humain. Les fibrocartilages calcifiés (CF) et non calcifiés (UF) sont facilement visibles, et constitués de larges cellules arrondies (FC). La tidemark (T) sépare la partie molle de la partie dure de l'organe, et marque une franche différence avant la partie calcifiée fixée à l'os (B). La jonction entre ces derniers se fait par une zone irrégulière appelée zone d'attache (flèches). Barre=100µm. (b) est un exemple d'enthèse purement fibreuse, comme au carré pronateur de l'avant-bras humain. Le tissu connectif fibreux dense (DFCT) attache le tendon à l'os avec un angle très oblique, sans périoste ou fibrocartilage présent. (barre : 200µm). (c) attachement périosté d'un ligament équin. La fixation se fait par l'intermédiaire d'un gros périoste (P) (barre : 100µm). (d) : l'organe enthèse du tendon d'Achille de l'homme. Il contient l'enthèse elle-même €, le sésamoïde (SF) et le fibrocartilage périosté (PF), la bourse rétro calcanéenne (RB) et le coussinet graisseux (FP). On observe clairement l'absence d'os compact et dense à la zone de fixation, (ST°= tubérosité supérieure). Barre= 3 mm. (e) : zone de glissement de l'enthèse organe, avec identification de cellules arrondies fibrocartilagineuses (CF)

L'étude descriptive pure de l'enthèse a longtemps été proposée. Mais sa meilleure connaissance nous pousse à la décrire en différentes zones, correspondant chacune à une fonction spécifique.

La zone de contact avec le tendon

Le fibrocartilage non calcifié

La tidemark

Le fibrocartilage calcifié

L'os spongieux sous-fibrocartilagineux

### 2.2.1 Relation structure fonction

La structure macroscopique des enthèses fibrocartilagineuses (Shaw, 2007)

Dolgo-Saburoff (Dolgo-Saburoff, 1929) a, le premier, décrit une structure en quatre couches qui correspondent à la zone d'insertion du tendon patellaire chez le chat. Il a retrouvé une première couche correspondant au ligament lui-même, puis un fibrocartilage non calcifié, un fibrocartilage calcifié et enfin l'os. Cette description en quatre couches est la pierre d'angle de la description des enthèses fibrocartilagineuses. Dans les suites de la description initiale, Cooper a montré qu'il existait une caractéristique très différente de chaque zone et que chaque zone avait une interaction sur les autres (Cooper, 1970).

#### 2.2.1.1 Le tendon

Dans sa partie la plus centrale, le tendon ou le ligament est classiquement constitué de fibres de collagène parallèles entre elles avec de nombreux fibroblastes dans leur périphérie. A l'approche de la zone de fibrocartilage non calcifiée, l'organisation des fibres devient moins évidente avec notamment, une majoration du contenu en PG et en matrice extracellulaire, les fibroblastes étant remplacés progressivement par des cellules fibrocartilagineuses. Ces cellules sont notamment beaucoup plus arrondies et elles se mettent en groupe, entourées par une production de matrice extracellulaire. Encore une fois, elles sont organisées en colonnes ce qui semble marquer leur origine fibroblastique lors du développement.

#### 2.2.1.2 Le fibrocartilage non calcifié et calcifié

Le rôle principal du fibrocartilage non calcifié est de produire un transfert atténué des charges à travers l'interface du tissu mou. Il autorise la traction graduelle des fibres de collagène lorsqu'elles arrivent sur l'os. Cette théorie du contrôle des tensions est en fait fondée sur des observations histologiques. Il existe une corrélation très nette entre l'épaisseur du fibrocartilage non calcifié et l'angle d'attaque, de fixation des tendons par rapport à l'os. Plus il existe un angle d'attaque important plus ce fibrocartilage non calcifié existe (Evans, 1990, Benjamin, 1991 et Boszczyk, 2003). Par ailleurs, Knese et Biermann (Knese, 1958) ont

montré que, très probablement, ce fibrocartilage avait un rôle de frein à l'élongation. En effet, ils supposent que ce cartilage interviendrait comme rétrocontrôle sur l'élongation des muscles. Lorsqu'il existe une trop grosse tension sur le muscle avec un rétrécissement du tendon du fait de l'élongation, ce fibrocartilage interviendrait pour stopper le mécanisme prédisposant à la lésion tendineuse par élongation. On peut considérer que ce fibrocartilage intervient essentiellement comme grand organisateur de l'orientation des fibres du tendon à son arrivée sur l'os et comme un régulateur de force lors des phénomènes de compression et de traction.

### 2.2.1.3 Tidemark

Les fibrocartilages calcifiés et non calcifié sont séparés par un front de calcification. Celui-ci est classiquement appelé la Tidemark. Cette tidemark, chez les patients très âgés, peut parfois être dédoublée (Benjamin, 1998).

D'un point de vue purement histologique, les fibres de collagène du fibrocartilage calcifié et du fibrocartilage non calcifié sont continues à travers cette tidemark.

Si on fait un parallèle avec le cartilage articulaire, on peut supposer que celui-ci a un rôle d'attachement des fibres de collagène qui lui sont perpendiculaires mais aussi pourrait éviter la pénétration des vaisseaux sanguins à travers le fibrocartilage non calcifié. Tout comme le cartilage, il est actuellement supposé que c'est la zone de fragilité de l'enthèse et qu'en cas d'arrachement de l'enthèse c'est à ce niveau que la rupture se fait.

L'aspect microscopique est extrêmement variable, ces variations pouvant se faire d'une part en fonction de l'âge mais aussi en fonction de la charge de traction appliquée sur l'enthèse. Il existe une adaptation de la tidemark aux contraintes mécaniques.

Lyons (Lyons, 2005) suppose que cette tidemark interviendrait aussi pour bloquer la migration des cristaux d'hydroxyapatite évitant ainsi la calcification de la zone non calcifiée lors de la maturation de l'appareil musculosquelettique. Si la répercussion de cette frontière sur les données biomécaniques de l'enthèse commence à être connue par les travaux de Moffat que nous rapportons plus bas, cette absence de minéralisation a un impact très important sur les propriétés biomécaniques du cartilage hyalin (Moffat, 2008).

#### 2.2.1.4 La plaque osseuse sous-chondrale

Contrairement à l'os se situant de part et d'autre de l'enthèse, la zone osseuse située juste en-dessous de l'enthèse est caractérisée par une structure irrégulière en relief ayant souvent un aspect de vagues ce qui permet d'augmenter la zone de contact entre le tendon et l'os résultant ainsi un ancrage important qui va résister à la force de traction.

Les forces extrêmement importantes qui sont exercées sur ces petites zones anatomiques nécessitent un ancrage très important que permet cette modification anatomique de l'os sous-chondral. La jonction entre le fibrocartilage calcifié et l'irrégularité relative de l'os en fait une zone parfois appelée zone de ciment car on pense qu'elle joue un rôle extrêmement important dans la fixation du tendon.

Une des explications finalistes de cette particularité serait qu'il existe une force de cisaillement extrêmement importante lors de la traction du ligament dont le vecteur est modifié au cours du mouvement, et afin de pouvoir avoir dans toutes les positions, un angle optimum de traction, cette modification anatomique permettrait d'autoriser un ancrage toujours adapté quelle que soit la position du tendon.

A l'heure actuelle, on ne sait pas si les fibres de collagène présentes au niveau de l'enthèse calcifiée sont en continuité ou pas avec l'os. Si dans les enthèses fibreuses, la fixation se fait par l'intermédiaire de fibres de Charpey, il n'est pas sûr que dans les enthèses de fibrocartilage, cette fixation se fasse de la même façon. En effet Benjamin (Benjamin, 2007) a bien montré que dans de nombreuses enthèses, l'os qui était situé sous le fibrocartilage n'était pas de l'os cortical mais bien de l'os spongieux qui ne reçoit pas des fibres de Charpey. Une des raisons de l'absence d'os cortical sous l'enthèse pourrait être que seul un os spongieux va permettre de dissiper le stress transmis de l'enthèse et permettre une déformation de l'os sous-chondral qui va se déformer sous l'action de la traction dissipant ainsi les forces de cisaillement. Ainsi l'os sous-chondral a un rôle majeur, en plus du fibrocartilage, dans le transfert et l'atténuation des forces. Par ailleurs, dans le même article Benjamin suppose que la présence d'un os sous-chondral non cortical permettrait de vasculariser l'enthèse.

Cette communication directe avec l'os et sa vascularisation permettrait probablement, comme c'est le cas au niveau du cartilage, une résorption osseuse et ainsi d'autoriser la dégradation des protéoglycanes du cartilage. Les metalloprotéases, dans leur activité ostéoclastique, participerait à cette activité.

Moffat (Moffat, 2008) a montré dans une étude sur les enthèses du ligament croisé antérieur bovin, que les résistances à la compression, étaient croissantes de la zone de fibrocartilage déminéralisé à celle du fibrocartilage minéralisé pour trouver son maximum de résistance à l'os. Indépendamment de la force de compression, c'est toujours le fibrocartilage déminéralisé qui subit la plus grande déformation.

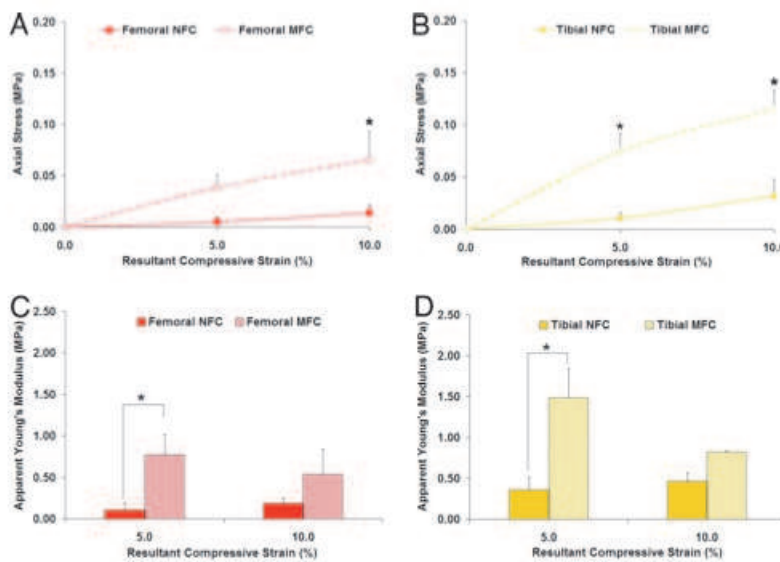


Figure 16 Différences de propriétés mécaniques en fonction du type de fibrocartilage de la zone d'insertion. Equilibre de stress axial (A,B) et module de Young (C,D) des fibrocartilages déminéralisés (NFC) et minéralisés (MFC) à 5 et 10% de compression. Le fibrocartilage minéralisé a une plus grande résistance à la compression, et un plus grand module de Young calculé. (Moffat, 2008)

Les auteurs ont corrélé ses propriétés aux données histologiques rapportées dans le paragraphe sur les propriétés histologiques minérales de l'enthèse. Ils ont ainsi pu montrer une relation étroite entre les couches de l'enthèse et certaines de leurs propriétés mécaniques. Si cette étude est intéressante car elle permet de mieux connaître la relation structure-fonction, il est important de noter que l'enthèse travaille beaucoup plus en traction qu'en compression et que d'autres études seraient nécessaires pour mieux connaître la fonction de chaque partie de l'enthèse.

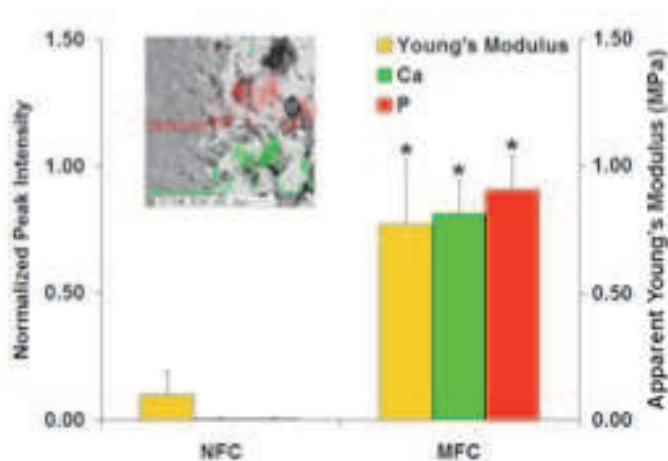
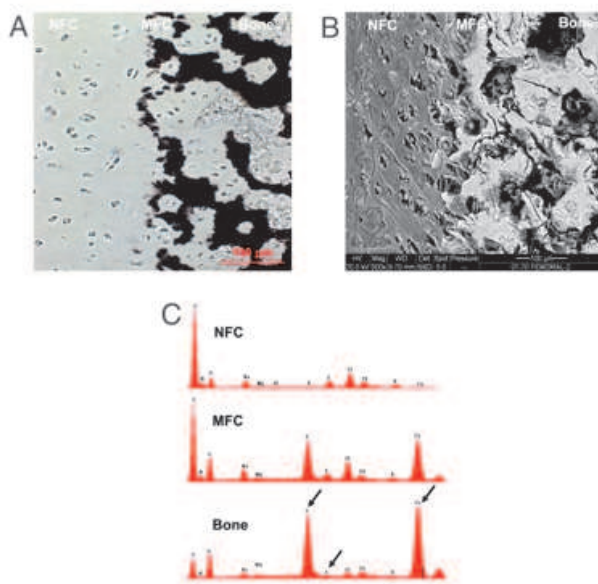


Figure 17: Relation structure-fonction au niveau de l'enthèse de LCA bovin. En progressant du FNM à l'os, il existe de manière nette et claire une augmentation du contenu en minéraux (Ca et P) qui correspond à une augmentation claire et nette du module de Young. (\*,  $p < 0,05$ ) (Moffat, 2008)

## 2.2.2 Composition en minéraux

Moffat a étudié de manière spécifique la répartition des minéraux au sein d'enthèses bovines de ligaments croisés antérieurs (Moffat, PNAS, 2008). En couplant les données histologiques en coloration von Kossa aux informations apportées par un microscope électronique à balayage, il a pu identifier de manière précise la composition en minéraux de ces enthèses.



**Figure 18 : Présence minérale et localisation à l'insertion du LCA bovin. (A) : coloration von kossa (x20) barre : 100 ym. (B) : image au MEB retro éclairé (X500) (barre : 100ym) on observe que les minéraux ne sont détectés que dans le fibrocartilage minéralisé (MFC) et l'os (B). Par spectre EDAX on détecte la présence de calcium et de phosphore en pics (flèche) uniquement dans le MFC et le B. (Moffat, 2008)**

Ils ont pu identifier la présence de calcium et de phosphore dans le fibrocartilage non minéralisé (FNM) et l'os. Le fibrocartilage minéralisé (FM) est une zone plutôt fine composée d'une matrice dense minéralisée, alors que l'os est plutôt composé d'une matrice poreuse minéralisée. La jonction entre FM et FNM est caractérisée par des digitations de matrice minéralisée entourant des chondrocytes hypertrophiques. L'EDAX (energy dispersive x-ray analysis) a mis en évidence des pics d'absorption pour le calcium et le phosphore uniquement dans les zones minéralisées. Comme on peut le suspecter, les pics de Ca et P se trouvent dans le tissu osseux puis diminuent jusqu'à la tidemark. Des sulfures (S), composants essentiels des PG, sont retrouvés dans l'ensemble des tissus. La plus grande présence est identifiée dans le FNM puis le taux diminue jusqu'à l'os.



## 2.3 Développement de l'enthèse

### 2.3.1 Prénatal

Le développement des différents types d'enthèses, fibreuse ou fibrocartilagineuse, a été synthétisé par Benjamin dans un article fondateur en 2000 (Benjamin, 2000). Le développement initial de l'enthèse dépend essentiellement de sa position par rapport aux segments osseux. Ainsi, dans la partie proximale des extrémités, le *primordia* des tendons forme une seule unité qui va par la suite se diviser en différents tendons. Ce *primordia* peut s'attacher directement sur le squelette dès son apparition (Kardon, 1998). Le développement de l'enthèse va alors se faire parallèlement à celui de son tendon et de son os.

A l'opposé, lorsque le *primordia* du tendon se trouve au niveau des extrémités, il n'est pas forcément fixé initialement sur le squelette et le développement de l'enthèse se fait à partir de l'os au niveau de son périoste ou de son péri-chondrium.

Ainsi dans cette région, l'enthèse et les tendons vont se réunir pour fusionner au contact de l'os.

Ce stade est extrêmement précoce au niveau du développement. La plupart des enthèses ressemblent à la cession d'un mélange entre le blastème des tendons et le péri-chondrium périostium, périoste des os.

Par la suite, en fonction des différents stimuli, ces enthèses vont se transformer. Cette dépendance va se faire en fait sous l'influence du type d'os sur lequel sont attachés le tendon ou ligament et leur topographie de fixation sur l'os.

Ainsi il existe une différence très nette en fonction du type de développement osseux. L'os peut se développer de façon directe (ossification de membrane comme les os membranaires tel que le crâne) ou bien l'os peut se développer à partir d'un cartilage, c'est ce que l'on appelle l'ossification endochondrale qui caractérise les os des membres.

Il existe une différence entre les enthèses suivant qu'elles viennent se fixer au niveau des épiphyses des os ou qu'elles viennent se fixer sur leur métaphyse et leur diaphyse. Les tendons et les ligaments qui sont fixés sur les os du carpe ou les os du pied et sur les épiphyses des os longs vont s'attacher par une zone de fibrocartilage alors que les autres enthèses restent fibreuses.

## 2.3.2 Post-natal

### 2.3.2.1 Facteurs biologiques

Aux stades les plus précoces, les tendons et les ligaments vont venir se fixer sur l'os par l'intermédiaire du péri-chondrium parfois à l'aide de fibres qui vont traverser ce cartilage hyalin. Lors de l'ossification enchondrale, durant la croissance, la plupart des cartilages sont détruits par le remodelage osseux. Au niveau des enthèses fibrocartilagineuses, on considère que cette zone de cartilage hyalin appelée plaque de croissance est laissée en place et va avec le temps se transformer en fibrocartilage définitif (Ralphs, 1991 et Rufai, 1992).

Après la naissance, la résorption du cartilage couplée au remodelage osseux vont venir former l'enthèse avec une zone de fibrocartilage qui va se développer par métaplasie des cellules ligamentaires. Alors que le développement continue, le cartilage initial est totalement résorbé et remplacé par de l'os qui va venir envahir les fibres du cartilage formées au contact du tendon et ainsi venir réaliser histologiquement l'enthèse (Gao, 1996).

Ainsi comme le supposaient les premiers auteurs décrivant l'enthèse (Knese, 1958), l'enthèse fibrocartilagineuse est en fait une plaque de croissance des épiphyses au niveau de la zone d'attache des tendons et des ligaments. De la même manière qu'une plaque de croissance classique, son évolution va se faire par remaniement matriciel, par prolifération cellulaire, sous l'influence de différents facteurs au cours de la croissance.

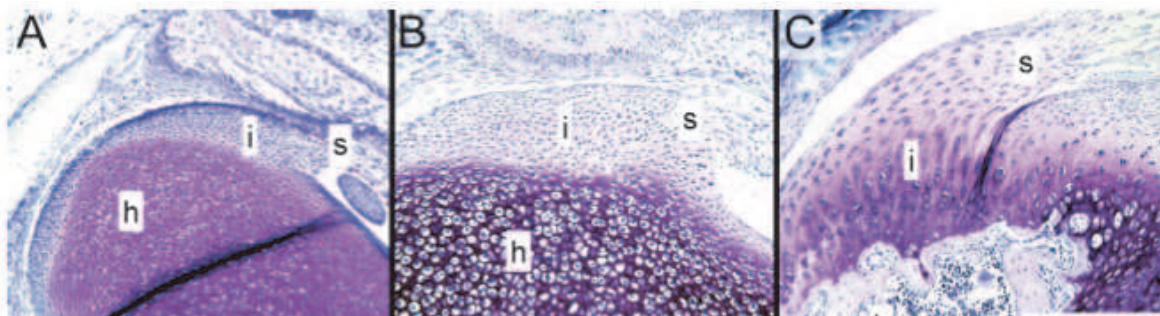
Ce développement et cette transformation vers une enthèse adulte sont le fait de différents facteurs dont un des éléments fondamentaux est le stress mécanique.

Il a été montré de manière très claire qu'au niveau du ligament collatéral médial du genou humain, dans sa zone d'insertion fémorale, la transformation du cartilage hyalin initial, ou de la plaque de croissance, en fibrocartilage, correspond au moment même où le stress mécanique est appliqué sur ce ligament (Gao, 1996 et Tipton, 1978).

Le développement métaplasique du fibrocartilage de l'enthèse explique pourquoi les cellules sont alignées en rangée. Les fibroblastes des ligaments ou des tendons d'où sont dérivées ces structures, sont initialement alignées comme à l'intérieur des tendons. On pense d'ailleurs que les constatations observées chez des animaux adultes où le collagène de type II se développe à l'intérieur du tendon est un signe que cette enthèse continue à se développer avec le temps (Gao, 1993 et Benjamin 1991).

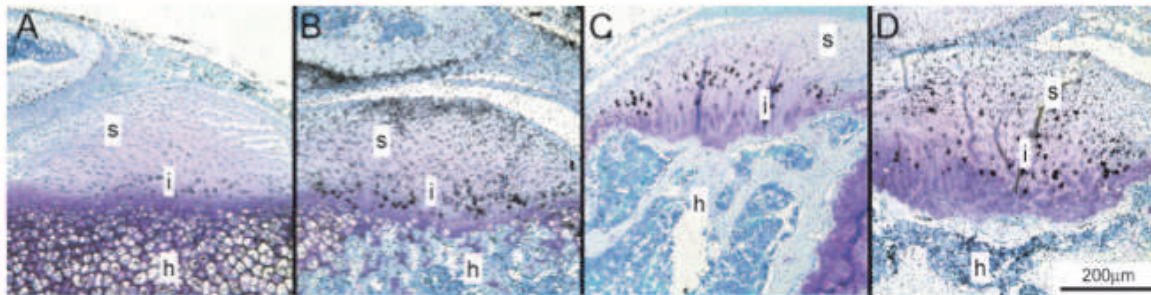
Galatz (Galatz, 2007) a montré la chronologie de formation de l'enthèse fibrocartilagineuse. Elle a étudié, par hybridation *in situ*, l'expression des gènes de la matrice extracellulaire et de facteurs de croissance, lors du développement d'une enthèse de supra-épineux de rat, depuis la période où la zone de jonction est identifiable en histologie (13,5 jours post-conception) jusqu'à l'âge adulte : 56 jours.

Chez le rat, l'enthèse fibrocartilagineuse n'est aperçue qu'à partir du 13,5 jours post conception. Les cellules situées en périphérie de la tête humérale expriment le collagène I, les cellules situées dans la tête humérale expriment le collagène de type II. Puis, à 15,5 jours, un amas de cellules, exprimant du collagène de type I se condense à la surface de la tête humérale pour former les prémices du tendon du supra-épineux. Jusqu'au 3<sup>ième</sup> jour post-naissance, les cellules tendineuses s'allongent et s'orientent dans l'axe du tendon. Pendant toute cette période, les expressions collagéniques restent localisées de part et d'autre de la future enthèse.



**Figure 19 : Croissance de l'enthèse peri-natale. le fibrocartilage de transition (i) n'est aperçu entre la tête humérale (h) et le tendon du supra-épineux (s) qu'à partir de la période post-natale (coloration bleu toluène), (A :15,5 j post conception, , B néonatale, c : 21 jours ( rat) (Galatz, 2007)**

A partir du 7<sup>ième</sup> jour, une zone de transition se forme entre l'os et le tendon, (figure 20). Cette zone de transition est constituée de 2 à 4 couches de fibrochondrocytes exprimant conjointement les 2 types de collagène. A ce stade, les chondrocytes du côté huméral sont d'aspect hypertrophique et expriment du collagène de type II. C'est à partir de 14 jours que ces chondrocytes hypertrophiques vont exprimer du collagène de type X (Figure 20). A partir de cet instant, les chondrocytes entourant l'os disparaissent et restent concentrés à la zone de jonction. Une zone de transition en quatre couches apparaît de manière très nette à partir des 21\_28 jours.



**Figure 20 : Expression du collagène de type X lors de développement : à 7 (A) 14(B),28 (C) et 56 jours (D) (toluidine bleu). Ce n'est qu'à partir de 14 jours post naissance que le collagène de type X est bien visible. Son expression est notée dans la zone minéralisée du fibrocartilage (coloration positive indiquée par les grains noirs) (h : tête humérale, i : zone d'insertion, s : supraspinatus) (Galatz, 2007)**

C'est à partir de ce stade que l'on arrive à bien identifier les caractéristiques de chaque couche de la zone de transition. Les fibroblastes, dans le tendon, expriment le collagène de type I, les fibrochondrocytes en zone 2 expriment du collagène II et du I, les chondrocytes hypertrophiques en zone 3 expriment du collagène de type II et X, et l'os mature est bien identifié en zone 4. A 56 jours, c'est une enthèse d'aspect classique qui est observée. A ce stade la répartition collagénique est identique, mais se fait en l'absence de chondrocytes hypertrophiques dans la zone 3.

Les auteurs ont étudié l'expression de TGFβ1 et TGFβ3 qui ne sont détectés qu'au stade embryonnaire. Il y a une inversion de l'expression de ces facteurs autour de 15,5 jpc (jours post conception) avec une expression plus précoce de TGFβ3 à 13,5 et 15,5 jpc, quand TGFβ1 est exprimé à 15,5 jpc et 18,5 jpc.

Timepoint	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Zone 4
13.5 dpc	Col I, TGF-β3	"	"	Col II
15.5 dpc	Col I, TGF-β1,3	"	"	Col II
18.5 dpc	Col I, TGF-β1	"	"	Col II
Neonatal	Col I	"	"	Col II
3 day	Col I	"	"	Col II
7 day	Col I	Col I, II	Col II	Col II
14 day	Col I	Col I, II	Col II, X	Col II
21 day	Col I	Col I, II	Col II, X	Bone
28 day	Col I	Col I	Col II, X	Bone
56 day	Col I	Col I	Col II, X	Bone

**Figure 21 : Expression des facteurs de croissances au cours du développement : Zone 1 : tendon, Zone 2 : fibrocartilage, Zone 3 : fibrocartilage minéralisé, Zone 4 : os. Col I : Collagène de type I, Col II : collagène de type II, Col X : Collagène de type X, a : zone non vue à ce stade (Galatz, 2007)**

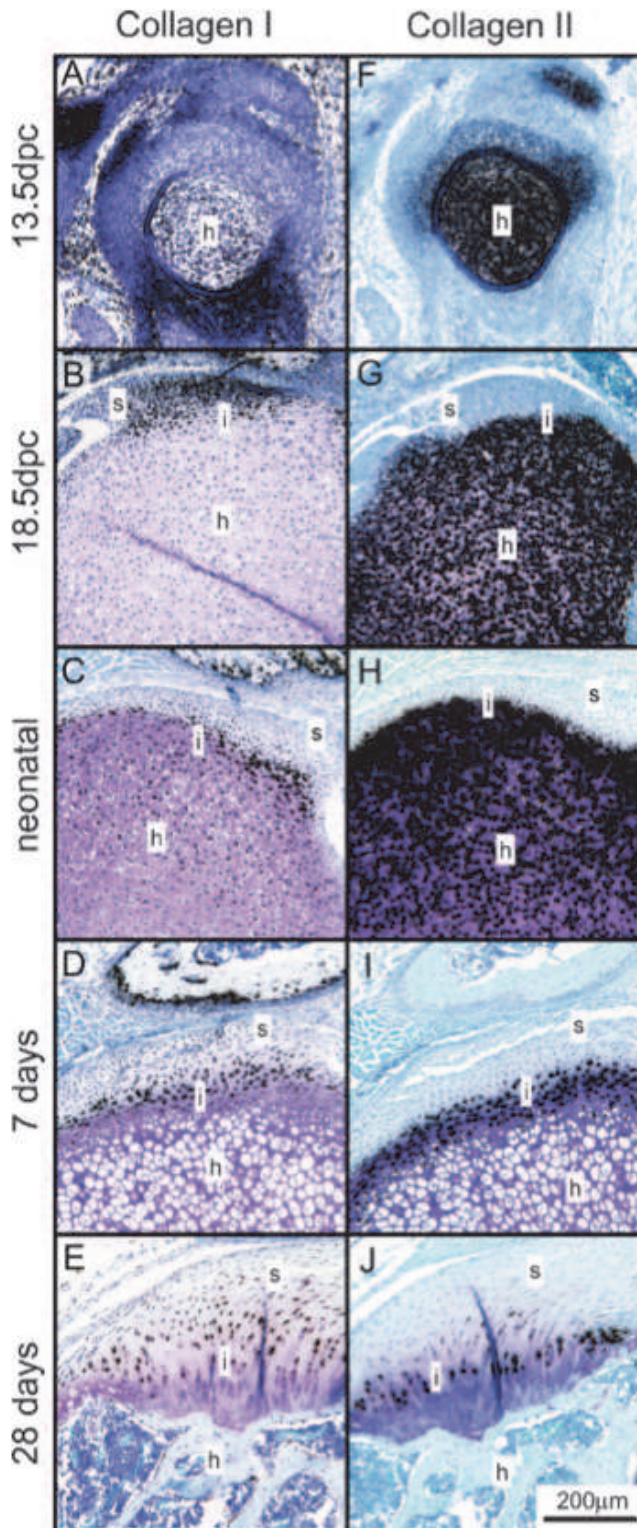


Figure 22 : Expression des collagènes de type I et II au cours du développement. Sélection de coupes histologiques avec coloration des collagènes de type I (A-E) et type II (F-J) à 13,5 j, 18,5J après conception, période néonatale, puis à 7 et 28 jours. Coloration toluène Bleu. La coloration en Collagène de type I s'oppose à celle de type II de part et d'autre de la zone d'enthèse (supra-épineux de rat). Le Collagène de type I est toujours du côté du tendon, le type II du côté osseux de l'insertion.

La coloration positive est indiquée par les grains noirs. S : supra-épineux, h : tête humérale, i : zone d'insertion. (Galatz, 2007).

Avant de décrire les facteurs influençant le développement des enthèses fibrocartilagineuses, nous avons voulu rapporter les différences qui existent avec le développement des enthèses fibreuses. D'un point de vue du développement, l'enthèse fibreuse va se développer à partir de la zone de fixation des tendons ou des ligaments sur le périoste ou le péri-chondrium mais sans qu'il y ait un passage par un stade de cartilage hyalin. Il est possible que simplement l'os se résorbe sous le périoste et vienne fixer et attraper le tendon. Cette fixation est plus faible et cela a des traductions cliniques. Ainsi, quand on se reporte au ligament collatéral médial du genou humain, ses arrachements sont dans la grande majorité des cas des arrachements distaux, là où la fixation se fait par une enthèse fibreuse alors qu'en proximal, où les arrachements sont rarissimes, la fixation se fait par l'intermédiaire d'un fibrocartilage (Woo, 1988).

Alors que les enthèses fibrocartilagineuses restent, au cours du développement, localisées aux épiphyses des os, les enthèses fibreuses peuvent évoluer et se déplacer parallèlement à la croissance des diaphyses osseuses (Videman, 1970). Ainsi, le développement de ces enthèses va suivre le développement de l'os et s'adapter à sa taille.

Il est intéressant de noter que si la plupart des tendons et des os apparaissent à des stades relativement précoces du développement fœtal, la formation du tissu transitionnel que représente l'enthèse se fait essentiellement en période post-natale. Plusieurs facteurs sont indispensables pour la formation de cette zone d'insertion des tendons sur l'os (Thomopoulos, 2010). Le développement de l'enthèse va coupler et impliquer les gènes et les facteurs impliqués dans la chondrogenèse, dans la tendinogénèse, et bien sur l'ensemble des stimuli associant la croissance osseuse, tendineuse et musculaire.

Scléroxis est un facteur de transcription associé avec la tendinogénèse et le développement tendineux. Le gène scléroxis est exprimé dans tous les progéniteurs et, dans les cellules des tissus tendineux.

Sox-9 est nécessaire à la chondrogénèse exprimé dans les chondrocytes prolifératifs et est responsable notamment de la différenciation chondrocytaire.

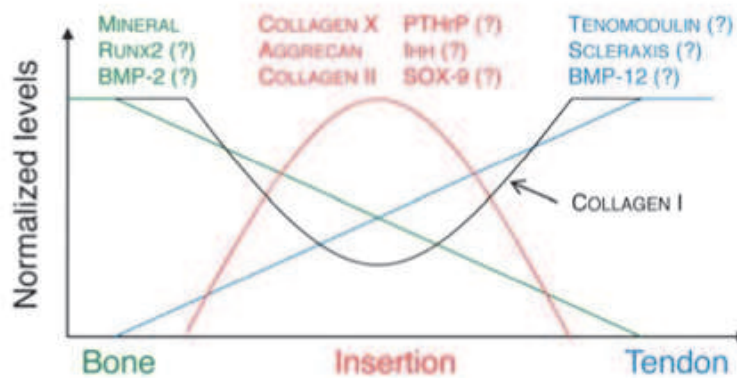
Indian Hedgehog (Ihh) et le Peptide Relié à la parathormone (PTH rP) sont indispensables à l'organisation et à la prolifération des chondrocytes ainsi qu'à leur différenciation. C'est un élément indispensable au développement de la plaque de croissance et nous l'avons vu, on

peut considérer que l'enthèse fibro-cartilagineuse est, à un certain stade, l'équivalent d'une plaque de croissance.

Concernant le stress mécanique, il a été montré que chez l'animal, le fait de retirer tout stress mécanique va aboutir à une détérioration des caractéristiques biomécaniques du tendon mais aussi à une désorganisation de sa composition chimique et de son organisation tridimensionnelle. Si ces notions sont bien développées chez l'adulte, ces notions sont un petit peu plus flous dans le cas du développement.

Cette véritable plaque de croissance que représente le fibrocartilage est certainement sensible à tous les stimuli de la croissance cartilagineuse. C'est pourquoi, on pense que la PTHrP est un élément fondamental dans le développement de l'enthèse fibro-cartilagineuse. Son action a notamment été mise en évidence par différentes études animales avec une modulation de sa sécrétion en cas de mise en décharge du tendon de la queue du rat (Chen, 2006).

Ihh et PTHrP sont connus pour être des marqueurs très fréquents de la différenciation chondrocytaire. Ainsi, les chondrocytes prolifératifs ou préhypertrophiques secrètent de l'Ihh lorsqu'elles deviennent hypertrophiques dans les périodes de croissance.



**Figure 23 : Différents facteurs influençant le développement de l'enthèse. La concentration de ces différents facteurs intervient dans la différenciation cellulaire et dans la formation des tissus. Les différentes concentrations en minéraux de l'enthèse native (trait vert), sont probablement liées dans l'enthèse mature à l'activité ostéoclastique, sous l'influence de facteurs tels que Runx2 et la BMP2. Le contenu en fibrocartilage (trait rouge) est probablement sous l'influence de PTHrP, IHH, Sox9. Le développement des facteurs tendineux doit se trouver sous l'influence des facteurs de la tendinogénèse tels que Scleraxis, BMP12 et la tenomoduline. (Thomopoulos, 2010)**

### 2.3.2.2 Facteurs biomécaniques

Une étude très intéressante réalisée par Thomopoulos (Thomopoulos, 2007) a montré l'influence du stress mécanique sur le développement de l'enthèse. Le fait de paralyser avec de la toxine botulique chez des rats, les muscles supraspinatus aboutit à une diminution de 66 % du volume du muscle. Cette diminution du volume du muscle va être couplée bien sûr à une diminution de la force de ce muscle et cela va avoir pour conséquence une diminution extrêmement importante de la minéralisation de la tête humérale liée à une augmentation de la résorption osseuse. Parallèlement à cette résorption, il va être mis en évidence une diminution de la formation du fibrocartilage dès le 14<sup>ème</sup> jour post-naissance.

Ainsi en cas de paralysie majeure, il n'y a pas de fibrocartilage qui se développe entre l'os et le tendon mais une structure désorganisée d'aspect mésenchymateux avec quelques chondrocytes hypertrophiques. Dans cette étude, l'effet obtenu par la paralysie obstétricale à la toxine botulique des muscles de la coiffe des rotateurs était transitoire. Ainsi à distance de cette disparition du stress mécanique, on observe, dans la période post-natale, un développement de l'enthèse mais de qualité bien moins satisfaisante que lorsque les stimuli mécaniques sont respectés en période fœtale.

Cette désorganisation liée à une diminution du stress mécanique lors du stade du développement se traduit parallèlement par une désorganisation des fibres de collagène au niveau de la zone d'insertion. Cette désorganisation se traduit notamment par un déficit de résistance à l'arrachement et des propriétés mécaniques inférieures (Thomopoulos, 2007).



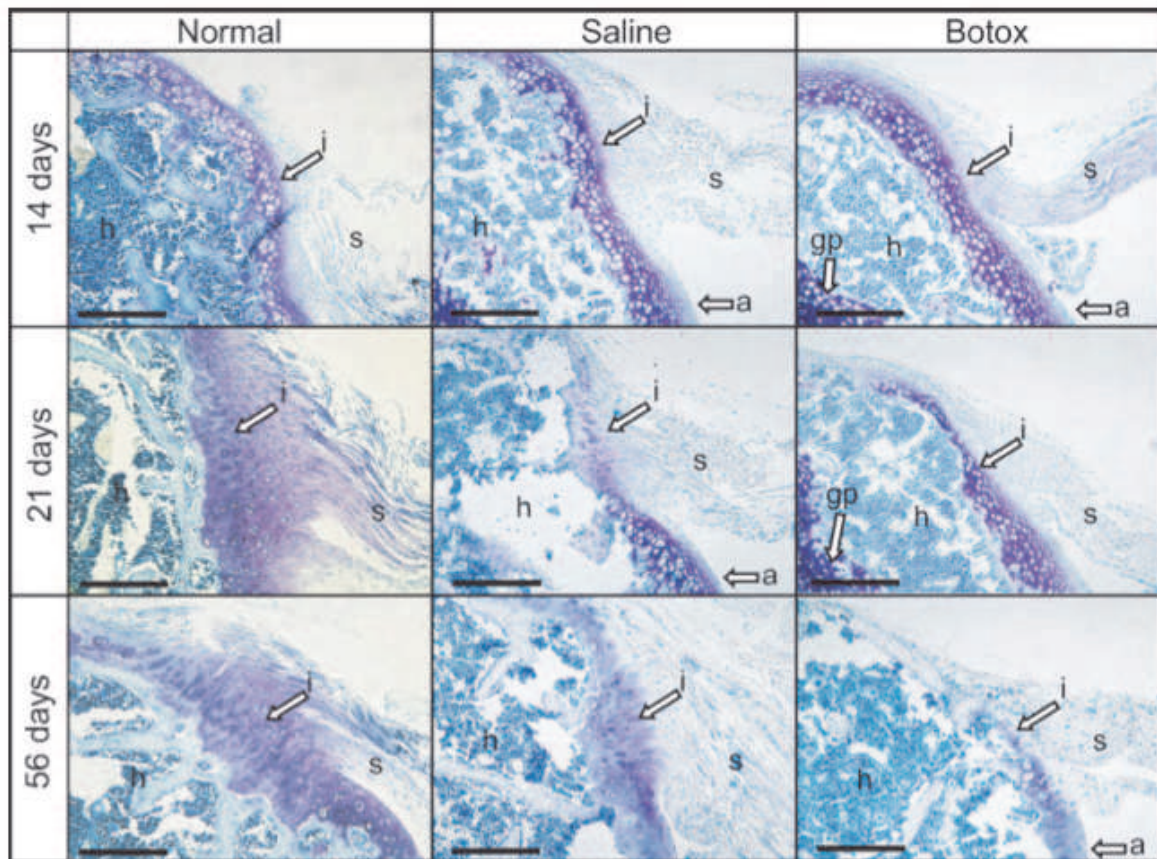


Figure 24: Influence des stimuli mécaniques sur le développement de l'enthèse : Le développement du fibrocartilage est diminué de manière très importante dans le groupe ayant eu une injection de toxine botulique, comparativement au groupe ayant bénéficié d'une injection de sérum physiologique intra musculaire. I : enthèse, s : supra-épineux, a : surface articulaire, h tête humérale, gp : plaque de croissance, échelle : une barre : 200ym. (Thomopoulos, 2007)

## 2.4 Vieillesse de l'enthèse

Peu d'études se sont intéressées au vieillissement naturel de l'enthèse. La première réalisée par Benjamin en 1991 était descriptive (Benjamin, 1991). L'auteur a observé des pièces humaines et mis en évidence la modification des fibrocartilages sur la zone d'insertion du tendon d'Achille. La seconde étude beaucoup plus récente datée de 2006 s'intéresse aux caractéristiques de la fixation du tendon sur l'os au niveau d'une enthèse d'un ligament croisé antérieur bovin à travers l'âge (Wand, 2006).

Benjamin a montré des différences très importantes dans la composition du collagène de type II des fibrocartilages lors du phénomène de vieillissement. Cela semble le fait des fibrocartilages soumis à des compressions. Il y a une modification de structure du collagène de type II, dont le diamètre des fibres diminue de manière significative. Avec le vieillissement, il existe aussi une diminution de la chondroïtine sulfate dans la matrice extracellulaire des fibrocartilages en général, que ce soit dans le ménisque (Ghosh, 1987) ou dans le disque intervertébral (Mc Devitt, 1988). Concernant le ménisque ou les disques intervertébraux, il existe avec l'âge une augmentation du kératane sulfate (Mc Devitt, 1988). Avec l'âge, apparaissent des modifications de la structure intra cellulaire (Benjamin, 1991). Ces cellules sont composées de nombreux filaments intermédiaires avec de larges plages de glycogène et parfois des noyaux séparés. Elles sont beaucoup moins riches en appareil de Golgi et vésicules sécrétoires ce qui va de paire avec leur baisse d'activité productrice même si l'activité de sécrétion de collagène II est conservée.

On note d'ailleurs qu'il existe aussi chez les cellules jeunes une présence intra-cytoplasmique de lipides et glycogènes mais dans des quantités moins importantes que dans les cellules plus adultes (Ralphs, 1991).

On suppose qu'il y a une diminution de la chondroïtine sulfate intra-cellulaire, ce qui va de paire avec le fait que les cellules plus âgées sécrètent moins de glycosaminoglycane. Parallèlement l'accumulation de glycogène intra-cellulaire pourrait venir du fait qu'il soit moins utilisé au niveau de la matrice mais continue à être synthétisé dans la cellule. Boskey (Boskey, 1980) a d'ailleurs incriminé cette accumulation de lipide dans la pathogénie de la calcification du cartilage.

Dans les études sur le vieillissement des enthèses, il a été noté très clairement que le collagène de type II généralement présent uniquement au niveau du fibrocartilage s'étend, avec l'âge, jusqu'à l'intérieur du tendon. En pratique clinique, il a souvent été rapporté qu'une des étiologies des ruptures de coiffe est une « calcification » de l'enthèse. Mais, contrairement à ce qui est parfois évoqué, il n'y a pas d'étude qui objective systématiquement une calcification du fibrocartilage avec l'âge.

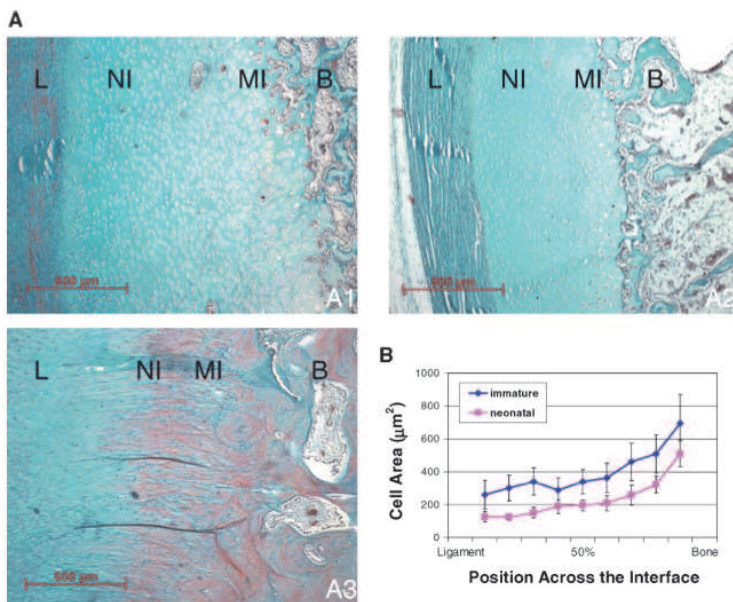
Il existe probablement une corrélation avec la physiopathologie. Wang (Wang, 2006) a étudié l'aspect d'enthèse du ligament croisé antérieur bovin chez des animaux de la période néonatale jusqu'à l'âge adulte (5 ans). Les animaux explorés étaient des animaux âgés de 7 jours (période néonatale), de 6 mois (période immature) et de 5 ans (période mature). L'équipe a étudié l'organisation de la matrice extracellulaire, non seulement les collagènes de

type I, II et X mais aussi, pour les protéoglycanes, la décorine et les protéines oligomériques (Comp). La cellularité, l'épaisseur de chaque zone et la concentration minérale locale ont été analysées.

D'une manière globale, il est intéressant de noter que l'aspect de l'enthèse chez l'animal immature est très proche de celui d'un cartilage hyalin, son aspect est différencié en quatre couches qui apparaissent avec la maturation en période post-néonatale. Lors des phénomènes de maturation de cette enthèse, il existe une augmentation de l'épaisseur des différentes couches depuis la région ligamentaire jusqu'à la région de l'os. Si l'épaisseur de chaque couche augmente, il persiste une différence entre chaque couche dans les mêmes proportions. Ce n'est que dans l'enthèse mature que va apparaître l'aspect d'organisation en colonne, autour du collagène, des chondrocytes.

Dans l'ensemble des cas, il existe du côté ligamentaire un aspect fibroblastique des cellules qui se transforme en aspect proche du chondrocyte au niveau de la zone de jonction alors que des chondrocytes hypertrophiques sont localisés dans la zone minéralisée au contact de l'os.

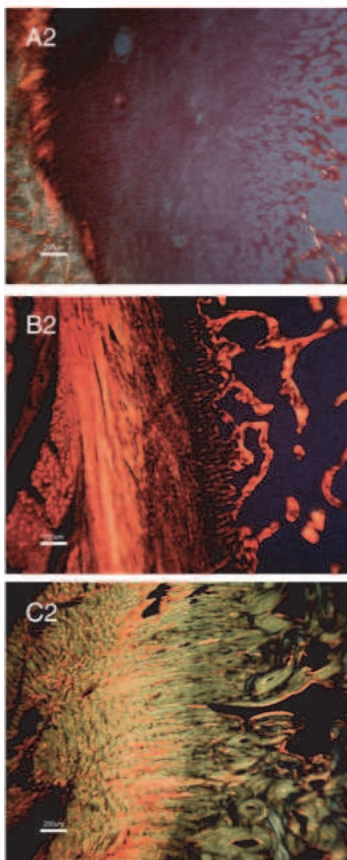
Il est intéressant de noter qu'au niveau de la zone d'insertion il n'y a aucune différence en terme de densité cellulaire avec le vieillissement de l'enthèse. Par contre, du côté ligamentaire il y a une différence statistiquement significative en terme de cellularité chez les animaux les moins développés.



**Figure 25 : Modifications liées à l'âge dans l'organisation matricielle et cellulaire de l'enthèse.**

**L : ligament, NI : non minéralisé, MI minéralisé, B : os. A1 : néonatal (1à7 j) A2 : immature (4à6 mois), A3 : mature (2à5 ans). En période immature à néonatale, la zone de jonction ressemble à celle d'un cartilage, puis se transforme en structure différenciée. B : avec le temps, la cellularité augmente, mais reste identique en proportion pour chaque zone. (Wang, 2006)**

Contrairement aux données préliminaires observées par Benjamin, il n'y a pas de modification de contenu en collagène II dans la zone d'insertion tendineuse durant les différentes périodes du vieillissement. C'est l'orientation des fibres de collagène dans l'espace qui était différente. Ainsi chez l'animal en début de maturation, il existe des fibres de collagène qui viennent se fixer sur la zone fibrocartilagineuse et prennent un angle à 90° en continuité du tendon alors que chez l'animal plus mature, ces fibres de collagène traversent l'interface et viennent se fixer directement sur l'os en conservant leur orientation perpendiculaire à l'insertion osseuse.



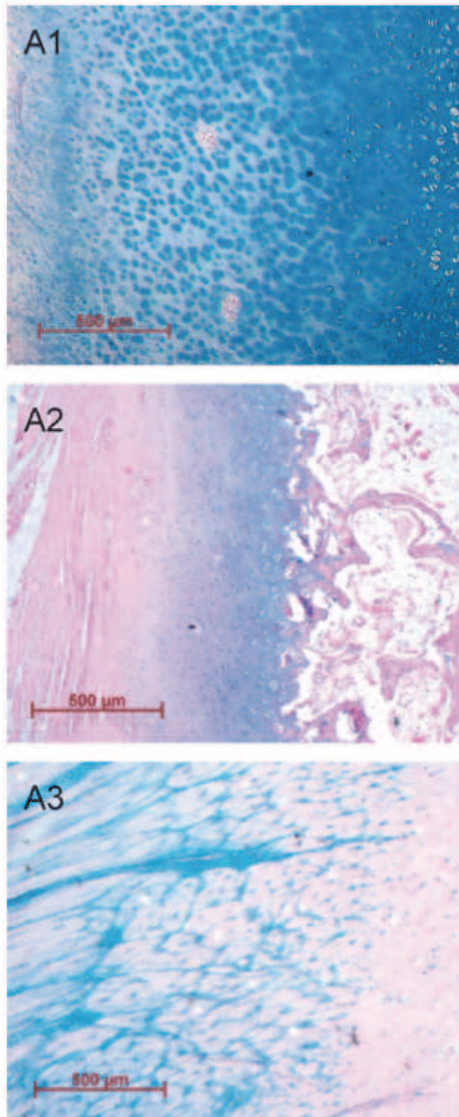
**Figure 26: Organisation des fibres de collagène I en fonction de l'âge. Rouge sirius et microscopie en lumière polarisée. Zone d'insertion tibiale. A2 : immature : les fibres de collagène II sont visibles à la zone de jonction, B2 : immature : Les fibres sont parallèles au tendon, C : elles sont perpendiculaires à l'os, à travers l'enthèse. Echelle : 200  $\mu$ m, (Wang, 2006)**

Concernant les protéines de la matrice extracellulaire et les protéoglycanes, il n'a pas été observé de différence au cours de la maturation du fibrocartilage concernant la décorine ou le COMP.

La concentration de glycosaminoglycanes semble beaucoup plus variable. Ainsi celle-ci est systématiquement identifiée dans la région du fibrocartilage mais son intensité diminue systématiquement avec l'âge. Les protéoglycanes sont contenues de manière très

importante dans le fibrocartilage immature et mature mais de manière beaucoup moins importante que dans le cartilage néonatal.

Dans ce même cartilage néonatal, les glycosaminoglycanes sont surtout associées à la matrice des chondrocytes hypertrophiques et à la zone de minéralisation.



**Figure 27 : Modification avec l'âge de l'organisation des protéoglycanes à travers l'enthèse. Coloration bleu alcian. A1 : néonatal, A2 ; immature ;A3 mature. Les PG sont retrouvés à travers toute les périodes , avec une coloration diminuant avec l'âge, parallèlement à la formation du fibrocartilage. (Wang, 2006)**

Concernant la répartition du collagène de type X, celui-ci est aussi réparti de manière différente en fonction de l'âge. Ainsi dans la période immature et néonatale, il est concentré essentiellement dans le pourtour des chondrocytes hypertrophiques et dans la région minéralisée. Sa répartition va s'étendre dans toute l'enthèse avec la maturation du squelette.

L'activité phosphatase-alcaline, de manière toute naturelle, est retrouvée essentiellement au niveau du front d'ossification de l'enthèse avec une activité majeure dans la période néonatale

qui diminue avec le temps et la maturation de l'enthèse. Bien sûr durant cette période néonatale, l'activité des chondrocytes hypertrophiques est telle qu'il existe une concentration importante autour des cellules.

Concernant la minéralisation de l'enthèse, il existe une modification de la distribution en fonction de la région et de l'âge. Ainsi à travers l'évolution, on objective une minéralisation progressive depuis l'os jusqu'à la tidemark, la minéralisation maximum étant obtenue à l'âge adulte.

Il n'existe pas d'étude permettant de connaître l'aspect de l'enthèse chez l'animal âgé.

## 2.5 Pathologies de l'enthèse

### 2.5.1 Pathologie microtraumatique

#### 2.5.1.1 Données épidémiologiques

Le sport ou les activités physiques intenses répétées sont les plus grandes pourvoyeuses d'enthésopathies symptomatiques (Claudepierre, 2005). Ainsi, dans les milieux sportifs, les consultations pour talalgies, épicondylites, enthésopathies rotuliennes par exemple sont très fréquentes. D'autres enthésopathies également très fréquentes surviennent sans pathologie sous-jacente identifiée et sans qu'une activité physique « excessive » soit toujours mise en évidence : il s'agit par exemple de certaines tendinopathies d'insertion de la coiffe des rotateurs, ou de la région trochantérienne ou du tendon d'Achille.

La tendinopathie d'insertion microtraumatique est étroitement liée au phénomène de vieillissement de l'enthèse. (Renström, 2005). Les syndromes d'hyperutilisation « overuse » sont une cause majeure de pathologie sportive (30 à 50%). Et les tendinopathies d'insertion représentent 15 à 25% des motifs de consultation pour pathologie tendineuse liée au sport. La physiopathologie n'est toujours pas clairement expliquée actuellement. Une meilleure compréhension des facteurs étiologiques permettrait de prévenir leur arrivée. Il existe 2 types de facteurs : les facteurs extrinsèques et les facteurs intrinsèques.

Les facteurs intrinsèques importants sont : les troubles de l'alignement, la diminution de la flexibilité, la faiblesse ou le déséquilibre musculaire, le surpoids, et bien sûr une maladie sous-jacente telle qu'une maladie de Haglund ou une arthrite inflammatoire.

Les facteurs extrinsèques majeurs sont : la surcharge, les erreurs d'entraînement, l'équipement inadapté, ou un geste inadapté (Sandmeier, 1997).

#### 2.5.1.2 Données physiopathologiques

Une pathologie d'hyperutilisation ou microtraumatique se définit comme un problème orthopédique récurrent, causant une douleur de l'appareil musculo-squelettique, lié à des mouvements répétitifs. L'enthèse, comme nous l'avons rappelé, s'adapte à l'augmentation de la demande mécanique, en modifiant sa surface de contact en collagène (Kannus, 1997), sa matrice extracellulaire (Jarvinen 1999) et son organisation dans l'espace (Benjamin, 1998).

Lorsque les capacités naturelles de réparation et de régénération sont dépassées, il en résulte l'apparition de modifications dégénératives. Si les modifications du tendon sont bien connues (déchirure des fibres de collagène, augmentation de la vascularisation et de la cellularité, altération et dédifférenciation des ténocytes, métaplasie fibrocartilagineuse et fissure tendineuse), l'histologie est beaucoup moins connue dans les tendinopathies d'insertion. Classiquement, aucune cellule inflammatoire n'est retrouvée dans la tendinopathie d'insertion. Au niveau du tendon, on sait qu'une traction de plus de 4 à 8% de la longueur originale est responsable de rupture des fibres tendineuses. Ce sont les répétitions de tels petits traumatismes qui aboutissent à des syndromes d'hyper-utilisation. Un déficit d'apport sanguin semble être un des éléments prédisposant aussi à l'enthésopathie. Certains facteurs mécaniques micro-traumatiques peuvent être responsables de ce trouble ischémique. Ces éléments confirment que la tendinopathie d'insertion n'est pas un problème d'inflammation chronique. Le passage à la chronicité se fait par le dépassement des capacités naturelles de cicatrisation, et ce sont les structures entourant l'enthèse ou le tendon qui s'enflamment. (Renstrom, 2005)

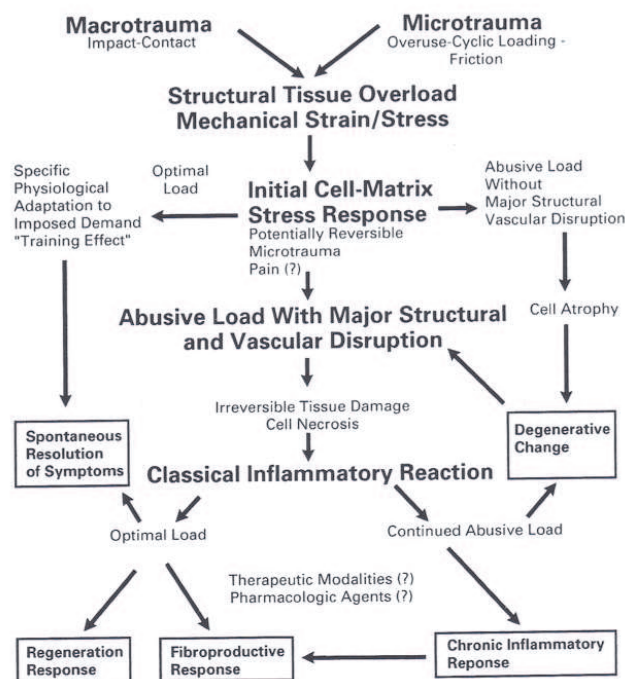


Figure 28 : Physiopathologie de l'inflammation secondaire dans les lésions de l'enthèse micro et macrotraumatiques (Leadbetter,1990)

### 2.5.2 La pathologie calcifiante

La calcification de l'enthèse peut être considérée comme une variable du vieillissement



physiologique. Par conséquent, la calcification de l'enthèse n'est pas forcément pathologique chez le sujet âgé et doit inquiéter quand elle survient chez le sujet jeune.

Une grande cause d'enthésopathies ossifiantes, faisant possiblement le lien entre les facteurs mécaniques et les facteurs métaboliques, est la maladie de Forestier (Gaucher, 1990)

### 2.5.3 La pathologie inflammatoire

Le dernier groupe d'affections touchant les enthèses est celui des maladies inflammatoires (Niepel, 1989). La fréquence de l'atteinte des enthèses dans les spondylarthropathies est démontrée par de multiples travaux. Elle est retrouvée tout particulièrement dans la spondylarthrite ankylosante. Elle est beaucoup plus faible dans la polyarthrite rhumatoïde, et peu de données existent pour les autres connectivites et maladies de système.

#### 2.5.3.1 Histologie des lésions d'enthésite dans la spondylarthrite ankylosante

Il ne s'agit pas d'une atteinte isolée de l'enthèse. L'atteinte est avant tout diffuse, ne touchant pas uniquement l'enthèse ou le fibrocartilage. Les études d'imagerie ont bien montré que ces lésions n'existaient pas sans la présence concomitante d'un oedème de la moelle osseuse et d'une inflammation de la synoviale. Seules deux études nous apportent des informations plus précises sur l'histologie de ces lésions.

Laloux (Laloux, 2001) a montré que l'infiltrat inflammatoire prédomine dans la moelle osseuse sous-enthésique, et est principalement constitué de lymphocytes T, ceux-ci étant majoritairement CD8+. Ces données ont été obtenues chez des sujets ayant des atteintes anciennes, opérés.

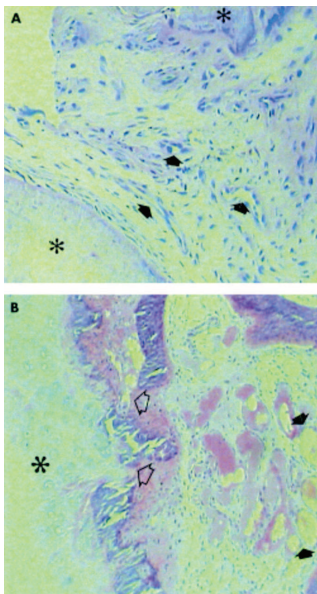
McGonagle (McGonagle, 2002) a rapporté l'histologie de lésions récentes sur des biopsies de l'enthèse chez des malades ayant des affections au stade débutant, avec une confirmation par imagerie (IRM et échographie) de l'inflammation de l'enthèse. Les auteurs ont objectivé une augmentation de la vascularisation dans les biopsies des patients, ainsi qu'un infiltrat inflammatoire essentiellement constitué de macrophages dans ces lésions enthésitiques jeunes.

Ces données sont donc actuellement trop parcellaires pour permettre une synthèse sur la nature des cellules réellement impliquées dans les étapes de l'enthésite.

### 2.5.3.2 Physiopathogénie

Dans cette pathologie inflammatoire des spondylarthropathies, deux explications sont proposées :

Les hypothèses actuelles impliquent, de manière séparées ou concomitantes, l'interaction du système immunitaire avec l'allèle HLA B27, et certaines bactéries de la muqueuse intestinale. Une des explications avancées associe le stress mécanique et l'inflammation, comme c'est le cas pour l'arthrose. Le stress mécanique est capable d'induire l'expression de nombreux gènes dont celui de certaines cytokines et de molécules d'adhésion. Cette expression génique pourrait passer avant tout par une stimulation du NFκ-B sous l'effet du stress mécanique. Le stress mécanique peut également induire des microtraumatismes, responsables de phénomènes de cicatritions locaux. Ces deux phénomènes s'accompagnent de l'activation de nombreux facteurs dont des cytokines tel que l'IL1, le TNF-α, l'IL8, et le TGF-β (Claudepierre, 2005).



**Figure 29: Histologie d'une enthèse de spondylarthropathie au stade précoce (H&E). A : le tendon est le siège d'une inflammation avec augmentation de la vascularisation (flèches). L'os est marqué par un astérisque. B : à ce stade précoce on voit très bien que le fibrocartilage est détaché de l'os, mais reste globalement intact. Les flèches ouvertes indiquent des lésions osseuses fréquemment décrits dans cette pathologie. (McGonagle, 2002)**

L'autre élément pris en compte par ces mêmes auteurs est celui des composants bactériens (McGonagle, 2002). En effet, même si la présence de bactéries viables n'a jamais pu être mise en évidence au sein d'articulations de patients atteints de spondylarthropathie, la présence de

composants bactériens a été rapportée. Or, des travaux montrent que ces composants bactériens sont susceptibles de déclencher une réponse inflammatoire locale (McGonagle, 2001). Il est donc envisageable qu'une défaillance ou une variante génétique du système immunitaire facilitant la diffusion de composants bactériens puisse permettre la nidation de ceux-ci à distance des sites de pénétration dans l'organisme avec induction d'une réaction inflammatoire locale (Claudepierre, 2005). L'auteur note que si la présence de ces composants bactériens n'a pas été mise en évidence dans les enthèses ceci paraît envisageable pour des raisons d'ordre essentiellement vasculaire :

- tout d'abord les microtraumatismes augmentent la vascularisation locale
- ensuite la circulation de type terminale observée dans l'enthèse pourrait favoriser l'arrêt ou le dépôt d'antigènes dans ces sites.

Une variation immunitaire, telle que la présentation anormale d'un peptide bactérien par la molécule HLA B27, pourrait entraîner une réaction inflammatoire diffuse à bas bruit, celle-ci ne s'exprimant réellement que dans des sites soumis à des stress mécaniques très particuliers favorisant « l'éruption » inflammatoire, éventuellement favorisée également par l'accumulation d'antigènes bactériens dans ces sites anatomiques. (Claudepierre, 2005).

La deuxième grande hypothèse développée dans ces dernières années fait appel essentiellement à un mécanisme auto-immun. Les auteurs pointent tout particulièrement le fait que de nombreux arguments sont en faveur d'un rôle primordial de l'os lui-même dans les symptômes et les lésions des spondylarthropathies (Maksymowych, 2000). Les anomalies osseuses radiologiques et scintigraphiques des spondylarthropathies sont connues depuis longtemps. Des travaux histologiques ont mis en évidence cette ostéite œdémateuse et inflammatoire, ou ostéomyélite, siégeant immédiatement sous l'enthèse ou sous le cartilage de la sacro-iliaque (Shichikawa, 1985). Des études IRM objectivent un œdème osseux diffus, très fréquent, autour des foyers inflammatoires des spondylarthropathies, qu'il s'agisse des enthèses des sacro-iliaques ou des articulations périphériques. Certains travaux histologiques ou fondés sur des IRM suggèrent que l'atteinte inflammatoire de la moelle osseuse est la lésion primitive des spondylarthropathies plutôt que l'enthésopathie, (Claudepierre, 2005) Il se pourrait donc qu'une réaction auto-immune prenne naissance dans la moelle osseuse dirigée contre les composants tissulaires immédiatement en contact avec elle, à savoir le fibrocartilage de l'enthèse et le cartilage articulaire (Gaucher, 1987).

Il a ainsi été retrouvé chez des patients atteints de spondylarthrite ankylosante des mécanismes d'immunité cellulaire vis-à-vis de protéoglycanes du cartilage (Mikecz, 1988).

Cette vision physiopathogénique des spondylarthropathies en fait une maladie auto-immune dirigée contre certains composants du cartilage, sous-tendue par le terrain génétique .Ceci donne du poids au concept d'enthèse proposé par Benjamin (Benjamin, 2001) incluant toutes les zones de jonction non seulement entre le fibrocartilage et l'os mais également entre le cartilage et l'os. Pour Claudepierre (Claudepierre, 2005), cette théorie n'exclut pas celle abordée préalablement, puisque l'on peut considérer que des mécanismes inflammatoires locaux déclenchés par un stress mécanique ou des composants bactériens favorisent la réaction inflammatoire d'origine auto-immune ou favorisent l'auto immunité elle-même.

Ochronose  
Chondrocalcinose  
Goutte  
Rhumatisme à apatite  
Hyperparathyroïdie  
Hypoparathyroïdie primitive  
Ostéomalacie  
Hypophosphatémie familiale  
Fluorose  
Acromégalie

**Figure 30 : Affections métaboliques associées à des enthésopathies.**

### **3 CICATRISATION DU TENDON SUR L'OS**

#### **3.1 Données cliniques**

La cicatrisation du tendon sur l'os est un processus sollicité de manière extrêmement fréquente en chirurgie orthopédique. En effet, cette dernière regroupe 3 grands types de gestes chirurgicaux : les arthroplasties qui viennent remplacer les articulations usées, les synthèses, qui réparent les fractures, et les gestes sur les parties molles, parmi les quels se trouvent les réinsertions tendineuses. Dans le cadre de ce travail nous allons nous intéresser aux pathologies de réparation des tendons naturellement fixés à l'os via une enthèse. Cela regroupe 3 grands groupes : la pathologie du ligament croisé antérieur, la pathologie du tendon d'Achille et la pathologie de la coiffe des rotateurs. Les lésions du ligament croisé antérieur, inséré naturellement sur l'os par des enthèses, se caractérise par de très fréquentes lésions traumatiques. La sanction chirurgicale en est le remplacement du ligament par un ligament prélevé en périphérie du genou. On parle de ligamentoplastie, et les résultats sont assez satisfaisant avec 80% de bon à très bon résultats.

Les deux groupes restant concernent plus la problématique abordée dans ce travail. Il s'agit non plus d'un ligament (attaché entre deux os) mais d'un tendon, avec d'un côté un muscle, de l'autre un os, avec une fixation par une enthèse. La pathologie d'arrachement du tendon d'Achille est fréquente, mais représente un faible pourcentage (20%) comparé aux lésions intra-corporéales (Paavola, 2002). Ces tendinopathies d'insertion se traitent d'abord médicalement puis chirurgicalement, avec des résultats satisfaisants, même si l'insertion reste plus fragile qu'à l'état initial. Cela se comprend bien par les phénomènes de cicatrisation, qui aboutissent à une cicatrice fibreuse, et en aucun cas à une restauration de l'enthèse. Le dernier problème concerne la pathologie de la coiffe des rotateurs. C'est une pathologie complexe, associant des lésions du muscle, du tendon, de l'os et de l'enthèse. En cas de rupture de la coiffe des rotateurs, l'enthèse disparaît (Goutalier, 2005) et lorsque le traitement médical ne permet pas de faire disparaître les symptômes, seule la chirurgie permet de venir réparer le tendon en le fixant sur l'os. Cependant, les données actuelles de la littérature montrent qu'après réparation des tendons de la coiffe des rotateurs, il existe fréquemment une absence de cicatrisation, un taux d'échec cicatriciel important. Lorsque la chirurgie se fait en ouvrant la peau, le taux de cicatrisation varie de 46 à 80%, selon l'étendue des lésions (Harryman, 1991), après réparation arthroscopique, où l'ensemble de la chirurgie se fait par mini-incisions, les taux de cicatrifications varient de 6 à 75%, en fonction de nombreux

paramètres (Boileau, 2005, Galatz, 2004). Il est ainsi admis que de manière globale le taux de cicatrisation est de l'ordre de 60%.

Ce faible taux de succès cicatriciel peut s'associer à une aggravation des symptômes, voire à une stagnation de la gêne fonctionnelle, pouvant aboutir à des chirurgies itératives dont la morbidité est croissante.

## **3.2 Données fondamentales**

### **3.2.1 Facteurs biologiques**

Galatz en 2005 (Galatz, 2005) a étudié la cinétique de la cicatrisation d'un tendon sur un os en s'intéressant aux lésions de l'enthèse. L'étude a porté sur des désinsertions de supraspinatus de rats. Les auteurs ont réalisé une étude biomécanique et histochimique avec exploration de la production de collagène I et III, mais aussi la production locale de TGF $\beta$ 3 et TGF $\beta$ 1. La technique chirurgicale a consisté à désinsérer le tendon du sus-épineux de rats Sprague Dawley adultes et à explorer à 1, 3, 7, 10 et 28 jours l'évolution des différentes données étudiées. D'un point de vue biomécanique, après la réparation, la force augmente de manière significative, jusqu'au 56<sup>ème</sup> jour. Parallèlement, la raideur augmente jusqu'à la fin du 1<sup>er</sup> mois, et se stabilise avec le temps.

#### **3.2.1.1 Composante cellulaire de la cicatrisation**

Concernant la réaction cellulaire, au tout début de la réparation, ce sont des cellules inflammatoires qui sont systématiquement présentes avec un aspect de polynucléaire neutrophile. Des lymphocytes et des cellules plasmiques apparaissent à partir du 3<sup>ème</sup> jour et deviennent prédominantes au 7<sup>e</sup> et 10<sup>e</sup> jours. Après un mois, les cellules inflammatoires ont disparu. Il y a un début de prolifération capillaire à partir du 3<sup>e</sup> jour avec un pic de présence au 7<sup>e</sup> jour. La prolifération des fibroblastes est détectée dès une semaine après la réparation, avec un pic au 10<sup>e</sup> jour. L'activité de remodelage osseux des ostéoblastes et des ostéoclastes se fait à partir de ce moment là.

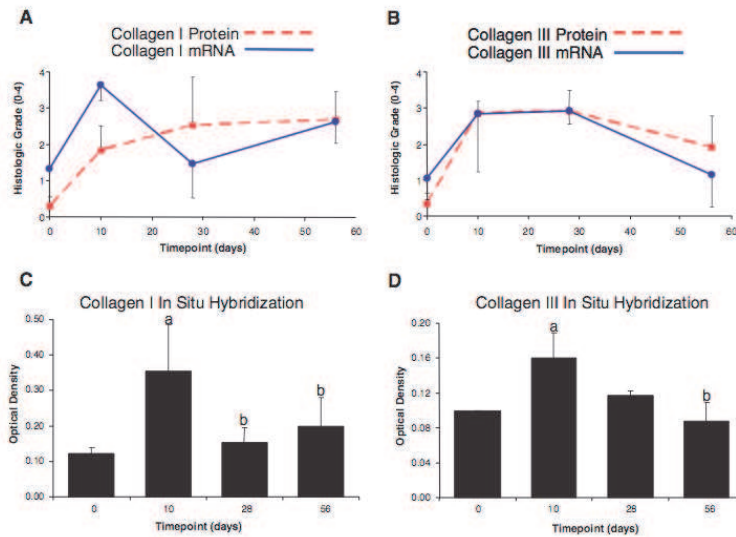
Parmi ces cellules, les macrophages jouent un rôle important. Le phénomène de cicatrisation du tendon sur l'os peut être divisé en trois étapes. Une étape inflammatoire, une étape de réparation et une étape de remodelage (Carpenter, 1997 ; Cheung, 2010). Après la phase

inflammatoire, c'est une réelle cascade inflammatoire qui est en fait une réponse complexe des tissus, impliquant un nombre variable de cytokines et recrutant des cellules dont le nombre et l'action fluctuent au cours du phénomène de cicatrisation (Carpenter, 1997). Ce phénomène inflammatoire commence dès la première semaine après une réparation de la coiffe des rotateurs et est caractérisée par une infiltration des neutrophiles qui vont s'associer à un recrutement des macrophages. Ce recrutement macrophagique aboutit à la sécrétion de TGF $\beta$ 1, qui augmente l'activité protéasique et la formation de collagène (Hays, 2008). Ce recrutement précoce macrophagique participe à la formation du tissu cicatriciel fibrovasculaire et il semblerait que TGF $\beta$ 1 soit étroitement lié à ce phénomène de formation cicatricielle en présence de macrophages recrutés.

On note par ailleurs des macrophages en plus petit nombre, à la zone de jonction entre l'os et le tendon, lors de la réparation ; et on suppose que ces macrophages présents juste à la jonction os/tendon, auraient un rôle anabolique, alors que ceux qui sont recrutés autour de la réparation auraient plutôt un rôle catabolique dans les phénomènes de réparation (Hays, 2008). C'est ce même phénomène de balance macrophagique qui expliquerait la présence de macrophages lors de tendinopathies d'hyperutilisation (Perry, 2005). De nombreux facteurs de croissance ont été identifiés pour jouer un rôle important dans le phénomène de cicatrisation naturelle du tendon sur l'os.

A partir d'un mois et jusqu'au 2<sup>e</sup> mois, il peut apparaître des aspects évocateurs de zone de transition mais uniquement dans des zones très limitées, avec un aspect très remanié et aucun aspect d'enthèse native n'est retrouvé.

Concernant l'expression de l'ARNm, celle-ci est augmentée au 10<sup>e</sup> jour puis diminue pour disparaître totalement un mois après la réparation. Concernant la protéine collagénique de type I sa concentration augmente progressivement pour obtenir un plateau au 28<sup>e</sup> jour. L'expression de l'ARNm du collagène de type III est augmentée au 10<sup>e</sup> jour et diminue progressivement pour disparaître à 2 mois. Le collagène de type III quant à lui est identifié dans les mêmes proportions que dans son ARNm.



**Figure 31 :** Les expressions des ARNm et des protéines des collagènes 1(A,C) et III (B,D) lors de la cicatrisation augmentent jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour puis diminuent avec le temps. a: différence statistiquement significative par rapport à J0, b, par rapport à J10. (Galatz 2006)

### 3.2.1.2 Les TGFβ

Concernant le TGFβ1 et son ARNm, ils sont essentiellement localisés au niveau de l'interface cicatricielle, sur la zone d'insertion du tendon et au niveau de la zone jouxtant l'articulation. Dans la période post opératoire, leur taux est très bas, pour obtenir un pic autour de 10 jours après la réparation. Concernant le TGFβ3 et son ARNm, ils sont localisés en plein niveau de la zone de la lésion et au contact des surfaces articulaires. Ils ne sont pas du tout retrouvés dans la zone de jonction entre le tendon et l'os. On note que la cellularité globale de la région va augmenter jusqu'au 10<sup>e</sup> jour avec une réaction inflammatoire puis la densité cellulaire va diminuer à partir d'un mois en restant systématiquement supérieure, ce qui existait avant que les lésions n'apparaissent. Ces données histologiques montrent que le tissu obtenu après réparation de la coiffe des rotateurs chez l'animal, est une cicatrice fibreuse, riche en collagène de type III, qui correspond globalement à la réponse observée lors d'une cicatrisation d'une plaie cutanée. Il est très important de noter que la production de collagène type III présente ne correspond pas du tout à du collagène normalement trouvé ni dans les fibrocartilages ni dans le tendon puisque c'est un collagène cutané.

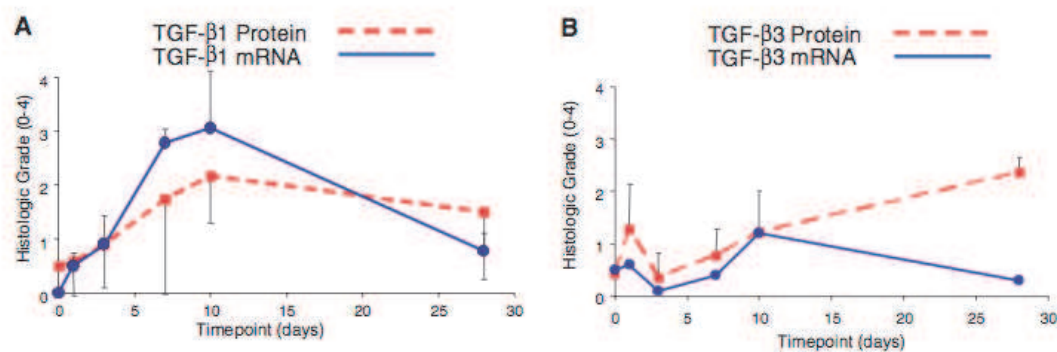
Lors de la cicatrisation, il existe quelques différences notamment concernant les problèmes de cicatrisation cutanée avec une augmentation de la formation du collagène I et III qui sont tout d'abord produits en quantité importante, puis dont la production est stoppée alors qu'elle perdure lors de la cicatrisation de la peau (Clore, 1979). Globalement, dans les modèles animaux de cicatrisation du tendon sur l'os, on observe que les propriétés histologiques sont stabilisées bien avant les propriétés mécaniques (Thomopoulos, 2003). La fixation que nous obtenons a l'aspect d'une cicatrice et non pas d'une restauration de la zone de jonction entre



l'os et le tendon telle qu'elle existait auparavant, dans le cadre d'un fibrocartilage ou d'une enthèse simple (Sakai, 2001 et Clore, 1979).

Comme on peut le supposer, la production de TGF $\beta$  est localisée exactement dans la zone de réparation et coïncide avec le pic de prolifération cellulaire et d'activité cellulaire. Ces deux facteurs, identifiés lors du développement de l'enthèse, sont des modulateurs majeurs du développement et de la différenciation de l'appareil musculo-squelettique (Roberts, 1995).

Le TGF $\beta$ 1 est connu pour être un promoteur de la cicatrisation tendineuse et est généralement associé aux phénomènes de migration cellulaire et d'angiogenèse (Molloy, 2003). Il est intéressant de noter que TGF $\beta$ 1 est généralement présent lors de la formation de cicatrice et coïncide parfois, dans certains modèles animaux avec la production d'une cicatrice excessive. Le TGF $\beta$ 3 est généralement associé à une cicatrisation fœtale des ouvertures, sans fibrose et dans le modèle décrit par Galatz (Galatz, 2006) il existe d'ailleurs une expression de TGF $\beta$ 3 dans la zone lésée du tendon mais pas à la zone de fixation du tendon. Il n'existe que dans les zones traumatisées par l'acte chirurgical. TGF $\beta$ 1 lui est retrouvé dans la zone de jonction.



**Figure 32 : Cinétique des TGF $\beta$  lors de la cicatrisation. Le taux d'ARNm et de protéine de TGF $\beta$ 1 (A) augmente les 10 premiers jours suivant la réparation puis diminue jusqu'au 28<sup>ième</sup> jour. Le taux d'ARNm et de protéine de TGF $\beta$ 3 ne sont pas dit statistiquement différent comparés au temps 0, si ce n'est à J28. (Galatz, 2006)**

Peu de choses sont connues sur les cellules impliquées dans la cicatrisation. Lors de la cicatrisation tendineuse, il existe une infiltration fibroblastique intra tendineuse, suivant un processus inflammatoire (Woo, 1997). Dans la cicatrisation du tendon dans l'os, un phénomène inflammatoire précoce a lieu, suivi d'une forte activité ostéoclastique et ostéoblastique couplées à une prolifération fibroblastique vers le dixième jour. En même temps un pic de TGF $\beta$ 1 est observé, parallèlement à une prolifération capillaire.

Bien sûr, il existe des limitations à cette étude puisque les lésions réalisées étaient essentiellement des lésions fraîches. Les auteurs se sont intéressés à l'influence de la chronicité des lésions en proposant dans un modèle comparable, d'étudier les propriétés biomécaniques en cas de réparation à distance de la création de la lésion. Les auteurs ont pu montrer qu'il existait un taux de cicatrisation inférieur (Galatz, 2005). De la même manière, ils ont pu démontrer qu'il existait une diminution de l'élasticité et de la souplesse du tendon lorsqu'on réalisait une réparation plus tardive. Les auteurs ont pu montrer aussi qu'il existait dans le même temps, du fait de l'absence de sollicitation mécanique osseuse, une diminution de la densité osseuse au niveau de la zone d'insertion initiale du tendon. Il est à noter qu'en partie clinique, cette faiblesse de l'os est un problème majeur lors des réparations de la coiffe des rotateurs.

D'autres facteurs biologiques impliqués dans la cicatrisation

#### 3.2.1.3 Les BMPs

Les BMP-12 et -14, exprimées dans les fibroblastes et impliquées de manière très importante dans la formation d'articulation de novo ont été identifiées dans les phénomènes de cicatrisation du tendon sur l'os, au niveau de la zone de jonction entre les deux (Seeherman 2008 ; Wurgler-Hauri 2007). Ainsi, Seeherman a montré qu'en cas de lésion de la coiffe des rotateurs traitée par réparation associée à une éponge recouverte de Rh BMP12, le phénomène de cicatrisation du tendon sur l'os est accéléré comparé à des contrôles non traités. BMP12 est retrouvée tout au long des différentes étapes de la cicatrisation. La BMP14 est surtout retrouvé, en pratique clinique, au bord de la zone de rupture et dans la bourse séreuse (Nakase, 2002) et dans la cicatrisation qui se détecte essentiellement en début de processus.

#### 3.2.1.4 Le bFGF

Le basic Fibroblast Growth Factor est un agent puissant de la cicatrisation cutanée. Il augmente la prolifération fibroblastique et diminue la formation collagénique chez l'homme, il est aussi présent lors de la cicatrisation du tendon (Dahlgren, 2005).

#### 3.2.1.5 L'IGF-1

L'Insulin-Like Growth Factor-1 intervient pour stimuler la synthèse protéique et la prolifération cellulaire en diminuant l'œdème, et a été mis en évidence lors des phénomènes de cicatrisation du tendon (Dahlgren, 2005).

### 3.2.1.6 Le PDGF $\beta$

Le Platelet-Derived Growth Factor  $\beta$  augmente parallèlement au taux local de collagène de type I, et est mis en évidence en petite quantité lors du phénomène de cicatrisation (Kobayashi, 2006).

### 3.2.1.7 Le COMP

Cartilage Oligomeric Matrix Protein est essentiellement un médiateur de la croissance tendineuse. Sa présence augmente avec la maturation du tendon et l'exercice et il jouerait un rôle important dans la fixation des fibres de collagène. Son expression est augmentée lors de la cicatrisation de manière très importante le premier mois (Wurgler-Hauri, 2007).

### 3.2.1.8 Le CTGF

Le Connective Tissue Growth Factor module la production de collagène induite par l'action du TGF $\beta$ 1 sur les fibroblastes. Il module aussi la chondrodédifférenciation des cellules souches mésenchymateuses (Fukunaga, 2003)

	CTRL	1 wk	2 wks	4 wks	8 wks	16 wks
BFGF	+/+	+++/>+++	++/>+++	+/+	++/>++	+/-
BMP.12	+/+	+++/>+++	+/>+++	+/+	++/>++	+/-
BMP.13	+/-	++/>+++	++/>+	++/>+	++/>+	-/-
BMP.14	+/++	++/>+++	+/>+	+/>+	+/++	-/-
COMP	+/+	+++/>+++	+/>+++	++/>+	+/+	-/-
CTGF	+/+	+++/>+++	++/>+++	+/+	+/++	+/-
PDGF-B	UD/+	UD/>+++	UD/>++	UD/>+	UD/>+	UD/>+
TGF- $\beta$ 1	+/+	++/>+++	++/>+++	-/>+	+/++	-/-

CTRL, control; bFGF, basic fibroblastic growth factor; BMP, bone morphogenic protein; COMP, cartilage oligomeric matrix protein; CTGF, connective tissue growth factor; PDGF-B, platelet-derived growth factor B; TGF- $\beta$ 1, transforming growth factor  $\beta$ 1; UD, undetected.

Figure 33 : Expression de différents facteurs de croissance de la cicatrisation os-tendon après réparation chez le lapin (Kobayashi, 2006)

Postoperative day	bFGF			IGF-1			PDGF			TGF- $\beta$		
	P	M	D	P	M	D	P	M	D	P	M	D
1	-	-	-	+/>-	+/>-	-	-	-	-	++	+	-
3	+/>-	+/>-	-	+	+	-	-	-	-	+	+/>-	-
5	+	+	-	++	+	-	-	-	-	+	+	-
7	++	++	-	+/>-	+/>-	-	+	+	-	+	+	-
9	++	++	-	+/>-	+/>-	-	+	+	-	+	+	-
11	+	+	-	-	+/>-	-	+/>-	+/>-	-	+	+	-
14	+/>-	+/>-	-	-	+/>-	-	-	+/>-	-	+	+	-
21	+/>-	+/>-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/>-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/>-	-

P, Proximal tendon; M, defect; D, distal tendon.

Figure 34 : Expression de différents facteurs de croissance de la cicatrisation os-tendon après réparation chez le rat. (Wurgler-Hauri, 2007)

### 3.2.2 Facteurs mécaniques

Les données de la littérature montrent qu'il existe une relation certaine entre la prolifération cellulaire et la cicatrisation entre l'os et le tendon, et les stimuli biomécaniques appliqués à la zone de la réparation (Rodeo, 2010).

De nombreux parallèles ont été faits entre la cicatrisation de la coiffe des rotateurs et les lésions du tendon d'Achille. En effet, dans les deux cas il s'agit de muscles attachés par l'intermédiaire d'un tendon sur l'os avec, au niveau de la jonction entre l'os et le tendon, une enthèse. Plusieurs données biomécaniques sont évaluées lors des phénomènes de cicatrisation. En effet, pour l'instant aucune étude ne permet de savoir s'il y a un intérêt ou pas à stimuler les muscles lors des phénomènes de cicatrisation chez l'homme. Cependant différentes études nous font penser qu'avoir des stimuli musculaires favorisait la prolifération de la zone de la cicatrisation et permettait d'obtenir de meilleurs résultats cliniques.

#### 3.2.2.1 Stimuli répétitifs

Si on prend comme exemple le tendon d'Achille de rat, Schizas (Schizas, 2010) a montré qu'une compression pneumatique intermittente quotidienne sur des lésions du tendon d'Achille permettait de stimuler la prolifération du phénomène de cicatrisation tendineuse permettant d'obtenir une qualité de la cicatrisation comparable à celle obtenue en cas de stimuli biomécaniques dus simplement par la marche. Ainsi, ce type de compression musculaire indirecte permettrait d'autoriser une immobilisation de l'articulation. Cette étude a permis de montrer que les phénomènes de mécanisme étaient liés à des phénomènes de modification du flux sanguin, de prolifération neuro-vasculaire, de prolifération fibromastique et de développement du système nerveux.

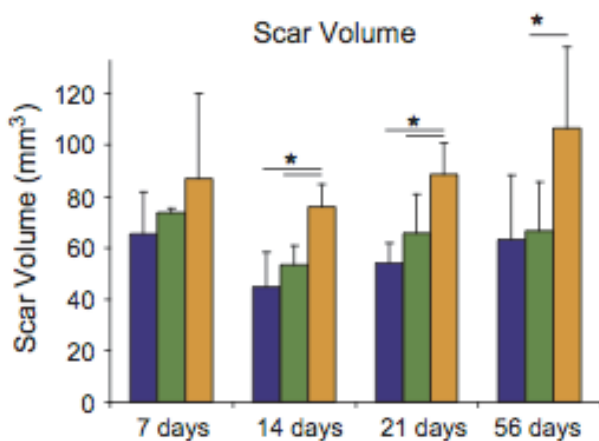
#### 3.2.2.2 Transduction mécano-biologique

Bring (Bring, 2009) a essayé de trouver les mécanismes responsables de cette transduction mécano-biologique. Ainsi, il a mis en évidence des modifications dans l'expression génique pour les récepteurs à substance P (NK1) et les récepteurs aux gènes de la calcitonine (CRLR et RAMP-1) ayant montré que, par l'intermédiaire de ces gènes, une immobilisation aboutissait à un mauvaise cicatrisation tendineuse au niveau du tendon d'Achille. Il

semblerait que cet effet soit relié à une diminution significative d'expression des récepteurs aux neuropeptides sensoriels.

### 3.2.2.3 L'immobilisation

Concernant la réparation de la coiffe des rotateurs, l'effet de la charge mécanique a été étudié dans une étude relativement perspécace sur l'effet de l'injection post-opératoire de toxine botulique A dans des muscles de la coiffe des rotateurs afin de les paralyser (Galatz, 2009). Les animaux ont soit été immobilisés dans un plâtre soit autorisés à bouger dans leur cage. Et dans cette étude il existe un groupe témoin pour lequel il existait simplement une injection de soluté salé intramusculaire. Les animaux ont été sacrifiés à 7, 14, 21 et 56 jours pour une étude histologique, et à 21 et 56 jours pour une étude biomécanique. Les groupes contenant les injections de solution saline avaient un phénomène cicatriciel plus important, une cicatrisation plus importante et des propriétés mécaniques supérieures au groupe contrôle paralysé. Le groupe traité par paralysie mais sans immobilisation avait des propriétés biomécaniques supérieures au groupe traité par paralysie avec immobilisation. Ainsi, les auteurs ont pu démontrer qu'une suppression totale des stimuli mécaniques était totalement néfaste au phénomène de cicatrisation des tendons sur l'os.



**Figure 35: Influence du stimulus mécanique sur le volume de la cicatrice après réparation d'une lésion du supraspinatus de rat. Le groupe S/C a un volume cicatriciel statistiquement supérieur comparé aux groupes ayant eu une injection de Botox dans le supra-épineux (couplée ou non à une immobilisation) (Galatz, 2009)**

L'ensemble de ces études a montré qu'il existe très probablement des contraintes mécaniques optimales pour obtenir une parfaite cicatrisation et qu'au-dessus ou en dessous de ces valeurs il existe une réponse néfaste.

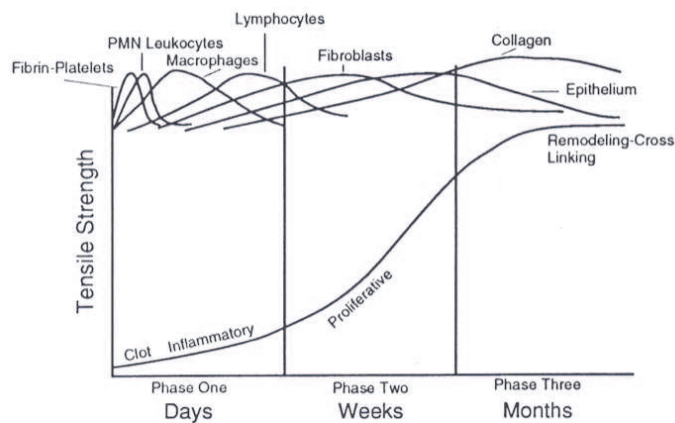
#### 3.2.2.4 La mobilisation

Soslowsky (Peltz, 2009) et son équipe a réalisé une étude comparant différents types d'immobilisation et de mobilisation après chirurgie de la coiffe des rotateurs chez le rat. Le premier groupe a eu une immobilisation totale. Dans le deuxième groupe, il y avait un protocole de mobilisation passive (600 cycles par jour de rotation interne et externe à une fréquence de 1Hz) ou bien de mobilisation passive avec un deuxième protocole (300 cycles par jour de rotation externe simplement à une fréquence de 0,5 Hz). Ces protocoles étaient tirés de différentes études qui avaient montré l'intérêt d'une mobilisation passive chez le chien ou chez l'homme. Après les deux premières semaines post-opératoires, les trois groupes ont eu quatre semaines de mobilisation *ad libitum* pendant une semaine puis augmentation d'une activité physique progressive pendant les trois semaines suivantes. A noter que la mobilité passive des épaules avait été étudiée pour chaque animal avant qu'il ne soit mis dans aucun groupe et à deux et six semaines après la chirurgie. Tous les animaux ont été sacrifiés à la sixième semaine et l'unité muscles – tendons - os a été étudiée d'un point de vue histologique et biomécanique. Concernant la mobilité globale, elle a été moins importante dans les groupes ayant eu une mobilisation passive que dans le groupe ayant eu une immobilisation globale à deux semaines, et a été significativement plus basse pendant les quatre semaines d'autorisation de mobilisation *ad libitum*. De la même manière, la raideur de l'articulation était plus importante dans le groupe qui avait été immobilisé en passif que dans le groupe totalement immobilisé. A six semaines, il n'y avait pas de différence dans les trois groupes concernant l'organisation des fibres de collagène ou bien les propriétés biomécaniques.

Cette étude a permis de conclure que les mobilisations passives post-opératoires immédiates se faisaient au détriment de la mobilisation et de la raideur de l'articulation mais qu'elles ne changeaient pas les propriétés mécaniques ou histologiques de la cicatrisation de la lésion du tendon dans le modèle animal après réparation.

Les auteurs ont supposé que lors de la réalisation d'une mobilisation passive, on aboutissait à la formation d'une cicatrice dans l'espace sous-acromial qui pouvait être responsable d'une diminution de la mobilité et une augmentation de la raideur de l'épaule. Ainsi, d'un point de vue clinique, ils concluaient à la nécessité d'éviter toute mobilisation passive après la chirurgie de la coiffe des rotateurs. Ces données biomécaniques montrent bien qu'il existe au niveau de la cicatrisation une influence certaine sur la cicatrisation.

### La cicatrisation de la peau



**Figure 36: Le phénomène de cicatrisation de la peau est proche de celui du tendon, (Leadbetter, 1992)**

La cicatrisation de la peau est un modèle très proche de celui des réinsertions du tendon sur l'os.

## 4 LA MEDECINE REGENERATIVE : PRINCIPES ET MOYENS

### 4.1 Histoire et Mythologie de la médecine régénérative

On considère aujourd'hui que la notion de médecine régénérative remonte à la mythologie grecque. Prométhée en est la première incarnation. Il est le fils de Japet, le Titan, et de Clyméné (ou Asia). Il est réputé intelligent et rusé et symbolise la révolte des hommes contre les dieux : on prétend parfois que c'est lui-même, et non Zeus, qui a créé l'humanité. C'est par le fait de Prométhée que l'âge d'or, où l'homme n'avait pas à travailler, que Zeus décide de punir les hommes, en leur imposant le travail et faisant disparaître le feu. Afin de défendre l'humanité, Prométhée vole du feu à Zeus et le cache. Mais ce feu est fragile, et à l'image de l'humanité, mortel. Afin de se venger, Zeus envoie aux hommes ce terrible mal qu'est Pandore : la femme. Elle va épouser le frère de Prométhée, Epiméthée, qui désobéissant à Zeus, ouvrira la boîte avec laquelle Zeus l'a créée et libèrera tous les maux de la Terre. Mais cela n'est pas suffisant, Prométhée sera aussi puni. Il est enchaîné sur une montagne et un aigle vient lui manger le foie. Tous les jours. Mais ce foie repousse pendant la nuit, et l'on pense actuellement que les Grecs avaient découvert que cet organe avait la capacité naturelle de régénérer.



**Figure 37 : Prométhée, Nicolas-Sébastien Adam, 1762, Musée du Louvre**



Par la suite Prométhée sera libéré par Héraclès, fils de Zeus. Héraclès par la suite blessera Chiron le centaure, qui, devant des souffrances énorme, échangera son immortalité avec Prométhée, qui lui laissera sa mort. Prométhée, première trace de la régénération de l'organisme, sera immortel. (Comte, 1889). Ainsi s'oppose t'il à Esculape, qui est le Dieu de la guérison et de la cicatrisation, l'organe est réparé mais ne retrouve pas une nouvelle jeunesse, il ne régénère pas.

La notion de médecine régénérative est inhérente à la notion de vie. Si certaines cellules de notre corps ont la capacité de se renouveler d'elles mêmes, et ainsi autoriser la réparation des lésions ou s'adapter au vieillissement, la destinée des cellules est avant tout de vieillir et de s'éteindre (deWitt, 2008). Des tissus comme la peau ou l'os ont une capacité naturelle à cicatriser avec le temps, quelque soit l'âge, alors que d'autres tissus, comme le cœur, ne se régénèrent pas. Les lésions traumatiques, la maladie et l'âge, sont responsables de lésions de notre organisme. La notion de médecine régénérative est apparue à la suite des travaux de John Gurdon (Gurdon, 1971) qui a montré que chez la grenouille, en reprogrammant et stimulant certaines cellules somatiques, elles pouvaient se régénérer. En stimulant le noyau de ces cellules par certaines protéines issues de l'œufs, ou en insérant certains gènes, les cellules somatiques se transformaient en cellules embryonnaires.

## **4.2 Moyens**

### **4.2.1 Principes de la thérapie cellulaire**

Le principe est d'utiliser des structures vivantes pour réparer les organes. Il existe deux grands principes de thérapeutique basés sur l'utilisation des cellules : la fabrication d'organes ou ingénierie tissulaire, et la médecine régénérative utilisant les cellules comme « médicament ».

L'ingénierie tissulaire est basée sur le concept de pouvoir, *in vitro*, créer un organe qui serait implantable et pourrait, immédiatement ou à terme, se substituer à l'organe dans lequel ils sont implantés. Le principe de l'ingénierie tissulaire est d'associer une structure de support (scaffold) à des cellules (cells) et des stimuli (qu'ils soient biologiques ou mécaniques).

Une application clinique existe déjà avec la réalisation de greffe de cartilage à partir de chondrocytes prélevés sur les genoux de patients présentant des pertes cartilagineuses importantes. Ces cellules sont purifiées, multipliées, suspendues dans un support 3D (gel à

base d'agarose) puis implantées chez le patient. Cependant, malgré une publication très importante dans ce domaine, les applications cliniques restent limitées, quelque soit le domaine de recherche (maladies endocriniennes, neurologiques ou cardio-vasculaires...). De nombreuses raisons font progressivement abandonner ce principe :

-Un coût prohibitif

-La difficulté d'intégration des organes développés in vitro, lors de leur implantation in vivo.

-La fragilité des organes développés in vitro

-L'obtention d'organes artificiels imparfaits du fait du manque de l'ensemble de stimuli indispensables à la maturation des organes

De fait, l'utilisation ces cellules, in vivo, dans des conditions de stimuli complexes, pour venir réparer directement des organes lésés, a fait son chemin. C'est le concept de la médecine régénérative. Arriver à obtenir une « régénération » de l'organe non plus en le remplaçant mais en le faisant se modifier et se régénérer par lui même, sous l'influence de nombreux stimuli.

Le principe de la médecine régénérative, très bien décrit par Caplan, est fondé sur la simple observation de la vie de la cellule. Une cellule vit à travers sa naissance, son développement, et sa mort. Chaque cellule, dans sa vie, présente des modifications liées à l'âge. Lors de sa maturation, à la période de sa demi-vie elle va stimuler la production de nouvelles cellules qui viendront lui succéder, assurant en un même temps la notion de turn-over mais aussi de spécificité ou différenciation tissulaire. Ce processus de turnover se fait par l'intermédiaire de médiateurs qui vont avertir les cellules progénitrices de la nécessité, à venir, de cellules pour remplacer celles qui seront bientôt inactives (Wagers 2004 ; Caplan, 1983). Ce turnover sous-entend qu'il existe dans l'organisme des cellules progénitrice qui permettent de donner naissance à des tissus et des organes différents. Ces cellules progénitrices sont appelées cellules souches adultes et sont à l'origine du renouvellement des organes matures lors du phénomène naturel de mort cellulaire.

Que ce soit pour l'os ou le cartilage, il a bien été montré que ces CSM gardent, indépendamment de leur âge, leur capacité intacte à produire des cellules différenciées (Haynesworth 1994) ou à se multiplier. Cette capacité à garder une capacité intacte de produire une matrice, indépendamment de l'âge, a aussi été montrée pour d'autres cellules comme le chondrocyte (Mesa, 2006). Extraire des cellules âgées de leur milieu âgé semble

redonner à ces cellules une nouvelle capacité à produire de manière active leur matrice, comme le feraient des cellules « jeunes ».

La médecine régénérative se base sur les propriétés de ces cellules pour réparer les organes.

#### 4.2.1.1 Les Cellules Souches Mésoenchymateuses Humaines

Les CSM, aussi appelées cellules mésoenchymateuses stromales multipotentes sont des cellules initialement identifiées dans la moelle osseuse adulte (Caplan, 2007) mais présentes dans différents tissus. Elles sont caractérisées d'une part par leur caractère non spécifique et d'autre part par leur capacité à se renouveler pendant une longue période. Elles se définissent comme une population cellulaire hétérogène adhérente au plastique, capable de former des CFU. Elles se différencient des cellules hématopoïétiques par des marqueurs de surfaces CD11b, CD14, CD34, CD45 et HLA-DR négatifs, mais exprimant les marqueurs CD73, CD90 et CD105. Elles ont la capacité de se différencier en différents types de tissus mésoenchymateux (os, cartilage, gras) ce qui définit leur fonctionnalité (Ghannam, 2010).

Elles sécrètent un spectre de produits bioactifs, immunomodulateurs mais aussi impliqués dans la réponse à l'agression, la réparation tissulaire, la régénération. (Dominici, 2006).

##### 4.2.1.1.1 Nombre de CSM

Plus qu'un nombre absolu de cellules, qui n'aurait pas vraiment de traduction clinique, on calcule la présence de CSM en colony Forming unit-fibroblastic. Ces CFU-f correspondent aux zones de régénération. Il est intéressant de noter qu'avec le vieillissement de l'organisme, au niveau de l'os, comme au niveau des autres tissus, le nombre diminue ce qui explique la plus faible capacité des organes à cicatriser spontanément. Mais si le nombre de colonies diminue, chaque colonie conserve une capacité à produire un organe conservant sa fonction, comme chez un sujet jeune. Par exemple, un os âgé conserve ses propriétés intrinsèques de cicatriser, mais de manière moins efficaces, moins rapide que le sujet jeune.

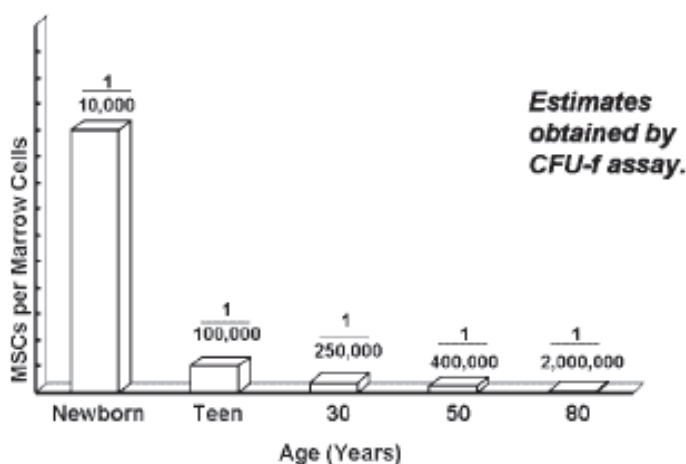


Figure 38 : Nombre de cellules souches mésenchymateuses dans le corps humain: le nombre de CFU diminue avec l'âge (Caplan, 2007)

#### 4.2.1.1.2 Les niches de CSM

Les cellules souches sont souvent localisées dans des environnements cellulaires qui les protègent, appelés niches. Ces niches sont composées des cellules souches elles-mêmes, mais aussi d'autres types cellulaires de soutien qui produisent un environnement riche en facteurs et molécules servant à maintenir l'état indifférencié des cellules souches. La plupart des cellules souches sont localisées dans des niches complexes (que l'on pense aux cellules stromales de la moëlle osseuse, ou dans les organes différenciés). La plupart des cellules souches prolifèrent assez peu dans la niche dans laquelle elles se trouvent. Elles doivent sortir de cet environnement cellulaire pour pouvoir proliférer intensivement et se différencier. Les CSM des différents tissus ont des marqueurs de surface et des propriétés de différenciation qui peuvent différer des CSM osseuses. Plusieurs études font suspecter que certaines niches des CS se trouvent notamment à la périphérie des vaisseaux venant vasculariser les organes. Il existe une relation phénotypique très étroite entre les cellules appelées péricytes des vaisseaux, et les CS des différents organes (Tavian 2005, Kubis 2005, Meirelles, 2005).

#### 4.2.1.1.3 Différenciation des CSM

De très nombreuses publications ont rapporté les capacités des CSM à se différencier en nombreux tissus sous l'influence de stimuli spécifiques. Par définition, elles ont la capacité de former de l'os (Bruder, 1998 ; Kon, 2000), du cartilage (Solchaga, 2005), ou du tissu adipeux.

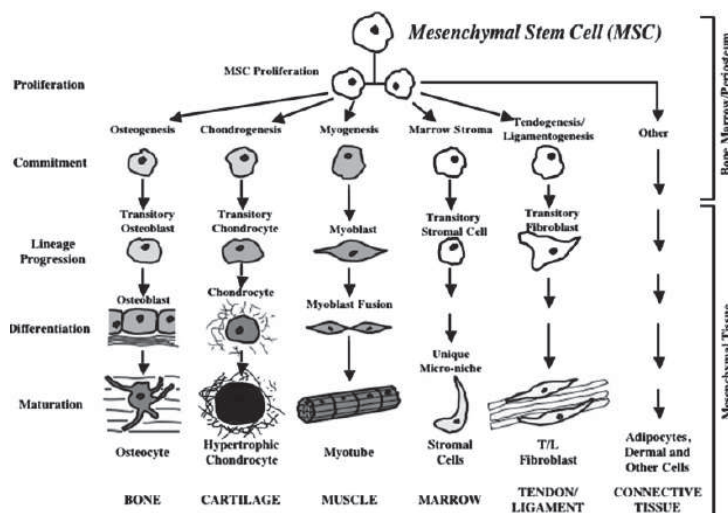


Figure 39 : Les différents type de différenciation des CSM, (Caplan, 1989)

Dans un travail initié lors d'un master, puis finalisé au cours de notre année de thèse, nous avons exploré un aspect particulier de cette différenciation des CSM. Différent stimuli ou conditions sont nécessaires pour obtenir la différenciation des CSM en chondrocytes. Une des possibilités consiste à maintenir les CSM dans une structure 3D avant de les soumettre à des facteurs de différenciation (TGF $\beta$ 3 et IGF). Il est ainsi théoriquement possible de chondrodifférencier des CSM *in vitro* pour ensuite récupérer les chondrocytes. Nous avons exploré dans ce travail (Cohen, 2010) la capacité de récupérer les chondrocytes obtenus après différenciation dans des billes d'alginate de CSM. Nous avons montré que si l'obtention de cellules à phénotype chondrocytaire (exprimant le collagène de type II et Sox9) est possible, elle se fait au prix d'une très forte mortalité (jusqu'à 83%). C'est dans la suite de ce travail que nous nous sommes orientés vers l'utilisation directe des CSM comme agent régénératif, plutôt que par le passage par une différenciation préliminaire.

#### 4.2.1.1.4 Plasticité des CSM

Cependant, plusieurs études ont montré que cette filiation directe des CSM / cellule différenciée était à pondérer. En effet, il existe des possibilités très nettes de modifier les phénotypes des différentes cellules ou bien, à partir de tissus apparemment différenciés d'obtenir, sous certains stimuli, d'autres tissus mésenchymateux différenciés. Cela fait apparaître deux notions importantes :

- il existe une plasticité cellulaire aboutissant à la possibilité de dédifférencier ou de différencier une cellule déjà mature en une autre cellule. On peut, in vitro, fabriquer du cartilage avec du tissu gras.
- Il existe, au sein des tissus différenciés, des CS qui conservent, même si elles sont programmées pour fabriquer un tissu, une capacité à fabriquer d'autres tissus sous l'influence de stimuli spécifiques.

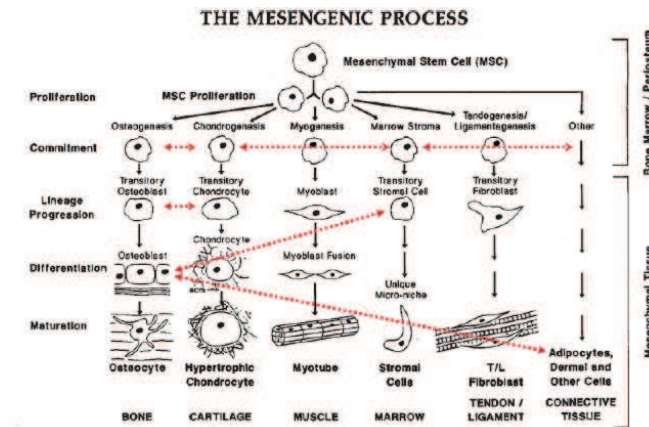


Figure 40 : La plasticité cellulaire des CSM. (Caplan, 2007)

#### 4.2.1.1.5 Activité trophique des CSM

Plus que leur capacité à se différencier, c'est actuellement leur activité trophique, ou paracrine, qui nous semble le plus intéressant chez les CSM. En effet, leur activité réparatrice semble, à travers la littérature, plus liée à leur capacité à stimuler une régénération de l'organe médiée par des facteurs de croissance, qu'à une réelle différenciation cellulaire des CSM en cellule différenciées de l'organe lésé. Cela a bien été montré dans les modèles d'animaux pour des lésions myocardiques : les CSM ne se transforment pas ou peu en cellules musculaires, mais viennent au contact de la lésion et stimulent une réparation tissulaire avec régénéscence possible de l'organe.

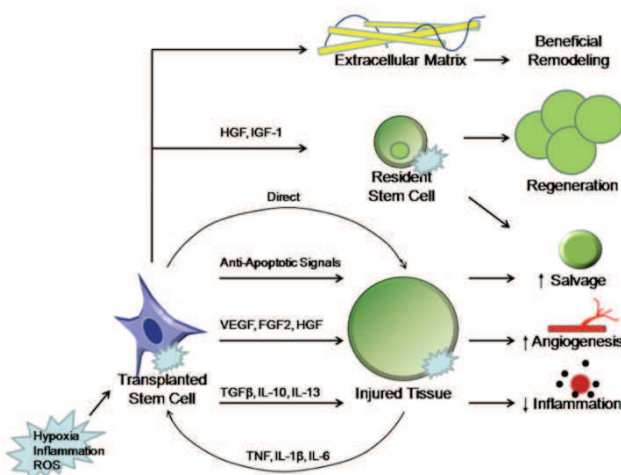


Figure 41: Activité paracrine des CSM : en cas de stimuli spécifiques (hypoxie, inflammation...) les CSM produisent des facteurs pro-régénératifs

#### 4.2.1.1.6 Activité immunorégulatrice des CSM

L'action immunomodulatrice des CSM se fait via des CSM activées par des cytokines proinflammatoires. L'interaction CSM-cellule hôte génère la production de facteurs solubles immunomodulateurs (IL6, NO, PGE2). Leur action se fait non seulement par un blocage des lymphocytes T ( inhibition de production et de reconnaissance) ,mais aussi via leur interaction avec d'autres cellules (Lymphocytes B, neutrophiles, cellules NK). (Ghannam, 2010)

#### 4.2.1.2 iPSCs

Les iPSCs : les cellules souches pluripotentes induites : ce sont des cellules souches pluripotentes, obtenues artificiellement à partir de cellules somatiques adultes différenciées. Les premiers cas rapportés étaient obtenus en forçant l'expression génique de certaines cellules adultes différenciées (Takahashi, 2006 ; Yu, 2007). A partir de ces travaux il a été montré que le forçage de l'expression de certains facteurs de transcription (Oct4, Sox2... ) permettaient de reprogrammer les cellules somatiques humaines ou animales en iPSCs. Dans la grande majorité des cas ces iPSCs sont obtenues à partir de fibroblastes, cellules très faciles à isoler et cultiver, mais aussi d'autres cellules comme les lymphocytes B ou les cellules pancréatiques (Yu, 2007). En dépit de la différence d'origine, ces iPSCs ont des propriétés très proches des cellules souches embryonnaires. Leur capacité de croissance, leur profil d'expression génique, leurs modifications épigénétiques et leur potentiel de développement sont très proches (Geoghegan, 2008).

#### 4.2.1.3 Cellules Souches Somatiques

Des cellules souches adultes ou multipotente somatique sont présentes dans les tissus. Leur fonction dans les tissus est de réparer, maintenir et régénérer les organes vieillissants ou lésés en remplaçant les cellules (Passina, 2006). En général ces cellules indifférenciées sont identifiables aussi bien chez l'animal ou le sujet jeune qu'adulte. Elles sont divisées en différents groupes en fonction de leur morphologie, leur marqueurs de surface, leur potentiel de différenciation et ou leur tissu d'origine (Herberts, 2011). Les cellules souches mésenchymateuses ou hématopoïétiques issues de la moelle osseuse adulte en sont des exemples. Elles ont la possibilité, en dépit de leur âge, de se renouveler, se répliquer et de se

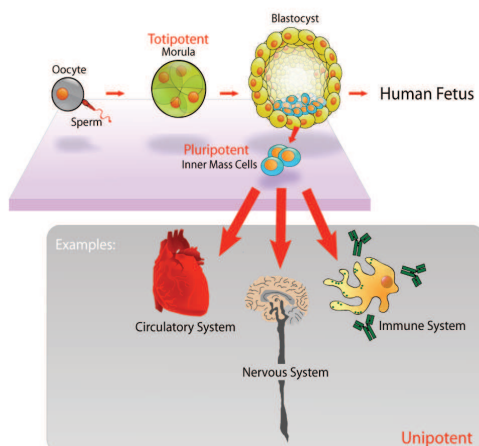
différencier, dans une certaine limite, dans différents tissus qu'elles produisent. D'autres exemples classiques sont les cellules adipocytaires, ou les cellules du sang de cordon.

#### 4.2.1.4 Cellules souches fœtales

Ces cellules peuvent être produites à partir du fœtus ou à partir des structures fœtales extra-embryonnaires. Contrairement aux cellules souches embryonnaires, le risque tératogène n'existe pas (Pappa, 2009). En fonction de leur tissu d'origine (liquide amniotique, cordon ombilical, gelée de Wharton, placenta ou membrane amniotique) leur dénomination varie. Elles sont facile d'accès, à un stade très prolifératif, et sont considérées comme de possibles armes dans la thérapie régénérative, à mi-chemin entre les cellules embryonnaires et les cellules souches somatiques (Herberts, 2011)

#### 4.2.1.5 Les cellules souches embryonnaires :

Les cellules souches embryonnaires se caractérisent par deux propriétés particulières : leur caractère pluripotent, et leur capacité à se répliquer. Leur caractère pluripotent leur permet de se transformer dans les 3 lignées possibles : ectoderme, endoderme et mésoderme ; c'est-à-dire l'ensemble des tissus de l'organisme. C'est la différence avec les cellules souches mésenchymateuses qui sont multipotente, c'est à dire capable de se différencier en différents tissus, mais pas tous. Elles sont obtenues à partir de la masse de cellules internes du blastocyste (morula) de 4 à 5 jours. D'un point de vue éthique, leur obtention nécessite, de fait, la destruction de l'embryon.



**Figure 42: Obtention des ES*c* : les cellules obtenues à partir de la morula, permettraient de fabriquer l'ensemble des tissus de l'organisme.**



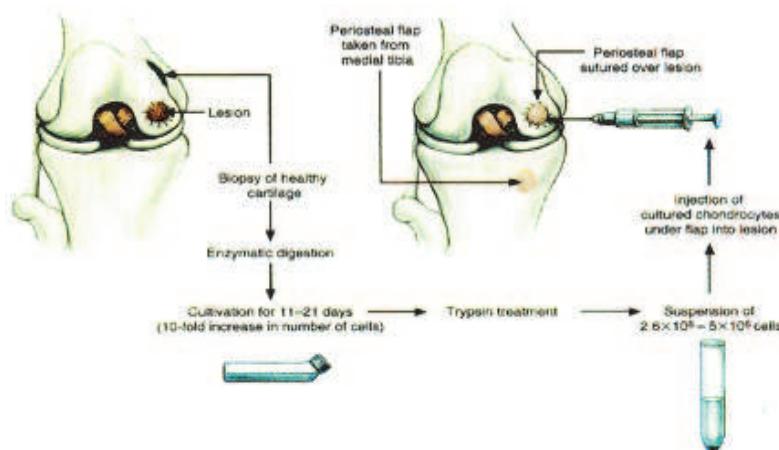
#### 4.2.1.6 Les chondrocytes

Le chondrocyte est une cellule différenciée qui dérive des cellules mésenchymateuses au cours du développement embryonnaire. Cette différenciation se traduit par la synthèse de protéines caractéristiques comme les collagènes II, IX et XI ainsi que l'agrécane. Ce phénotype est maintenu dans les cartilages stables tels que le cartilage articulaire. Dans le cartilage de croissance, ces cellules se différencient en chondrocytes hypertrophiques pour permettre l'ossification endochondrale. Les chondrocytes hypertrophiques synthétisent du collagène de type X et sont entourés d'une matrice qui se calcifie (Chevalier 1998).

Les chondrocytes représentent 10% du volume du cartilage. Le nombre de cellules varie d'une articulation à l'autre et diminue chez un sujet à partir de l'âge de 20 ans. Elles sont noyées dans une abondante matrice extra-cellulaire et n'ont pas de contact direct entre elles (Chevalier 1998).

Le chondrocyte a longtemps été considéré comme une cellule quiescente. Depuis les années 70-80, les chondrocytes sont considérés comme des unités fonctionnelles et métaboliques responsables de l'homéostasie de la matrice cartilagineuse. Chaque cellule possède tous les organelles nécessaires à la synthèse et à la maturation des protéines intra et extracellulaires. Le chondrocyte libère des facteurs cataboliques et anaboliques qui régulent la synthèse des protéines matricielles (collagènes, protéoglycanes, glycoprotéines de structure) et des enzymes de dégradation (métalloprotéases matricielles MMP, agrécanases) (Chevalier 1998; Aigner 2002).

Ils sont actuellement utilisés dans des études cliniques et greffés dans des lésions cartilagineuses.



**Figure 43 : Principes de la thérapie cellulaire du cartilage à partir de chondrocytes autologues.**

## 4.2.2 Les scaffolds

Afin de pouvoir greffer des cellules dans un organe, il est nécessaire d'avoir un support, temporaire ou définitif, qui contient les cellules et leur permet d'agir sur l'organe cible. Les supports, ou scaffold, sont extrêmement nombreux.

La fibrine glue est une des « scaffolds » les plus fréquemment utilisées en ingénierie tissulaire ou thérapie cellulaire comme support résorbable transportant les cellules (Ahmed, 2008). Elle associe du fibrinogène purifié à de la thrombine. Depuis plus de 30 ans, elle est utilisée en pratique clinique de par ses propriétés hémostatiques et ses capacités à venir combler les lésions. En ingénierie tissulaire elle a un double rôle : transporter les cellules mais aussi permettre le développement d'une matrice. Par ailleurs, de part ses propriétés d'adhérence, elle permet de délivrer et de fixer les cellules en un lieu précis, ce qui va garantir la prolifération locale des cellules injectées (Marlovits, kssa). La vitesse de polymérisation de la fibrine glue va dépendre du contenu du gel en chacun des composants (fibrinogène et thrombine) ainsi que de la quantité de cellules contenues dans la thrombine. Un des intérêt de ce gel est de pouvoir facilement être mélangé à d'autres substances, comme l'acide hyaluronique ou la chondroïtine-6 Sulfate (Chou, 2007)

## 4.3 Modèles animaux et médecine régénérative.

### 4.3.1 Principes généraux

Un des principaux problèmes de la médecine régénérative est de pouvoir valider son utilité avant de passer au stade clinique chez l'homme. Cela ne peut se faire sans passer par des modèles animaux, dont la concordance avec la clinique doit être la plus proche possible. En effet, la plupart des modèles utilisés est réalisée sur des mécanismes lésionnels récents, ne tenant pas en compte le caractère chronique et donc multifactoriel des pathologies traitées par la médecine régénérative. Sah (Sah, 2010) a rapporté les pré-requis nécessaires au développement de la médecine régénérative dans une revue sommant les éléments indispensables pour que la médecine régénérative soit utilisée dans des conditions translationnelles, c'est-à-dire le plus proche possible des modèles humain, afin d'obtenir une application clinique rapide.

Le développement de ces modèles doit répondre à 4 questions fondamentales :

- 1) D'un point de vue clinique, quels sont les problèmes tissulaires ou organiques qui peuvent être traités par la médecine régénérative ?
- 2) Existe-t'il des modèles adaptés de manière spécifique à chaque lésion traumatique ou dégénérative des organes qui nous permettent d'évaluer l'efficacité, les mécanismes et la sécurité des thérapies envisagées ?
- 3) Avons-nous besoins de modèles animaux standardisés ? Et si oui, est-il possible de développer ces modèles, et comment ?
- 4) Quelles sont les voies de recherches translationnelles et régénératives pour ces lésions ou maladies qui permettraient, rapidement, d'aboutir à des études cliniques ?

#### 4.3.2 Modèles animaux pour la coiffe des rotateurs

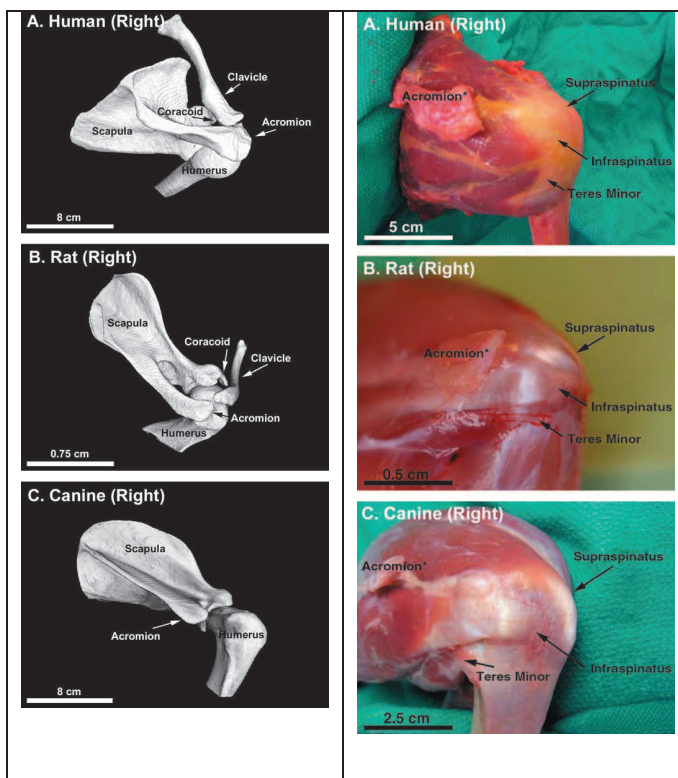
##### 4.3.2.1 Problématique clinique

Comme nous l'avons souligné, la pathologie de la coiffe des rotateurs est une cause très fréquente de consultation des patients. En l'absence de réparation des tendons de la coiffe, chez des patients jeunes, la lésion ne peut cicatriser seule, et cela aboutit à une lésion diffuse multi-tissulaire de l'épaule (cartilage, os, muscle). Avec le temps cette lésion, en l'absence de réparation, va s'étendre et devenir non réparable (Matthews, 2006). Il y a donc, en cas de plainte fonctionnelle, et après échec du traitement médical, une indication à tenter de réparer ces tendons, ce qui permet de stopper le vieillissement accéléré de l'épaule. Malgré une meilleure compréhension de cette pathologie et des techniques chirurgicales de plus en plus complexes, le taux d'échec des réparations reste élevé (20 à 95%). Ces échecs peuvent être de 2 types : soit absence de cicatrisation, soit nouvelle déchirure après cicatrisation).

Les facteurs impliqués dans ces échecs sont nombreux : l'âge du patient, la taille de la lésion, le tabac, l'ancienneté de la lésion, la qualité du muscle et la qualité du tendon, mais aussi la technique chirurgicale et la capacité de l'organisme à cicatriser (Derwin, 2010). Le taux important d'échec de réparation pousse actuellement les praticiens à traiter ces lésions le plus tôt possible, afin de diminuer le taux d'échec. Mais, la grande majorité des patients traités présente des lésions anciennes. Il est pour cela important d'arriver à obtenir des modèles animaux correspondant aux conditions dans lesquelles la chirurgie reste peu efficace. Il faut valider des thérapies permettant d'augmenter les capacités à cicatriser et renforcer la qualité de la cicatrisation.

Ainsi le modèle parfait serait possiblement :

- 1) une anatomie osseuse et musculo-tendineuse proche
- 2) une fonction de l'épaule proche de celle de l'homme
- 3) une pathogénie péri-articulaire
- 4) des conditions évocatrices de lésions chroniques
- 5) une taille de tendon permettant un geste de réparation chirurgicale
- 6) un taux global de cicatrisation proche de celui de l'homme
- 7) l'absence de cicatrisation spontanée du tendon
- 8) l'accès aux tests mécaniques après réparation
- 9) la possibilité d'exploration par l'imagerie de données cliniquement intéressantes
- 10) la présence d'une amyotrophie musculaire irréversible après lésion tendineuse.



**Figure 44 : Aspect osseux et macroscopique d'une épaule humaine, de rat et de chien. (Derwin, 2010)**

#### 4.3.2.2 Modèles actuels

#### 4.3.2.2.1 Le rat

Soslowky est le premier à avoir exploré l'épaule du rat et a montré des similitudes en terme d'anatomie, mais aussi de fonction (travail en élévation) (Soslowky, 1996). L'acromion, comme chez l'homme, vient couvrir le sus épineux et limiter en avant l'espace de travail des muscles. Les tendons sont séparés les uns des autres, alors que chez l'homme, ils fusionnent à leur insertion. C'est généralement le tendon du sus-épineux qui est exploré chez le rat, car son fonctionnement est proche de celui de l'homme. C'est pourquoi, ce modèle a beaucoup été étudié pour explorer la pathogénie extrinsèque des lésions de la coiffe des rotateurs. (Soslowky, 1996 ; Soslowky, 2002 ; Wurgler-Hauri 2007). C'est un modèle utilisé aussi pour explorer les données biomécaniques, la cicatrisation et les thérapies adjuvantes régénératives, dans les lésions aiguës de désinsertion du tendon sur l'os. Du fait du faible coût global de ce modèle (prix des animaux, de leur hébergement...), et de l'existence d'outils couramment utilisés en recherche fondamentale, il est possible de réaliser de nombreux cas, ouvrant la porte aux études moléculaires, histologiques, ou immuno-histologiques. Dans ce modèle, jusqu'à notre travail, il avait été montré que le taux de cicatrisation était de 100%. Ce qui en a fait un modèle pratique pour explorer l'effet de thérapies adjuvantes, comme les facteurs de croissance ou renfort de coiffe, qui ne peuvent agir que s'il existe déjà une cicatrisation naturelle (Murray, 2007). Un des intérêts de ce modèle est aussi de pouvoir contrôler la charge appliquée sur la zone de réparation entre l'os et le tendon (immobilisation plâtrée, paralysie musculaire, ou mobilisation libre voire exercices quotidiens) (Gimbel, 2007 ; Thomopoulos, 2003 ; Murray, 2007). Par ailleurs, ce modèle autorise une chirurgie bilatérale, permettant de comparer 2 techniques et la réparation des 2 tendons (Galatz, 2005 ; Gimbel, 2004). Les lésions chroniques s'accompagnent d'une amyotrophie et infiltration graisseuse comme chez l'homme (Barton, 2005).

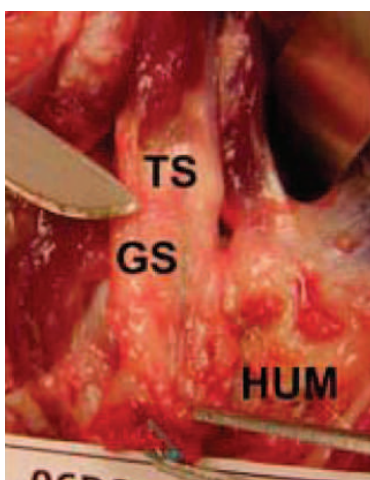
Certaines limites doivent pondérer l'intérêt de ce modèle en thérapie régénérative :

- 1) l'amyotrophie après lésion tendineuse semble rendre toute chirurgie impossible.
- 2) il n'y a pas d'échec de cicatrisation, puisque une cicatrisation apparaît spontanément, ce qui ne permet pas d'explorer ce phénomène fondamental.
- 3) la petite taille des tendons ne permet pas d'explorer les différentes techniques chirurgicales.

#### 4.3.2.2.2 Les gros animaux

Quatre animaux sont utilisés de manière régulière pour explorer la coiffe des rotateurs : le lapin, la brebis, le mouton et le chien (Uthoff, 200 ; Gerber, 1999 ; Schlegel 2006 ; Oguma, 2001). Contrairement aux rats, dans ces modèles, l'anatomie osseuse est différente de celle de l'homme. L'acromion, la coracoïde ou la clavicule peuvent être absents, et ainsi la coiffe n'est pas recouverte (Derwin, 2010). La coiffe aussi est différente. Celle-ci est extra-synoviale et extra-articulaire, alignée plus que convergente, et sans mélange des tendons à leur insertion. L'intérêt principal de ces modèles est de pouvoir réaliser une lésion bien visible et de varier les techniques de réparation. Cependant, dans ces études, ce sont des réparations sur tendons fraîchement lésé qui sont réalisées dans la littérature. En revanche, du fait de la taille des lésions, il a souvent été utilisé pour évaluer l'injection de facteurs de croissance, d'interposition de scaffold ou de renfort part substitut de coiffe (Seeherman 2008 ; Mc Adams 2007 ; Chen 2007 ; Dejardin 1999 ; Nicholson 2007).

Coleman (Coleman, 2003) a montré chez le mouton que le fait de détacher le tendon abouti à une rétraction tendineuse importante en 6 semaines, associé à une atrophie et enraidissement musculaire. Cela en fait un bon modèle pour étudier l'infiltration graisseuse mais, encore une fois, un volumineux tissu cicatriciel apparaît entre le tendon et l'os rendant difficile d'objectiver un échec de cicatrisation (Derwin, 2007) puisqu'il n'y a plus de solution de continuité. Dans ces modèles animaux, il existe un taux important d'échec de réparation. Cependant, ces échecs sont, à priori, le fait de conditions mécaniques intenses, ne prenant pas en compte le phénomène de cicatrisation ; les échecs de réparation sont des échecs précoces, comme cela a été démontré en marquant les berges de la réparation tendineuse par des billes radio-opaques chez le chien (Derwin, 2007).



**Figure 45: Aspect de néo tendon après échec de réparation du tendon du supra-épineux (TS) sur l'humérus (hum) de chien. GS : le tissu cicatriciel pouvant être pris pour un tendon (Derwin, 2007)**

Il existe plusieurs limites à l'utilisation de gros animaux. Ce sont des animaux marchants, qui n'utilisent pas leur membre supérieur comme l'homme. Les sollicitations mécaniques sont

majeures, du fait du poids des animaux. Tous ces animaux, comme le rat, donnent formation à une cicatrice fibreuse entre le tendon libéré et l'os. Ce tendon a parfois des propriétés visuelles, mécaniques et histologiques proches du tendon. (Gerber, 1999). Ces modèles ont un tel taux de rupture en cas de chirurgie qu'ils sont considérés comme de mauvais modèles pour les thérapies régénératives puisque le tendon ne reste pas au contact de l'os et il n'est donc pas facile de maintenir le produit à la zone de cicatrisation.

## **5 VALIDATION D'UN MODELE ANIMAL DE LESION DEGENERATIVE DE L'ENTHESE**

### **5.1 Objectifs**

L'expérimentation animale est une technique permettant, à un stade préclinique, d'étudier l'effet putatif d'une thérapie dans des conditions proches de celle de l'organisme humain ; en ingénierie tissulaire comme en thérapie cellulaire appliquée à l'appareil locomoteur, que cela concerne l'os, le tendon, le cartilage ou le muscle, les modèles animaux sont très fréquemment utilisés car ils permettent de cibler l'action d'une thérapie sur un organe facilement individualisable. Un des biais principaux de ces expérimentations animales, surtout dans le domaine de la thérapie régénérative, vient de l'âge physiologique de ces animaux. Peu d'études se servent d'animaux âgés ou de modèles proches d'un âge physiologique, correspondant à la population ciblée par la thérapie. Gerber (1999) a montré que lorsque l'on fait une désinsertion de coiffe chez la brebis, lors d'une reprise chirurgicale à 4 semaines, il existe un néo-tendon formé, rendant difficile l'interprétation des résultats. Les études actuellement publiées sur la cicatrisation de l'enthèse ne tiennent ainsi pas compte, jusqu'à ce jour, de son vieillissement et ainsi la conservent lors des détachements tendineux. Les capacités naturelles de cicatrisation sont donc conservées, par la présence de ces enthèses. Nous nous sommes attaché à essayer de valider un modèle du petit animal, impliquant une enthèse, mais dont la capacité naturelle de cicatrisation était altéré, comme cela est retrouvé chez l'être humain. Vouloir utiliser des thérapies régénératives sur des organes non lésés et aux capacités de cicatrisation naturelle conservées nous semblait un biais important pour juger de l'efficacité de ces thérapies.

Un des objectifs associés était de pouvoir quantifier le taux de cicatrisation pour connaître l'effet de la thérapie adjuvante sur la notion la plus importante : l'échec ou la réussite de la réparation. A ce jour, aucune étude publiée ne rapporte de taux de cicatrisation. La raison en est la tendance naturelle à la cicatrisation que nous venons d'évoquer. Cette notion nous paraissant fondamentale, nous avons recherché et validé des critères objectifs d'échec de cicatrisation.



## 5.2 Matériel et méthodes

Tous les animaux ont été utilisés en accord avec le Comité d’Ethique et le département animalier de l’Université Pierre et Marie Curie. L’autorisation (P3/2008/003) a été reçue de l’Université Pierre et Marie Curie (Comité Régional d’Ethique pour l’Expérimentation Animale – Ile-de-France – Paris – Comité 3).

Des rats wistar de 4 jours ont été utilisés pour obtenir les cellules, des rats wistar de 3 mois pour réaliser la chirurgie. Un total de 142 rats a été opéré. Du fait d’incidents pendant les tests mécaniques ou les coupes histologiques, la chirurgie a été faite afin d’obtenir un minimum de 6 pièces pour chaque étape biomécanique et 4 pour chaque étude histologique. Ainsi 52 animaux ont été utilisés dans le groupe G1, 51 dans le groupe G2, et 39 dans le groupe G3.

### 5.2.1 Etudes préliminaires

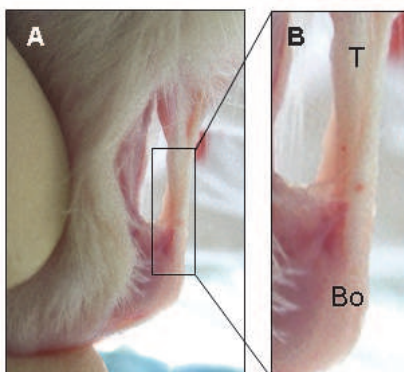
Les lésions dégénératives de l’enthèse chez l’homme entrent dans le cadre d’une pathologie globale de l’épaule associant différentes pathologies. A des lésions tendineuses (Goutallier, 2004), s’ajoutent des lésions musculaires (Goutallier, 1994) ainsi qu’une disparition de l’enthèse (Goutallier 2004) et de la cellularité du tissu osseux de la tête humérale (Galatz, 2005). Nous avons initialement voulu inclure l’ensemble de ces données dans notre modèle dégénératif.

Afin de trouver un modèle adapté à notre étude, nous avons besoin de 3 critères :

- obtention maîtrisée de cellules (chondrocytes et cellules souches mésenchymateuses),
- accès possible aux tests biomécaniques,
- identification facile des structures étudiées (tendon/enthèse/muscle/os)

Il nous est paru impossible d’obtenir ces trois critères dans le modèle murin du fait de la taille des organes et de la difficulté d’obtenir des cellules souches mésenchymateuses.

Nous nous sommes tournés vers le modèle du rat dont plusieurs publications avaient déjà été faite sur le tendon d’Achille.



**Figure 46: A /B: Aspect macroscopique du tendon (T) et de la zone d’insertion (Bo) du tendon sur le calcaneum de rat wistar 3 mois.**

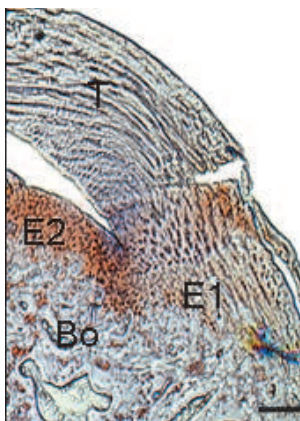
Nous avons choisi des rats mâles de 3 mois, correspondant à l'âge adulte, le genre permettant d'éviter toute influence de l'imprégnation hormonale.

La première étape consistait à valider la présence d'une enthèse bien individualisable à la jonction entre l'os et le tendon.

Dix animaux ont été sacrifiés. Le bloc comprenant calcanéum et tendon d'Achille ont été prélevés et l'ensemble des tissus environnant a été retiré.



**Figure 47 :** Le tendon d'Achille de rat est un modèle très intéressant car c'est une structure individualisée, permettant facilement d'identifier le muscle, le tendon et l'os.



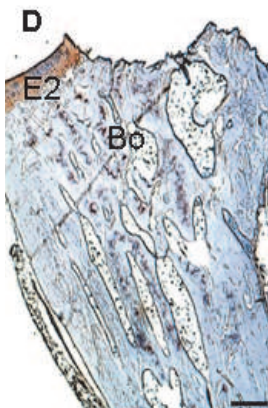
**Figure 48 :** Coupe histologique de la zone d'insertion du tendon sur l'os. Immunocoloration collagène II. T : tendon, E1 enthèse de fixation, E2 enthèse de glissement, Bo : calcanéum. Les 2 zones de l'enthèse sont bien individualisées par le riche contenu en collagène de type II. Barre : 200

Dans un premier temps nous avons voulu réaliser un modèle le plus proche possible de la pratique clinique et avons réalisé de simples désinsertions du tendon d'Achille puis nous avons fermé la peau. Les animaux ont été sacrifiés à J15, 30 et 45. Quelque soit le stade, nous avons systématiquement objectivé la présence d'un tissu fibreux apparaissant entre le calcanéum du rat et le moignon rétracté du tendon. Ce tendon néoformé mesurait systématiquement plus de 1 cm. La rétraction musculaire était telle qu'il n'a jamais été possible de venir fixer le moignon tendineux sur le calcanéum. Dans ces conditions, ce

modèle ne pouvait être utilisé pour notre étude. L'intérêt de cette étude a été de montrer que même en cas d'absence de réparation du tendon, il apparaissait, très rapidement, un néo tendon dont la longueur était systématiquement supérieure à 1 cm. Nous nous sommes servis de ces données pour valider nos critères d'échec de réparation : toute réparation aboutissant à un tendon de plus de 1 cm a été considéré comme un échec de réparation, même si un tendon semblait en place, considérant que ce tendon n'était pas un succès de réparation mais bien un échec de réparation couplé à une apparition de néo tendon.

Ne pouvant utiliser ce modèle nous avons voulu approcher un modèle dégénératif et avons décidé de détruire mécaniquement l'enthèse afin d'avoir des conditions de cicatrisation plus proche de l'état physiologique de l'être âgé.

Dans un premier temps, cinq animaux ont été sacrifiés et les tendons d'Achille ont été sectionnés à 1 mm de leur insertion afin d'éviter de conserver de l'enthèse dans le tendon. En utilisant une curette, la zone native d'insertion a été retirée du sommet du calcanéum. Les calcanéums des 5 animaux ont été passés en histologie (cf protocoles histologiques) avec réalisation de coupes dans l'axe du calcanéum passant par le sommet. Une coloration du collagène de type II a été réalisée afin de mettre en évidence une zone restante de fibrocartilage.



**Figure 49: Aspect histologique du tendon du calcanéum (Bo) après destruction mécanique de l'enthèse de fixation du tendon. La zone E2 de glissement du tendon est respectée, la zone E1 de fixation du tendon est totalement détruite.**

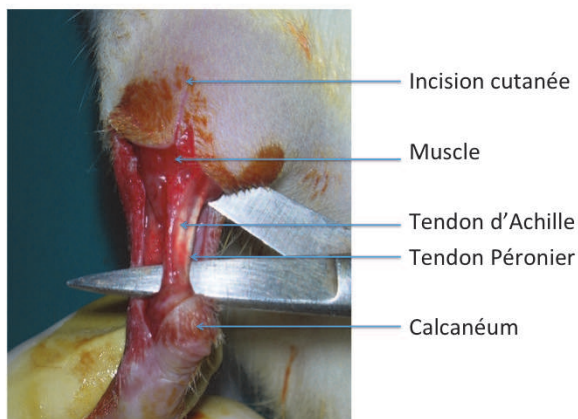
Sur les dix prélèvements réalisés, une lecture en double aveugle des coupes histologiques a été réalisée. Dans tous les cas, l'enthèse de fixation était retirée en entier, ne laissant que l'enthèse de glissement. Il n'y avait pas de différence entre les 2 lecteurs ( $\kappa=1$ ). Cette technique de destruction était donc facile, reproductible et fiable.

### 5.2.2 Technique chirurgicale

L'ensemble des animaux opérés dans cette étude a bénéficié de la même technique chirurgicale. Afin de valider notre modèle, le premier groupe n'a bénéficié d'aucune injection cellulaire concomitante.

Les animaux ont été opérés sous anesthésie générale. Celle-ci était réalisée par inhalation d'isoflurane. Les animaux étaient allongés sur le dos, sur une plaque chauffante pour éviter toute hypothermie. La patte droite était systématiquement opérée, laissant la patte gauche indemne de toute chirurgie, comme recommandée par le comité d'éthique. La patte était rasée puis badigeonnée avec de l'alcool iodé afin de réaliser une antiseptie locale.

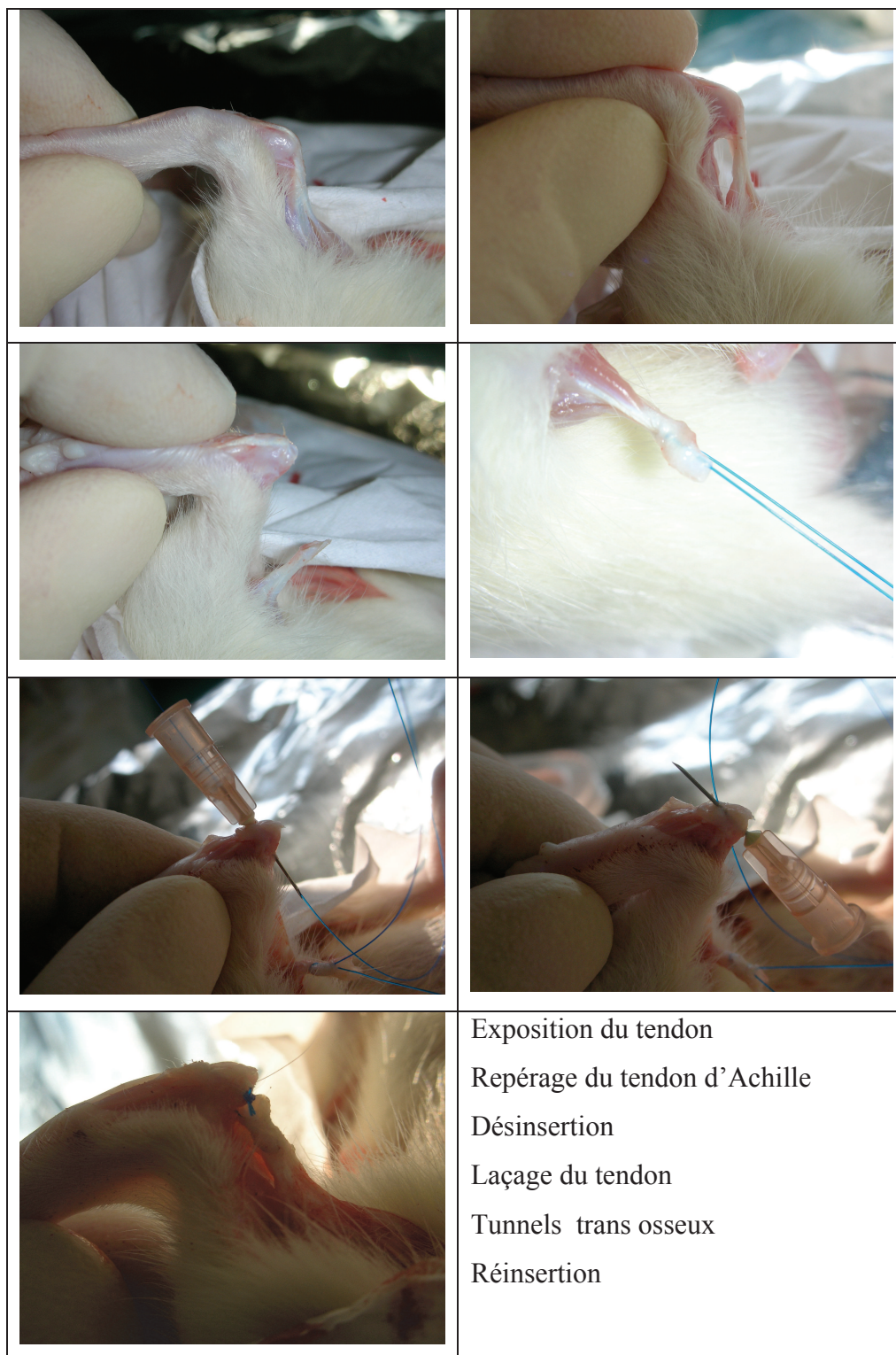
A l'aide d'un bistouri lame 11, une incision de 1 cm était réalisée sur le bord médial de la jambe de l'animal et le tendon d'Achille était exposé. Celui-ci était systématiquement sectionné à 1 mm de son insertion sur le calcanéum.



**Figure 50 : Aspect classique du tendon d'Achille avec, juste à ses côtés, le tendon péronier latéral.**

L'enthèse est détruite avec la curette afin d'éviter de refixer directement le tendon sur le fibrocartilage. Un fil non résorbable de 4/0 (ethibon) est passé dans le tendon en réalisant un point de Kessler afin d'éviter les déchirures. A l'aide d'une aiguille de 18G, 2 tunnels trans-osseux sont réalisés dans le calcanéum, à sa face supérieure, afin de venir rattacher le tendon. Le nœud de fixation a toujours été réalisé sur le bord latéral de la réparation afin d'éviter que l'animal ne marche dessus, ce qui risquait de blesser la peau et d'être la source d'une infection secondaire. La peau était ensuite fermée par des agrafes qui étaient retirées à J7.

Les animaux étaient stockés 2 par cage, sans restriction autre de déplacement, avec une injection intra-péritonéale d'antalgiques.



**Figure 51 : Technique chirurgicale de réparation du tendon d'Achille de rat**

### 5.2.3 Validation des critères objectifs de cicatrisation.

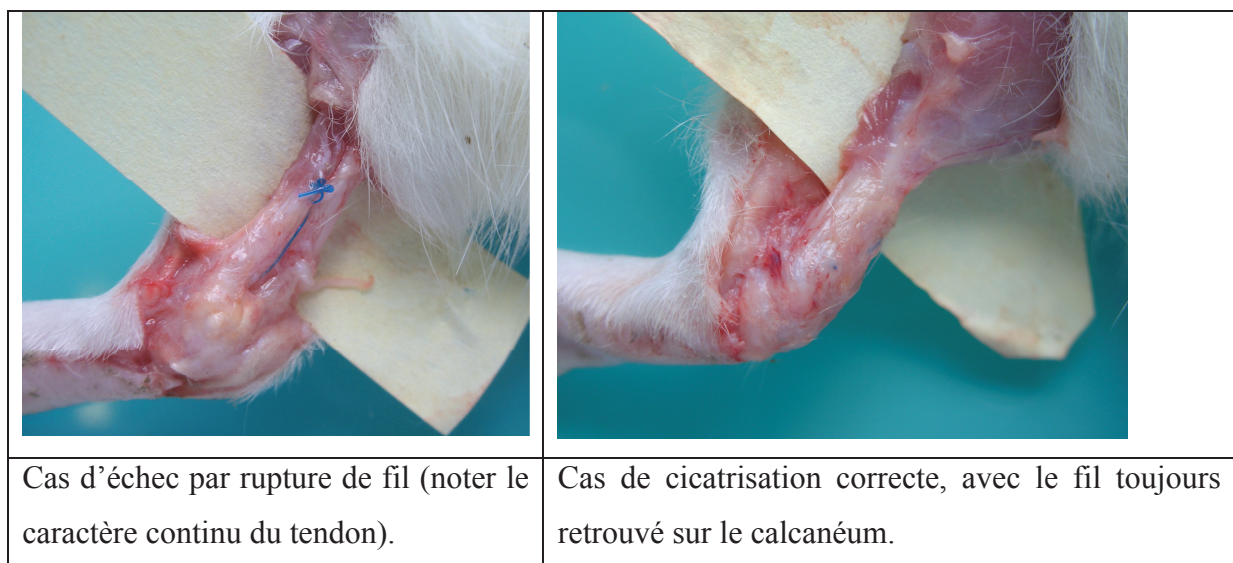
Trente animaux ont bénéficié de la réparation du tendon d'Achille sur un calcanéum sans enthèse. Les animaux ont été sacrifiés par groupe de 10 à J15, J30 et J45 après la chirurgie.

En se fondant sur nos données préliminaires, nous avons décidé que retrouver un tendon continue, mais dont la longueur (c'est-à-dire la longueur entre le calcanéum et le muscle) était supérieure à 1 cm était un échec de réparation, par formation d'un néo-tendon après arrachage du fil.

Nous avons ainsi objectivé 3 critères d'échec :

- 1) distance calcanéum – muscle > 1 cm
- 2) rupture de suture
- 3) déchirure du tendon avec gap entre le tendon et le calcanéum

L'ensemble des pièces prélevées a été analysé en double lecture (CS+GN) et la simplicité de nos critères objectifs a permis d'obtenir une parfaite corrélation entre les 2 observateurs.



**Figure 52 : Aspect macroscopiques du tendon après réparation**

Ces critères de cicatrisation, dans une population d'animaux opérés sans injection de cellules, ont permis d'objectiver un taux global de cicatrisation de 40%.

Quelque soit le délai, il y avait, dans chaque groupe, 60% d'échec (J15, J30, J45).

Après avoir examiné les pièces pour rechercher le taux de cicatrisation, les pièces ont été réparties en deux groupes. Pour chaque période, huit pièces étaient destinées à la biomécanique, deux à l'histologie.

#### 5.2.4 Validation de l'échelle histologique et dégradation de l'enthèse

Préparation des échantillons.

Afin d'obtenir des données histologiques, les échantillons ont été fixés dans du PFA à 3,7%, ils ont été décalcifiés puis ensuite inclus dans de la paraffine pour obtenir des coupes de section de 5µm d'épaisseur dans le plan sagittal. Un immuno-marquage a été réalisé pour le collagène de type II et une coloration a été réalisée au bleu Alcian pour obtenir le glycosaminoglycane.

La production de la néo-enthèse et son organisation étaient analysées en utilisant deux échelles histologiques que nous avons développées.

La néo-enthèse à 15, 30 et 45 jours a été évaluée en mesurant la production locale de collagène II à la jonction entre l'os et le tendon, la production de glycosaminoglycanes ainsi que la présence de cellules à la jonction os-tendon. Cette évaluation s'est faite avec une augmentation de la taille x 25.

Dans un deuxième temps, l'organisation même de l'enthèse à 45 jours après la chirurgie a été qualifiée en explorant 4 échantillons pour chaque groupe avec un grossissement à x100. Un score histologique a été attribué pour chaque critère suivant :

- Le pourcentage de contact entre l'os et le tendon avec production locale de collagène II,
- L'organisation du collagène II,
- L'organisation des chondrocytes,
- La production du glycosaminoglycane.

Three columns used to define production of an enthesis

Points	Cells at bone-tendon junction	Type II collagen at bone-tendon junction	GAG content	Type II collagen organisation	Chondrocytes organisation
Magnification	X 25	X 25	X 25	X 100	X 100
1	No	< 25%	No	No	No cells
2	Clusters	25 to 50%	Isolated area	Isolated patches around a few cells	Isolated cells
3	Large areas	50 to 75%	Large areas	Focal area	Clusters
4	Over the whole junction	> 75%	Over the whole junction	Covering bone-tendon junction	In columns

Four columns used to define enthesis organisation

4 points x4 columns: native enthesis scores 16

Figure 53: Echelle histologique de caractérisation de l'enthèse

Une lecture en triple aveugle a été réalisée (CS, NG et GN). La validation du score a été obtenue lorsque nous avons mis en évidence qu'en absence de production de l'enthèse un score inférieur à 5 était systématiquement obtenu, alors que sur les coupes d'enthèses native, un score de 16 était systématiquement obtenu ( $p < 0,05$ ).

La variation inter-individuelle du score histologique était très bas avec un taux de corrélation pour chaque critère très bas ( $p = 0,003$  jusqu'à  $p = 10^{-13}$ ). Cela montrait qu'il existait une lecture simple et reproductible des coupes histologiques et que chaque critère était important dans la description de l'enthèse. Un test de Student n'a pas retrouvé de  $p$  statistiquement significatif entre les critères ce qui signifie qu'ils étaient tous indépendants et que la positivité d'un critère n'impliquait pas forcément la positivité ou la négativité d'un autre. Cette indépendance soulignait l'importance de chacun de ces 3 critères dans la description histologique de l'enthèse. Trois critères étaient relativement corrélés : le pourcentage de contact entre l'os et le tendon, le type de collagène produit et la présence de cellules au niveau de la jonction entre l'os et le tendon ( $p < 10^{-16}$ ). Le pourcentage de contact entre l'os et le tendon était aussi corrélé à la présence de collagène II ou de glycosaminoglycanes ( $p < 0,002$ ) mais ces corrélations n'étaient pas surprenantes dans la mesure où les cellules ajoutées ont



induit la production d'une matrice de type collagène II ou de glycosaminoglycane.

#### 5.2.5 Validation de la machine de test biomécanique.

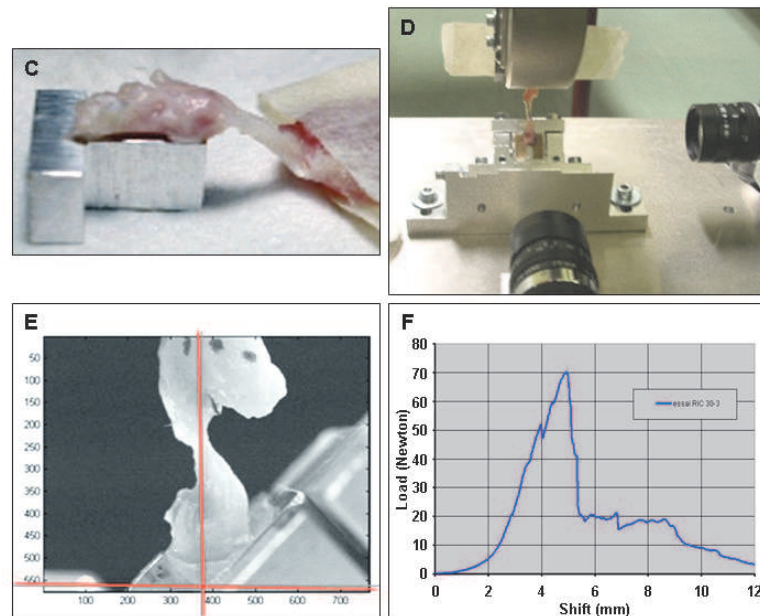
Lors du sacrifice des animaux à chaque période de test (J15,J30,J45), des pièces composées de l'unité comportant le calcanéum, le tendon et la partie distale du muscle de la loge postérieure de la jambe ont été prélevées ensemble. Ils ont été mis dans du papier imbibé de sérum physiologique, entouré d'un container en plastique et conservé à -20°C.

L'ensemble des échantillons correspondant à une même période de test était décongelé à température ambiante pendant 12 heures et testé lors de la même séance afin d'éviter tout biais lié au temps de décongélation ou aux conditions de test (température, humidité). Les tests ont été réalisés dans des conditions proches de la physiologie (Blum, 2007, 39) en appliquant une force de traction sur le tendon positionné à 135° de l'axe du calcanéum comme cela est recommandé dans d'autres études biomécaniques portant sur le tendon d'Achille (Best, 1993, 40). Ces conditions ont nécessité le développement par l'ENSAM d'un protocole de fixation et d'un système de traction spécifique. La partie plantaire du calcanéum était collée sur un petit support d'acier de 3mm de large qui était ensuite inclus dans une petite boîte d'acier (13 x 13 x 10mm) (figure 55). La partie proximale du calcanéum sur laquelle venait se fixer le tendon était laissée libre alors que la partie distale du calcanéum était incluse dans une résine dentaire (Lang dental, Wheeling, IR, USA) (figure 5). Ensuite, la petite boîte contenant le calcanéum était fixée sur un support triangulaire qui permettait d'avoir une inclinaison de 135° du calcanéum par rapport à l'axe de traction de la machine (modèle 5.5.6.5, Instrom, Canton, MA, USA). La base triangulaire était mise sur une plateforme ajustable qui permettait d'aligner l'axe du tendon avec l'axe de la machine. La partie proximale du calcanéum était mise juste dans l'axe de la machine qui a été repérée grâce à une aiguille. L'utilisation de caméras CCD placées à 90° l'une de l'autre et autour de l'exemple permettait de vérifier la position du tendon de manière reproductible (figure 54). La partie fibreuse du muscle du calcanéum était retirée laissant simplement son aponévrose. Un scotch de laboratoire double face a été placé sur cette aponévrose après avoir laissé 3mm de la partie distale du tendon. La fixation s'est faite entre l'aponévrose et le scotch par l'utilisation de colle super glue. Ce scotch double face était la zone dans laquelle une mâchoire spécifiquement dessinée venait permettre de réaliser la traction sur l'ensemble de l'échantillon. La longueur globale de l'échantillon était définie par une pré-charge de 0,1 N.

Les échantillons étaient ensuite chargés avec un taux de traction de 10mm/min jusqu'à l'échec. Ils étaient testés à température ambiante et étaient conservés humides systématiquement par vaporisation de sérum physiologique.

La résistance à l'arrachement de la zone d'insertion du tendon cicatrisée dans les tests en traction était le paramètre mesuré principal à 15, 30 et 45 jours après la chirurgie. Un minimum de 6 échantillons a été utilisé pour chaque période et pour chaque famille (G1, G2, G3).

Afin d'obtenir une référence, nous avons commencé par réaliser les tests sur 6 entèses natives vierges de toute chirurgie chez des animaux âgés de 4,5 mois afin de déterminer quelle était la valeur normale de l'attachement de cette entèse. Le choix de 4,5 mois correspondait à l'âge auquel les animaux opérés étaient sacrifiés (opérés à 3 mois d'âge, et attente de 45 jours de cicatrisation pour les derniers délais).



**Figure 54 : Tests biomécaniques :**  
C le calcanéum était collé sur une pièce en aluminium, D dispositif de traction en place, avec contrôle par 2 caméras numériques orthogonales. E aspect de rupture de la cicatrisation. F courbe force/traction.

## **6 ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA THERAPIE CELLULAIRE SUR LA REGENERESCENCE DE L'ENTHESE**

### 6.1 Objectifs

Les données de la littérature ont montré les limites des capacités de l'organisme lors des phénomènes de cicatrisation du tendon sur l'os.

L'objectif principal de ce travail est d'étudier l'influence de la thérapie cellulaire sur le taux global de cicatrisation.

Les objectifs accessoires de ce travail sont de montrer, dans les mêmes conditions une modification de la résistance à l'arrachement et de la qualité histologique de la cicatrisation.

### 6.2 Matériels et méthode

#### 6.2.1 Isolement et culture cellulaire des chondrocytes.

##### 6.2.1.1 Isolement cellulaire

Cette technique est inspirée de celle mise au point au sein du laboratoire pour les chondrocytes de souris, et qui a fait l'objet d'une publication en 2005 (Salvat, 2005).

Ces cultures sont établies à partir du cartilage articulaire de rats wistar nouveau-nés de 3 jours (photographies A). Ce cartilage est immature et extrêmement riche en cellules qui sont capables de proliférer : ce sont des chondrocytes articulaires immatures. La photographie D illustre la quantité de chondrocytes présents dans une tête fémorale.

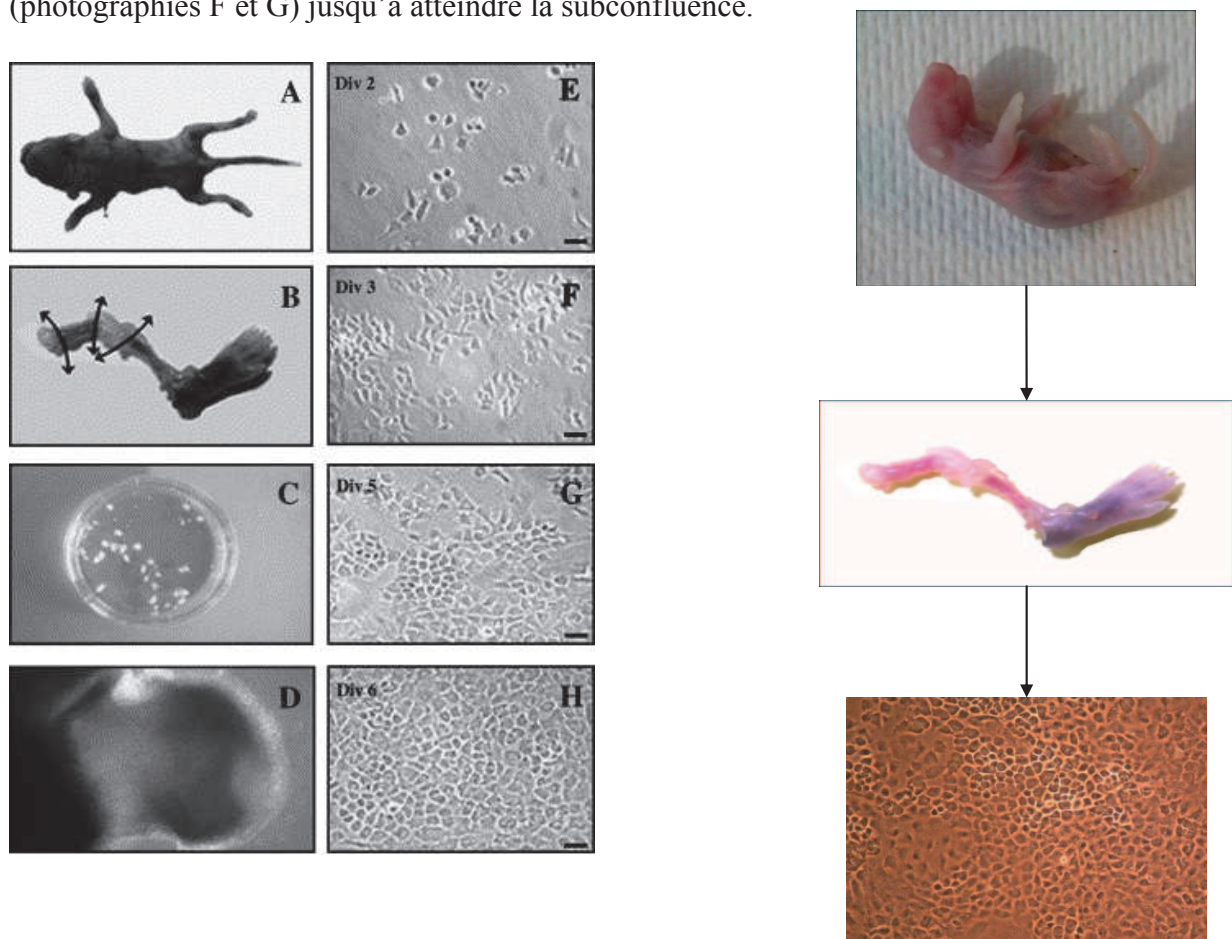
Les rats sont sacrifiés par injection intra-abdominale de 0,1ml de phénobarbital et les membres inférieurs ont été isolés de façon à conserver l'articulation de la hanche et du genou (photographies B). Les tissus mous (peau, muscles et ligaments) sont éliminés. La tête fémorale, qui est une petite sphère lisse, blanche, translucide et bien délimitée, ainsi que le genou sont disséqués en excluant l'os qui apparaît brun. Ces échantillons sont récupérés et lavés dans du PBS puis soumis à une digestion enzymatique (photographie C). Les diaphyses des jambes et des fémurs sont conservées pour nos prélèvements de cellules souches.

Trois digestions sont successivement réalisées avec de la collagénase D (Roche Diagnostics) diluée dans du milieu DMEM 1g/litre de glucose supplémenté en Penicilline (100 UI/ml), Streptomycine (100µg/ml) et Glutamine (4mM) (DMEM1-PSGlu) puis filtrée (filtre 22µm) :

- 1- une digestion avec de la collagénase D, 3 mg/ml, 45 minutes, à 37°C ;
- 2- lavage des fragments au PBS
- 3- et une digestion avec de la collagénase D, 0,5 mg/ml, pendant la nuit, à 37°C.

Entre chaque digestion, les explants sont passés plusieurs fois dans des pipettes de volume décroissant (25 ml à 1 ml), ce qui modifie la vitesse d'entrée du cartilage dans la pipette. Cette manipulation favorise la dissociation des éléments non cartilagineux résiduels puis, après la dernière digestion, la dissociation des cellules. Les cellules sont alors recueillies dans un tube contenant du PBS et sont comptées sur cellule de Malassez. Elles sont ensuite utilisées « fraîches » pour être injectée lors de la chirurgie.

Afin de valider cette technique chez le rat, nous avons réalisé des cultures cellulaires sur plaque. Nous avons pu confirmer la pureté de la population cellulaire et son phénotype chondrocytaire. En effet, les chondrocytes adhèrent au plastique pendant les 48 premières heures (photographie E). Elles prolifèrent en formant des clones pendant les 3 jours suivants (photographies F et G) jusqu'à atteindre la subconfluence.

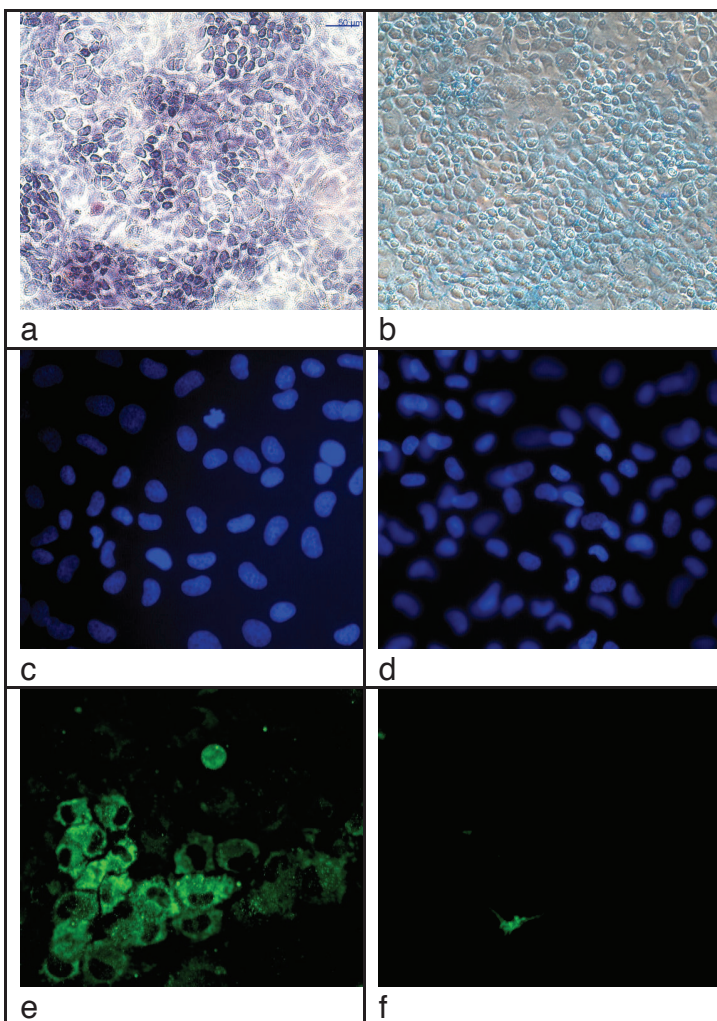


**Figure 55 : Technique de culture primaire de chondrocytes articulaires de rats.**

Après le prélèvement des membres inférieurs de rats de 3 jours (A), la peau et les tissus mous sont éliminés (B). Le cartilage articulaire des têtes fémorales et des genoux est prélevé (C). Après digestion enzymatique à la collagénase, les cellules sont ensemencées dans des boîtes de culture. La morphologie des chondrocytes articulaires de rats en culture primaire est observée après 2 (E), 3 (F), 5 (G) et 6 (H) jours (Echelle = 20 µm).

### 6.2.1.2 Caractérisation phénotypique des cellules

Parallèlement, les cellules étaient mises en culture dans des boîtes de culture ( $8 \times 10^3$  cellules/cm<sup>2</sup>) pour confirmer leur phénotype chondrocytaire. En congruence (après 7 jours de culture), les cellules ont montré un phénotype typique de chondrocyte avec un aspect rond ou polygonal et un cytoplasme granulaire.



**Figure 56 : Phénotypage des chondrocytes de rats : a le bleu alcian confirme la production de GAG, b, par contre à 6 jours de culture il n'existe pas d'activité phosphatase alcaline, éliminant la présence d'ostéocytes. Le collagène de type II était très clairement exprimé par les chondrocytes (c,e) mais pas par la population de fibroblaste témoin (d,f)**

Le phénotype chondrocytaire a été ensuite confirmé par un phénotypage aux anticorps anti-collagène II et par le bleu alcian pour mettre en évidence le glycosaminoglycane. La coloration à la phosphatase alcaline a été réalisée pour démontrer l'absence de cellules osseuses qui auraient pu venir contaminer notre culture primaire.

### 6.2.1.3 Culture

Si ce n'est pour le phénotypage initial, aucun chondrocyte n'a été utilisé après culture. La culture chondrocytaire 2D étant pourvoyeuse de dédifférenciation, nous avons voulu utiliser des cellules fraîches, le lendemain de leur prélèvement.

## 6.2.2 Isolement et culture cellulaire des Cellules Souches Mésoenchymateuses

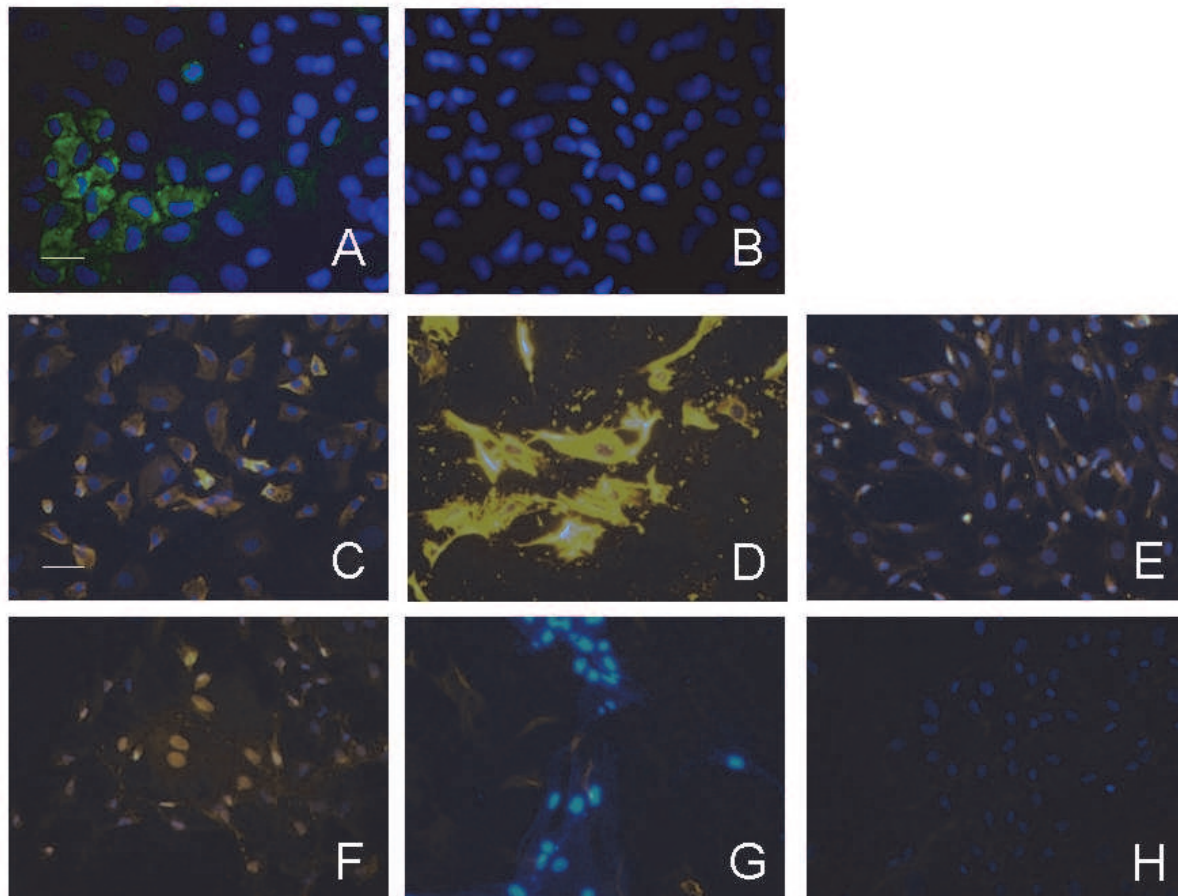
### 6.2.2.1 Isolement cellulaire

Les rats sont sacrifiés par injection intra-abdominale de 0,1ml de phénobarbital et les membres inférieurs ont été isolés de façon à conserver les diaphyses des jambes et des fémurs. Les tissus mous (peau, muscles et ligaments) sont éliminés. Le cas échéant, la tête fémorale et les genoux ont été conservés pour récupérer les chondrocytes. Les diaphyses fémorales et tibiales étaient ensuite immédiatement placés dans une hotte stérile et lavés sous pression avec une petite aiguille de 18G et une seringue de 20cc, au niveau de la partie centrale de leur diaphyse avec une solution de culture de cellules souches mésoenchymateuses ( $\alpha$ -MEM avec 1%  $\beta$ -Glutamine et 1% d'antibiotique et 10% de sérum bovin fœtal Hyclone®) contenant 5 IU/ml d'Héparine). La solution obtenue est ensuite passée dans un filtre à 90 $\mu$ m et centrifugée 10 minutes à 1500 tours/minute. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PDS contenant 1% d'antibiotiques puis mises en culture sur des flasques de 75cm<sup>2</sup> pendant 48 heures. Le milieu de culture a été changé à 48 heures afin de pouvoir retirer les cellules non adhérentes. Cette technique permet d'isoler de façon très spécifique les cellules souches mésoenchymateuses (fixées en 48 heures) des cellules hématopoïétiques (fixation supérieure à 48 heures) ou des cellules osseuses. Le milieu de culture de culture a été ensuite changé tous les deux jours. Après 4 passages, les cellules souches mésoenchymateuses prélevées par trypsination puis étaient injectées. Parallèlement à ces cultures, une partie des cellules a été conservée pour confirmer le phénotype.

### 5.2.2.2 Caractérisation phénotypique des cellules

Les cellules ont été cultivées sur des petites plaques de verre sphériques dans des plaques 24 puits. Lorsqu'elles étaient confluentes, elles ont été fixées avec de la Formaline à 4% en

utilisant un kit de caractérisation cellulaire de cellules souches (Chemicon mesenchymal stem cell characterization kit (Chemicon, USA)), les cellules ont été phénotypées avec mise en évidence de marqueurs positifs de cellules souches mésenchymateuses de rats (intégrine  $\beta$ -1, CD 54, fibronectine et collagène de type I) et l'absence de cellules hématopoïétiques (CD 14 et CD 45). Brièvement, la formaline a été retirée en lavant à trois reprises les puits avec du PBS. Une solution bloquante, contenant des anticorps anti fibronectine, collagène et intégrine  $\beta$ 1 a été déposée dans les puits et laissée ainsi 12h. Des solutions bloquantes ont ensuite été appliquées, contenant des anticorps de différenciation cellulaire (CD54,CD45,C14). L'anticorps primaire a été appliqué comme recommandé par le fournisseur. Les contrôles négatifs ont systématiquement été testés. L'ensemble des puits a ensuite été rincé puis un anticorps secondaire (IgG de singe anti-rat fixé à un marqueur fluorescent) a été appliqué pendant 2h. Les puits ont été rincés avec du PBS à trois reprises, puis les noyaux ont été colorés avec une solution de DAPI. Chaque plaque de verre sphérique était ensuite retirée et collée sur une lame de verre. La population retrouvée était pure avec uniquement des cellules souches mésenchymateuses retrouvées puisque la coloration montrait une réponse positive pour l'intégrine  $\beta$ 1, la fibronectine, le collagène de type I, et le CD54. Le CD14 et CD45 ne fixaient pas.



**Figure 57 : Phénotypage des chondrocytes et cellules souches mésenchymateuses.**  
**Chondrocytes : A Coloration positive pour le collagène II des chondrocytes (A) et témoin négatif (B)**  
**CSM : Coloration positive pour le collagène de type I, (C), la fibronectine (D), l'intégrine  $\beta$ 1(E), et le CD 54 (F), et coloration négative pour CD45 (G) et CD14 (H), échelle 100 $\mu$ m.**

### 6.2.2.3 Culture

Contrairement aux chondrocytes, les cellules souches mésenchymateuses peuvent être amplifiées largement et ne modifient pas, en l'absence de modification de leur milieu de culture, leur phénotype.

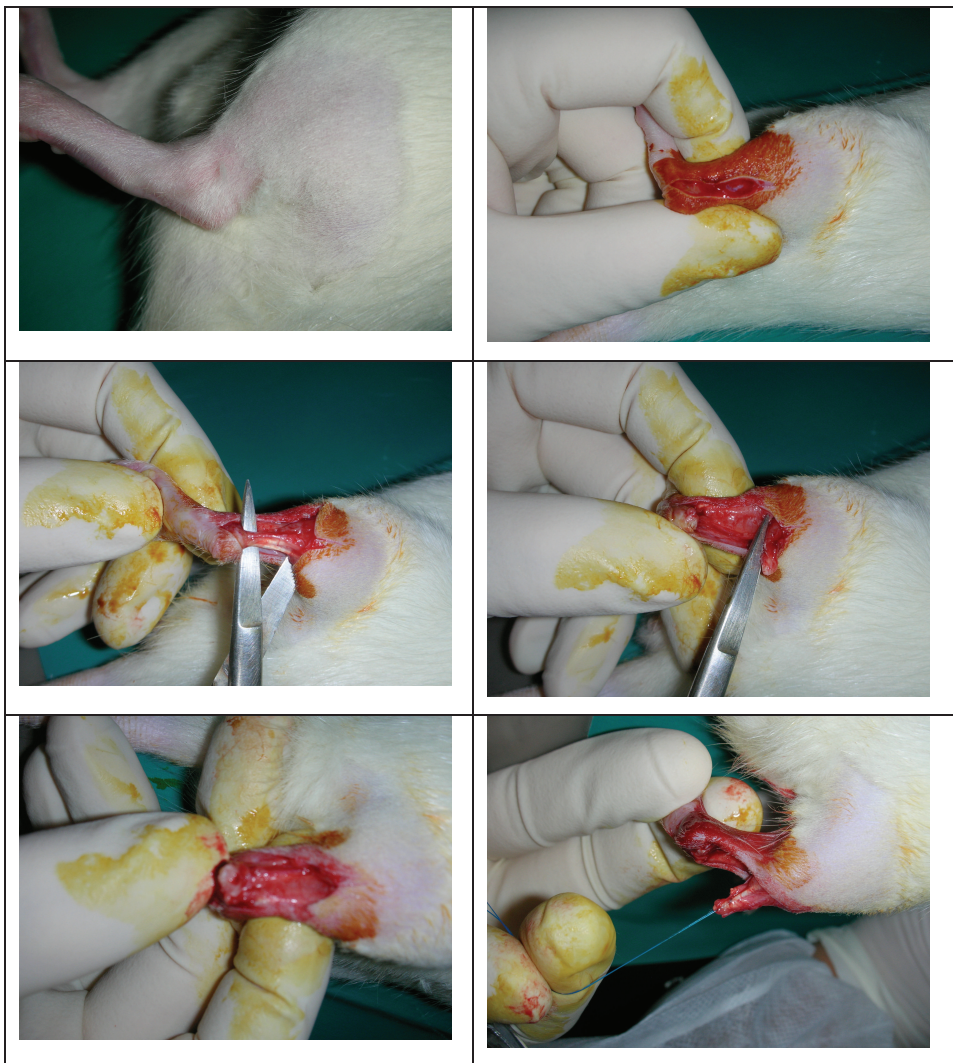
Afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules, les CSM étaient passées 4 fois. Comme pour les chondrocytes, 4 millions de cellules étaient injectées dans chaque réparation.

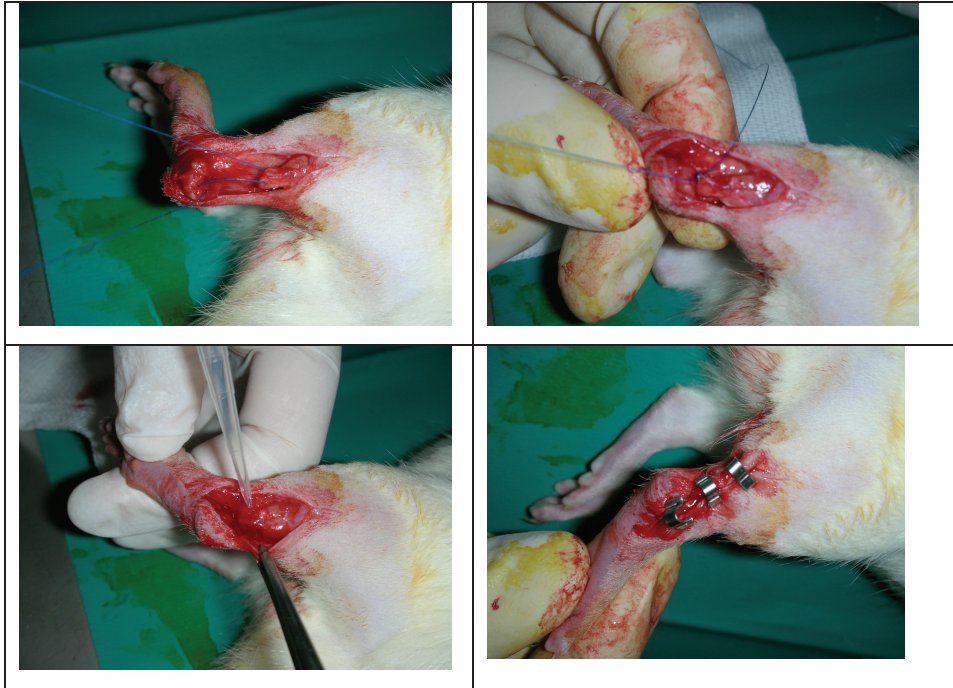


### 6.2.3 Techniques d'injection cellulaire lors des réparations.

Les chondrocytes furent utilisés frais, le lendemain de leur prélèvement, les cellules souches étaient cultivées jusqu'au quatrième passage. Les cellules étaient suspendues dans du fibrinogène bovin (Sigma) dilué dans du PBS à la concentration de 40mg/ml) et mélangé avec un volume équivalent de solution de thrombine à 20ui/ml, (Sigma) afin d'obtenir une concentration finale cellulaire de 4 millions de cellules / 100 µl. (Awad, 1999 ; Silverman, 1999 ; Peretti, 2004 ; Randolph, 2003).

La solution était préparée au moment de la chirurgie, et l'injection de 100µl se faisait juste avant de serrer le nœud de la réparation. Le durcissement de la solution était obtenu en 5 secondes ; il était attendu avant de fermer la peau.





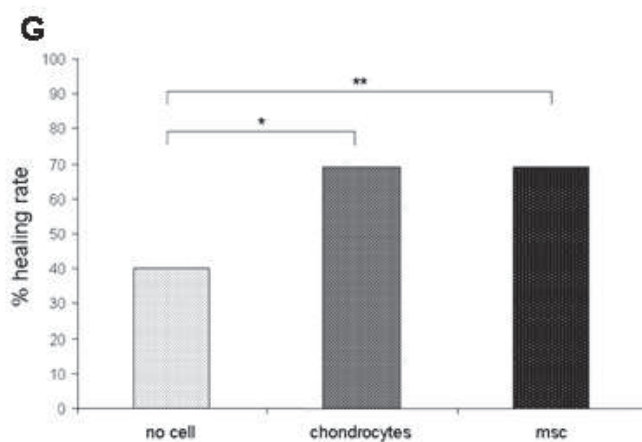
**Figure 58 : Technique chirurgicale de réinsertion tendineuse, avec injection cellulaire.**

## 6.3 Résultats

### 6.3.1 Taux global de cicatrisation

Afin de savoir si la thérapie cellulaire pouvait augmenter le taux global de cicatrisation après destruction de l'enthèse puis réparation, des chondrocytes de rat (groupe G2 n = 51) et des cellules souches mésenchymateuses CSM (groupe G3 n = 39) ont été injectées sur le site de réparation avant le serrage du nœud comme décrit précédemment. L'ensemble a été comparé au groupe contrôle (G1). Pour les groupes ayant bénéficié d'injection de cellules, nous avons réalisé une double lecture indépendante pour savoir si la réparation était un succès ou un échec, en appliquant les critères validés dans le modèle (CS et GN). De la même manière que pour le groupe du modèle (G1), du fait de la simplicité des critères, il n'a pas été noté de différence de lecture entre les 2 observateurs.

Il y avait une différence statistiquement significative sur le pourcentage global de cicatrisation obtenue avec les chondrocytes ou les cellules souches. Ainsi, lorsque aucune cellule n'a été injectée (groupe contrôle G1 n = 52), 40 % des tendons ont cicatrisé alors que dans le groupe traité par cellules le taux montait à 69 % (P = 0,028 entre G2 et G1 et P = 0,006 entre G3 et G1). Aucune différence consécutive n'a été observée entre les groupes G2 et G3 (P = 0,9). Ainsi, les deux groupes de thérapie cellulaire augmentaient le taux global de cicatrisation après réparation chirurgicale.



**Figure 59 : Résultat de l'influence de la thérapie cellulaire sur le taux global de cicatrisation.**

### 6.3.2 Résistance à l'arrachement.

Des tests statistiques utilisant le Student T-test ont été utilisés pour comparer les différentes valeurs.

La résistance à l'arrachement correspond à la traction nécessaire à appliquer sur le tendon afin d'obtenir une rupture de la jonction entre l'os et le tendon. Les tests ont été réalisés grâce à la machine développée à l'ENSAM. L'ensemble des pièces correspondant au même stade de cicatrisation (J15/J30/J45) étaient testées lors de la même séance. Pour ce faire les pièces étaient décongelées pendant 2 heures, à température ambiante, avant le test.

A 15 jours

La valeur de résistance à l'arrachement obtenu dans le groupe G1, sans injection cellulaire

était de 35.9±13.4N. La résistance obtenue avec injection de chondrocytes était de 40.5±9.5 N, et celle du groupe avec injection de cellules souches de 39.6± 8.7 N. Aucune différence n'existait entre ces différentes valeurs. Ces données ont confirmé l'absence de propriétés biomécaniques de la fibrine glue dès le 15<sup>ème</sup> jour.

Les valeurs obtenues étaient statistiquement différentes de la valeur de fixation d'une enthèse native (74,4N±10,9N) (G1, p=0,001 ; G2<0,001 ; G3p<0,0001)

#### A 30 jours

La valeur de résistance à l'arrachement obtenu dans le group G1, sans injection cellulaire était de 61,2±6,7N. La résistance obtenue avec injection de chondrocytes était de 65,4±15,7 N, et celle du groupe avec injection de cellules souches de 57,5±11,1 N. La résistance à l'arrachement augmente avec le temps après la chirurgie dans les trois groupes opérés. La valeur absolue la plus faible était donc retrouvée après injection de cellules souches. On notait une différence statistiquement significative entre la valeur native de résistance à l'arrachement et les valeur obtenues dans le groupe G1 ( p<0,05) et le groupe G3 (p<0,05).

#### A 45 jours

A 45 jours, la résistance à l'arrachement avait une valeur statistiquement significative plus haute pour le groupe injecté de chondrocytes G2 et injecté de cellules souches G3 comparé à la chirurgie seule G1 (68,7 ± 15 N, 80,3 ± 13 N, 84,6 ± 17 N pour G1, G2 et G3 respectivement, p<0,05). Une plus grande résistance à l'arrachement était aussi obtenue pour les groupes avec injection de cellules souches mésenchymateuses à 45 jours comparés à une enthèse native. La valeur de la résistance à l'arrachement obtenue avec la chirurgie simple était inférieure à celle d'une enthèse native.

Ainsi, on peut conclure que la thérapie cellulaire permet d'obtenir une augmentation de la résistance à l'arrachement après réparation du tendon dans notre modèle de destruction de l'enthèse

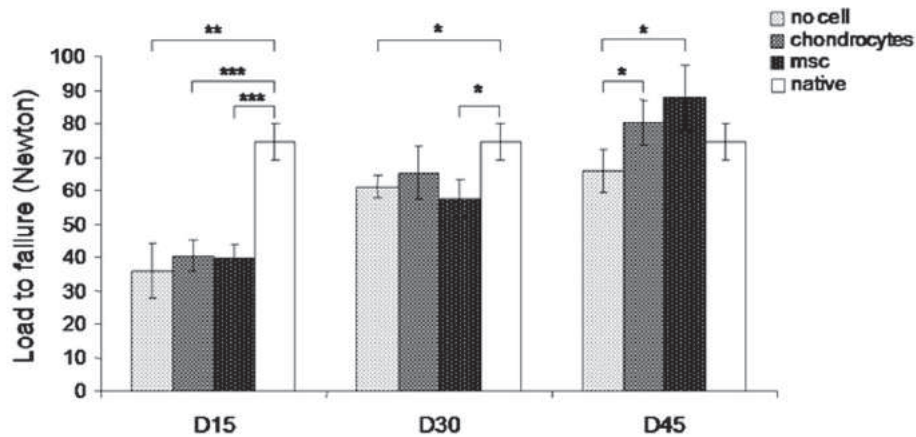


Figure 60: Données biomécaniques de résistance à l'arrachement.

### 6.3.3 Données histologiques

#### 6.3.3.1 Evolution de la zone de jonction

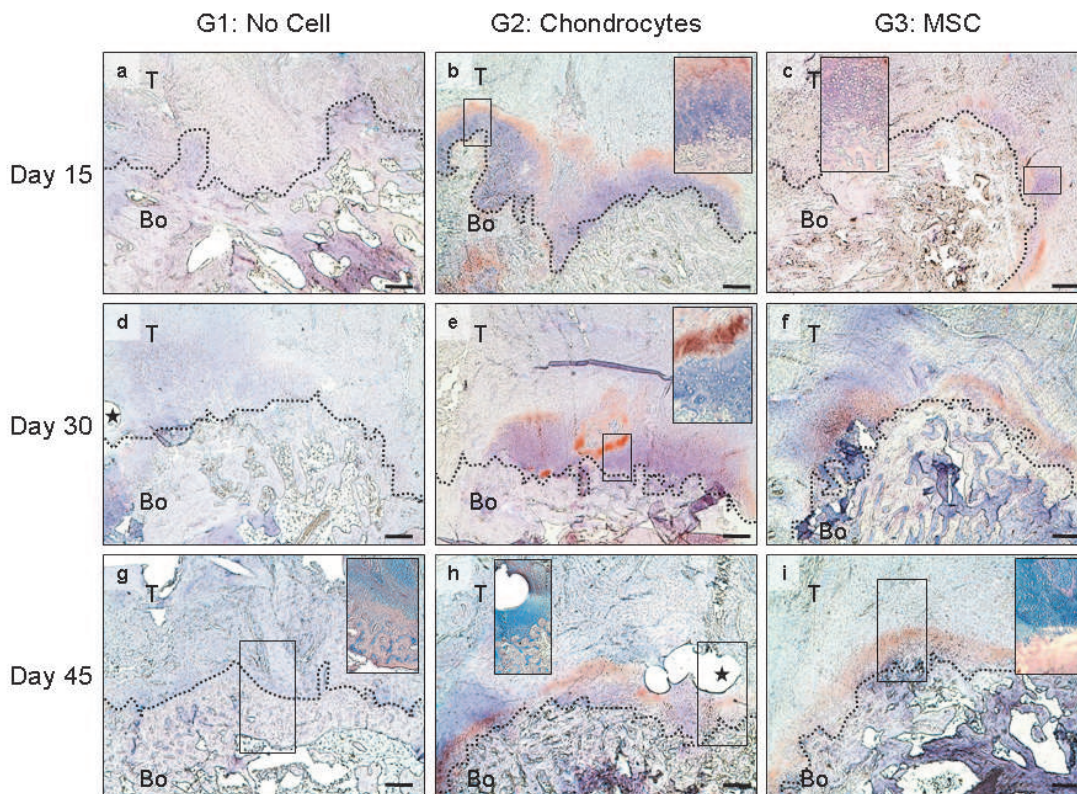
G1 (chirurgie sans injection cellulaire) :

Aucun collagène de type II n'a été identifié par immuno-coloration dans le groupe G1 que ce soit à 15, 30 ou 45 jours après la chirurgie (figure 3a, d, g). Cependant il est apparu un tissu fibreux qui était positif dans le collagène I (donné mais non montré).

Le bleu alcian ne montrait pas non plus d'apparition de glycosaminoglycanes après 45 jours du groupe G1 (figure 3g en 1/4).

G2 (chirurgie et injection de chondrocytes) :

Dans le groupe G2 il apparaît de manière très précoce, dès le 15<sup>ième</sup> jour un amas cellulaire entre le tendon et l'os, produisant à sa surface, du côté du tendon, une couche de collagène de type II. Au 30<sup>ième</sup> jour, cette couche cellulaire apparaît plus fine avec une production très importante de collagène de type II. Au 45<sup>ième</sup> jour, la couche de cellule a régressé en épaisseur et laisse place à une couche fine de collagène de type II à la jonction os-tendon. Cette couche mélange la production de collagène de type II et les cellules.



**Figure 61: Etude histologique de l'apparition de l'enthèse après injection cellulaire**  
**G1 aucune cellule n'est injectée, G2 les chondrocytes sont injectés, G3, les CSM sont**  
**injectés. Les histologies sont réalisées à 15, 30 et 45 jours. (H&E)**

G3 (chirurgie et injection de cellules souches mésenchymateuses) :

Dans ce dernier groupe, on note systématiquement une agrégation cellulaire à la zone de jonction entre l'os et le tendon, dont l'épaisseur est inférieure à celle objectivée avec l'injection de chondrocytes. Il existe au 15<sup>ième</sup> jour une faible production hétérogène de collagène de type II. Au 30<sup>ième</sup> jour, la production de collagène de type II est plus harmonieuse, mais avec une couche cellulaire beaucoup plus fine que pour les chondrocytes, et une production collagénique entourant les cellules, sans que cette zone soit identifiée plus au contact du tendon comme c'est le cas pour les chondrocytes. Au 45<sup>ième</sup> jour la zone de jonction est répartie de manière harmonieuse entre l'os et le tendon, sans retrouver l'hypercellularité des groupes avec injection de chondrocytes.

Ainsi, aucune enthèse n'a été restaurée lorsqu'aucune cellule n'a été injectée. Au contraire dans les groupes où les cellules ont été injectées une enthèse est apparue après réparation. Ces enthèses ont commencé à apparaître dès le 15<sup>ème</sup> jour (figure 3b et c). Dans les groupes G2 et G3, une immuno-coloration du collagène II a été positive avec apparition locale d'agrégats cellulaires.

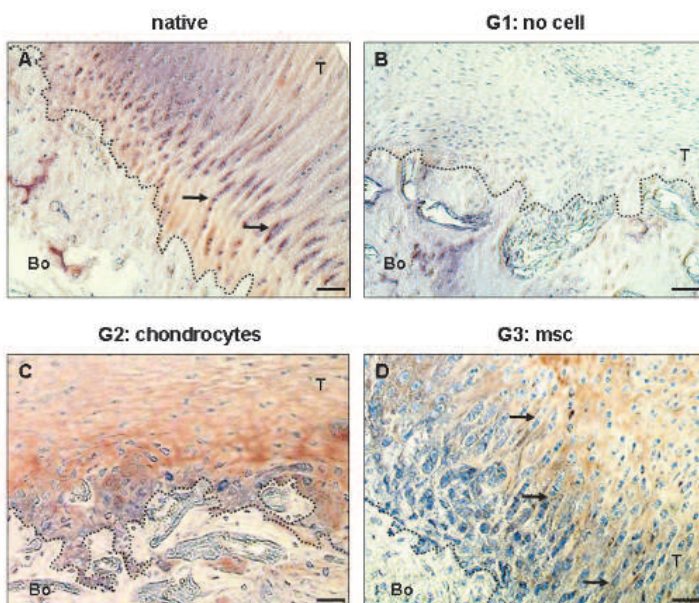
### 6.3.3.2 Etude morphologique de l'enthèse à 45 jours.

Une seconde étude histologique a été réalisée à 45 jours afin de connaître l'organisation de cette enthèse. Chaque coupe (4 par groupe) a été analysée en utilisant notre échelle, en lecture aveugle par 3 observateurs indépendants (MG,AP,GN) .

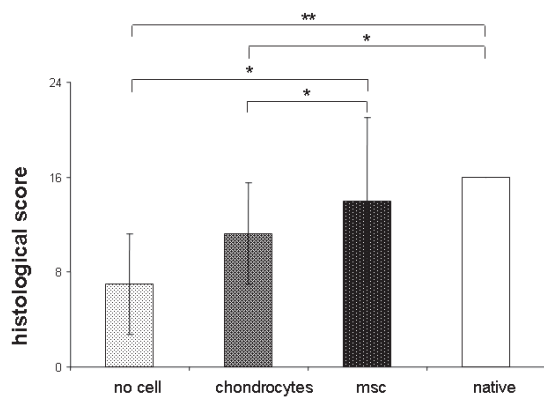
Dans le groupe G3, les cellules étaient localisées à la jonction entre l'os et le cartilage avec une organisation en colonnes (figure 4d). Cette organisation cellulaire a été observée dans l'enthèse native (figure 4a).

Cependant, ni dans le groupe G2 ni dans le groupe G1 on a eu un aspect d'organisation en colonnes des chondrocytes à la jonction entre l'os et le cartilage à 45 jours (figure 4b et c). De plus, lorsque l'organisation de l'enthèse a été quantifiée à l'aide de notre échelle, il a été mis en évidence une différence statistiquement significative entre tous les groupes sauf entre le groupe induit par l'injection de cellules souches mésenchymateuses et le groupe des enthèses natives.

Ainsi à 45 jours, on peut dire que histologiquement l'aspect de l'enthèse induit par les cellules souches mésenchymateuses est extrêmement proche de celui induit par une enthèse native.



**Figure 62 : Etude histologique de l'aspect de l'enthèse à 45 jours (comparaison native, cicatrisation seule, cicatrisation après injection de chondrocytes et de CSM). (H&E)**



**Figure 63: Etude statistique du score histologique des différentes enthèses. On ne retrouve pas de différence entre l'enthèse native et celle induite par l'injection de cellules souches mésenchymateuses**



## 7 DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

### 7.1 Thérapie cellulaire des fibrocartilages par les chondrocytes.

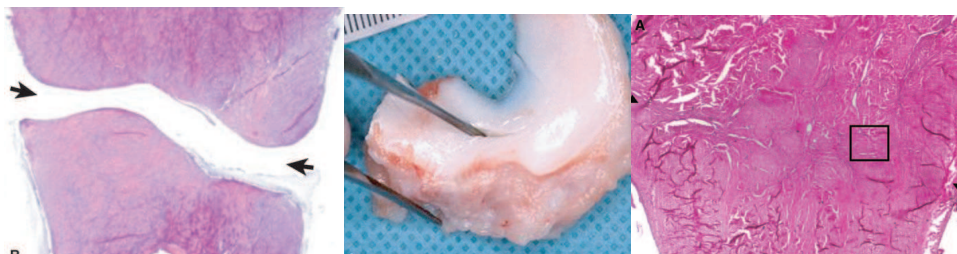
A ce jour, aucune application de la thérapie cellulaire des fibrocartilages par chondrocytes autologues ne se fait chez l'homme du fait de la morbidité du prélèvement et de la difficulté de la culture des chondrocytes.

#### 7.1.1 Cicatrisation du ménisque.

Weinand (Weinand, 2006) a montré dans une étude chez le porc que l'utilisation de chondrocytes déposés par sédimentation sur une mèche de Vicryl interposée dans une lésion méniscale en zone non vascularisée aboutissait à une cicatrisation du ménisque dans des conditions *in vivo*. L'auteur, après avoir prélevé des chondrocytes allogéniques, les a fixés sur une membrane de Vicryl. Les animaux étaient opérés avec réalisation d'une lésion méniscale systématiquement identique en zone non vascularisée.

Chez les animaux qui n'ont pas bénéficié de greffe de chondrocytes, il n'a jamais été mis en évidence de cicatrisation du fait de l'absence de vascularisation dans ces zones méniscales. En revanche, les animaux ayant bénéficié d'une greffe de chondrocytes ont systématiquement objectivé une cicatrisation du ménisque dans un délai de douze semaines.

Il est important de noter qu'il n'y a pas eu de réaction inflammatoire dans la zone réparée. Ceci peut être lié bien sûr au caractère peu allergisant des chondrocytes mais aussi et surtout au fait que les fibrocartilages sont des zones peu vascularisées et donc peu propices au développement d'une réaction immunogène.



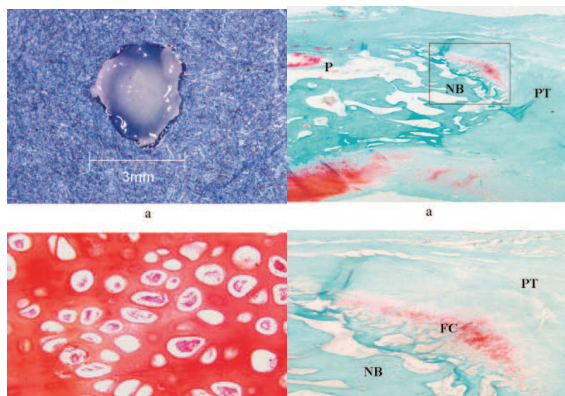
**Figure 64 : Utilisation des chondrocytes pour cicatriser une lésion méniscale en zone avasculaire. Modèle porcin, à Gauche, à 12 semaines, persistance de la lésion induite dans le ménisque, au milieu : aspect macroscopique du ménisque porcin et de sa lésion, à droite : aspect cicatrisé après 12 semaines *in vivo* d'implantation de chondrocytes. (Weinand, 2006)**

### 7.1.2 Cicatrisation des enthèses.

Un travail proche du nôtre a été publié en 2004 par l'équipe de Margaret Wong (Wong, 2004). Le principe de cette étude était de savoir si l'injection de chondrocytes allait permettre la production d'une enthèse après destruction de celle-ci. Cette étude était purement histologique, et étudiait la possibilité d'utiliser des chondrocytes de culture allogénique, concentrés, afin de favoriser la cicatrisation et la réapparition d'une enthèse lorsque l'on réalisait une destruction de celle-ci par excision de la pointe de la rotule.

Les auteurs ont prélevé des cartilages costaux chez des lapins de la même espèce. Ils les ont cultivés pendant 14 jours. Après avoir obtenu un nombre suffisant de cellules, ils ont réalisé une sédimentation pour fabriquer des petits agrégats qui étaient implantés.

D'un point de vue chirurgical, le tiers distal de la rotule était excisé ; emportant à la fois la partie distale de la rotule mais aussi la partie proximale du tendon. Par la suite, le tendon a été refixé sur la rotule dans une zone bien sûr ne contenant pas d'enthèse.

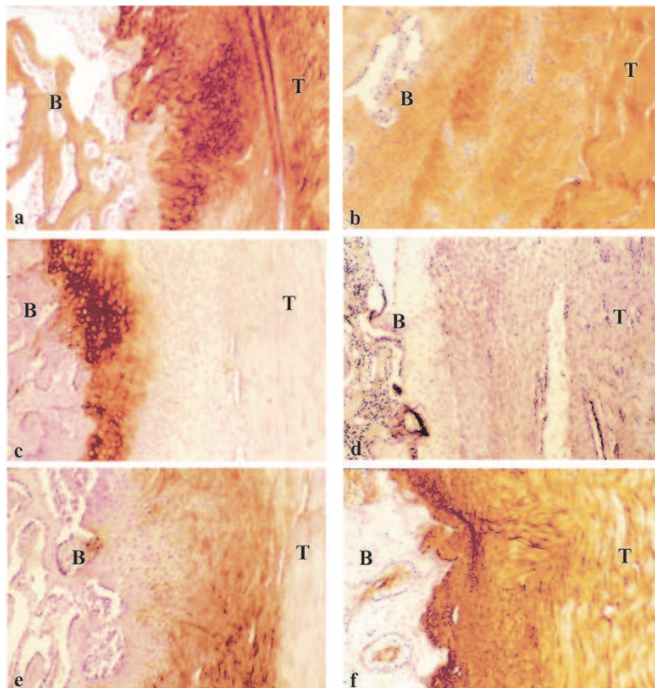


**Figure 65 : Etude histologique de la thérapie cellulaire de l'enthèse par agrégat chondrocytaire. Haut gauche : aspect macroscopique d'un agrégat de chondrocytes. Bas gauche : aspect typique de chondrocytes. Haut droit et bas droit : immunocoloration collagène de type II montrant la production d'une enthèse. (Wong, 2004)**

Cette étude a montré que lorsque l'on implantait des chondrocytes entre un os et un tendon dans une zone qui initialement avait une enthèse, il apparaît précocement une nouvelle enthèse plus riche en chondrocytes. Par ailleurs, comme c'est souvent le cas dans les greffes de chondrocytes allogéniques, aucun rejet n'avait été observé dans les animaux greffés. Encore une fois, la vascularisation est possiblement responsable de cette absence de rejet d'allogreffe de même que le caractère immunosuppresseur des chondrocytes.

## 7.2 Thérapie cellulaire de l'enthèse par CSM

Les 2 premières études animales évaluant l'effet des cellules souches mésenchymateuses sur la cicatrisation du tendon sur l'os ont été publiées en 2004. Ouyang a étudié l'influence de l'adjonction de cellules souches mésenchymateuses lors de la cicatrisation du tendon fléchisseur de l'hallux dans un tunnel osseux réalisé dans le calcanéum de lapin (Ouyang, 2004). Les cellules utilisées étaient autologues, cultivées et multipliées de 3 à 4 semaines avant l'implantation de 10 millions de cellules. L'auteur a objectivé la formation d'une matrice riche en collagène de type II à un stade très précoce, dès la seconde semaine, après utilisation de cellules souches mésenchymateuses. Cette étude n'incluait pas de test biomécanique, mais montrait l'intérêt potentiel des cellules souches pour modifier le phénomène naturel de fixation aboutissant à la formation d'une cicatrice fibreuse.



**Figure 66: Influence de l'injection de CSM autologues sur la production de collagène de type II chez le lapin.**

**Colonne de gauche : animaux traités, colonne de droite : contrôle.**

**Première ligne : immunomarquage collagène de type I identique.**

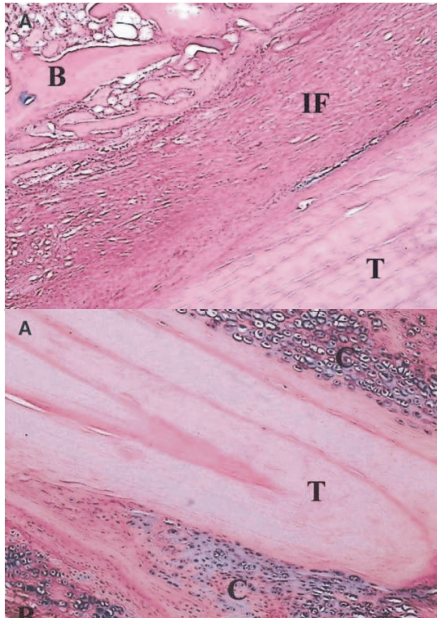
**Seconde ligne : immunomarquage collagène de type II uniquement à Gauche (CSM).**

**Troisième ligne : immunomarquage collagène de type III identique.**

**(Ouyang, 2004)**

Lim (Lim, 2004) a utilisé un modèle de reconstruction du ligament croisé antérieur chez le lapin pour étudier l'effet d'injection de cellules souches mésenchymateuses de lapin sur la cicatrisation de demi-tendineux dans des tunnels osseux. Les cellules utilisées étaient autologues, et cultivées et multipliées de 3 à 4 semaines avant l'implantation de 4 millions de cellules. Il a rapporté la formation d'un fibrocartilage, dans le groupe traité par cellules souches, de manière très précoce, à l'opposé du contrôle. Le groupe contrôle a cicatrisé avec apparition d'une cicatrice fibreuse, contenant quelques fibres de Charpey. A 8 semaines de la

chirurgie, le groupe traité par cellules souches avait une résistance à l'arrachement et une raideur plus importante que le groupe témoin. Cette différence était apparue à un stade relativement tardif, puisque non détectable en période post-opératoire immédiate.

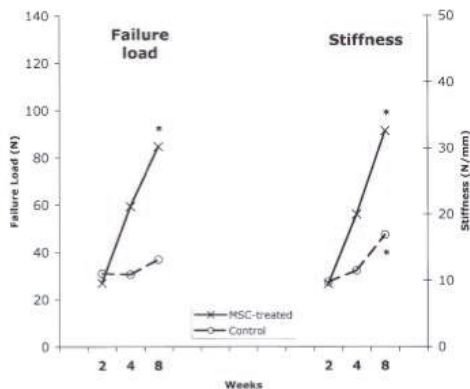


**Figure 67 : Aspect de cicatrisation du tendon dans l'os avec injection de CSM autologues dans les reconstruction du LCA de lapin, 2 semaines pos-op.**

Haut : En l'absence d'injection de CSM, un tissu fibreux se forme (IF) entre l'os (B) et le tendon (T).

Bas : Lors de l'injection de CSM un fibrocartilage (C) apparaît entre l'os (B) et le tendon (T).

H&E x100, (Lim, 2004)

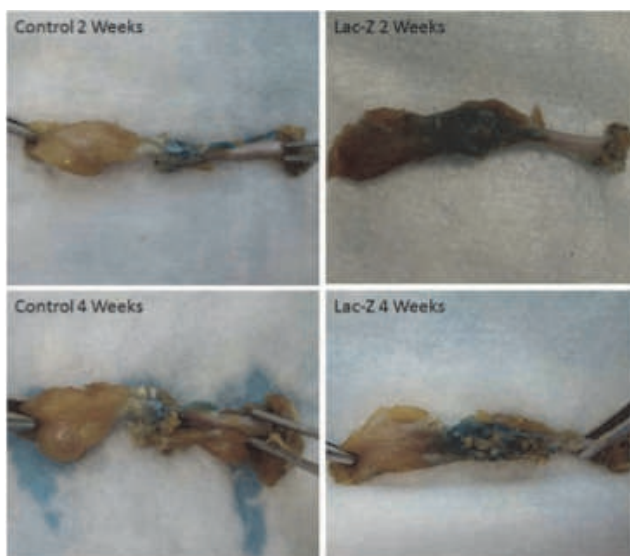


**Figure 68 : Etude biomécanique de l'influence de l'injection de CSM autologues : On objective une différence statistiquement significative au cours du temps pour la résistance à l'arrachement et la raideur. A 8 semaines apparaît une différence entre les 2 groupes (CSM / pas de cellule) (Lim, 2004)**

Gulotta en 2009 a réalisé une étude relativement proche de notre travail (Gulotta, 2009). Il a injecté des cellules souches mésenchymateuses allogéniques dans une désinsertion puis réparation du tendon supra-épineux du rat Lewis. Les cellules souches étaient des cellules souches allogéniques, appliquées à la dose de 1 million par réparation. Trois groupes ont été alloués : réparation simple, réparation avec fibrine seule, réparation avec fibrine et cellules souches. Huit animaux ont bénéficié de l'injection de cellules tracées par Ad-LacZ. Les animaux ont été sacrifiés à 2 et 4 semaines pour étude histologique à la recherche de la production d'un fibrocartilage ou de collagène de type II, et une étude biomécanique a

parallèlement été menée. Globalement les auteurs ont retrouvé les mêmes résultats court terme que nous. En effet, aucune différence statistiquement significative n'a été retrouvée en terme de production de fibrocartilage ou de production de collagène de type II puisque leur étude s'est arrêtée à 4 semaines. Nous objectivons des différences à partir de 6 semaines. De la même manière, en terme de données biomécaniques, les effets de la thérapie cellulaire ne se détectent, dans notre étude, qu'à partir de 6 semaines avec les CSM.

Chez les animaux ayant bénéficié de l'injection locale de CSM transfectées avec AD-LacZ les auteurs observent une activité  $\beta$ -galactosidase plus importante à la zone de réparation à 2 et 4 semaines que dans le groupe contrôle, avec cependant une diminution de l'activité avec le temps. Cette notion importante vient nous éclairer sur la problématique de l'activité des cellules souches. Leur injection est suivie par une migration vers la zone lésée, une concentration locale, pour venir agir sur la zone traumatisée.



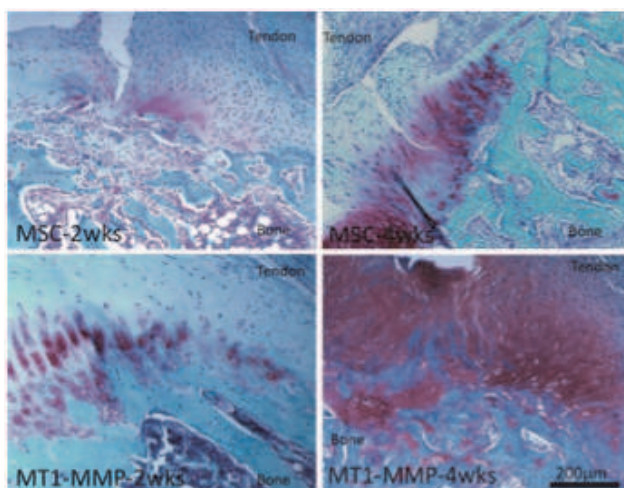
**Figure 69 : Concentration locale des CSM au site de réparation, évolution avec le temps. Les CSM transfectées par AD-LacZ expriment une activité  $\beta$ -galactosidase à la zone de jonction, activité diminuant avec le temps. (Gulotta, 2009)**

Ces données semblent montrer qu'il n'y a pas d'effet « immédiat » ou précoce de cette thérapeutique, en terme de production de fibrocartilage ou de renforcement biomécanique avec l'utilisation de CSM. Certes le nombre de cellules injectées est faible, mais à ce jour, l'importance de la quantité de cellules à injecter n'a pas été montrée. La différence entre ces données et celles de notre étude semble donner, en fin de compte, une importance au volume de cellules injectées. Nous avons injecté quatre fois plus de cellules. Nous détectons, dans notre groupe ayant bénéficié d'injection de CSM, un fibrocartilage dès la quatrième semaine. Par ailleurs, seuls 3 animaux ont été testés d'un point de vue biomécanique dans l'étude de Gulotta, ce qui est relativement faible, puisque dans notre étude, nous avons imposé un minimum de 8 tests biomécaniques par période.

L'effet des cellules souches est probablement plus tardif, comme nous le montrons dans notre étude, avec induction à la phase précoce de mécanismes régénératifs, possiblement liés à la quantité de cellules injectées, qui vont se traduire, à maturité, par de meilleures caractéristiques histologiques et biomécaniques.

Dans notre travail, l'injection de chondrocytes, cellules différenciées, donne des résultats biomécaniques et histologiques précoces, dès 15 jours pour l'histologie, 30 pour la biomécanique. Cette différenciation prend probablement plus de temps pour les CSM, et le délai d'apparition des effets est possiblement lié à l'étape de « maturation-différenciation » des cellules injectées.

Les CSM restant des cellules faciles à obtenir et à cultiver, Gulotta a voulu étudier l'intérêt de coupler leur injection à un inducteur de la chondrogénèse, et du développement embryonnaire des tissus musculosquelettiques : la MT1-MMP (Métalloprotéase Matricielle de Membrane de type 1) (Gulotta, 2010). L'hypothèse était que transfecter les CSM avec ce facteur apporterait un signal permettant de stimuler l'activité régénératrice des CSM à un stade précoce. L'étude fut réalisée sur le rat, les cellules furent injectées selon les mêmes modalités, avec les mêmes délais. Les auteurs n'ont pas retrouvé de différence statistiquement significative du point de vue histologique. Par contre, en terme de biomécanique, l'induction d'une réponse plus rapide des CSM par la transfection se traduit par une meilleure résistance à l'arrachement à 4 semaines.

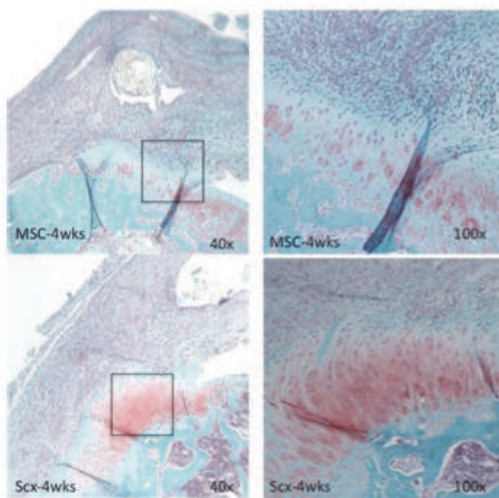


**Figure 70 : intérêt histologique de la transfection des CSM par MT1MMP pour induire de manière précoce un fibrocartilage chez le rat.**  
**A gauche 2 semaines, à droite 4 semaines. En haut : CSM seules, en bas : CSM +MT1MMP. Coloration SO/fast green x100**  
**Protéoglycanes couleur magenta. Production plus importante en bas à droite (p=0,05), (Gulotta, 2010)**

L'action de la MT1-MMP peut s'expliquer de 2 manières. Elle promeut naturellement la dégradation tissulaire, et cette étude fait suspecter son action dans la dégradation de la cicatrice fibreuse qui classiquement se forme dans la cicatrisation de tendon sur l'os.

Empêchant la formation de cette cicatrice, elle favoriserait l'apparition du fibrocartilage localement. C'est notamment par l'intermédiaire de l'action de ces métalloprotéases que l'on explique le rôle protecteur des CSM dans les lésions ischémiques myocardiques : par leur capacité à prévenir la formation du tissu cicatriciel. Par ailleurs MT1-MMP stimule la production de COX-2, favorisant la formation osseuse et fibrocartilagineuse. L'inhibition de COX-2 est néfaste à la cicatrization de la coiffe (Cohen, 2006).

Dans la suite de ce travail, Gulotta a recherché un autre facteur de transcription permettant d'agir prématurément, c'est à dire dans un délai inférieur à 4 semaines, dès les 15 jours post implantation (Gulotta, 2011). L'auteur a transfecté ses CSM avec Scléroxis. Comme nous l'avons rappelé lors du chapitre sur le développement de l'enthèse, Scléroxis est un facteur de transcription impliqué dans la tendinogénèse et la régénération tendineuse (Lejar, 2007). L'expression de Scléroxis est détectée précocement dans la formation du mésoderme, définit une zone entre les cellules du sclérotome et du myotome dans le développement des somites, et persiste avec le développement du tendon et de sa zone d'insertion sur l'os. Il semble stimuler directement l'attachement du tendon sur l'os, par son expression parallèle à celle de Sox-9, et donc par son potentiel d'induction de chondro-différenciation (Asou, 2002). Les cellules souches étaient allogéniques, appliquées à la dose de 1 million par réparation. Les auteurs ont objectivé une production très précoce d'un fibrocartilage, dès le 15<sup>ème</sup> jour, dans le groupe ayant bénéficié d'injection de CSM transfectées. Cela s'est traduit cliniquement par de meilleures propriétés biomécaniques, avec une résistance à l'arrachement plus importante à 4 semaines, et des propriétés modifiées dès le 15<sup>ème</sup> jour pour la raideur et la force de résistance à l'arrachement, rapportée au volume cicatriciel.



**Figure 71: Intérêt de la transfection des CSM par Scx pour induire de manière précoce un fibrocartilage chez le rat.**  
**A gauche x40, A droite x100**  
**En haut : CSM seules, en bas : CSM -Ad-Scx.**  
**Coloration SO/fast green x100**  
**Protéoglycane couleur magenta.**  
**Production plus importante en bas à droite (p=0,05) (Gulotta, 2010)**

Cette étude confirme le potentielle de régénération des cellules souches mésenchymateuses, montrant qu'elles autorisent, au prix de stimulations par transcription, une plus importante régénération du fibrocartilage et une plus importante résistance à l'arrachement.

Nous pensons que ces études ont certaines limites : elles imposent l'utilisation de thérapie génique pour laquelle l'application clinique est plus difficile que la plus classique thérapie cellulaire seule. Par ailleurs, aucune de ces études n'étudie le taux global de cicatrisation. Nous avons montré dans notre étude qu'il existait une corrélation entre l'apparition de l'enthèse et la cicatrisation du tendon, mais aucune de ces études ne vient le confirmer.

Les modes d'action exacts des cellules souches restent encore inconnus, de même que la quantité de cellules à injecter.

	Animal	Grefte/ tendon	Cellules injectées	Contrôle	Cellules	Taux de cicatrisation	Force	Histologie	Délais en sem
Lim, 2004	Lapin	Auto	Autologue	non	4M	Non	Augmentée	Fibrocartilage induit	8
Ouyang 2004	Lapin	Auto	Autologue	non	10M	Non	Non testée	Fibrocartilage induit	6
Gulotta 2009	Rat	Auto	Allogénique	fibrine	1M	Non	Pas de différence	Pas de différence	4
Gulotta 2010	Rat	Auto	Allogénique MT1MMP	CSM	1M	Non	Augmentée	Pas de différence	4
Gulotta 2011	Rat	Auto	Allogénique Scx	CSM	1M	Non	Augmentée	Augmentée	4
Nourissat 2010	Rat	Auto	Allogénique	Chondrocytes /non	4M	Oui Augmenté	Augmentée	Augmentée	6

**Figure 72: Etudes impliquant l'utilisation de cellules souches dans la cicatrisation du tendon sur l'os. (Cellules = Concentration en million)**

### 7.3 L'utilisation de la fibrine

L'ensemble des études explorant l'effet des cellules souches mésenchymateuses dans la cicatrisation du tendon sur l'os a montré l'absence d'effet de ce support sur les propriétés histologiques et biomécaniques des reconstructions. La fibrine a été utilisée dans de nombreux modèles de cicatrisation d'un tendon dans l'os (Shoemaker, 1989 ; Thomopoulos, 2002). Elle a aussi fréquemment été utilisée comme transporteur de facteurs de croissance (Yamazaki, 2005) dans les reconstructions du ligament croisé antérieur. La grande majorité de ces études a montré que la fibrine n'apportait aucune, voire une minime modification du processus de cicatrisation. Ainsi, Shoemaker a étudié l'influence de l'application de fibrine dans des reconstructions ligamentaires chez le chien, utilisant des auto ou des allogreffes, et



n'a montré aucune différence histologique ou biomécanique (Shoemaker, 1989). Yamazaki (Yamazaki, 2005) a effectué des reconstructions du ligament croisé antérieur avec des autogreffes selon 3 conditions : greffe seule, greffe et fibrine, greffe et facteurs de croissance suspendus dans de la fibrine. Aucune différence biomécanique ou histologique n'a été observée entre les 2 premiers groupes. Cela est en accord avec l'ensemble des études de Gulotta (Gulotta, 2009-2010-2011) et notre travail.

#### 7.4 Voies de recherches actuelles

A l'heure actuelle, il existe trois grandes stratégies de recherche de réparation de la coiffe des rotateurs.

La première concerne un renfort tendineux en utilisant des composants à contenu cellulaire. La deuxième concerne les renforts de coiffe qui s'appuient sur des matrices extracellulaires qui viennent couvrir, protéger et renforcer la réparation. Enfin, il existe une grande partie de recherche qui va utiliser des facteurs de croissance pour augmenter les chances de cicatrisation. Les deux premières voies ont déjà fait l'objet de recherches et publications cliniques.

##### 7.4.1 Utilisation de renforts tendineux à composants cellulaires

Iwata (Iwata, 2008) a rapporté dans une étude chez l'animal l'utilisation de tendons vivants pour renforcer une lésion tendineuse dans une épaule de rat. Il a mis en évidence le fait que des cellules autologues proliféraient à l'intérieur de la greffe. Cependant, comme c'est souvent le cas, il n'était pas possible de savoir avec le temps si cette prolifération était pérenne ou pas. Lorsque l'on greffe un tendon, il peut être d'origine autologue ou d'origine allogénique.

Ainsi, Moore (Moore, 2006) rapporte une série clinique de 28 patients ayant bénéficié d'une allogreffe pour une rupture massive de coiffe. C'était une allogreffe humaine qui provenait du tendon d'Achille, de tendons quadricipitaux ou de tendons patellaires. L'auteur rapporte des résultats qui sont comparables à ceux des patients ayant eu simplement un geste contre la douleur sans aucune réparation mais, en revanche, rapporte un cas d'infection secondaire dans le groupe ayant subi des allogreffes.

Afin d'éviter tout rejet de ces greffes, l'utilisation de greffes autologues semble être plus utile.

Plusieurs études ont utilisé un tendon autologue : le tendon du biceps qui est prélevé au niveau de l'épaule pour essayer de renforcer ou de compléter une réparation de coiffe (Rhee, 2008). Ces auteurs ont d'ailleurs montré qu'en terme de cicatrisation, il y avait une augmentation du taux en cas d'utilisation de la greffe. Dans les ruptures massives de coiffe, ils observaient un taux d'échec de cicatrisation de 40 % lorsque l'on utilisait le renfort avec un biceps alors que lorsque la réparation était simple, ce taux d'échec de cicatrisation était de 73,7 %.

#### 7.4.2 Les renforts par matrice extracellulaire

Le principe d'utiliser ces matrices extra-cellulaires est fondée sur deux concepts. Le premier est qu'elles vont permettre de compenser la perte des substances qui existe au niveau de ces tendons, le deuxième est qu'elles vont permettre une réhabilitation par les cellules du receveur autorisant ainsi la formation d'un néotendon (Adams, 2006).

Actuellement, il existe sur le marché de nombreuses matrices qui sont utilisées et utilisables chez l'homme. Elles sont de nature soit allogénique (derme humain) soit xénogénique (derme ou intestin porcine). Bien sûr, elles sont traitées pour être totalement décellularisées afin d'éviter toute réaction allergique. Le principe de décellularisation se fait selon trois procédés : soit physique (congélation, destruction mécanique), soit chimique (solution hypotonique, détergents), soit enzymatique (trypsination des tissus) (Cheng, 2010). Les premiers résultats publiés chez l'animal semblent démontrer l'intérêt de ces techniques de réparation. Si l'on prend l'exemple d'une xéno greffe disponible sur le marché (Restore®, De Puy), il a été démontré que d'un point de vue clinique il n'y avait pas forcément une amélioration lorsque l'on utilisait ces allogreffes pour renforcer la coiffe. Par ailleurs, il a été montré qu'il persistait dans la matrice de ces substituts de coiffe assez d'ADN pouvant être responsable d'une réaction inflammatoire chez près de 20 % des patients. Enfin, l'utilisation de renfort augmente le volume dans l'épaule et de fait il a été noté une augmentation de syndromes de conflit sous-acromial avec des douleurs qui se prolongeaient après l'opération. Un autre renfort de coiffe appelé Permacol® (Zimmer) est aussi une xéno greffe dans laquelle il n'a pas été mis en évidence de persistance d'ADN et de fait, à ce jour, aucun rapport de réaction inflammatoire n'a été fait. (Cheung, 2010)

Concernant le but ultime de cette chirurgie, la cicatrisation, les études cliniques montrent qu'il n'y a aucune différence que l'on utilise ou pas un support de renfort de coiffe (Walton, 2007 ; Iannotti, 2006).

Si les résultats sont globalement bons, aucune étude n'a été comparative versus l'absence de greffe. Si on s'intéresse uniquement aux taux d'échec de réparation en terme de cicatrisation, ils étaient les mêmes que l'on utilise ou pas ce substitut de coiffe (Soler, 2007 ; Gilbert, 2009).

Adams (Adams, 2006) a montré que si l'on compare les greffes allogéniques aux greffes autogéniques, il existe dans la période post-opératoire immédiate chez le chien une meilleure récupération dans le groupe allogénique. Cependant à distance (trois mois), les résultats sont identiques en terme de résistance sur l'arrachement ou de données histologiques.

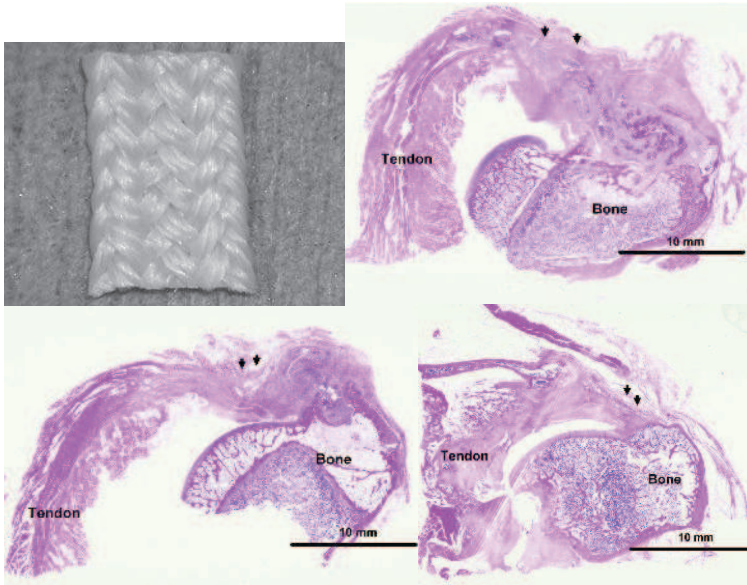
Il existe actuellement deux matrices allogéniques faites à partir de tissus humains Allopatch® (MTF) et faites à partir de peau humaine GraftJacket® faites à partir de fascia lata humain (Biomet). Ces deux substituts ont les mêmes propriétés en terme de force et de résistance à l'arrachement. Il semblerait que si les propriétés mécaniques de ces greffes sont supérieures à celles des xéngreffes, il n'en reste pas moins qu'elles ont des propriétés mécaniques inférieures à celles des autogreffes (Derwin, 2009).

La seule étude clinique évaluant ces allogreffes est celle de Bond (Bond, 2008) qui a montré un taux de récurrence après utilisation de GraftJacket® dans la rupture massive de coiffe de 19% ce qui est beaucoup moins que les taux généralement rapportés dans la littérature (Zumstein, 2008). Mais il s'agissait d'une étude non comparative.

Ces greffes allogéniques conservent cependant un petit peu d'ADN dans leur matrice. Par conséquent, il est possible d'obtenir des réactions inflammatoires qui vont être responsables de douleurs, d'œdèmes et peut-être d'une augmentation de la dégradation de la coiffe des rotateurs qui était réparée. Enfin, comparé à des greffes autologues il y a moins d'élasticité dans ces tissus qui ont été traités et cela peut être une cause d'échec sur la cicatrisation.

#### 7.4.3 Renforts artificiels

Une autre partie des recherches portées sur les substituts de coiffe fait appel à des renforts artificiels en acide polyglycolique. Pour l'instant, nous ne disposons que d'études animales, relativement anciennes, qui semble montrer que ces morceaux de coiffe artificielle semblent favoriser la prolifération fibroblastique que ce soit à la zone d'attachement du tendon ou bien lorsqu'ils se substituent au tendon (Yokoya, 2008 ; Funakoshi, 2006).



**Figure 73 : Réparation de coiffe de lapin, avec renfort recouvert de cellules. Haut gauche : le renfort. Haut droit : aspect histologique à 12 semaines avec orientation des fibres de collagène. Bas gauche : désorganisation des fibres. Bas droit : contrôle : petite membrane fibroblastique sur un petit tendon. (H&E) (Funokashi, 2004)**

D'autres études animales utilisant ce substitut résorbable n'ont pas montré de différence en terme de cicatrisation ou de force de résistance à l'arrachement (Mac Gillivray, 2006).

La tendance actuelle est plutôt de s'orienter vers des matrices extra-cellulaires qui seraient renforcées par des cellules fixées sur ces matrices. Leur principe serait de prélever des cellules fibroblastiques dans des zones saines et supportant bien les prélèvements (tendon patellaire, fascia lata) ou bien tout organe accessible aux prélèvements qui permettrait de récupérer les cellules fibroblastiques. Celles-ci seraient mises en co-culture avec les patches sur lesquels elles viendraient se fixer. (Cheung, 2010)

Chen (Chen, 2007) a ainsi utilisé cette technique dans un modèle animal de lésion de la coiffe chez le lapin. Les données histologiques ont montré que la prolifération cellulaire était comparable à celle de la cicatrisation normale.

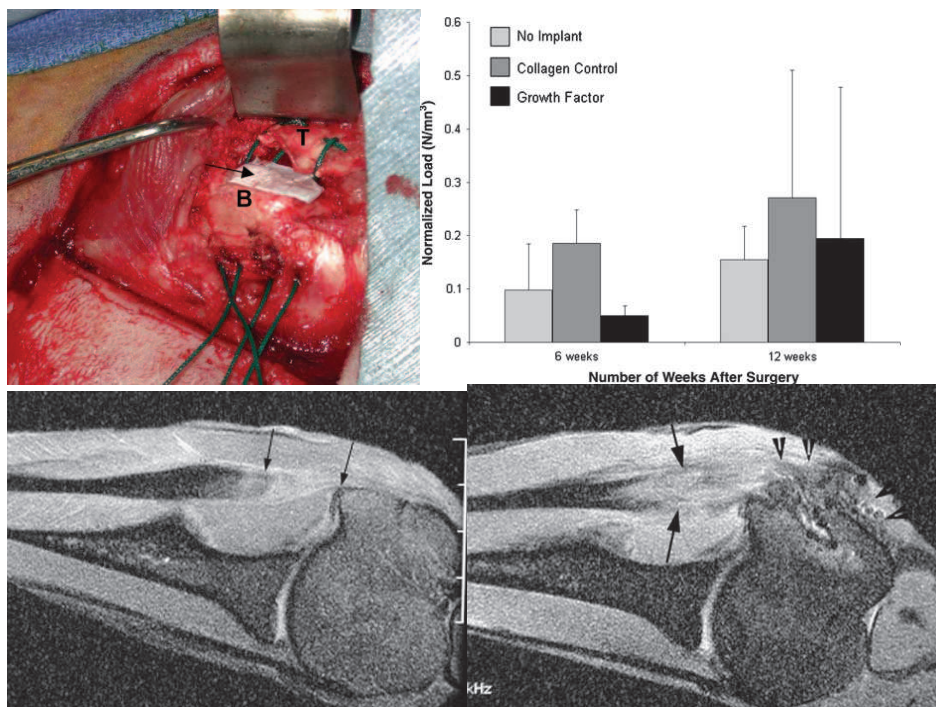
#### 7.4.4 L'utilisation de facteurs de croissance

Fondés sur des données naturelles du développement de l'enthèse et des phénomènes naturels de la cicatrisation du tendon sur l'os, plusieurs facteurs de croissance ont été testés que ce soit indépendamment ou bien en combinaison pour essayer de stimuler la cicatrisation du tendon sur l'os.

Rodeo en 2007 (Rodeo, 2007) a utilisé des facteurs de croissance au tropisme osseux (BMP2 à BMP7, TGF- $\beta$ 1 jusqu'à TGF- $\beta$ 3 et FGF). Ils ont été déposés dans une éponge de collagène-I en contact d'un espace entre l'os et le tendon. Cet apport de facteurs de croissance à la zone de jonction a abouti systématiquement à la formation d'un volumineux tissu cicatriciel et d'une croissance de l'os sous-jacent.

Mais lorsque l'on rapportait la taille du tendon à celle de l'ensemble des facteurs de cicatrisation, il n'y avait aucune différence par rapport à un phénomène de cicatrisation naturelle si ce n'est probablement une accélération du phénomène de cicatrisation sans modification de la qualité de la réparation.

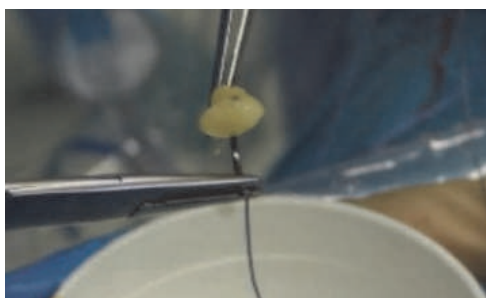
Les mêmes résultats ont été obtenus lorsque cette équipe a déposé sur une lésion de la BMP-12 recombinante humaine chez le mouton. S'il y avait initialement une augmentation de la force de 300 %, celle-ci était essentiellement proportionnelle à l'augmentation du volume globale de cicatrisation. Rapporté au volume normal de cicatrisation spontanée, il n'y avait aucune différence. Le TGF- $\beta$ 1 a aussi été utilisé dans la cicatrisation du tendon sur l'os et malgré cela, même si le TGF- $\beta$  entraîne une augmentation de la prolifération fibroblastique, aucune augmentation de la force d'ancrage du tendon n'a été observée (Galatz, 2004).



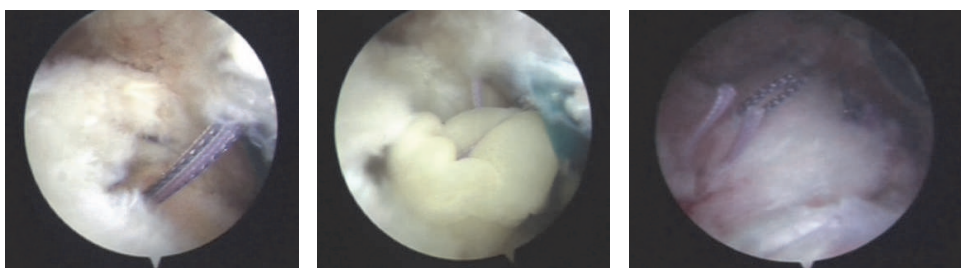
**Figure 74 : Utilisation de facteurs de croissance pour réparer la coiffe (modèle ovin)**  
**HD** : une éponge de collagène est interposée, avec ou sans facteurs de croissance  
**HG** : à on objective une résistance à l'arrachement augmentée  
**BD** : aspect IRM d'échec de réparation, **BG** aspect IRM de succès de réparation  
 (Rodeo, 2007)

Du fait des difficultés d'utilisation des facteurs de croissance in vivo, la tendance actuelle est de s'orienter vers des sources endogènes de facteurs de croissance comme les concentrés plaquettaires PRP (platelet-rich plasma) qui sont obtenus par centrifugation de sang autologue. En effet, ce produit contient de nombreux facteurs de croissance intra-plaquettaires impliqués dans les phénomènes de cicatrisation : PDGF, TGF- $\beta$  et bFGF, VEGF, EGF et les facteurs de croissance des tissus conjonctifs (Everts, 2006). Les données actuelles de la littérature (de Vos, 2010 ; Randelli, 2008 ; Castricini, 2011) ne semblent montrer aucune amélioration clinique sur les phénomènes de cicatrisation de la coiffe des rotateurs ; ou de toute autre enthèse ou fibrocartilage. Un effet clinique n'a été montrée que dans les tendinites.

Castricini, dans une étude arthroscopique prospective randomisée de réparations isolées du tendon supra-épineux, a comparé une interposition, ou non, d'une matrice autologue enrichie en plaquette (Cascade, MTF) prélevée chez le patient opéré. Chaque bras de l'étude comportait 45 et 43 patients. La technique chirurgicale et le protocole de rééducation étaient identiques.



**Figure 75 : Application clinique du PRP injecté lors de réparation de coiffe des rotateurs humaines. Matrice chargée en concentré plaquettaire déposée entre l'os et le tendon lors d'une réparation de coiffe des rotateurs chez l'homme.**



La mobilisation active de l'épaule a été autorisée à partir de 45 jours. Le contrôle de la cicatrisation a été fait par IRM, ce qui est relativement peu précis, d'autant que la réinsertion avait été réalisée avec des ancrés en acier, pourvoyeuses de nombreux artefacts. Par ailleurs, dans cette étude, les IRM ont été réalisées dans des délais non précisés. L'auteur ne retrouve

aucune différence statistiquement significative entre les deux groupes, en terme de résultat clinique ou de cicatrisation.

Randelli a publié une première étude prospective randomisée sur l'effet du PRP dans les réparations de coiffe (Randelli, 2008). Il ne retrouvait aucune différence entre les deux groupes, si ce n'est une récupération plus rapide. Dans une récente étude (Randelli, 2011), ce même auteur a étudié l'effet de l'injection de concentré plaquettaire lors des réparations de coiffe. Il a inclus 45 patients au total, et semble retrouver l'effet précoce antalgique des concentrés plaquettaires dans les suites opératoires. Cependant, les deux populations ont, en préopératoire, des douleurs différentes, moins importantes dans le groupe PRP. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative en terme d'échec de cicatrisation globale, à 2 ans. En revanche, dans les petites lésions de la coiffe, il y avait une différence statistiquement significative en faveur des concentrés plaquettaire avec 100% de cicatrisation.

## 7.5 Limites actuelles de l'utilisation clinique de la thérapie cellulaire

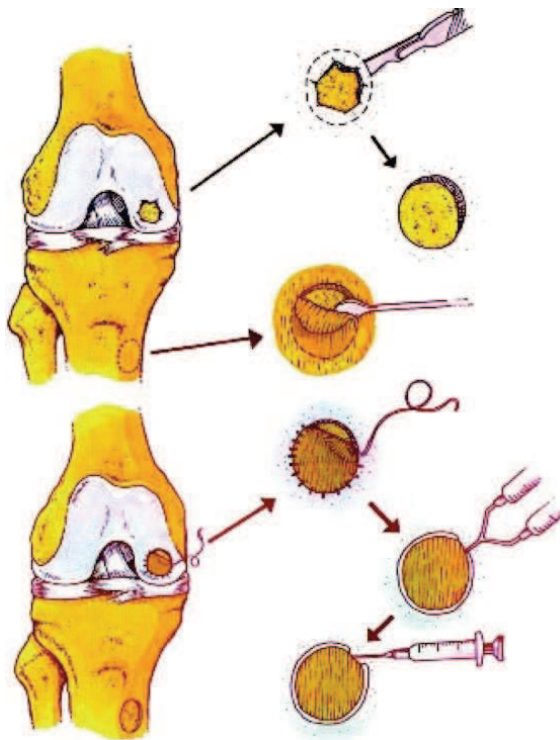
### 7.5.1 Les chondrocytes

#### 7.5.1.1 Utilisation des chondrocytes dans la réparation du cartilage.

L'utilisation des chondrocytes autologues dans la réparation du cartilage a été décrite pour la première fois en 1994 par Brittberg (Brittberg, 1994). La procédure initiale correspondait à une technique d'implantation en deux temps. Tout d'abord il fallait prélever des chondrocytes dans une zone de cartilage sain. Dans un deuxième temps, ces chondrocytes étaient cultivés *in vitro* puis ils étaient réimplantés lors d'une nouvelle chirurgie. Le principe de cette technique était bien sûr d'imaginer que les chondrocytes allaient ainsi pouvoir redonner un tissu aussi proche que possible du cartilage natif. Pour cette technique, il est nécessaire de prélever entre 200 et 300mg de cartilage en zone saine. Les cellules sont ensuite isolées et cultivées pendant trois à quatre semaines. Pendant ce délai, on multiplie le taux de cellules par approximativement 30 fois permettant d'obtenir globalement en moyenne pour une procédure 12 millions de cellules. Le délai moyen entre les deux procédures de prélèvement et de réinjection est de six semaines à six mois. La réimplantation se fait généralement sous un patch de périoste qui est prélevé au genou. Les cellules cultivées sont injectées dans une solution sous ce patch. Brittberg a rapporté ces résultats à 2 et 10 ans chez près de 250

patients qui avaient des lésions chondrales importantes (Brittberg, 2003). Les résultats cliniques obtenus sont relativement bons puisque à dix ans on obtient 84 % de patients très satisfaits à satisfaits. Parmi les patients de cette étude, un certain nombre a bénéficié d'une arthroscopie à quatre ans. 75 % des patients présentaient un aspect ressemblant vraiment à du cartilage hyalin. Les autres avaient plutôt un aspect de fibrocartilage. Un certain nombre de patient avait une persistance du patch utilisé pour maintenir les chondrocytes, avec persistance d'un tissu fibreux au contact de la greffe.

Une autre étude indépendante réalisée aux Etats-Unis par Browne (Browne, 2005) a retrouvé des résultats cliniques aussi prometteurs, et c'est dans la foulée de ces publications que s'est fait le développement de ces greffes de chondrocytes. Cependant, avec l'expansion des indications, des limites à leur utilisation sont apparues. De nombreuses études notamment réalisées chez des patients plus âgés ont montré qu'il y avait très fréquemment des hypertrophies des greffes pouvant être gênantes parfois ou aggraver les symptômes au genou. Chez les patients de plus de 45 ans dans différentes études, près d'une fois sur deux, une arthroscopie secondaire a été nécessaire pour diminuer le volume de la greffe ou retirer le volet périoste (Henderson, 2006).



**Figure 76 : Technique de greffe de chondrocytes de Brittberg: les chondrocytes sont prélevés en zone saine, isolés et prélevés, puis réinjecté sous une membrane de périoste dans la lésion cartilagineuse. (Strauss, 2011)**



Du fait de ces limites, plusieurs études ont été menées de manière rétrospective ou prospective pour comparer ces greffes de chondrocytes, extrêmement coûteuses, à d'autres techniques plus conventionnelles. Ainsi, Fu (Fu, 2005) a montré que si on comparait ces greffes de chondrocytes à de simples débridements arthroscopiques de la lésion, il existait très peu de différence clinique avec certes une petite préférence pour les greffes de chondrocytes mais lesquelles avaient nécessité de manière significative un nombre plus important de reprises chirurgicales.

Une autre technique pour le remplacement du cartilage consiste à prélever des carottes cartilagineuses en zone saine, et à venir les mettre dans les endroits portants du genou ou de la cheville où il manque du cartilage. On parle de mosaïcoplastie.

Lorsque l'on compare l'ensemble des techniques de reconstruction du cartilage, on se rend bien compte que très probablement les greffes de chondrocytes ont une place très limitée puisque leurs résultats histologiques ne sont pas meilleurs que ceux des autres techniques développées.

De fait, une nouvelle génération des greffes de chondrocytes s'est développée permettant de se passer du patch de périoste qui venait couvrir le cartilage. Les chondrocytes sont suspendus sous un patch collagénique résorbable qui a pour but d'éviter la survenue des complications liées aux précédents patches. Il semblerait effectivement, dans les études les plus récentes, que les résultats soient comparables en terme de réparation cartilagineuse mais avec moins de complications en terme de reprise chirurgicale.

Enfin la troisième génération de greffe de chondrocytes consiste à venir déposer des chondrocytes qui sont suspendus dans une matrice induite elle-même par les chondrocytes cultivés dans des supports 3D (MACI). De fait, elles viennent s'impacter dans la lésion cartilagineuse et n'ont plus besoin d'être recouvertes par un patch de périoste ou de collagène. Si on peut imaginer que l'absence de patch est une amélioration théorique, les premiers résultats cliniques ne sont pas meilleurs que pour des greffes de chondrocytes de première ou deuxième génération (Barlett, 2005).

Si l'utilisation de chondrocytes articulaires se justifie pour réparer des pertes de substance cartilagineuses importantes dont l'issue est l'arthrose, leur prélèvement pour traiter les lésions de l'enthèse est difficilement imaginable. Les lésions du cartilage nécessitant une greffe sont rarissimes alors que les lésions de l'enthèse sont très fréquentes. La morbidité du prélèvement n'est pas envisageable dans le traitement des lésions de l'enthèse. Si l'obtention de

chondrocytes *in vitro*, à partir de cellules souches différenciées (Cohen, 2010) est une voie de recherche, à ce jour elle n'a pas d'application clinique.

## 7.5.2 Les cellules souches

### 7.5.2.1 Utilisation clinique des CSM en clinique orthopédique

Le fait que les cellules mésenchymateuses possèdent la possibilité de se différencier en différents tissus que ce soit l'os ou le cartilage et qu'elles puissent s'expandre *in vitro* de manière relativement facile, associé à leurs propriétés immuno-suppressive et immuno-modulatrices, en font un candidat extrêmement attractif pour les applications cliniques (Undale, 2011). Cependant, la mise en culture des cellules souches mésenchymateuses humaines est limitée puisque avec le temps elles ont des capacités de prolifération qui diminuent probablement en rapport avec un phénomène de sénescence qui se fait parallèlement à la réduction des télomères (Abdallah, 2007).

Les cellules mésenchymateuses doivent être cultivées *in vitro* en présence de sérum foetal animal avec concentration de 10 à 20 %. L'utilisation de ce sérum pose toujours des problèmes à cause du risque de transmission du prion ou de maladie animale non détectable à ce jour, et ce, même si à l'heure actuelle, les conditions de sécurité optimales sont recherchées. Par ailleurs, des protéines ou même des peptides peuvent être incorporés dans les cellules souches mésenchymateuses lors de leur culture ce qui peut être responsable de réaction allergisante surtout si leur utilisation nécessite la répétition des injections. A l'heure actuelle, plusieurs laboratoires produisent des milieux de culture sécurisés autorisant dans ce cas là l'application de la culture de cellules souches humaine notamment aux Etats-Unis. Il est alors possible d'obtenir des cellules souches humaines cultivées dans des conditions sécurisées. A l'heure actuelle, la FDA a approuvé certains produits afin de les utiliser en clinique.

Dans le domaine de l'orthopédie, les cellules souches ont été utilisées et validées dans 3 indications.

TABLE. Clinical Applications of Human Mesenchymal Stem Cells (MSCs) for Tissue Regeneration

Condition	Type of cells	Mode of administration	Outcome
Fracture nonunion	Autologous bone marrow-derived pluripotent MSCs	100% hydroxyapatite macroporous ceramic scaffolds seeded with MSCs	Radiographic and computed tomographic evidence of bone formation; patients recovered limb function
	Autologous bone marrow grafting	Subcutaneous	Positive correlation between volume of mineralized callus at 4 mo and number and concentration of fibroblast colony-forming units in graft
Osteogenesis imperfecta	Allogeneic bone marrow transplant	Intravenous	Histologic changes indicative of new bone formation; increases in total body bone mineral content
	Engraftment of donor osteoblasts	Intravenous	Improvement in linear growth, total body bone mineral content, and fracture rate in 3 of 5 children with severe osteogenesis imperfecta
	Gene-marked allogeneic MSCs	Two intravenous infusions	Of 6 patients, 5 showed engraftment in bone, skin, and marrow stroma and increase in growth velocity during 6 mo after infusion
	Allogeneic HLA-mismatched MSCs of fetal liver	Implantation into uterus at 32 wk of gestation	Presence of osteocalcin-, osteopontin-, and bone sialoprotein-positive cells of donor origin in bone more than 9 mo after transplant
Hypophosphatasia	Allogeneic cultured osteoblasts and bone fragments from crushed iliac	Intravenous	Clinical and radiologic evidence of full mineralization of patient bones; after transplant, patient began to walk and run
	Allogeneic HLA-matched T-cell-depleted marrow and second infusion of ex vivo expanded marrow cells	Intravenous	Clinical and radiographic improvement without correction of biochemical features of hypophosphatasia
	Allogeneic heterogeneous population of marrow cells and bone fragments	Intravenous, intraperitoneal, and subcutaneous	Radiographic evidence of improved skeletal mineralization; patient is active and growing 7 y after transplant and has clinical phenotype of mild hypophosphatasia

**Figure 77. Etudes cliniques étudiant l'injection de CSM chez l'homme en orthopédie. Trois pathologies ont été étudiées: Les pseudarthroses, l'ostéogénèse imparfaite, l'hypophosphatémie. Aucun effet secondaire n'est noté, avec une amélioration clinique systématique (Undale, 2011)**

Cependant d'autres problèmes persistent dans l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses. Nous avons décidé de séparer les risques liés directement à l'utilisation des CSM de ceux liés à l'utilisation de CSM cultivés. En effet, il est possible actuellement d'obtenir des CSM sans les expandre.

#### 7.5.2.2. Les limites de l'utilisation des CSM

##### 7.5.2.2.1 Le mode d'injection

Le mode d'injection est loin d'être défini. Plusieurs études ont utilisé la voie systémique de perfusion pour utiliser les cellules souches mésenchymateuses. Cependant, un nombre important de cellules souches peut être éliminé par le foie, rendant leur destruction massive rapide.

Du fait de leur activité paracrine, leur mode d'admission va aboutir à une libération de substances dans l'organisme, dont l'effet, possiblement délétère, va se faire sur des organes, sans que les cellules ne soient elles-mêmes retrouvées localement. Il est probable que le mode d'admission influence non seulement le mode d'action des cellules, mais aussi leurs effets secondaires (Kassem, 2005).

Différentes hypothèses existent pour expliquer l'efficacité des cellules souches.

Elles peuvent probablement permettre de stimuler la réparation des tissus lésés en recrutant ou en facilitant la différenciation de cellules souches locales propre à chaque tissu (les cellules souches du stroma) et ce recrutement peut se faire soit par l'intermédiaire de leur activité paracrine, soit directement en évitant le filtre que représente le foie.

Aujourd'hui, il n'est pas possible de savoir si l'activité paracrine des cellules souches a uniquement un effet trophique positif ou s'il n'est pas responsable aussi d'une certaine toxicité. Il a été démontré, dans différentes études, que les cellules souches injectées viennent se fixer en très petit nombre au niveau des zones réparées. Si les cellules souches viennent effectivement se fixer au niveau des tissus réparés, il persiste une inconnue en terme de relation immunitaire avec le tissu hôte et les possibilités de modification avec le temps. Bien évidemment la question principale est de savoir s'il y a un risque cancérigène de ces cellules dont la propriété principale est de se multiplier sans limites.

Un des risques importants de la thérapie cellulaire est lié à la nécessité d'un nombre extrêmement important de cellules à injecter. Actuellement aucune étude ne nous permet de savoir s'il faut un nombre très important ou un nombre très petit de cellules ainsi que leur taux de survie après une utilisation clinique.

On ne sait pas si le fait de les injecter en périphérie ne risque pas d'entraîner des agrégats cellulaires responsables de microthrombi. Il est probable que l'injection intra-portale soit la plus utile mais aussi cliniquement la plus difficile. De nombreuses complications et notamment thrombo-emboliques ont été rapportées dans les premières études cliniques de transplantation de la cellule souche humaine (Kikuchi, 2002).

#### 7.5.2.2.2 Le risque tumoral.

Il faut bien noter que ces cellules souches ont des propriétés qui sont très proches de celles des cellules souches cancéreuses. Elles ont une durée de vie relativement longue, elles sont très résistantes à l'apoptose et peuvent se multiplier et s'expandre pendant une période de temps relativement longue. C'est pourquoi les cellules souches mésenchymateuses ont parfois été considérées comme à risque de transformation maligne. Par ailleurs, les facteurs impliqués dans la prolifération tumorale sont aussi impliqués dans la prolifération des cellules souches mésenchymateuses. Et c'est pourquoi à l'heure actuelle, un des facteurs majeurs bloquant l'utilisation clinique des cellules souches est ce risque cancérigène (Li, 2006). Ce risque cancérigène des cellules souches mésenchymateuses intervient à toutes les étapes de leur utilisation clinique. Il dépend tout d'abord, bien sûr, des conditions de culture. Il dépend aussi du site d'injection (c'est-à-dire des conditions locales dans lesquelles les cellules souches ont été déposées) et puis la façon dont les cellules souches vont être manipulées et modifiées peut jouer un rôle (Herberts, 2011).

Un cas clinique de tumeur nerveuse après injection de cellules souches embryonnaires intrathécales a d'ailleurs été rapporté (Amariglio, 2009).

L'environnement dans lequel les cellules souches injectées a probablement une importance sur les risques cancérigènes (Herberts, 2011). Ainsi chez la souris, il a été montré que le risque cancérigène était différent en fonction du type d'espèces sur lesquels étaient injectées les cellules souches cancérigènes. En cas d'injection de cellules souches d'un type particulier dans la même espèce, le risque tératogène est important alors que lorsque l'on croise les espèces celui-ci diminue (Knoepfler, 2009). Leur rôle trophique dans le soutien, la stimulation et le développement de tissu tumoral existant est aussi probablement important.

#### 7.5.2.2.3 Effet tumoral périphérique

En plus de leur possibilité intrinsèque à se transformer en tumeur, les cellules souches peuvent par un effet paracrine, stimuler la prolifération ou la croissance de cellules tumorales (Prockop, 2007). Cet aspect est utilisé uniquement pour les cellules souches mésenchymateuses. En fonction des études, on note une inhibition, une stimulation ou une absence d'effets sur une croissance tumorale.

*A priori*, l'effet dépend du type de cellules cancéreuses stimulées, le type de cellules souches utilisées ainsi que de l'intégrité du système immunitaire et des modalités de l'injection cellulaire.

Deux types d'explications ont été donnés. Le premier est que les cellules souches permettraient de créer un support fibreux dans lequel la tumeur pourrait se développer. Le second est que ces cellules souches mésenchymateuses pourraient diminuer le phénomène de rejet humain naturel, et en augmentant la tolérance de l'organisme, faciliteraient la prolifération tumorale. Cependant, pour l'instant, ces constatations sont uniquement fondées sur des travaux chez l'animal et rien n'a été identifié chez l'homme.

L'idéal serait de pouvoir choisir de manière extrêmement précise les cellules souches mésenchymateuses qui risquent d'induire une tumeur. Cependant aujourd'hui aucune identification phénotypique ne permet de savoir si telle ou telle cellule souche favorise la prolifération tumorale.

#### 7.5.2.2.4 Effet de la réponse immunitaire

De par leurs propriétés intrinsèques, l'administration de cellules souches peut modifier les réactions du système immunitaire face à l'étranger. Cette action peut se faire soit directement, soit en modulant l'effet du système immunitaire. Que ce soit les cellules souches embryonnaires mais aussi et surtout les cellules souches mésenchymateuses, de nombreuses publications ont montré qu'elles avaient un potentiel immunogénique très faible et qu'elles avaient donc un effet intéressant dans les phénomènes de réaction immunitaire.

Ainsi, les administrations des cellules souches mésenchymateuses allogéniques n'induisent *a priori* que très peu de réponse immunitaire. Cependant, si ces cellules souches mésenchymateuses doivent se différencier, le risque immunitaire peut probablement apparaître. On imagine que cette réaction est d'autant plus importante que ces cellules souches risquent, potentiellement, de se différencier dans des cellules qui n'étaient pas faites pour agir dans tel ou tel organe.

Un rejet de la greffe cellulaire risque bien sûr d'aboutir à une inefficacité totale de l'injection cellulaire. L'utilisation d'immunosuppresseurs risque d'augmenter les réactions de rejet. C'est pourquoi actuellement on discute des possibilités de créer des banques de cellules en obtenant bien sûr l'histocompatibilité du donneur.

#### 7.5.2.2.5 La fixation ectopique

Les cellules souches mésenchymateuses ont l'habitude de venir se localiser dans différents endroits de l'organisme que ce soit la moelle osseuse, les muscles ou la rate ; ou dans tous les tissus traumatisés ou pathologiques que ce soit un problème tumoral ou ischémique.

A l'heure actuelle, on ne sait pas comment ce mécanisme migratoire fonctionne. Bien sûr on suspecte le rôle des chimiokines et des récepteurs d'adhésion cellulaire. Cependant, de nombreuses études dans le cadre de l'infarctus du myocarde ont montré que la fixation locale cellulaire était extrêmement faible (Menasche, 2009).

### **7.5.2.3 Limites de l'utilisation des CSM cultivées**

#### 7.5.2.3.1 Le risque tumoral.

Les cellules souches pluripotentes (Esc ou iPSC) peuvent évidemment inclure, dans leur nombre, des cellules responsables de tumeur. Dans des modèles animaux, des injections de ce genre de cellules ont donné non seulement des tumeurs bénignes mais aussi des tumeurs malignes (Shih, 2007).

Les cultures *in vitro* de cellules souches peuvent aussi en elles-mêmes être considérées comme favorisant la survenue de tumeurs cellulaires. Pour certains auteurs, certaines cellules souches embryonnaires existent et sont responsables de l'apparition de cancer. Elles sont appelées les cellules souches cancéreuses et sont capables d'une croissance indépendante et de développer à elles seules un cancer (Li, 2006). Cependant, à ce jour, indépendamment des similarités qui existent entre des cellules souches somatiques et des cellules souches cancéreuses, aucun lien direct n'a pu être mis en évidence entre ces deux lignées.

Concernant les cellules souches somatiques, elles sont depuis de très nombreuses années utilisées (transplantation de cellules souches hématopoïétiques ou mésenchymateuses) sans notion de cancer induit.

#### 7.5.2.3.2 Les conditions de culture *in vitro*.

Pour les cellules souches embryonnaires comme pour les iPSC, une différenciation *in vitro* est indispensable avant de les utiliser en pratique clinique. En effet, en l'absence de différenciation, il existe un risque majeur de transformation tumorale. Par ailleurs, pour les

cellules souches somatiques, on peut parfois être amené à les redifférencier pour les utiliser de manière clinique.

Les expansions et les cultures de cellules *in vitro* peuvent changer les caractéristiques des cellules du fait de différents facteurs agissant aux niveaux intra- ou extra-cellulaires.

Afin d'éviter les phénomènes de faible expansion *in vitro*, différentes possibilités thérapeutiques ont été explorées. Pour augmenter l'efficacité de la prolifération, ces cellules peuvent être cultivées avec du Fibroblast Growth factor-2, dans des conditions de basse pression en oxygène ou bien dans des structures 3D, ce qui semble permettre d'obtenir un grand nombre de cellules (Ito, 2007 ; Ren , 2006 ; Grayson 2006).

Toute division cellulaire a inéluctablement le risque d'introduire une mutation délétère avec, du fait de la stimulation importante, une possibilité que le phénomène naturel de réparation génétique ne fonctionne pas. Cela a notamment été rapporté dans le cadre de lignées embryonnaires humaines (Narva, 2010).

Par ailleurs, concernant les lignées animales, plusieurs publications ont montré qu'en cas de culture *in vitro* à très long terme, il existait des transformations malignes spontanées (Li, 2007).

A l'heure actuelle, concernant les cellules souches mésenchymateuses, aucune publication ne montre qu'il y a une possibilité de transformation en cellules malignes.

#### 7.5.2.3.3 Modifications génétiques

Certains types de cellules souches (les iPSC) ont systématiquement besoin d'une manipulation génétique afin de modifier leur phénotype. Ainsi, afin de connaître leur risque cancérogène, il est fondamental de connaître les modalités de leur modification.

Les rétrovirus et lentivirus ont été utilisés pour générer des espèces humaines ou animales. Dans ce cas là, les virus sont modifiés génétiquement afin d'obtenir la transformation cellulaire demandée. Il existe possiblement un risque que ces virus s'intègrent au génome du receveur. Les limites de la sécurité concernant les patients sont ainsi très faibles (Bushman, 2007).

#### 7.5.2.3.4 Risque lié au milieu de culture.

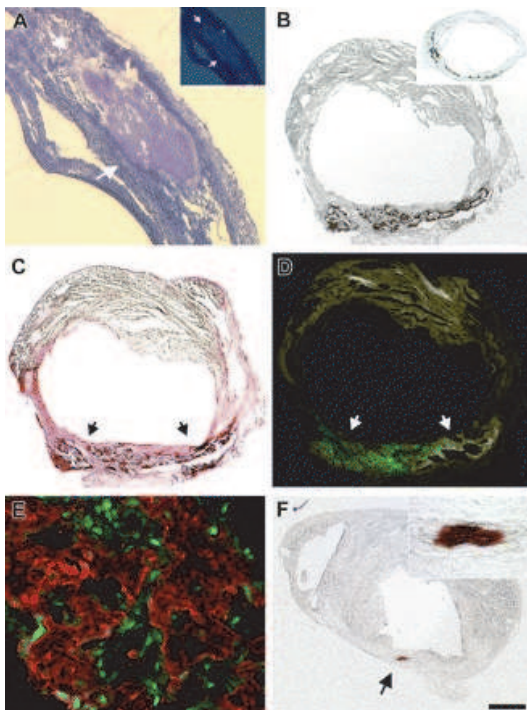
A partir du moment où on pratique une culture cellulaire, les techniques classiques de stérilisation, de purification ou de traitement antiviral sont limitées. C'est pourquoi les risques



viraux et bactériens sont des éléments majeurs et fondamentaux dans l'utilisation de cellules souches cultivées non autologues. Les risques ici rejoignent ceux de tout tissu humain transplanté vivant (et en particulier l'infection à CMV).

#### 7.5.2.3.5 Différenciation ou dédifférenciation non désirée

Que ce soit pour les iPSC ou pour les cellules souches embryonnaires, il est indispensable d'avoir avant l'injection ou l'administration une différenciation cellulaire bien définie. Cependant on ne sait pas si *in vitro* ou *in vivo* un phénomène de dédifférenciation va se produire avec le temps. Des cas de dédifférenciation ou de redifférenciation ont été décrits lors d'utilisation de cellules souches somatiques. Cependant à l'heure actuelle on n'en connaît pas les conséquences cliniques (Pessina, 2006). Des cas d'ossification intra-cardiaque ont été décrits dans des études animales d'injection de cellules souches mésenchymateuses dans la moelle osseuse (Breitbach, 2007).



**Figure 78 : Calcification et formation osseuse intra cardiaque après injection de CSM.**

**A :** Une coloration de la paroi cardiaque au bleu de méthylène 30 jours après l'injection objective une zone encapsulée, calcifiée au microscope polarisé. **B, C, D, F :** Une coloration von Kossa confirme la calcification intra pariétale, mais uniquement dans la zone infarctée, où les cellules sont venue agir (CSM de passage à 3 à 5). **E** les CSM marquées sont retrouvées uniquement dans la zone calcifiées de la paroi cardiaque. (Breitbach, 2007)

## 8 PERSPECTIVES ET CONCLUSION GENERALE

Notre modèle a une pertinence toute particulière pour explorer le taux global de cicatrisation. En partenariat avec le laboratoire de biologie du développement de l'UMR7622 nous voulons juger de l'intérêt de la transfection de nos cellules par des gènes du développement pour connaître leur effet sur le taux de cicatrisation. Nous avons pu montrer que lors du phénomène de cicatrisation tendineuse, des gènes impliqués dans le développement (EGR1 et EGR2) sont réactivés pour participer à la cicatrisation. Il est possible de surexprimer ces gènes dans des cellules transfectées (fibroblastes ou cellules souches mésenchymateuses) afin d'obtenir une réponse plus importante. En utilisant notre modèle, nous voulons voir s'il est possible d'obtenir un taux de cicatrisation plus important, et bien sûr une production fibrocartilagineuse plus précoce se traduisant par de meilleures propriétés biomécaniques.

Actuellement, les études évaluant la thérapie cellulaire par cellules souches mésenchymateuses sont essentiellement des études portant sur des maladies graves. Même si nous avons montré la dangerosité inhérente à la culture et l'utilisation des cellules souches, il faut garder à l'esprit que l'utilisation de cellules autologues non cultivées est possible et que parallèlement aujourd'hui ces cellules sont cultivées avec la plus grande sécurité (sans sérum animal...) dans certains laboratoires. Dans la mesure où nous pensons que les CSM pourraient être utilisées directement au lit du malade après prélèvement, nous nous intéressons à leur utilisation dans l'arthrose. Notre projet a pour finalité d'étudier le possible rôle protecteur et régénératif des CSM dans un modèle animal d'arthrose induite par un stress mécanique. Nous pensons que, par leur activité paracrine potentielle comme par leur activité de chondro-différenciation potentielle, les CSM peuvent trouver leur place dans l'arsenal thérapeutique de l'arthrose. Pour cela nous avons développé et actuellement maîtrisons le modèle d'arthrose induite par déstabilisation du ménisque médial chez le petit animal.

Le vieillissement d'une population de plus en plus active, mais aussi l'augmentation de la durée du travail dans un corps vieillissant font que la demande fonctionnelle des patients est de plus en plus importante. En cas de lésion de l'appareil musculo-squelettique, dépassant le traitement médical, les techniques classiques de réparation chirurgicale, couplées aux limites physiologiques de l'organisme, peuvent se solder par des échecs, aboutissant à des gênes fonctionnelles voir à de véritables handicaps. La médecine régénérative est fondée sur le concept que l'organisme n'a pas ou plus sa capacité à se régénérer, et qu'il nécessite une aide pour améliorer sa guérison. Notre étude a souligné l'importance de développer des

modèles animaux adaptés à cette nouvelle prise en charge thérapeutique. Nous avons développé le premier modèle permettant d'évaluer le taux de cicatrisation après réparation d'un tendon sur l'os. Cette donnée est l'objectif principal, et la faille majeure aussi, des chirurgies de la coiffe des rotateurs. Utiliser des modèles classiques explorant uniquement la résistance à l'arrachement n'a pas de valeur translationnelle pertinente.

Les thérapies régénératives peuvent trouver leur place dans deux grandes indications : soit la thérapie seule, agissant comme un médicament isolé, soit une thérapie adjuvante, par exemple couplée à de la chirurgie. Dans les deux cas cette thérapie doit trouver sa place et ses indications. L'exemple de l'utilisation clinique des concentrés plaquettaires est assez démonstratrice : l'utilisation sur des lésions d'âge différent, chez des patients d'âge différent, s'est soldée par une absence de différence clinique. La thérapie régénérative se trouve à mi-chemin entre les traitements conventionnels et la chirurgie ; ou couplée à celle-ci. Que ce soit les cellules souches autologues de la moelle osseuse ou les concentrés plaquettaires, il existe actuellement des appareils permettant de les prélever et réinjecter au lit du patient. Les recherches fondamentales, comme notre étude, nous poussent à vouloir les essayer. Mais nous pensons qu'il faut les utiliser sur des pathologies bien identifiées, à des stades précis de lésion de l'organe. S'il on s'attache à l'enthèse, il existe probablement une place pour l'injection de concentrés plaquettaires au stade micro-traumatique, lorsque les lésions anatomiques sont minimales et que les cellules fibro-chondrocytaires conservent leur capacité de synthèse. A un stade très avancé de lésion dégénérative de l'enthèse, avec destruction de celle-ci et arrachement de la coiffe des rotateurs, nous pensons qu'injecter des plaquettes, qui vont libérer des facteurs de croissance est inutile. Le facteur de croissance vient agir en stimulant la production matricielle cellulaire. Dans les lésions de coiffe, il n'y a plus de contenu cellulaire viable. Le stade de thérapie par facteur de croissance est dépassé, c'est la place de la thérapie cellulaire de « remplacement » nécessitant l'adjonction de cellules pouvant se fixer et se différencier et promouvoir l'apparition d'un organe : l'enthèse.

Ainsi la place des thérapies régénératives, dans l'ensemble des pathologies de l'organisme, est à définir précisément dans l'arsenal thérapeutique. Son évaluation doit se faire par des modèles animaux adaptés, dont les lésions créées doivent avoir une signification clinique et correspondre à une problématique adaptée à cette thérapie. D'un point de vue clinique, une meilleure compréhension de la physiopathologie des lésions, une identification des mécanismes faisant passer du vieillissement physiologique au vieillissement pathologique, de la sénescence à la maladie, devraient nous permettre d'identifier des marqueurs de la phase

précoce de la maladie, au stade où celle-ci reste réversible et où la thérapie régénérative pourrait être la plus efficace.

## ANNEXE 1

### Article de recherche 1 :

**Mesenchymal stem cell therapy regenerates the native bone-tendon junction after surgical repair in a degenerative rat model.**

*Nourissat G, Diop A, Maurel N, Salvat C, Dumont S, Pigenet A, Gosset M, Houard X, Berenbaum F.*

*Publié dans Plos One – 2010.*



## **ANNEXE 2**

**Article de recherche 2 :**

**Survival of porcine mesenchymal stem cells over the alginate recovered cellular method.**

***Cohen J, Zaleski KL, Nourissat G, Julien TP, Randolph MA, Yaremchuk MJ.***

***Publié dans J Biomed Mater Res A 2010***





## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

### A

**Abdallah BM, Kassem M. (2007)** Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008 Jan;15(2):109-116. Nov 8.

**Adams JE, Zobitz ME, Reach JS, An KN, Steinmann SP. (2006)** Rotator cuff repair using an acellular dermal matrix graft: an in vivo study in a canine model. *Arthroscopy.*;22:700–709.

**Aigner, T. and McKenna L (2002)** Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci* 59(1): 5-18.

**Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, Paz N, Koren-Michowitz M, Waldman D, Leider-Trejo L, et al (2009)** Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Medicine*, 6:0221-0231.

**Asou Y, Nifuji A, Tsuji K, Shinomiya K, Olson EN, Koopman P, Noda M. (2002)** Coordinated expression of scleraxis and Sox9 genes during embryonic development of tendons and cartilage. *J Orthop Res.*;20(4):827-833.

**Araujo VG, figuereado CA, Joazeiro P, Mora OA, Toledo M (2002)** In vitro rapid organization of rabbit meniscus fibrochondrocytes in chondro-like tissue structure. *J submicrosc. Cytol Pathol* 34, 335-343,

**Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan AI (1999)** Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng.* Jun;5(3):267-77.

### B

**Barton ER, Gimbel JA, Williams GR, Soslowsky LJ (2005)** Rat supraspinatus muscle atrophy after tendon detachment. *J Orthop Res* 23, 259

**Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR, Carrington RW, Flanagan AM, Briggs TW, Bentley G (2005)** Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *J Bone Joint Surg Br.*;87:640-5.

**Buckwaler JA, Mankin HJ (1997)** Articular Cartilage. I. Tissue design and chondrocyte-matrix integration. Instruction course lecture. *AAOS JBJS Am*, 79, 600-611,

**Benjamin M, Evans EJ, Rao RD, Findlay JA, Pemberton DJ (1991)** Quantitative differences in the histology of the attachment zones of the meniscal horns in the knee joint of man. *J Anat.* 177: 127–134.

**Benjamin M, Ralphs JR (1998)** Fibrocartilage in tendon and ligament: An adaptation to compressive load. *J Anat*, 193, 481-494

**Benjamin M, Ralphs JR (2004)** Biology of fibrocartilage cells. *Int Rev Cytol.* 233:1-45.

- Benjamin M, Ralphs JR (2000)** The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int. Rev. Cytol.* 196, 85–130.
- Benjamin M, McGonagle D (2001)** The anatomical basis for disease localisation in seronegative spondyloarthropathy at entheses and related sites. *J Anat.* Nov;199(Pt 5):503-26.
- Benjamin M, Toumi H, Suzuki D, Redman S, Emery P, McGonagle D (2007)** Microdamage and altered vascularity at the enthesis-bone interface provides an anatomic explanation for bone involvement in the HLA-B27 associated spondyloarthritides and allied disorders. *Arthritis Rheum:* 56: 224–233.
- Benjamin M, Tyers RN, Ralphs JR (1991)** Age-related changes in tendon fibrocartilage. *J Anat.* Dec;179:127-36.
- Bluteau G, Conrozier T, Mathieu P, Vignon E, Herbage D, Mallein-Gerin F (2001)** Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta.* May 3;1526(2):147-58.
- Boileau P, Brassart N, Watkinson DJ, Carles M, Hatzidakis AM, Krishnan SG (2005)** Arthroscopic repair of full-thickness tears of the supra- spinatus: does the tendon really heal? *J Bone Joint Surg Am.*;87(6):1229-1240.
- Bond JL, Dopirak RM, Higgins J, Burns J, Snyder SJ (2008)** Arthroscopic replacement of massive, irreparable rotator cuff tears using a GraftJacket allograft: technique and preliminary results. *Arthroscopy.*;24:403–409.
- Boskey AL (1981)** Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 157, 225-257.
- Boszczyk AA, Boszczyk BM, Putz R, Benjamin M, Milz S (2003)** Expression of a wide range of fibrocartilage molecules at the entheses of the alar ligaments – possible antigenic targets for rheumatoid arthritis? *J Rheum:* 30: 1420–1425.
- Breitbart M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JW, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch W, Jacobsen SE, Fleischmann BK (2007)** Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood.* Aug 15;110(4):1362-9
- Bring DK, Reno C, Renstrom P, Salo P, Hart DA, Ackermann PW (2009)** Joint immobilization reduces the expression of sensory neuropeptide receptors and impairs healing after tendon rupture in a rat model. *J Orthop Res.*;27:274-80.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994)** Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.*;331:889-95.
- Brittberg M, Peterson L, Sjögren-Jansson E, Tallheden T, Lindahl A (2003)** Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am.*;85-A Suppl 3:109-15.
- Browne JE, Anderson AF, Arciero R, Mandelbaum B, Moseley JB Jr, Micheli LJ, Fu F, Erggelet C (2005)** Clinical outcome of autologous chondrocyte implantation at 5 years in US subjects. *Clin Orthop Relat Res* :237-45.

**Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S (1998)** The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg* 80-:985.

**Bushman FD (2007)** Retroviral integration and human gene therapy. *Journal of Clinical Investigation*, 117:2083-2086.

## C

**Caplan AI (2007)** Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. Nov;213(2):341-7.

**Carpenter JE, Thomopoulos S, Flanagan CL, DeBano CM, Soslowsky LJ (1998)** Rotator cuff defect healing: a biomechanical and histologic analysis in an animal model. *J Shoulder Elbow Surg*. Nov-Dec;7(6):599-605.

**Castricini R, Longo UG, De Benedetto M, Panfoli N, Pirani P, Zini R, Maffulli N, Denaro V (2011)** Platelet-rich plasma augmentation for arthroscopic rotator cuff repair: a randomized controlled trial. *Am J Sports Med*. Feb;39(2):258-65

**Chen X, Nasiri A, Dreyer B, Judex S, Broadus AE (2006)** The principal domain of PTHrP is the circumference of long bones, in articular cartilage, periosteum, and entheses. *Journal of Bone and Mineral Research*;21:S445

**Chen JM, Willers C, Xu J, Wang A, Zheng, MH (2007)** Autologous tenocyte therapy using porcine-derived bioscaffolds for massive rotator cuff defect in rabbits. *Tissue Eng* 13, 1479-91

**Chevalier X (1998)** Physiopathology of arthrosis. The normal cartilage. *Presse Med* 27(2): 75-80.

**Chubinskaya S, Cs-Szabo G, Kuettner KE (1998)** ADAM-10 message is expressed in human articular cartilage. *J Histochem Cytochem*. Jun;46(6):723-9.

**Cheung EV, Silverio L, Sperling JW (2010)** Strategies in biologic augmentation of rotator cuff repair: a review. *Clin Orthop Relat Res*. Jun;468(6):1476-84.

**Chou CH, Cheng WT, Kuo TF, Sun JS, Lin FH, Tsai JC (2007)** Fibrin glue mixed with gelatin/hyaluronic acid/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer for articular cartilage tissue engineering: the results of real-time polymerase chain reaction. *J Biomed Mater Res A*. Sep 1;82(3):757-67.

**Claudepierre P, Voisin MC, (2005)** The entheses: histology, pathology, and pathophysiology, *Joint Bone Spine*, 72, 32-37

**Clore JN, Cohen IK, Diegelmann RF (1979)** Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin. *Proc Soc Exp Biol Med* 161: 337 – 340.

**Cohen DB, Kawamura S, Ehteshami JR, Rodeo SA (2006)** Indomethacin and celecoxib impair rotator cuff tendon-to-bone healing. *Am J Sports Med*.;34(3):362-369.

**Coleman, SH, Fealy S, Ehteshami JR, MacGillivray JD, Altchek DW, Warren RF, Turner AS (2003)** Chronic rotator cuff injury and repair model in sheep. *J Bone Joint Surg Am* 85-A, 2391.

**Comte Fernand (1989)** Les grandes figures des mythologies, France Loisir,

**Cooper RR, Misol S (1970)** Tendon and ligament insertion. A light and electron microscopic study. *J Bone Jt Surg*: 52A: 1–20.

## D

**Dahlgren LA, Mohammed HO, Nixon AJ (2005)** Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. *J Orthop Res.*;23:84–92.

**Dejardin LM, Arnoczky SP, Clarke RB (1999)** Use of small intestinal submucosal implants for regeneration of large fascial defects: an experimental study in dogs. *J Biomed Mater Res* 46, 203.

**Derwin KA, Baker AR, Iannotti JP, McCarron JA (2010)** Preclinical models for translating regenerative medicine therapies for rotator cuff repair. *Tissue Eng Part B Rev*. Feb;16(1):21-30.

**Derwin KA, Baker AR, Codsí MJ, Iannotti JP (2007)** Assessment of the canine model of rotator cuff injury and repair. *J Shoulder Elbow Surg* 16, S140.

**Derwin KA, Codsí MJ, Milks RA, Baker AR, McCarron JA, Iannotti JP (2009)** Rotator cuff repair augmentation in a canine model with use of a woven poly-L-lactide device. *J Bone Joint Surg Am*. 91:1159–1171.

**Dolgo-Saburoff B (1929)** Über ursprung und insertion der Skelettmuskeln. *Anat Anz*: 68: 8–87.

**Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E (2006)** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8(4):315-7.

## E

**Eanes ED, Hailer AW, Midura RJ, Hascall VC (1992)** Proteoglycan inhibition of calcium phosphate precipitation in liposomal suspensions. *Glycobiology*. Dec;2(6):571-8.

**Evans EJ, Benjamin M, Pemberton DJ (1990)** Fibrocartilage in the attachment zones of the quadriceps tendon and patellar ligament of man. *J Anat*: 171: 155–162.

**Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffmann J, Overvest EP, Box HA, van Zundert A (2006)** Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol* ;38:174–187.

**Eyre DR, Matsui Y, Wu JJ (2002)** Collagen polymorphisms in intervertebral disc. *Biochem Soc Trans*, Nov;30 (Pt 6):844-8.

## F

**Fu FH, Zurakowski D, Browne JE, Mandelbaum B, Erggelet C, Moseley JB Jr, Anderson AF, Micheli LJ**

**(2005)** Autologous chondrocyte implantation versus debridement for treatment of full-thickness chondral defects of the knee: an observational cohort study with 3-year follow-up. *Am J Sports Med.*;33:1658-66.

**Fujioka H, Thakur R, Wang GJ, Mizuno K, Balian G, Hurwitz SR (1998)** Comparison of surgically attached and non-attached repair of the rat Achilles tendon-bone interface. Cellular organization and type X collagen expression. *Connect Tissue Res.* 37(3-4):205-18.

**Fukunaga T, Yamashiro T, Oya S, Takeshita N, Takigawa M, Takano-Yamamoto T (2003)** Connective tissue growth factor mRNA expression pattern in cartilages is associated with their type I collagen expression. *Bone*;33:911-8.

**Funakoshi T, Majima T, Suenaga N, Iwasaki N, Yamane S, Minami A (2006)** Rotator cuff regeneration using chitin fabric as an acellular matrix. *J Shoulder Elbow Surg.*;15:112–118.

## G

**Galatz LM, Ball CM, Teefey SA, Middleton WD, Yamaguchi K (2004)** The outcome and repair integrity of completely arthroscopically repaired large and massive rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am.* 86(2):219-224.

**Galatz LM, Charlton N, Das R, Kim HM, Havlioglu N, Thomopoulos S (2009)** Complete removal of load is detrimental to rotator cuff healing. *J Shoulder Elbow Surg.* 18:669-75.

**Galatz L, Rothermich S, VanderPloeg K, Petersen B, Sandell L, Thomopoulos S (2007)** Development of the supraspinatus tendon-to-bone insertion: localized expression of extracellular matrix and growth factor genes. *J Orthop Res.* Dec;25(12):1621-8.

**Galatz LM, Rothermich SY, Zaegel M, Silva MJ, Havlioglu N, Thomopoulos S (2005)** Delayed repair of tendon to bone injuries leads to decreased biomechanical properties and bone loss. *J Orthop Res.* Nov;23(6):1441-7.

**Galatz LM, Sandell LJ, Rothermich SY, Das R, Mastny A, Havlioglu N, Silva MJ, Thomopoulos S (2006)** Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. *J Orthop Res.* Mar;24(3):541-50.

**Gao J, Oqvist G, Messner K (1994)** The attachments of the rabbit medial meniscus: A morphological investigation using image analysis and immunohistochemistry. *J. Anat.* 185, 663–667.

**Gao J, Messner K, Ralphs JR, Benjamin M (1996)** An immunohistochemical study of enthesis development in the medial collateral ligament of the rat knee joint. *Anat Embryol Oct*;194(4):399-406.

**Gaucher A, Péré P, Gillet PM (1990)** From ankylosing spondylitis to Forestier's disease : ossifying enthesopathy, a unifying concept. *J Rheumatol*;17:854–6.

**Gaucher A, Péré P, Régent D, Grandhay P, Aussedat R, Vivard T (1987)** Spondylarthropathies or ossifying polyenthesitis. Scintigraphic and scanographic evidence. *Rev Rhum*;54:243–8.

**Gerber C, Schneeberger AG, Perren SM, Nyffeler RW (1999)** Experimental rotator cuff repair. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am* 81, 128.

**Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D (2010)** Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther.* Mar 15;1(1):2.

**Ghosh P, Taylor TKF (1987)** The knee joint meniscus. A fibrocartilage of some distinction. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 224,52-63.

**Gilbert TW, Freund JM, Badylak SF (2009)** Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *J Surg Res.*;152:135–139.

**Gimbel JA, Van Kleunen JP, Lake SP, Williams GR, Soslowky LJ (2007)** The role of repair tension on tendon to bone healing in an animal model of chronic rotator cuff tears. *J Biomech*; 40:561-8.

**Gimbel, JA, Van Kleunen, JP, Mehta S, Perry SM, Williams GR, Soslowky LJ (2004)** Supraspinatus tendon organizational and mechanical properties in a chronic rotator cuff tear animal model. *J Biomech* 37, 739-49

**Gimbel, JA, Van Kleunen JP, Williams GR, Thomopoulos S, Soslowky LJ (2007)** Long durations of immobilization in the rat result in enhanced mechanical properties of the healing supraspinatus tendon insertion site. *J Biomech Eng* 129, 400-4

**Goutallier D, Postel JM, Van Driessche S, Voisin MC (2005)** Histological lesions of supraspinatus tendons in full thickness tears of the rotator cuff. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* Apr; 91(2):109-13.

**Goutallier D, Postel JM, Bernageau J, Lavau L, Voisin MC (1994 )** Fatty muscle degeneration in cuff ruptures. Pre- and postoperative evaluation by CT scan. *Clin Orthop Relat Res.* Jul;(304):78-83.

**Gooding CR, Bartlett W, Bentley G, Skinner JA, Carrington R, Flanagan A (2006)** A prospective, randomised study comparing two techniques of autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee: Periosteum covered versus type I/III collagen covered. *Knee.*;13:203-10.

**Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T (2006)** Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol.*;207(2):331-339

**Gulotta LV, Kovacevic D, Ehteshami JR, Dagher E, Packer JD, Rodeo SA (2009)** Application of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rotator cuff repair model. *Am J Sports Med.* Nov;37(11):2126-33

**Gulotta LV, Kovacevic D, Montgomery S, Ehteshami JR, Packer JD, Rodeo SA (2010)** Stem cells genetically modified with the developmental gene MT1-MMP improve regeneration of the supraspinatus tendon-to-bone insertion site. *Am J Sports Med.* Jul;38(7):1429-37.

**Gulotta LV, Kovacevic D, Packer JD, Deng XH, Rodeo SA (2011)** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with scleraxis improve rotator cuff healing in a rat model. *Am J Sports Med.* Jun;39(6):1282-9

## H

**Havelka S, Horn V (1999)** Observations on the tidemark and calcified layer of articular cartilage. In “Biology of the Synovial Joint” (C. W. Archer, B. Caterson, M. Benjamin, and J. R. Ralphs, Eds.), pp. 331–346. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

**Hayes AJ, Benjamin M, Ralphs JR (2001)** Extracellular matrix in development of the intervertebral disc. *Matrix Biol* 20, 107-121,

**Hayes AJ, Benjamin M, Ralphs JR (1999)** Role of actin stress fibres in the development of the intervertebral disc: cytoskeletal control of extracellular matrix assembly. *Dev Dyn.* Jul;215(3):179-89.

**Harryman DT 2nd, Mack LA, Wang KY, Jackins SE, Richardson ML, Matsen FA 3rd (1991)** Repairs of the rotator cuff: correlation of functional results with integrity of the cuff. *J Bone Joint Surg Am.*;73(7): 982-989.

**Hays PL, Kawamura S, Deng XH, Dagher E, Mithoefer K, Ying L, Rodeo SA (2008)** The role of macrophages in early healing of a tendon graft in a bone tunnel. *J Bone Joint Surg Am.*;90: 565–579.

**Henderson I, Gui J, Lavigne P (2006)** Autologous chondrocyte implantation: natural history of postimplantation periosteal hypertrophy and effects of repair-site debridement on outcome. *Arthroscopy.*;22:1318-24 e1.

**Herberts CA, Kwa MSG, Hermsen HPH (2011)** Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of translational medicine,* 9,29, 2-14.

**Hiraki Y, Inoue H, Iyama K, Kamizono A, Ochiai M, Shukunami C, Iijima S, Suzuki F, Kondo J (1997)** Identification of chondromodulin I as a novel endothelial cell growth inhibitor. Purification and its localization in the avascular zone of epiphyseal cartilage. *J Biol Chem.* Dec 19;272(51):32419-26.

## I

**Iannotti JP, Codsi MJ, Kwon YW, Derwin K, Ciccone J, Brems JJ (2006)** Porcine small intestine submucosa augmentation of surgical repair of chronic two-tendon rotator cuff tears: a randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am.*;88:1238–1244.

**Iozzo RV (1997)** The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 32(2):141-74.

**Iozzo RV (1998)** Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.*;67:609-52.

**Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Seyama Y, Tsuchiya T (2007)** FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF- $\beta$ 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jul 20;359(1):108-114. May 21.

**Iwata Y, Morihara T, Tachiiri H, Kajikawa Y, Yoshida A, Arai Y, Tokunaga D, Sakamoto H, Matsuda K, Kurokawa M, Kawata M, Kubo T (2008)** Behavior of host and graft cells in the early remodeling process of rotator cuff defects in a transgenic animal model. *J Shoulder Elbow Surg.*;17(1 Suppl):101S–107S.

## J

**Jacenko O, Roberts DW, Campbell MR, McManus PM, Gress CJ, Tao Z (2002)** Linking hematopoiesis to endochondral skeletogenesis through analysis of mice transgenic for collagen X. *Am J Pathol.* Jun;160(6):2019-34.

**Jarvinen TA, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TLN, Kvist M, Hurme T, Isola J, Kalimo H, Jarvinen M (1999)** Mechanical loading regulates tenascin-C expression in the osteotendinous junction. *J. Cell Sci.* 112, 3157–3166.

## K

**Kannus P, Józsa L, Natri A, Järvinen M (1997)** Effects of training, immobilization and remobilization on tendons. *Scand J Med Sci Sports.* Apr;7(2):67-71.

**Kapila S, Xie Y (1998)** Targeted induction of collagenase and stromelysin by relaxin in unprimed and beta-estradiol-primed diarthrodial joint fibrocartilaginous cells but not in synoviocytes. *Lab Invest.* Aug;78(8):925-38.

**Kardon, G. (1998)** Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development* Oct;125(20):4019-32.

**Kassem M, Burns JS, Castro JG, Munoz DR (2005)** Adult stem cells and cancer. *Cancer Research* 65:9601.

**Kavanagh E, Ashhurst DE (2001)** Distribution of biglycan and decorin in collateral and cruciate ligament and menisci of rabbit knee joint. *J Histochem. Cytochem.* 49, 877-885

**Kikuchi K, Rudolph R, Murakami C, Kowdley K, McDonald GB (2002)** Portal vein thrombosis after hematopoietic cell transplantation: Frequency, treatment and outcome. *Bone Marrow Transplantation*, 29:329-333.

**Knese K-H, Biermann H (1958)** Die Knochenbildung an sehnens- und Bandsätzen im Bereich ursprünglich chondraler Apophysen. *Z Zellforsch.* 49: 142–187.

**Knoepfler PS (2009)** Deconstructing stem cell tumorigenicity: A roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells*, 27:1050-1056.

**Kobayashi M, Itoi E, Minagawa H, Miyakoshi N, Takahashi S, Tuoheti Y, Okada K, Shimada Y (2006)** Expression of growth factors in the early phase of supraspinatus tendon healing in rabbits. *J Shoulder Elbow Surg.*;15:371–377.

**Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R (2000)** Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerated bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 49:328–337.



**Kubis N, Tomita Y, Tran-Dinh A, Planat-Bernard V, Andre M, Karaszewski B, Waeckel L, Penicaud L, Silvestre J-S, Casteilla L, Seylaz J, Pindard E (2006)** Vascular fate of adipose tissue-derived adult stromal cells in the ischemic murine brain: A combined imaging- histological study. *NeuroImage* 34:1–11.

## L

**Leadbetter WB (1992)** Cell-Matrix response in tendon injury. *Clinics in Sports Medicine*, 11,3, 533-578

**Laloux L, Voisin MC, Allain J, Martin N, Kerboul L, Chevalier X, et al. (2001)** Immunohistological study of entheses in spondyloarthropathies: comparison in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*; 60:316–21.

**Landesberg R, Takeuchi E, Puzas JE (1996)** Cellular, biomechanical and molecular characterization of the bovine temporomandibular joint disc. *Arch Oral Biocl*, 41, 761-767.

**Le Graverand MPH, Ou Y, Scheild-Yee T, Barclay L; Hart D, Natsume T, Rattner JB (2001)** The cells of the rabbit meniscus: their arrangement, interrelationships, morphological variations and cytoarchitecture. *J Anat*, 198, 525-535.

**Le Graverand MPH, Sciore P Eggerer J, Rattner JP, Vignon E, Barclay L, Hart DA, Rattner JB (2001)** Formation and phenotype of cell clusters in osteoarthritic meniscus. *Arthritis Rheum*. 44, 411-418,

**Léjard V, Brideau G, Blais F, Salingcarnboriboon R, Wagner G, Roehrl MH, Noda M, Duprez D, Houillier P, Rossert J (2007)** Scleraxis and NFATc regulate the expression of the pro-alpha1(I) collagen gene in tendon fibroblasts. *J Biol Chem*. Jun 15;282(24):17665-75.

**Li H, Fan X, Kovi RC, Jo Y, Moquin B, Konz R, Stoicov C, Kurt-Jones E, Grossman SR, Lyle S, Rogers AB, Montrose M, Houghton J. (2007)** Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: A model of age-related tumorigenesis in mice. *Cancer Research*, 67:10889-10898.

**Lim JK, Hui J, Li L, Thambyah A, Goh J, Lee EH (2004)** Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*.;20(9):899-910.

**Liu SH, Yang RS, Al-Shaikh R, Lane JM (1995)** Collagen in tendon, ligament and bone healing: A current review, *Clin Orthop Relat Res*. Sep;(318):265-78.

## M

**MacGillivray JD, Fealy S, Terry MA, Koh JL, Nixon AJ, Warren RF (2006)** Biomechanical evaluation of a rotator cuff defect model augmented with a bioresorbable scaffold in goats. *J Shoulder Elbow Surg*. Sep-Oct;15(5):639-44

**Maksymowych W (2000)** Ankylosing spondylitis. At the interface between bone and cartilage. *J Rheumatol*;27:2295–301.

**Mao JJ, Rahemtulla F, Scott PG (1998)** Proteoglycan expression in the rat temporomandibular joint in

response to unilateral bite raise. *J. Dent. Res.* 77, 1520–1528.

**Martin JA, Mehr D, Pardubsky PD, Buckwalter JA (2003)** The role of tenascin-C in adaptation of tendons to compressive loading. *Biorheology* 40, 321–329.

**Matthews TJ, Hand GC, Rees JL, Athanasou NA, Carr AJ (2006)** Pathology of the torn rotator cuff tendon: reduction in potential for repair as tear size increases. *J Bone Joint Surg Br* 88, 489.

**McAdams TR, Knudsen KR, Yalamanchi N, Chang J, Goodman SB (2007)** Deltoid flap combined with fascia lata autograft for rotator cuff defects: a histologic study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 15, 1144.

**McDevitt CA (1988)** Proteoglycans of the intervertebral disc. In *The Biology of the Intervertebral Disc*, vol. 1 (ed. P. Ghosh), pp. 151-170. Boca Raton: CRC.

**McDevitt CA, Webber RJ (1990)** The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop Relat Res.* Mar;(252):8-18.

**McGonagle D, Benjamin M, Marzo-Ortega H, Emery P (2002)** Advances in the understanding of enthesial inflammation. *Curr Rheumatol Rep.* Dec;4(6):500-6.

**McGonagle D, Stockwin L, Isaacs J, Emery P (2001)** An enthesitis based model for the pathogenesis of spondyloarthropathy. Additive effects of microbial adjuvant and biomechanical factors at disease sites. *J Rheumatol*;28:2155–9.

**McGonagle D, Marzo-Ortega H, O'Connor P, Gibbo W, Hawkey P, Henshaw K, et al. (2002)** Histological assessment of the early enthesitis lesion in spondyloarthropathy. *Ann Rheum Dis*;61:534–7.

**Melrose J, Ghosh P, Taylor TK (2001)** A comparative analysis of the differential spatial and temporal distribution of the large (aggrecan, versican) and small (decorine, biglycan, fibromoduline) proteoglycans of the intervertebral disc. *J anat*, 198, 3-15

**Menasche P (2009)** Stem cell therapy for heart failure: Are arrhythmias a real safety concern? *Circulation* 119:2735-2740.

**Mesa JM, Zaporozhan V, Weinand C, Johnson TS, Bonassar L, Randolph MA, Yaremchuk MJ, Butler PE (2006)** Tissue engineering cartilage with aged articular chondrocytes in vivo. *Plast Reconstr Surg*. Jul;118(1):41-9;

**Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB (2006)** Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119:2204–2213.

**Mikecz K, Arzoumanian A, Poole AR (1988)** Isolation of proteoglycan specific T lymphocytes from patients with ankylosing spondylitis. *Cell Immunol*;112:55–63.

**Miller RR, McDevitt CA (1991)** Thrombospondin in ligament, meniscus and intervertebral disc. *Biochim Biophys Acta.* Nov 14;1115(1):85-8.

**Milz S, Rufai A, Buettner A, Putz R, Ralphs JR, Benjamin M (2002)** Three dimensional reconstruction of the Achille tendon insertion in man. *J Anat*, 200, 145-152

**Moffat KL, Sun WH, Pena PE, Chahine NO, Doty SB, Ateshian GA, Hung CT, Lu HH (2008)** Characterization of the structure-function relationship at the ligament-to-bone interface. *Proc Natl Acad Sci Jun* 10;105(23):7947-52.

**Molloy T, Wang Y, Murrell G (2003)** The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med* 33:381–394.

**Moore DR, Cain EL, Schwartz ML, Clancy WG Jr (2006)** Allograft reconstruction for massive, irreparable rotator cuff tears. *Am J Sports Med.* 34:392–396.

**Murray DH, Kubiak EN, Jazrawi LM, Araghi A, Kummer F, Loebenberg MI, Zuckerman JD (2007)** The effect of cartilage-derived morphogenetic protein 2 on initial healing of a rotator cuff defect in a rat model. *J Shoulder Elbow Surg* 16, 251-4

**Mwale F, Tchetina E, Wu CW, Poole AR (2002)** The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. *J Bone Miner Res.* Feb;17(2):275-83.

**Myllyharju J, Kivirikko KI (2001)** Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med.* Feb;33(1):7-21.

## N

**Nakase T, Ariga K, Meng W, Iwasaki M, Tomita T, Myoui A, Yonenobu K, Yoshikawa H (2002)** Distribution of genes for parathyroid hormone (PTH)-related peptide, Indian hedgehog, PTH receptor and patched in the process of experimental spondylosis in mice. *J. Neurosurg.* 97(suppl. 1), 82–87.

**Nakase T, Sugamoto K, Miyamoto T, Tsumaki N, Luyten FP, Inui H, Myoui A, Tomita T, Yoshikawa H. (2002)** Activation of cartilage-derived morphogenetic protein-1 in torn rotator cuff. *Clin Orthop Relat Res:junz* (399) 140-5.

**Närvä E, Autio R, Rahkonen N, Kong L, Harrison N, Kitsberg D, Borghese L, Itskovitz-Eldor J, Rasool O, Dvorak P, Hovatta O, Otonkoski T, Tuuri T, Cui W, Brüstle O, Baker D, Maltby E, Moore HD, Benvenisty N, Andrews PW, Yli-Harja O, Lahesmaa R. (2010)** High-resolution DNA analysis of human embryonic stem cell lines reveals culture-induced copy number changes and loss of heterozygosity. *Nature Biotechnology*, 28:371-377.

**Nicholson GP, Breur GJ, Van SD, Yao JQ, Kim J, Blanchard CR (2007)** Evaluation of a cross-linked acellular porcine dermal patch for rotator cuff repair augmentation in an ovine model. *J Shoulder Elbow Surg* 16, S184.

**Niepel GA, Sit'Aj S (1979)** Enthesopathy. *Clinics in Rheumatic Diseases* ;5:857–72.

**Nofal GA, Knudson CB (2002)** Latrunculin and cytochalasin decrease chondrocyte matrix retention. *J Histochem Cytochem.* Oct;50(10):1313-24.

## O

**Oguma H, Murakami G, Takahashi-Iwanaga H, Aoki M, Ishii S (2001)** Early anchoring collagen fibers at

the bone-tendon interface are conducted by woven bone formation: light microscope and scanning electron microscope observation using a canine model. *J Orthop Res* 19, 873-80

**Ouyang HW, Goh JC, Lee EH (2004)** Use of bone marrow stromal cells for tendon graft-to-bone healing: histological and immunohistochemical studies in a rabbit model. *Am J Sports Med.*;32(2):321-327.

## P

**Paavola M, Kannus P, Järvinen TA, Khan K, Józsa L, Järvinen M (2002)** Achilles tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am.* Nov;84-A(11):2062-76.

**Peretti GM, Gill TJ, Xu JW, Randolph MA, Morse KR, Zaleske DJ (2004)** Cell-based therapy for meniscal repair: a large animal study. *Am J Sports Med.* Jan-Feb;32(1):146-58.

**Perry SM, McIlhenny SE, Hoffman MC, Soslowky LJ (2005)** Inflammatory and angiogenic mRNA levels are altered in a supraspinatus tendon overuse animal model. *J Shoulder Elbow Surg.* 14(1 Suppl):79S–83S.

**Petersen W, Pufe T, Kurz B, Mentlein R, Tillmann B (2002)** Angiogenesis in fetal tendon development: spatial and temporal expression of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor. *Anat Embryol.* Jul;205(4):263-70.

**Prockop DJ, Olson SD (2007)** Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions. *Blood.* Apr 15;109(8):3147-51.

## Q

## R

**Ralphs JR, Benjamin M, Thornett A (1991)** Cell and matrix biology of the suprapatella in the rat: A structural and immunocytochemical study of fibrocartilage in a tendon subject to compression. *Anat. Rec.* 231, 167-177.

**Randelli PS, Arrigoni P, Cabitza P, Volpi P, Maffulli N (2008)** Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair: a pilot study. *Disabil Rehabil* ;30:1584-1589.

**Randelli PS, Arrigoni P, Ragone V, Aliprandi A, Cabitza P (2011)** Platelet rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: a prospective RCT study, 2-year follow-up. *J Shoulder Elbow Surg.* Jun;20(4):518-28.

**Randolph MA, Anseth K, Yaremchuk MJ (2003)** Tissue engineering of cartilage. *Clin Plast Surg.* Oct;30(4):519-37.

**Ren H, Cao Y, Zhao Q, Li J, Zhou C, Liao L, Jia M, Zhao Q, Cai H, Han ZC, Yang R, Chen G, Zhao RC. (2006)** Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 18;347(1):12-21.

**Renstrom P, Hach T (2005)** Insertional Tendinopathy in Sport, in *Tendon Injuries*, Maffulli N, Renstrom P, Leadbetter WB, Springer

**Rhee YG, Cho NS, Lim CT, Yi JW, Vishvanathan T (2008)** Bridging the gap in immobile massive rotator cuff tears: augmentation using the tenotomized biceps. *Am J Sports Med*;36:1511– 1518.

**Robbins JR, Evanko SP, Vogel KG (1997)** Mechanical loading and TGF-beta regulate proteoglycan synthesis in tendon. *Arch Biochem Biophys*. Jun 15;342(2):203-11.

**Rodeo SA, Delos D, Weber A, Ju X, Cunningham ME, Fortier L, Maher S (2010)** What's new in orthopaedic research. *J Bone Joint Surg Am*. Oct 20;92(14):2491-501.

**Rufai A, Benjamin M, Ralphs JR (1995)** The development of fibrocartilage in the rat intervertebral disc. *Anat Embryol (Berl)*. Jul;192(1):53-62.

**Rufai A, Ralphs JR, Benjamin M (1995)** Structure and histopathology of the insertional region of the human Achilles tendon. *J Orthop Res*. Jul;13(4):585-93.

**Rufai A, Ralphs JR, Benjamin M (1996)** Ultrastructure of fibrocartilages at the insertion of the rat Achilles tendon. *J Anat*. Aug;189 ( Pt 1):185-91.

**Roberts AB, Sporn MB (1995)** Transforming growth factor-b. In: Clark RAF, editor. *The molecular and cellular biology of wound repair*, 2nd ed. New York: Plenum Press; p 265 – 275.

**Roughley PJ, Lee ER (1994)** Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech*. Aug 1;28(5):385-9

## S

**Sakai H, Koibuchi N, Ohtake H, Tamai K, Fukui N, Oda H, Saotome K (2001)** Type I and type III procollagen gene expressions in the early phase of ligament healing in rabbits: an in situ hybridization study. *J Orthop Res* 19:132–135

**Salvat C, Pigenet A, Humbert L, Berenbaum F, Thirion S (2005)** Immature murine articular chondrocytes in primary culture: a new tool for investigating cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. Mar;13(3):243-9.

**Sandmeier R, Renström PA (1997)** Diagnosis and treatment of chronic tendon disorders in sports. *Scand J Med Sci Sports*. Apr;7(2):96-106.

**Santra M, Reed CC, Iozzo RV (2002)** Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope. *J Biol Chem*, 277, 35671-35981

**Schizas N, Li J, Andersson T, Fahlgren A, Aspenberg P, Ahmed M, Ackermann P W (2010)** Compression therapy promotes proliferative repair during rat Achilles tendon immobilization. *J Orthop Res*;28:852-8.

**Schlegel TF, Hawkins RJ, Lewis CW, Motta, T, Turner AS (2006)** The effects of augmentation with Swine small intestine submucosa on tendon healing under tension: histologic and mechanical evaluations in sheep. *Am J Sports Med* 34, 275.

**Seeherman HJ, Archambault JM, Rodeo SA, Turner AS, D'Augusta D, Li XJ, Smith E, Wozney JM (2008)** rhBMP-12 accelerates healing of rotator cuff repairs in a sheep model. *J Bone Joint Surg Am.*;90:2206–2219

**Shaw HM, Benjamin M (2007)** Structure-function relationships of entheses in relation to mechanical load and exercise. *Scand J Med Sci Sports.* Aug;17(4):303-15. Epub 2007 May 9.

**Shih CC, Forman SJ, Chu P, Slovak M (2007)** Human embryonic stem cells are prone to generate primitive, undifferentiated tumors in engrafted human fetal tissues in severe combined immunodeficient mice. *Stem Cells and Development* 16:893-902.

**Shichikawa K, Tsujimoto M, Nishioko J, Nishibayashi Y, Matsumoto K (1985)** Histopathology of early sacroiliitis and enthesitis in ankylosing spondylitis. In: Ziff M, Cohen SB, editors. *Advances in Inflammatory Research: The Spondylarthropathies*, 9. New York: Raven Press;.

**Shoemaker SC, Rechl H, Campbell P, Kram HB, Sanchez M (1989)** Effects of fibrin sealant on incorporation of autograft and xenograft tendons within bone tunnels: a preliminary study. *Am J Sports Med.*;17(3):318-324.

**Silverman RP, Passaretti D, Huang W, Randolph MA, Yaremchuk MJ (1999)** Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin glue polymer. *Plastic & Reconstructive Surgery.* Jun.103 (7): 1809-18.

**Singh K, Masuda K, Thonar EJ, An HS, Cs-Szabo G (2009)** Age-related changes in the extracellular matrix of nucleus pulposus and annulus fibrosus of human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976).* Jan 1;34(1):10-6.

**Solchaga LA, Temenoff JS, Gao J, Mikos AG, Caplan AI, Goldberg VM (2005)** Repair of osteochondral defects with hyaluronan- and polyester-based scaffolds. *Osteoarthritis Cartilage* 13:297–309.

**Soler JA, Gidwani S, Curtis MJ (2007)** Early complications from the use of porcine dermal collagen implants (Permacol) as bridging constructs in the repair of massive rotator cuff tears: a report of 4 cases. *Acta Orthop Belg.*;73:432–436.

**Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, Banerji I, Moalli MR (1996)** Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg* 5, 383-92

**Soslowsky LJ, Thomopoulos S, Esmail A, Flanagan CL, Iannotti JP, Williamson JD, Carpenter JE (2002)** Rotator cuff tendinosis in an animal model: role of extrinsic and overuse factors. *Ann Biomed Eng* 30, 1057-63

**Stockwell RA (1979)** *Biology of cartilage cells*, Cambridge university press, Cambridge

## T

**Tavian M, Zheng B, Oberlin E, Crisan M, Sun B, Huard J, Peault B (2005)** The vascular wall as a source of stem cells. *Ann NY Acad Sci* 1044:41–50.

**Takahashi K, Yamanaka S (2006)** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult

fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. Aug 25;126(4):663-76.

**Takao T, Iwaki T, Kondo J, Hiraki Y (2000)** Immunohistochemistry of chondromodulin-I in the human intervertebral discs with special reference to the degenerative changes. *Histochem J*. Sep;32(9):545-50.

**Thomopoulos S, Genin GM, Galatz LM (2010)** The development and morphogenesis of the tendon-to-bone insertion - what development can teach us about healing. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. Mar;10(1):35-45.

**Thomopoulos S, Kim HM, Rothermich SY, Biederstadt C, Das R, Galatz LM (2007)** Decreased muscle loading delays maturation of the tendon enthesis during postnatal development. *J Orthop Res*. Sep;25(9):1154-63

**Thomopoulos S, Hattersley G, Rosen V, Mertens M, Galatz L, Williams GR, Soslowky L (2002)** The localized expression of extracellular matrix components in healing tendon insertion sites: an in situ hybridization study. *J Orthop Res*. May;20(3):454-63.

**Thomopoulos S, Williams GR, Soslowky LJ (2003)** Tendon to bone healing: differences in biomechanical, structural, and compositional properties due to a range of activity levels. *J Biomech Eng* 125:106– 113.

**Thomopoulos S, Soslowky LJ, Flanagan CL, Tun S, Keefer CC, Mastaw J, Carpenter JE. (2002)** The effect of fibrin clot on healing rat supraspinatus tendon defects. *J Shoulder Elbow Surg*.;11(3):239-247.

**Tipton CM, Matthes RD, Martin RK (1978)** Influence of age and sex on the strength of bone-ligament junctions in knee joints of rats. *J. BoneJoint Surg*. 60A, 230-234.

## U

**Undale AH, Westendorf JJ, Yaszemski MJ, Khosla S (2009)** Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases. *Mayo Clin Proc*. Oct;84(10):893-902.

**Uhthoff HK, Matsumoto F, Trudel G, Himori K (2003)** Early reattachment does not reverse atrophy and fat accumulation of the supraspinatus—an experimental study in rabbits. *J Orthop Res* 21, 386.

## V

**Vo N, Seo HY, Robinson A, Sowa G, Bentley D, Taylor L, Studer R, Usas A, Huard J, Alber S, Watkins SC, Lee J, Coehlo P, Wang D, Loppini M, Robbins PD, Niedernhofer LJ, Kang J (2010)** Accelerated aging of intervertebral discs in a mouse model of progeria. *J Orthop Res*. Dec;28(12):1600-7.

**de Vos RJ, Weir A, van Schie HT, Bierma-Zeinstra SM, Verhaar JA, Weinans H, Tol JL. (2010)** Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *JAMA*.;303:144-149.

**Vidernan, T (1970)** An experimental study of the effects of growth on the relationship of tendons and ligaments to bone at the site of diaphyseal insertion. *Acta Whop. &and*. 131(Suppl.),1-22.

## W

**Walton JR, Bowman NK, Khatib Y, Linklater J, Murrell GA (2007)** Restore orthobiologic implant: not recommended for augmentation of rotator cuff repairs. *J Bone Joint Surg Am.* 89:786–791.

**Wang IE, Mitroo S, Chen FH, Lu HH, Doty SB (2006)** Age-dependent changes in matrix composition and organization at the ligament-to-bone insertion. *J Orthop Res.* Aug;24(8):1745-55.

**Weinand C, Peretti GM, Adams SB, Bonassar LJ, Randolph MA, Gill TJ (2006)** An Allogenic Cell-Based Implant for Meniscal Lesions, *Am J Sports Med* 34:1779-1789.

**Wong MW, Qin L, Tai JK, Lee SK, Leung KS, Chan KM (2004)** Engineered allogeneic chondrocyte pellet for reconstruction of fibrocartilage zone at bone-tendon junction : a preliminary histological observation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* Aug 15;70(2):362-7.

**Woo SL, Livesay GA, Runco TJ, et al. (1997)** Structure and function of tendon and ligament. In: Mow VC, Hayes WC, editor. *Basic orthopaedic biomechanics.* Philadelphia: Lippincott-Raven; p209 – 252.

**Würgler-Hauri CC, Dourte LM, Baradet TC, Williams GR, Soslowky LJ (2007)** Temporal expression of 8 growth factors in tendon-to-bone healing in a rat supraspinatus model. *J Shoulder Elbow Surg.* Sep-Oct;16(5 Suppl):S198-203.

## X

## Y

**Yamazaki S, Yasuda K, Tomita F, Tohyama H, Minami A (2005)** The effect of transforming growth factor-beta1 on intraosseous healing of flexor tendon autograft replacement of anterior cruciate ligament in dogs. *Arthroscopy.*;21(9):1034-1041.

**Yokoya S, Mochizuki Y, Nagata Y, Deie M, Ochi M (2008)** Tendonbone insertion repair and regeneration using polyglycolic acid sheet in the rabbit rotator cuff injury model. *Am J Sports Med.*;36:1298–1309.

**Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007)** Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* Dec 21;318(5858):1917-20

## Z

**Zumstein MA, Jost B, Hempel J, Hodler J, Gerber C (2008)** The clinical and structural long-term results of open repair of massive tears of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg Am.*;90:2423–2431.



# Mesenchymal Stem Cell Therapy Regenerates the Native Bone-Tendon Junction after Surgical Repair in a Degenerative Rat Model

Geoffroy Nourissat<sup>1</sup>, Amadou Diop<sup>2</sup>, Nathalie Maurel<sup>2</sup>, Colette Salvat<sup>1</sup>, Sylvie Dumont<sup>3</sup>, Audrey Pigenet<sup>1</sup>, Marjolaine Gosset<sup>1</sup>, Xavier Houard<sup>1</sup>, Francis Berenbaum<sup>1,4\*</sup>

**1** UR 4, Pierre & Marie Curie University, Paris, France, **2** Biomechanics and bone remodeling (EPBRO), Arts et Métiers ParisTech, Paris, France, **3** Department of anatomopathology, AP-HP Saint Antoine hospital, Pierre & Marie Curie University, Paris, France, **4** Department of Rheumatology, AP-HP Saint Antoine hospital, Pierre & Marie Curie University, Paris, France

## Abstract

**Background:** The enthesis, which attaches the tendon to the bone, naturally disappears with aging, thus limiting joint mobility. Surgery is frequently needed but the clinical outcome is often poor due to the decreased natural healing capacity of the elderly. This study explored the benefits of a treatment based on injecting chondrocyte and mesenchymal stem cells (MSC) in a new rat model of degenerative enthesis repair.

**Methodology:** The Achilles' tendon was cut and the enthesis destroyed. The damage was repaired by classical surgery without cell injection (group G1, n = 52) and with chondrocyte (group G2, n = 51) or MSC injection (group G3, n = 39). The healing rate was determined macroscopically 15, 30 and 45 days later. The production and organization of a new enthesis was assessed by histological scoring of collagen II immunostaining, glycoaminoglycan production and the presence of columnar chondrocytes. The biomechanical load required to rupture the bone-tendon junction was determined.

**Principal Findings:** The spontaneous healing rate in the G1 control group was 40%, close to those observed in humans. Cell injection significantly improved healing (69%,  $p = 0.0028$  for G2 and  $p = 0.006$  for G3) and the load-to-failure after 45 days ( $p < 0.05$ ) over controls. A new enthesis was clearly produced in cell-injected G2 and G3 rats, but not in the controls. Only the MSC-injected G3 rats had an organized enthesis with columnar chondrocytes as in a native enthesis 45 days after surgery.

**Conclusions:** Cell therapy is an efficient procedure for reconstructing degenerative entheses. MSC treatment produced better organ regeneration than chondrocyte treatment. The morphological and biomechanical properties were similar to those of a native enthesis.

**Citation:** Nourissat G, Diop A, Maurel N, Salvat C, Dumont S, et al. (2010) Mesenchymal Stem Cell Therapy Regenerates the Native Bone-Tendon Junction after Surgical Repair in a Degenerative Rat Model. PLoS ONE 5(8): e12248. doi:10.1371/journal.pone.0012248

**Editor:** Francois Patrick Rannou, Hôpital Cochin, France

**Received:** April 2, 2010; **Accepted:** July 22, 2010; **Published:** August 18, 2010

**Copyright:** © 2010 Nourissat et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was funded by a grant from SOFCOT (Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique): The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: francis.berenbaum@sat.aphp.fr

## Introduction

Population aging and a better quality of life have led to surgery now being performed on elderly patients who are still very active. The two main orthopedic surgical procedures are joint replacement in cases of osteoarthritis (OA) and the repair of failed tissues. The repair of many joints is particularly challenging in elderly patients because this surgery depends on the natural healing capacity of the body and older people heal more slowly [1]. Tendons and ligaments are fibers made up of dense connective tissue and they are critical for physiological movement and the stability of joints because of their attachment to bone [2]. Injury to these structures can significantly destabilize joints, resulting in the development of degenerative joint diseases, especially in the upper limbs [2]. The most common disorders affect the supraspinatus tendon of the rotator cuff, the Achilles tendon, the flexor tendons

of the hand, and the anterior cruciate and medial collateral ligaments of the knee [3,4]. Almost 60% of people over 60 suffer from a torn shoulder tendon [3,5]. Current clinical data indicate that 50% of surgically repaired shoulder cuff tears do not heal properly [3,5,6]. These poor healing rates are independent of the surgical procedure used [6–8] and the poor healing is statistically linked to a negative clinical outcome [6]. Several extrinsic and intrinsic mechanisms have been proposed to explain the development of rotator cuff disease [3,9–11]. One reason for this failure after repair is the age of the surrounding tissues. Fresh, limited lesions heal more rapidly in healthy patients [6]. Unfortunately, rotator cuff disease usually occurs in the elderly, who obviously have aging tissues [9]. Adipose tissue infiltrates the muscles, structural disorders appear in tendon, mineral changes affect the humeral head, and the enthesis disappears [5]. The enthesis is delimited by the region covering the tendon-to-bone

insertion [11]. This fibrocartilage consists of four distinct zones: the tendon zone (organizing the anchoring of tendon type I collagen fibers arriving at the enthesis), the unmineralized fibrocartilage, the mineralized fibrocartilage and the bone. The calcification front is the boundary between the two fibrocartilage zones [4]. This four-layer structure is a biomechanical organ transmits loads and decreases the concentration of stress at the attachment zone, acting like a tectonic plate [4]. Many elements are involved in this particular biomechanical function, but a main one is the presence of chondrocytes producing type II collagen [4,11]. Aging or acute trauma can cause the tendon to become detached from the bone by breakdown or destruction of the enthesis [5,10,11].

The high failure rate after repair is independent of the technical procedure used. Hence, orthopedic research has focused on ways to enhance the healing rate [7,8,12–15]. Both cell therapy and tissue engineering have been investigated [12–15]. Several animal studies have explored the use of adjuvants like soft tissue allografts and allogenic growth factors to enhance bone-tendon healing [15–18]. One possibility is to use an allogenic scaffold. Cells may be embedded in it to reinforce anchoring or to increase the size of the tendon [17]. Whereas animal studies have reported improvements in load-to-failure, early clinical studies did not reproduce this effect [13,14,17]. Another avenue of research is to use recombinant growth factors to promote and enhance the natural ability of the bone to repair the tendon [15]. Experiments using BMP in bone-tendon fixation on sheep showed that it tends to increase load-to-failure in biomechanical tests performed 6 to 12 weeks after repair [15]. Because natural bone-tendon fixation involves a fibrocartilage [4] several authors [19] have studied the effect of implanting cultured chondrocytes between the bone and tendon. But they reported only histological data and no biomechanical tests were performed. One of the main reasons for the paucity of data on cell therapy in bone-tendon healing is the lack of a suitable animal model.

The first aim of this study was to develop and validate a small animal model for exploring the capacity of cell treatment to restore the enthesis. Cell therapy is difficult to use on the rat supraspinatus [20] and there are many data on the biomechanics of the Achilles' tendon and calcaneus of Wistar rats. We therefore developed a model based on the destruction of the enthesis of the Achilles' tendon. The model needed to have a spontaneous healing rate after repair of the bone-tendon junction of 50%, similar to human surgical outcomes. The second part of this study evaluates the effect of depositing chondrocytes or mesenchymal stem cells (MSCs) during the initial repair. Chondrocytes are the natural cells of the enthesis and can produce type II collagen, the major promoter of anchorage. Because the body contains few chondrocytes, we evaluated the capacity of MSCs to produce the same effect as chondrocytes.

## Results

### Experimental model of Achilles' tendon repair

This study was approved by the animal research committee of our university and all animal experiments complied with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee.

The enthesis, the area of bone-tendon junction (Fig. 1A, B), is made up of two areas that stain positively for collagen II. These correspond to the insertion of the tendon into the bone (E1) and the sliding zone of the tendon (E2) (Fig. 1C). The tendon healing model required the destruction of the enthesis followed by the attachment of the tendon to the bone using bony tunnels with sutures (see Material and Methods). The surgical procedure totally

destroyed the enthesis, as evidenced by the absence of both tendon and collagen II-positive fibrocartilage (Fig. 1D). In contrast, the E2 cartilage was present after the destruction of the enthesis. Healing failure was evaluated at sacrifice by three macroscopic criteria: 1) the proximal migration of the tendon with a gap between the tendon and the bone, 2) suture rupture (Fig. 1E, F), and 3) the distance between the bone and the muscle of  $>1$  cm. These criteria gave an overall healing rate of 40% (control group G1) (Fig. 1G). The healing rate of our model is therefore similar to that of human shoulder cuff surgery [3].

### Improvement in overall healing rate by chondrocyte and MSC cell therapy

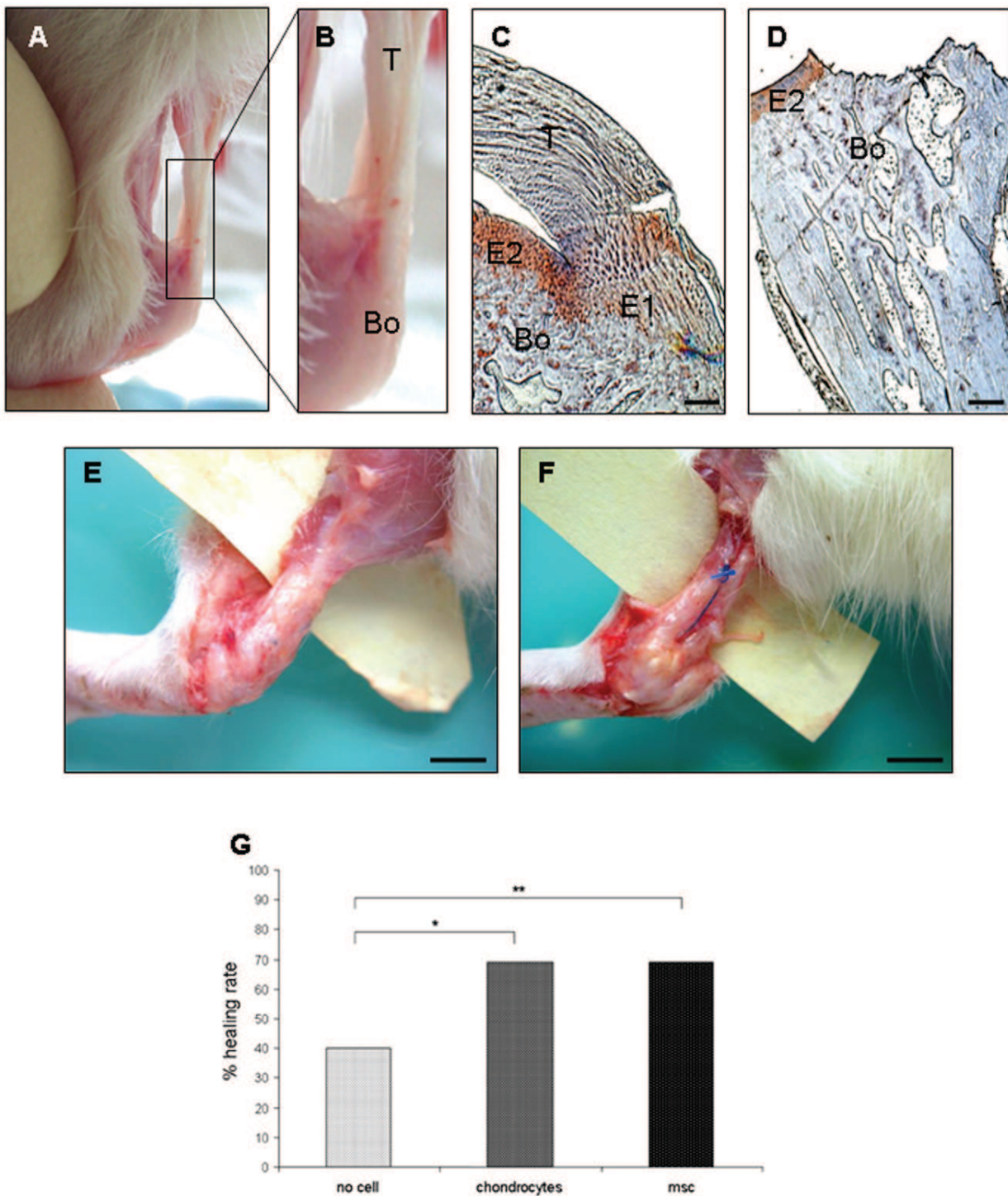
Rat chondrocytes (group G2,  $n=51$ ) or MSCs (group G3,  $n=39$ ) were injected into the repair site before tightening the suture to determine the effect of cell therapy on the healing rate after enthesis destruction and repair. The overall percentage of healing was significantly higher than in the G1 control group when both chondrocytes and MSCs were injected (Fig. 1G). Only 40% of the tendons healed when no cells were injected (control group G1,  $n=52$ ), whereas the healing rate rose to 69% for the two groups of cell-treated rats ( $p=0.0028$  between G2 and G1, and  $p=0.006$  between G3 and G1). There was no statistically significant difference between G2 and G3 ( $p=0.9$ ). Both cell therapies increased the overall tendon-to-bone healing rate after surgical repair.

### Influence of cell therapy on the load-to-failure 45 days after repair

The load-to-failure is the load required to rupture the bone-tendon junction. Rupture was obtained 15 days after surgery with a significantly lower load in the control G1 group ( $35.9\pm 13.4$  N) than in an uninjured enthesis ( $74.4\pm 10.9$  N,  $p=0.001$ ) (Fig. 2). The injection of neither chondrocytes ( $40.5\pm 9.5$  N,  $p<0.001$ ) nor MSCs ( $39.6\pm 8.7$  N,  $p<0.0001$ ) improved the load-to-failure after 15 days. The values were similar to those for the G1 group and significantly lower than those for the native enthesis (Fig. 2). The load-to-failure values increased with time after surgery in all three groups of rats and reached a plateau between days 30 and 45 for the G1 group. The G2 and G3 rats did not reach this plateau and the load-to-failure values increased further between days 30 and 45. The load-to-failure values 45 days after repair were significantly higher in chondrocyte-injected G2 ( $80.3\pm 13.0$  N) and MSC-injected G3 ( $84.6\pm 17.1$  N) groups than in the G1 rats ( $68.7\pm 15.1$  N) that had been given no cells (Fig. 2). The load-to-failure values for the two cell-injected groups 45 days after repair were also higher than those of native entheses. Thus, cell therapy improved the strength of the repaired tendon.

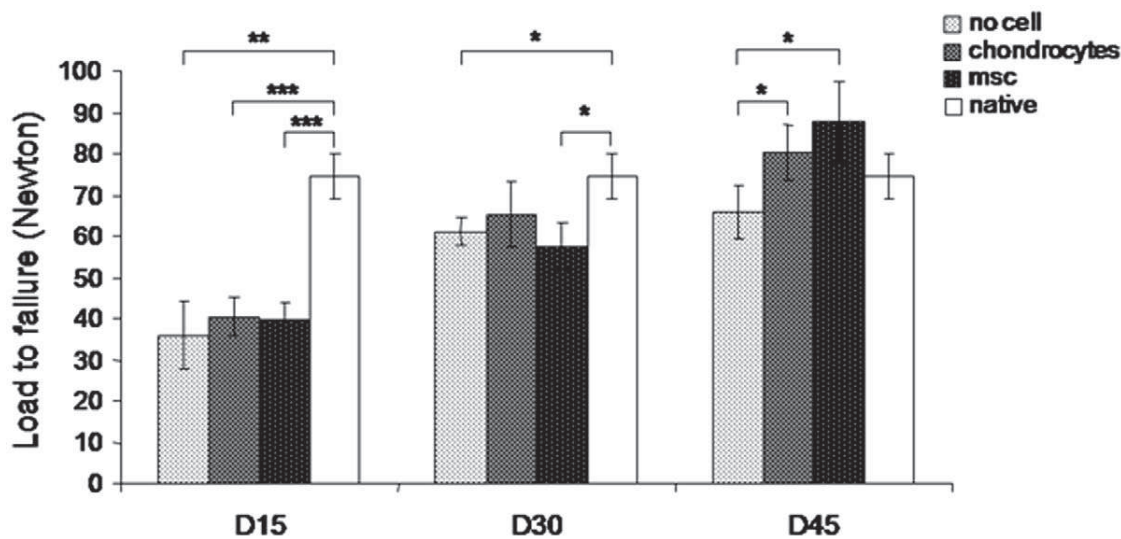
### Restoration of a native-like enthesis by MSC-injection

No collagen II immunostaining was detected in control G1 group of rats 15 and 30 days after surgery and only a faint positive staining was observed on day 45 (Fig. 3a, d and g), although there was fibrous tissue throughout the healing process. Alcian blue staining did not reveal any glycoaminoglycan (GAG) in the G1 repairs 45 days post-surgery (Fig. 3g inset). The histological scale of enthesis production (table 1) indicated that no enthesis was restored when no cells were injected. In contrast, the bone tendon junctions of cell-injected rats showed collagen II deposits as early as 15 days post-repair (Fig. 3b and c). There was collagen II-positive staining around local cell clusters that delimited the bone-cartilage junction in both G2 and G3 rats (Fig. 3b, c and e insets). The numbers of cells in the clusters decreased over time,



**Figure 1. Enthesis structure and healing ratse after repair.** The entesis is the area of bone-tendon junction. A) Wistar rat Achilles tendon-bone junction. B) Higher magnification of the delimited area shown in (A). T, tendon; Bo, bone. C and D) Type II collagen immunostaining of a native (C) and a destroyed entesis (D). Native entesis shows two positive areas of collagen II staining: E1, the insertion of the tendon (T) into the bone (Bo) and E2, the sliding zone of the tendon. Note the absence of the tendon and the E1 area just after destruction of the entesis (D). (C and D, scale = 200 $\mu$ m). E and F) Healing failure after repair was evaluated by suture breakage (E) and a distance between the bone and the tendon of greater than 1 cm (F) (E and F, scale = 1 cm). G) Healing rate was evaluated at sacrifice for the three groups of rats and expressed as a percentage. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ .

doi:10.1371/journal.pone.0012248.g001



**Figure 2. Improvement by cell therapy of the load-to-failure after repair of Achilles tendons.** We determined the Load-to-failure of Achilles tendons taken from control (G1), chondrocyte- (G2) and MSC-injected (G3) rats 15, 30 and 45 days after repair and compared them to those of a native entheses ( $74.4 \pm 10.9$  N, white box). There was a statistically significant difference between the value for the native entheses and those for other populations at 15 days post-repair. There was a statistically significant difference between the values for the native entheses and those of G1 and G3 30 days post-repair, and a statistically significant difference between G1 and G2 and G3, 45 days post-repair. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

doi:10.1371/journal.pone.0012248.g002

whereas type II collagen and GAG production increased (Fig. 3). A second histological analysis was performed at 45 days to assess the morphological organization of the entheses (table 1). The cells at the bone-cartilage junction were organized into columns in the MSC-injected G3 rats (Fig. 4D). Native entheses contained similarly organized chondrocytes (Fig. 4A). In contrast, the entheses of neither the G2 nor the G1 rats had this columnar chondrocyte distribution at the cartilage-bone junction 45 days after repair (Fig. 4B and C). Quantification of the organization of the entheses showed statistically significant differences between the native entheses and G1 ( $p = 0.008$ ), between the G3 entheses and G1 ( $p = 0.027$ ), between the native and G2 entheses ( $p = 0.005$ ) and between the G3 entheses and G2 ( $p = 0.05$ ), whereas the differences between the native and G3, or G1 and G2 entheses were not significantly different. Thus, the histological appearance of the entheses injected with MSCs at 45 days was similar to that of the native entheses, but not any of the others (Fig. 4).

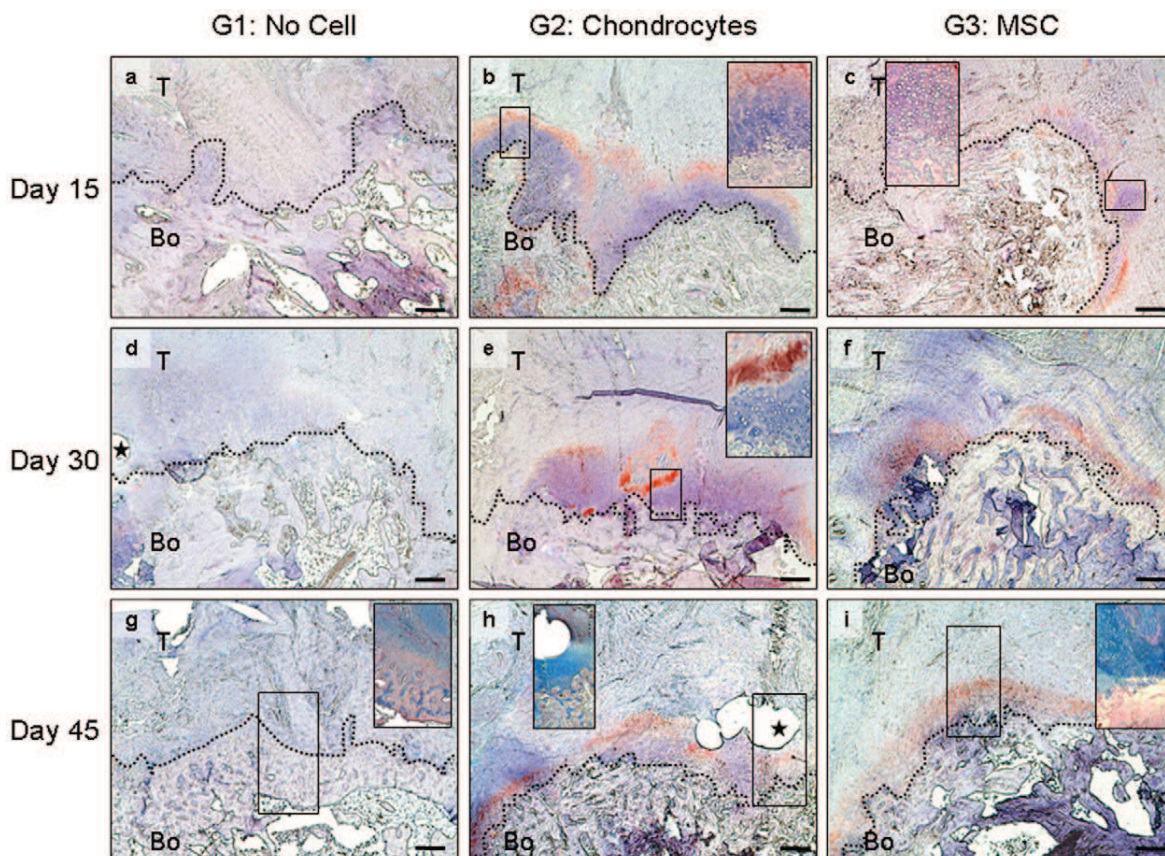
## Discussion

Repair of tendon-bone insertion is a very common surgical procedure, especially for shoulder cuff disorders or anterior cruciate ligament reconstruction. It is one of the most common procedures in sports medicine [3,5,11]. Shoulder cuff surgery results in a scar, but 40 to 80% of interventions fail to repair the problem because no healing occurs [3]. Animal models using sheep, rabbits, dogs and rats have therefore been developed to test adjuvant therapies [21–24]. The sheep model developed by Gerber et al. [23] can develop a fatty infiltration of the muscle after tendon release, as in the human shoulder. Rodeo et al. [18] and Gerber et al. [23] both reported that the tendon heals naturally after release, even without sutures, by producing a neo-tendon. This makes it difficult to determine exactly where the initial tendon was located under second-look surgery. Rodeo et al. [18] explored the effect of local growth factors on sheep supraspinatus tendon repair. The tendons were systematically torn with the formation of a neo-tendon between the released tendon

and the humerus head. The same problem was reported for a rabbit cuff model [24]. However, without healing criteria, it was not possible to determine whether the healing was induced by the adjuvant therapy or by the natural healing ability of the tendon.

It was necessary to develop an animal model to assess the overall healing rate, the main clinical outcome after surgery. Our rat Achilles tendon model is more similar to human shoulder tendons than is the rat supraspinatus tendon used by Galatz et al. [22]. It is a long tendon that is readily exposed because it lies just under the skin. It is inserted into the bone via an entheses and attached to a well-identified muscle. It is easy to work on, and many animals can be tested because it is not expensive. The criteria of failure are easy to assess. They are: migration of the tendon proximally with a gap between the tendon and the bone, suture breakage, and a distance between the bone and the muscle of over 1 cm. These criteria are reproducible (with inter- and intra-observer coefficients of correlation of 100%) without any specific training. They also had an overall healing rate of 40% after entheses destruction, which is close to the human rate, and are convenient for evaluating the effects of adjuvant therapy on healing. This is, to our knowledge, the only animal model that can be used to evaluate the overall healing rate. Reports published to date on bone-tendon healing have only explored the load-to-failure rate [13–15,18,21–24]. It is very important to destroy the entheses. Murrell studied rats whose Achilles tendon had been severed and reported that there was no biomechanical difference between rats who had undergone surgical repair and those who had not. Natural healing occurred within 15 days, as in other animal models. Similarly, there was no difference in the load-to-failure at 15 days in our animals, but the overall healing rates were different [25]. Most of our tendon-bone insertions failed at the entheses during mechanical tests. Those that failed at the tendon were not included in the data analyses. We demonstrate the importance of entheses destruction in our model to obtain a global healing rate close to the human rate.

The challenging for regenerative medicine is to develop models as similar as possible to degenerative age-related changes in



**Figure 3. Enthesis production induced by cell therapy after repair.** Immunostaining of collagen II in the enthesis of control G1 rats (a, d, g), chondrocyte-injected G2 rats (b, e, h) and MSC-injected G3 rats (c, f, i) 15, 30 and 45 days after repair. There was no collagen II staining of G1 control enthesis on day 15 (a), whereas the bone-tendon junction of cell-injected rats was positively stained (b, c). Chondrocyte- (b) and MSC-treated repairs (c) also contained large aggregates of cells on top of the bone that corresponded to injected cells. (b, c insets) Higher magnification views of delimited areas showing cell aggregates. There was no type II collagen matrix detected in the repairs without cells on day 30 (d). Cell therapy was associated with the deposition of a collagen II matrix, which appears to be more abundant when chondrocytes were injected (e) than when MSCs were used (f). *Insert* in (e) is a higher magnification view of the delimited area of the corresponding panel, showing cell aggregates close to the collagen II matrix at the bone-tendon junction 30 days post repair. There was neither type II collagen matrix (g) nor GAG (g, inset) in the G1 repairs without cells 45 days post repair. In contrast, a homogeneous collagen II- and GAG-rich matrix covered the bone at the tendon insertion in the cell-injected rat (h, i). *Insets* (g-i) show alcian blue staining of GAG in the delimited area in the corresponding panel. Bone (Bo) is localized at the base of the image and tendon (T) above it. Tendon and bone areas are delimited by dotted lines. Stars show the hole left by the suture used for repair. Scale = 200 $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0012248.g003

organs. One of the most widely accepted models of OA, a typical aging joint disease, is the destabilization of the medial meniscus in young mice [26]. We have used a similar approach by surgically destroying the enthesis.

Gulotta et al. [27] explored the effect of applying bone marrow-derived MSCs in a fibrin glue gel to rat shoulders after supraspinatus repair. They found that there was no difference in the load-to-failure for the group injected with MSCs and the group without cell at 30 days, but they did not explore the effect 15 days later. We found a significant difference in the load-to-failure data at 45 days for the rats without cells and those that had been injected with cells. The values for the rats given cell injections were higher. Thus injecting cells (chondrocytes or MSCs) produces a mechanically stronger insertion than does surgery alone.

Histological examination revealed that the local injection of chondrocytes or MSCs stimulated the production of a neo-enthesis at the bone-tendon junction, and that this did not occur after surgery alone. It is not clear whether the chondrocytes at the bone-tendon junctions of the rats given chondrocyte injections were the

same as those injected during surgery. They may have come from the calcaneus bone, or from local or general differentiated MSCs. We used chondrocytes to evaluate the effect of cell therapy on bone-tendon healing because they are natural components of the enthesis. They are likely to stimulate bone-tendon healing because they are currently used in clinical practice to produce cartilage [28]. There are reports that chondrocytes can develop the histological appearance of an enthesis when they are placed between a bone and a tendon [19]. Weinand [29] demonstrated that swine chondrocytes placed in an avascular lesion of the meniscus helped the meniscus to heal. But because chondrocytes are rare and difficult to obtain and tend to dedifferentiate in monolayer cultures, we examined the effects of bone marrow-derived MSCs, as they are progenitors of chondrocytes [30]. Gulotta et al. [27] found no difference in the histological production of an enthesis in 2 groups of tendon repairs, one with and the other without MSC injection during repair. They noted the organization of a fibrocartilage with time, but no histomorphometric analysis was performed at 45 days, as the study stopped

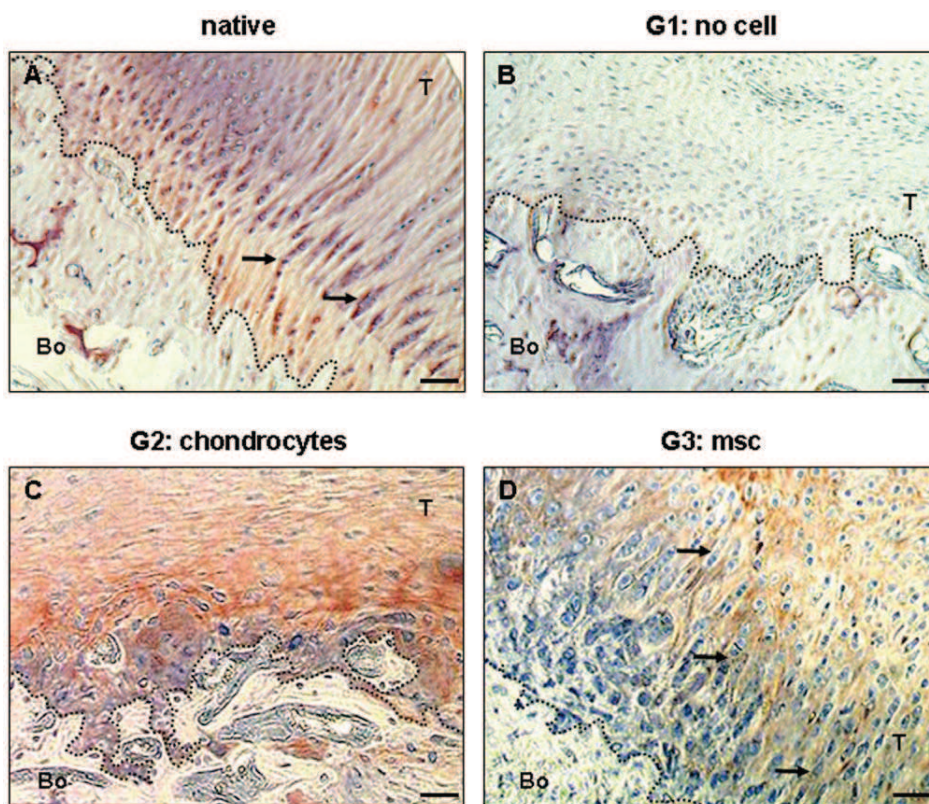
**Table 1.** Histological scale used to assess the tissue engineering of the enthesis.

Scoring	Cell at bone-tendon junction	Collagen II at bone-tendon junction	GAG content	Collagen organization	Chondrocyte organization
1	No	<25%	No	No	No cells
2	Clusters	25 to 50%	Isolated area	Isolated patches around few cells	Isolated cells
3	Large areas	50 to 75%	Large areas	Focal area	Clusters
4	Over the whole junction	>75%	Over the whole junction	Covering bone-tendon junction	In columns

The first 3 columns are visual grades assigned by examining x 25 images of the bone-tendon junction. The last 2 columns are assessments of x 100 images. The first column uses sections stained with H&E and the second immunostained for type II collagen. The third column sections were stained with Alcian Blue. Columns 1 to 3 were used to define the production of an enthesis. Columns 2 to 5 were used to rank the organization of the neo-enthesis (16-point scale). The native enthesis always scored 16 points in double blind trials (SD = 0).  
doi:10.1371/journal.pone.0012248.t001

at 30 days. We found that the MSCs promoted the production of an enthesis at the bone-tendon junction. Stimulated MSCs can produce cartilage and fibrocartilage *in vitro* [31–36] but it is not clear just how they act. Gulotta et al. [27] tracked the cells with transduced MSCs and found that they became concentrated in the site of repair, but that their number decreased with time. They

may induce the production of a neo-enthesis without any differentiation by releasing paracrine factors that recruit host cells to restore the enthesis. This seems to occur after a myocardial muscle lesion [37]. MSCs may also stimulate the rapid reconstruction of an enthesis. We find that chondrocytes produced type II collagen earlier than did MSCs, and the repaired insertion



**Figure 4. Restoration of enthesis organization by MSC-injection 45 days post repair.** Immunohistochemical staining for collagen II was performed on native entheses (A) and 45 days post-repair entheses from control G1 (B), chondrocyte-injected G2 (C) and MSC-injected G3 rats (D). A) Native enthesis contained columns of chondrocytes (arrows) at the bone-tendon junction and there was positive collagen II immunostaining at the junction. B) Control bone-tendon junction 45 days after surgery showing the absence of both cells and type collagen II. In contrast, the bone-tendon junctions of repairs with cells injected were intensely stained for collagen II (C and D). However, the collagen II distribution was not uniform and there were no chondrocyte columns in chondrocyte-injected rats (C), whereas the repairs of MSC-injected rats 45 days after surgery showed uniform type II collagen distribution at the bone-tendon junction and the chondrocytes formed columns (arrows) (D). Scale = 200µm. T, tendon; Bo, bone. Dotted lines delimitate bone and tendon.  
doi:10.1371/journal.pone.0012248.g004

had a slightly stronger load-to-failure at 30 days than that produced by the MSCs. However, the type II collagen and GAG production in insertions repaired with chondrocytes and MSCs was the same 45 days post-repair. Nevertheless, the structure of entheses induced *in vivo* with MSCs was better (Fig. 4). Histologically, the structure of MSC-induced entheses was very similar to that of native entheses, more so than the chondrocyte-induced entheses. Lastly, repairs made with MSCs gave better load-to-failure values than did repairs made with chondrocytes (Fig. 5), although the difference was not significant. We suggest that the presence (and perhaps better organization) of type II collagen fibers and chondrocytes seen on histology results in greater strength. MSCs seem to be more effective than chondrocytes at regenerating the enthesis so that the tendon is bound strongly to the bone, restoring the histological appearance of the native fibrocartilage.

## Materials and Methods

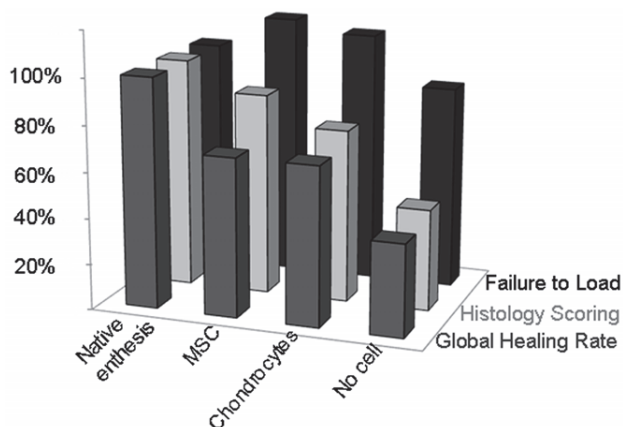
### Material

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France), unless stated otherwise. Fetal calf serum (FCS) was from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Collagenase D was from Roche Diagnostics (Meylan, France).

### Experimental rat model of degenerative entheses model repair

All animal experiments complied with the regulations of the Ethical Committee of the Pierre & Marie Curie University animal welfare Department. Approval (P3/2008/003) (Comité Régional d'éthique pour l'expérimentation animale, Ile de France – Paris – Comité 3).

Male Wistar rats (300 g, 3 months old; supplied by Janvier, Orléans, France) were anesthetized and the Achilles tendon of the left leg was exposed and released from the calcaneum. The tendon was cut at its insertion on the bone, and the enthesis was destroyed



**Figure 5. Global results of the study reporting evolution of the histology scoring, failure to load and global healing rate for each population at 45 days.** This graph shows the results of each item at 45 days of treatment. The left columns are the data reported for a native enthesis, for animal of the same age as those tested. This graph illustrates the importance of the MSC. While the overall healing rates for the chondrocyte-treated and MSC-treated rats are the same, histological scores and load-to-failure rates of the MSC-treated rats are better than those of the chondrocyte-treated rats. doi:10.1371/journal.pone.0012248.g005

with a burr (Fig. 1D). A sterile needle (BD microlance®, 23G) was used to make 2 tunnels through the calcaneum and a 4/0 non-absorbable (4/0 Ethibond) suture was used to attach the tendon back to the bone (Fig. 6A, B). The wound was then closed. The rats were given a pain killer and allowed to recover. They were housed 2 to a cage and allowed to move without restriction. Rats were sacrificed 15, 30 and 45 days after surgery.

A total of 142 rats underwent surgery and were assigned to 1 of 3 experimental groups, as follows: G1, no cells injected (n = 52), G2, chondrocytes injected (n = 51) and G3, MSCs injected (n = 39) at the site of repair just before tightening the suture. Because some rats died and some biomechanical tests or histological assessments failed, surgery was performed to obtain 6 successful biomechanical tests per group and period, and 4 histological assessments per group and recovery time.

### Cell injection

Freshly isolated chondrocytes and expanded MSCs (passage 4) were suspended in bovine fibrinogen (40 mg/mL, Sigma) in phosphate-buffered saline (PBS) and mixed with an equal volume of bovine thrombin solution (20 U/mL, Sigma) [38–40] to obtain a final concentration of  $4 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ L [12,38,40]. The solution was prepared during surgery, and injected (100  $\mu$ L) at the site of repair just before tightening the suture.

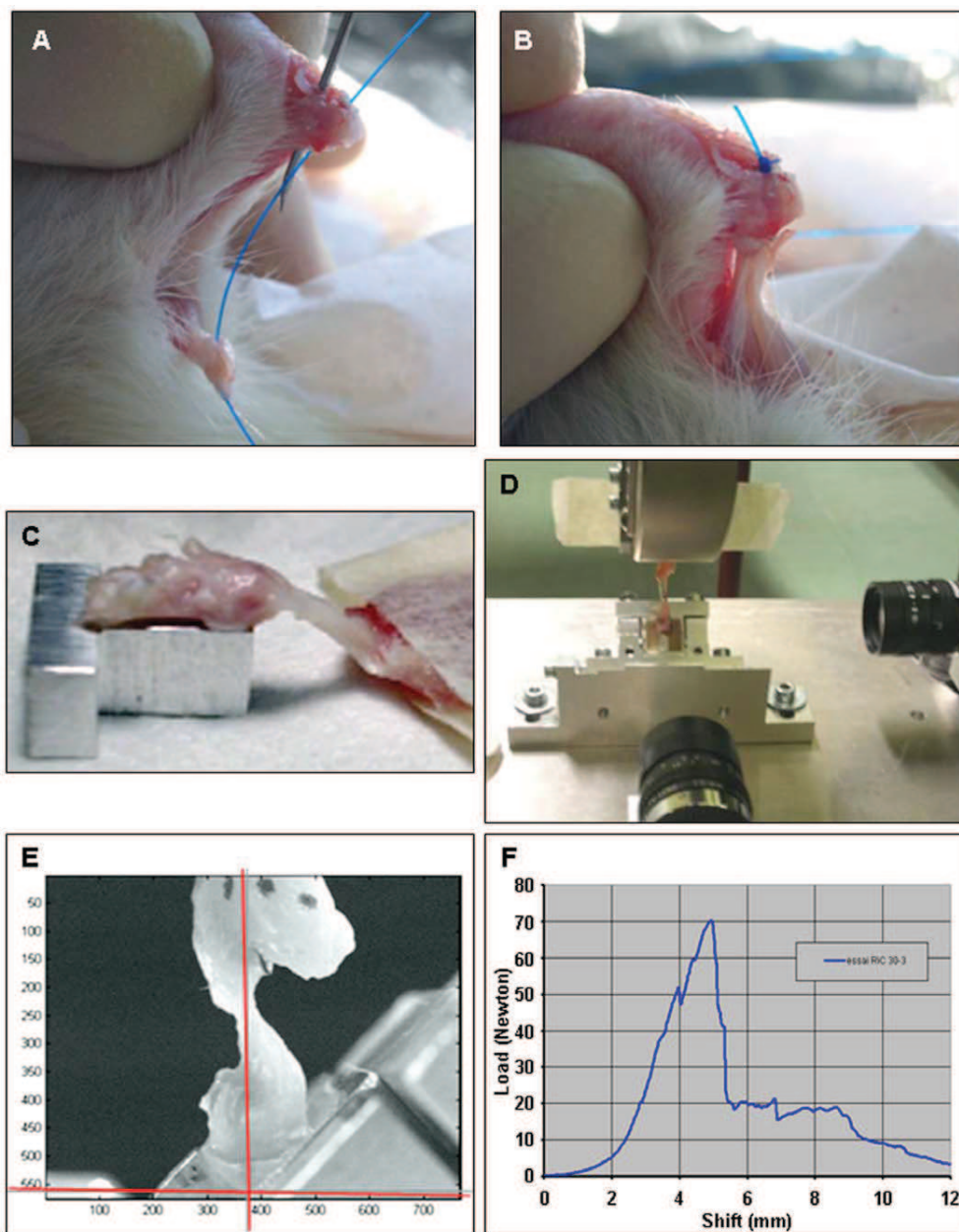
### Cell preparation and characterization

**Chondrocyte.** Hip and knee cartilages from 4 day-old Wistar rats were harvested as previously described [39]. Briefly, rats were killed by injecting 0.1 mL phenobarbital. The skin on the back and legs was cleaned with antiseptic and removed under sterile conditions. The femurs were dislocated, and the soft tissues around the joints were discarded. Hip and knee cartilages were removed and washed in PBS containing 1% antibiotic. The femoral heads, femoral condyles, and tibial plateaux isolated from two litters (15 rats) were incubated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin and 0.05 mg/mL streptomycin 2 times for 45 min with collagenase D (3 mg/mL) and overnight with collagenase D (0.5 mg/mL) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>: 95% air. The resulting cell suspension was mixed to disperse cell aggregates, filtered through a sterile 60  $\mu$ m filter and centrifuged for 10 min at 1500 rpm. The chondrocytes so collected were washed in PBS, suspended in culture medium supplemented with 10% FCS and counted in a hemocytometer.

The average yield per rat was  $10^6$  chondrocytes, of which more than 97% excluded Trypan blue. The chondrocytes were injected the day after harvesting to prevent dedifferentiation.

In parallel, cells were seeded on a culture dish ( $8 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>) to confirm their chondrocyte phenotype. At confluence (7 days after seeding), cells showed the typical chondrocyte morphology with a rounded or polygonal shape and granular cytoplasm. The chondrocyte phenotype was confirmed by immunostaining for type II collagen (Chondrex, Redmond, WA, USA) (Fig. 7) and by Alcian Blue staining for sulfated proteoglycans. Alkaline phosphatase staining was performed to demonstrate that there were no bone cells in the primary cultures.

**Mesenchymal Stem Cells.** MSCs were obtained from 4 day-old Wistar rats. The lower limbs were removed as described above and the femur and tibia shafts were immediately placed in a sterile hood and flushed with MSC medium (alpha MEM supplemented with 1% alpha glutamine, 1% antibiotic, 10% Hyclone SVF) containing heparin (5 IU/mL). This solution was passed through a 60  $\mu$ m filter and centrifuged for 10 min at 1500 rpm. The resulting cells were washed 3 times in PBS containing 1% antibiotic and seeded on 75 cm<sup>2</sup> plates for 48 h.



**Figure 6. Enthesis repair after destruction and mechanical loading.** (A and B) The tendon was retained by a sutures passing through the tendon and two tunnels in the calcaneus bone after destruction of the entheses. The tunnels were made using a 23G sterile needle (A) and a 4/0 non absorbable suture was passed through the hole to attach the tendon to the bone (B). The plantar side of the calcaneum was placed on a metal rod. The box was fixed to a triangular piece of metal and the fiber part of the muscle was removed, leaving only its aponeurosis fixed in a double-sided tape (C). The proximal tip of the calcaneum was placed on the machine, two CCD cameras were placed at 90° around the sample (frontal and lateral to the calcaneum) to check the positioning (D and E). A load-to-failure curve was obtained for each sample tested (F).  
doi:10.1371/journal.pone.0012248.g006

The medium was then changed to remove dead cells and any non-adhering stem cells. The medium was subsequently changed every other day. After 4 passages, MSCs were injected and their phenotype was confirmed.

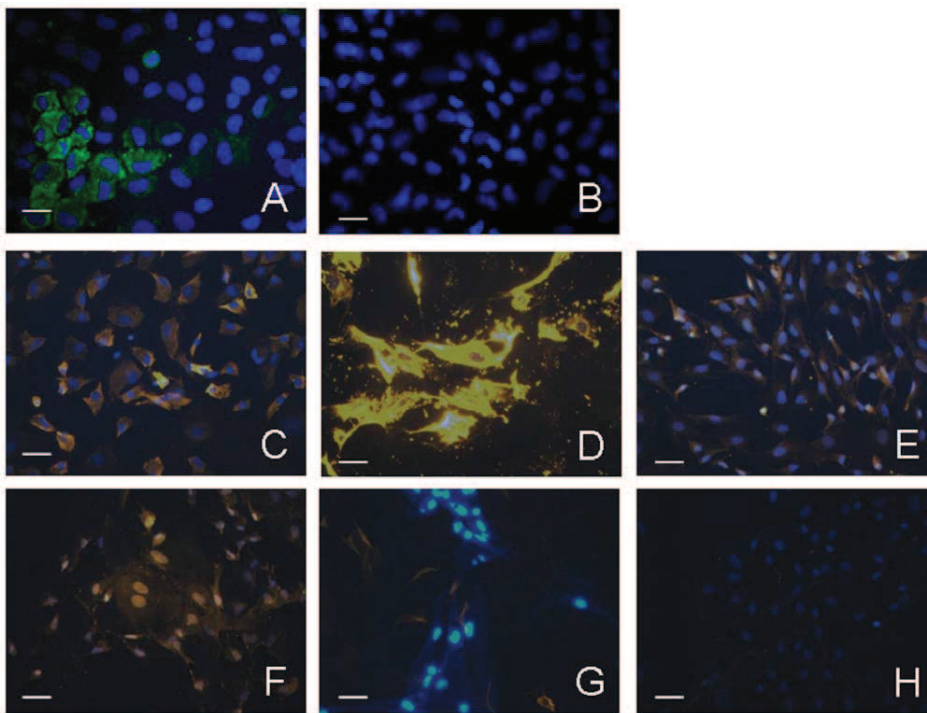
Cells were cultured on sterile round cover slips placed in 24-well plates. The confluent cells were fixed with 4% neutral buffered formalin. We used the ChemiconR Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Chemicon, USA) to demonstrate the presence of markers of rat MSCs (integrin  $\beta 1$ , CD54, fibronectin

and type I collagen) and the absence of hematopoietic cell surface markers (CD14 and CD45) (Fig. 7).

#### Overall healing rate

Healing failure at sacrifice was defined by one of three criteria: 1) the proximal migration of the tendon with a gap between the tendon and the bone, 2) suture rupture (Fig. 1E and F), and 3) a distance of >1 cm between the bone and the muscle. The overall healing rate was assessed in a double blind analysis (by CS





**Figure 7. MSC and chondrocyte immuno-characterization.** Fluorescent immunostaining. A: type II collagen around chondrocytes and its negative control: B. C: Type I collagen of rat MSCs. D: Fibronectin in rat MSCs. E: Integrin  $\beta$ 1 in rat MSCs. F: CD54 in rat MSCs. G: CD45 negative immunostaining of rat MSCs. H: CD14 negative immunostaining of rat MSCs. Scale is 100  $\mu$ m. doi:10.1371/journal.pone.0012248.g007

and GN) of each tendon. The kappa coefficient of concordance was 1.0, demonstrating no inter-observer difference.

### Mechanical analysis

Samples composed of the calcaneum, tendon and distal part of the muscle were removed as a unit at sacrifice. They were placed in a moist paper and plastic wrap and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Samples were thawed at room temperature before mechanical testing. Tests were performed under near-physiological conditions [41] by applying force to the tendon positioned at  $135^{\circ}$  with respect to the plantar side of the calcaneum [42] using a custom made device.

The plantar side of the calcaneum was placed on a 3 mm diameter vertical metal rod placed in a box ( $13 \times 13 \times 10$  mm) (Fig. 6). The distal part of the calcaneum was embedded in dental resin (Lang Dental, Wheeling, IL, USA), leaving at least 3 mm of its proximal part outside the resin (Fig. 6). The box was fixed to a triangular piece of metal so that the plantar side of the calcaneum was at  $135^{\circ}$  to the axis of traction of the testing machine (model 5565; Instron, Canton, MA, USA).

The triangular base was mounted on an adjustable platform that enabled the tendon to be aligned with the machine axis. The proximal tip of the calcaneum was placed on the machine axis indicated by a needle. Two CCD cameras placed at  $90^{\circ}$  around the sample (frontal and lateral to the calcaneum) were used to check the positioning (Fig. 6).

The fiber part of the muscle was removed, leaving only its aponeurosis. Double-sided tape was placed on this aponeurosis so as to leave 3 mm of tendon free for testing. The double-sided tape was placed in custom made striated jaws fixed in the machine axis.

The initial length of the sample was defined for a preload of 0.1 N. Samples were then loaded at a traction rate of 10 mm/min

until failure. They were tested at room temperature and kept moist throughout the test.

The load-to-failure of the healed bone-tendon insertion in the tensile test was the main parameter measured 15, 30 and 45 days after surgery. We used 6 to 8 samples for the final data analysis at each time for each group (G1, G2, G3).

Reference data were obtained by testing 6 unoperated samples (native entheses) from 4.5 month-old rats to determine the natural load-to-failure of the bone-tendon insertion of the rat Achilles tendon.

### Histological data

Samples were fixed in 3.7% paraformaldehyde, decalcified and embedded in paraffin. 5  $\mu$ m sections were cut in the same sagittal plane and immunostained for type II collagen and Alcian Blue staining for GAG, as described [43].

Neo-entheses production and organization were analyzed using two histological scales. First, neo-entheses production at 15, 30 and 45 days was assessed by measuring type II collagen production at the bone-tendon junction, the GAG content and cell deposition (magnification  $\times 25$ ) (table 1, first three columns). Second, the organization of the entheses 45 days after surgery was quantified on 4 samples from each group (magnification  $\times 100$ ). Histological scores (1 to 4) were given for each of the following criteria: 1) the percentage contact between bone and tendon with type II collagen production, 2) type II collagen organization, 3) chondrocyte organization and 4) GAG production (table 1). A total score of less than 5 indicated the absence of an entheses as in the samples whose entheses had been destroyed; the histological slides of native entheses routinely scored 16 ( $p < 0.05$ ).

A blinded analysis was performed by three of the authors. The inter-observer variation of the histological scale was very small,

with a very low correlation for each criterion ( $p = 0.003$  to  $10^{-13}$ ). Student's *t*-test showed non-significant *p* values between criteria, meaning that one criterion was not responsible for the positive or negative nature of any other. Three criteria were correlated: the percentage contact between the bone and tendon, type II collagen production and cells at the bone tendon junction ( $p < 10^{-6}$ ). The percentage of bone-tendon contact was correlated with type II collagen production and the GAG content ( $p < 0.002$ ). These correlations are not surprising as the cells were added to produce a matrix rich in type II collagen and GAG.

## Statistics

Results are expressed as means  $\pm$  SD. We used a one-tailed Student's *t*-test to compare the load-to-failure data for native, G1, G2 and G3 rats at each time. The overall healing rate was assessed using Pearson's Chi-squared test. Histological data underwent statistical analysis. Intra-observer reproducibility was

evaluated with a one-tailed Student's *t*-test on correlation coefficients. We also performed one-tailed Student's *t*-tests to demonstrate the independence of each item of the scale and to compare the histological scores of the groups. Significance was set at  $p < 0.05$ .

## Acknowledgments

We thank Dr O. Parkes for editing the text and Dr J.R. Werther for help with the statistical analyses.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GN AD NM FB. Performed the experiments: GN AD NM CS SD AP. Analyzed the data: GN AD NM AP MG. Contributed reagents/materials/analysis tools: GN. Wrote the paper: GN AD NM XH FB.

## References

- Liu JH, Etzioni DA, O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY (2004) The increasing workload of general surgery. *Arch Surg* 139: 423–428.
- Aslan H, Kimelman-Bleic N, Pelled G, Gazit D (2008) Molecular targets for tendon neofunction. *J Clin Invest* 118: 439–444.
- Burkhart SS, Lo IK (2006) Arthroscopic rotator cuff repair. *J Am Acad Orthop Surg* 14: 333–346.
- Moffat KL, Sun WH, Pena PE, Chahine NO, Doty SB, et al. (2008) Characterization of the structure-function relationship at the ligament-to-bone interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7947–7952.
- Yamaguchi K, Ditsios K, Middleton WD, Hildebolt CF, Galatz LM, et al. (2006) The demographic and morphological features of rotator cuff disease. A comparison of asymptomatic and symptomatic shoulders. *J Bone Joint Surg Am* 88: 1699–1704.
- Boileau P, Brassart N, Watkinson DJ, Carles M, Hatzidakis AM, et al. (2005) Arthroscopic repair of full-thickness tears of the supraspinatus: does the tendon really heal? *J Bone Joint Surg Am* 87: 1229–1240.
- Kim DH, Elattrache NS, Tibone JE, Jun BJ, DeLaMora SN, et al. (2006) Biomechanical comparison of a single-row versus double-row suture anchor technique for rotator cuff repair. *Am J Sports Med* 34: 407–414.
- Park JY, Lhee SH, Choi JH, Park HK, Yu JW, et al. (2008) Comparison of the clinical outcomes of single- and double-row repairs in rotator cuff tears. *Am J Sports Med* 36: 1310–1316.
- Goutallier D, Postel JM, Van Driessche S, Voisin MC (2005) Histological lesions of supraspinatus tendons in full thickness tears of the rotator cuff. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 91: 109–113.
- Tytherleigh-Strong G, Hirahara A, Miniaci A (2001) Rotator cuff disease. *Curr Opin Rheumatol* 13: 135–145.
- Woo SL, Maynard J, Butler DL, Lyon R, Torzilli P, et al. (1987) Ligament, tendon, and joint capsule insertions to bone. In *Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues*. Woo SL, ed. Savannah GA: American Academy of Orthopaedic Surgeons. pp 126–166.
- Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, et al. (1999) Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 5: 267–277.
- Funakoshi T, Majima T, Iwasaki N, Suenaga N, Sawaguchi N, et al. (2005) Application of tissue engineering techniques for rotator cuff regeneration using a chitosan-based hyaluronan hybrid fiber scaffold. *Am J Sports Med* 33: 1193–201.
- Funakoshi T, Majima T, Suenaga N, Iwasaki N, Yamane S, et al. (2006) Rotator cuff regeneration using chitin fabric as an acellular matrix. *J Shoulder Elbow Surg* 15: 112–118.
- Kovacevic D, Rodeo SA (2008) Biological augmentation of rotator cuff tendon repair. *Clin Orthop Relat Res* 466: 622–633.
- Derwin KA, Baker AR, Codsí MJ, Iannotti JP (2007) Assessment of the canine model of rotator cuff injury and repair. *J Shoulder Elbow Surg* 16: S140–148.
- Iannotti JP, Codsí MJ, Kwon YW, Derwin K, Ciccone J, et al. (2006) Porcine small intestine submucosa augmentation of surgical repair of chronic two-tendon rotator cuff tears. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am* 88: 1238–1244.
- Rodeo SA, Potter HG, Kawamura S, Turner AS, Kim HJ, et al. (2007) Biologic augmentation of rotator cuff tendon-healing with use of a mixture of osteoinductive growth factors. *J Bone Joint Surg Am* 89: 2485–2497.
- Wong MW, Qin L, Tai JK, Lee SK, Leung KS, et al. (2004) Engineered allogenic chondrocyte pellet for reconstruction of fibrocartilage zone at bone-tendon junction—a preliminary histological observation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 70: 362–367.
- Thomopoulos S, Soslowky LJ, Flanagan CL, Tun S, Keefer CC, et al. (2002) The effect of fibrin clot on healing rat supraspinatus tendon defects. *J Shoulder Elbow Surg* 11: 239–247.
- Carpenter JE, Thomopoulos S, Soslowky LJ (1999) Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications. *Clin Orthop Relat Res* 367: S296–311.
- Galatz LM, Sandell LJ, Rothermich SY, Das R, Mastny A, et al. (2006) Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. *J Orthop Res* 24: 541–550.
- Gerber C, Schneeberger AG, Perren SM, Nyffeler RW (1999) Experimental rotator cuff repair. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am* 81: 1281–1290.
- Gupta R, Lee TQ (2007) Contributions of the different rabbit models to our understanding of rotator cuff pathology. *J Shoulder Elbow Surg* 16: S149–157.
- Murrell GA, Lilly EG, 3rd, Collins A, Seaber AV, Goldner RD, et al. (1993) Achilles tendon injuries: a comparison of surgical repair versus no repair in a rat model. *Foot Ankle* 14: 400–406.
- Glasson SS, Blanchet TJ, Morris EA (2007) The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 15: 1061–1069.
- Gulotta LV, Kovacevic D, Ehteshami JR, Dagher E, Packer JD, et al. (2009) Application of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rotator cuff repair model. *Am J Sports Med* 37: 2126–2133.
- Wood JJ, Malek MA, Frassica FJ, Polder JA, Mohan AK, et al. (2006) Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *J Bone Joint Surg Am* 88: 503–507.
- Weinand C, Peretti GM, Adams SB, Jr., Bonassar LJ, Randolph MA, et al. (2006) An allogenic cell-based implant for meniscal lesions. *Am J Sports Med* 34: 1779–1789.
- Grove JE, Bruscia E, Krause DS (2004) Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 22: 487–500.
- Derfoul A, Perkins GL, Hall DJ, Tuan RS (2006) Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells* 24: 1487–1495.
- Huang CY, Hagar KL, Frost LE, Sun Y, Cheung HS (2004) Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22: 313–323.
- Im GI, Jung NH, Tae SK (2006) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from patients in late adulthood: the optimal conditions of growth factors. *Tissue Eng* 12: 527–536.
- Lee KB, Hui JH, Song IC, Ardany L, Lee EH (2007) Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects—a porcine model. *Stem Cells* 25: 2964–2971.
- Matsuda C, Takagi M, Hattori T, Wakitani S, Yoshida T (2005) Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Chondrocytes for Construction of Three-dimensional Cartilage Tissue. *Cytotechnology* 47: 11–17.
- Steck E, Bertram H, Abel R, Chen B, Winter A, et al. (2005) Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 23: 403–411.
- Caplan AI, Dennis JE (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98: 1076–1084.
- Peretti GM, Gill TJ, Xu JW, Randolph MA, Morse KR, et al. (2004) Cell-based therapy for meniscal repair: a large animal study. *Am J Sports Med* 32: 146–158.
- Salvat C, Pigenet A, Humbert L, Berenbaum F, Thirion S (2005) Immature murine articular chondrocytes in primary culture: a new tool for investigating cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 243–249.

40. Silverman RP, Passaretti D, Huang W, Randolph MA, Yaremchuk MJ (1999) Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin glue polymer. *Plast Reconstr Surg* 103: 1809–1818.
41. Blum EK, Haun C, Ryan JE (2007) A musculo-skeletal model of rat ankle motion and its experimental test on rat. *J Biomech* 40: 891–899.
42. Best TM, Collins A, Lilly EG, Seaber AV, Goldner R, et al. (1993) Achilles tendon healing: a correlation between functional and mechanical performance in the rat. *J Orthop Res* 11: 897–906.
43. Randolph MA, Anseth K, Yaremchuk MJ (2003) Tissue engineering of cartilage. *Clin Plast Surg* 30: 519–537.

# Survival of porcine mesenchymal stem cells over the alginate recovered cellular method

Jonah Cohen,<sup>1,2</sup> Katherine L. Zaleski,<sup>1</sup> Geoffroy Nourissat,<sup>1</sup> Terrill P. Julien,<sup>1</sup> Mark A. Randolph,<sup>1</sup> Michael J. Yaremchuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Plastic Surgery, Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital, WAC 453, 15 Parkman Street, Boston, Massachusetts 02114

<sup>2</sup>Brown Medical School, Brown University, Providence, Rhode Island 02912

Received 30 July 2010; revised 12 July 2010; accepted 15 July 2010

Published online 26 October 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.a.32961

**Abstract:** Although previous studies have established alginate as a three-dimensional scaffold for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs), little is known about the cytotoxic effects of the polymerizing and chelating reagents used in the alginate recovered cellular method. Swine MSCs (sMSC) were suspended in the polymerizing agent, CaCl<sub>2</sub>, and viability was assessed using a trypan blue exclusion assay at intervals over 2 h. MSCs were also suspended in two different chelating agents, 55 mM sodium citrate and 50 mM EDTA, and viability was calculated. Finally, sMSCs and human MSCs were encapsulated and cultured *in vitro*. The sMSC were collected at day 4 and the cells were recovered by chelation. Encapsulated hMSCs were cultured with TGFβ<sub>3</sub> and IGF-1 and assayed by qRT-PCR for collagen types I and II and sox9 with encapsulated human dermal fibroblasts and chondrocytes as controls recovered on days

0, 7, and 14. Only 53% of sMSCs were viable after 10 min in CaCl<sub>2</sub>, the standard polymerization period, whereas 94% of encapsulated sMSCs in polymerized alginate were alive at 15 days. After 20 min in chelating agents, sodium citrate and EDTA, only 46% and 17% of the cells, were viable, respectively. The alginate recovered sMSCs yielded 12% survival. Human MSCs upregulated cartilage-specific collagen type II over the 14-day culture. Collagen I remained unchanged in the hMSCs. Alginate is a suitable agent for chondrodifferentiation of MSCs and can be dissolved by chelation, but the agents involved in hydrogel polymerization and cell recovery should be altered to improve MSC survival. © 2010 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part A*: 96A: 93–99, 2011.

**Key Words:** mesenchymal stem cells, tissue engineering, scaffold, alginate hydrogel, cartilage

## INTRODUCTION

Cartilage has little capacity for healing and regeneration due to a lack of vascularization that does not allow a normal inflammatory response and provide a route for putative repair cells to invade the lesion. Cell-based therapies could provide a superior repair over standard microfracture (drilling into the subchondral bone to permit bone marrow invasion) if sufficient numbers of chondrogenic cells can be transferred into the lesion.<sup>1</sup> To acquire sufficient numbers of chondrocytes, biopsies of cartilage have to be made from uninjured sites in the joint and cultured to reach desired numbers of cells to have a therapeutic benefit. The possibility of using plentiful amounts of bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) would obviate the destruction of normal cartilage surfaces to obtain chondrocytes, but cultured undifferentiated MSC might be no better than bone marrow invasion after microfracture. Theoretically, differentiated MSCs could be an alternative to chondrocytes, but efficient means to grow and differentiate the MSCs are needed. MSCs can be expanded easily in monolayer culture, but a differentiation step is needed to convert them to a chondrogenic phenotype. It is well established that MSC dif-

ferentiates into chondrogenic lineage when placed in a three-dimensional (3D) pellet culture.<sup>2</sup> Ideally, a reversible 3D culture method might allow differentiation of the MSC, while at the same time, permit recovery of the differentiated cells for implantation.

Homicz et al.<sup>3</sup> have shown that alginate-cultured chondrocytes are more spherical in appearance than those cultured in polyglycolic acid (PGA) scaffolds, which appeared elongated in nature.<sup>4,5</sup> Compared to cells cultured in PGA or a monolayer; cells cultured in alginate produced a higher concentration of sulfated glycosaminoglycans and type II collagen levels.<sup>6</sup> Alginate is a copolymer of D-mannuronic acid and L-guluronic acid that polymerizes the presence of calcium chloride, providing an ideal environment for the expansion of chondrocytes into chondrons and islets.<sup>7,8</sup> Another advantage of alginate is that hydrogel polymerization and depolymerization (or chelation) are easily controlled.<sup>9</sup> After polymerization with calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>), the reaction is easily reversed by the addition of either sodium citrate or ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) that chelates the calcium, releasing the chondrons for *in vivo* application. Building on the use of alginate as an

**Correspondence to:** M. A. Randolph; e-mail: randolph.mark@MGH.harvard.edu  
Contract grant sponsor: The American Foundation for Surgery of the Hand

environment to amplify chondrocytes, Masuda et al.<sup>10</sup> developed a two-step approach to expanding chondrocytes and forming cartilaginous tissue using the alginate recovered chondrocyte method. However, as the supply of autologous chondrocytes for tissue transplantation is limited and often involves donor-site morbidity, the use of bone marrow derived MSCs is favorable.<sup>11,12</sup>

It has been demonstrated that MSCs under growth factor conditions such as the TGF- $\beta$  superfamily can maintain the chondrogenic phenotype and produce type II collagen in alginate;<sup>13</sup> however, no quantitative data exist documenting the cytotoxic effects of alginate polymerization and subsequent chelation on these cells. The objectives of this study were (1) to determine the cytotoxicity of alginate-polymerizing agent CaCl<sub>2</sub> upon MSCs, (2) to assess the viability of MSCs in alginate hydrogel constructs, (3) to determine the cytotoxicity of chelating agents sodium citrate and EDTA upon MSCs, (4) to determine the viability of MSCs recovered from alginate using agents in standard concentrations specified by the current literature, and (5) to determine if alginate encapsulated human MSCs could be differentiated using growth factors and recovered using this method.

## MATERIALS AND METHODS

All use of human cells and tissues were approved by the Institutional Review Board (IRB) for Partners Health Care System, and all animal use were approved but the Institutional Animal Care and Use Committee of the Massachusetts General Hospital. Swine and human bone marrow-derived MSCs, human dermal fibroblasts (HDF), and human chondrocytes were used in these studies.

### Monolayer culture for cell population expansion

Human bone marrow (50 mL) was purchased from Lonza to isolate hMSCs. Bone marrow was aspirated from the iliac crest of domestic swine and collected in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 100 U/mL heparin. The same procedures were used for human and swine samples for MSC isolation and cell culture. The samples were diluted 1:2 with DMEM, layered over Ficoll-Hypaque density, and then centrifuged at room temperature for 20 min at 1300 rpm. The nucleated cells at the sample/medium interface were collected, washed twice, and resuspended in DMEM. The cells were then expanded *in vitro* in 150-cm<sup>2</sup> culture flasks with MSC media at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 3 weeks. The MSC media contained low-glucose DMEM (Gibco), 10% fetal bovine serum (Gibco), 1% antibiotic-antimycotic solution (Sigma—10,000 U/mL of penicillin, 10 mg/mL of streptomycin, and 25  $\mu$ g/mL of amphotericin B), 1% MEM nonessential amino acid solution (Gibco), 1% L-glutamine (Gibco), 0.05% ascorbic acid (Sigma), and 0.2% dexamethasone (Sigma). No growth factors were added during the monolayer cell culture. The media was changed completely three times per week. Once adherent cells had grown to confluence, they were detached with 0.05% trypsin-EDTA (Gibco), reseeded, and cultured for two further passages. The cells were removed from the plates using

0.05% trypsin-EDTA, and a cell count was taken with a hemacytometer with 0.2% trypan blue.

HDF (ATCC, Normal Human Dermal fibroblasts: CCD-32Sk) was purchased and seeded onto tissue-culture plates at a density of  $1 \times 10^6$  cells/plate and cultured in monolayer with fibroblast media (low-glucose DMEM, 10% fetal bovine serum, and 1% antibiotic antimycotic). The cells were grown to confluence and removed from the culture dishes by trypsin digestion. Discarded sterile articular cartilage was obtained from the operating room of Massachusetts General Hospital under an IRB-approved protocol. Under sterile conditions, the cartilage was washed twice with PBS containing 1% antibiotic antimycotic (Sigma) and minced into 1-mm<sup>3</sup> fragments. The fragments were digested overnight with 0.05% (w/v) collagenase (Worthington, Freehold, NJ) at 37°C. The human chondrocytes were used immediately without culturing.

### Swine MSC suspension in calcium chloride

About  $200 \times 10^6$  swine MSCs were suspended in 20 mL of PBS with 1% antibiotic-antimycotic solution. One milliliter of the MSC/PBS solution was subsequently added to each of two 15-mL conical tubes, each containing  $10 \times 10^6$  cells and centrifuged for 7 min at 1500 rpm. The remaining media were aspirated from each tube and 5 mL of alginate-polymerizing agent CaCl<sub>2</sub> [pH 7.2] at a concentration of 102 mM was added to each of the tubes yielding two samples for viability testing. The conical tubes were placed on a rocking device at 4°C for 120 min, and cell viability was determined at 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, and 120 min by trypan blue exclusion. Cells counts were obtained by two different investigators, and the values were averaged. Viability was determined by scoring the percentage of unstained cells after staining and based on the number of living cells divided by total cell number.

### Live/dead assay

To study the cytotoxicity of alginate,  $50 \times 10^6$  swine MSCs were suspended in 5 mL of 2% LVG alginate (PRONOVA<sup>TM</sup>, FMC BioPolymer) stock solution in 0.9% saline. One milliliter of the alginate/MSC solution was subsequently added to five 15-mL conical tubes each containing  $10 \times 10^6$  cells, and droplets of the solution were polymerized with the addition of 10 mL of 102 mM CaCl<sub>2</sub>. After 30 min, the CaCl<sub>2</sub> was aspirated, and the alginate/MSC constructs were washed twice with PBS. MSC media (same as above) were subsequently added, the cells were incubated at 37°C for 15 days *in vitro*, and media were changed every other day. After 15 days, cell viability was visualized for each construct using Live/Dead<sup>®</sup> cell viability/cytotoxicity assay kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). According to the manufacturer's instructions, 8  $\mu$ M of calcein AM and 4  $\mu$ M of ethidium homodimer-1 were added to the constructs. The constructs were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 20 min. Viability was examined using a fluorescence microscopic system (Nikon, El Segundo, CA). Images of five randomly selected fields of view were taken for each sample, and the number of live and dead cells was counted and the values averaged.

### Swine MSC suspension in sodium citrate, EDTA, and PBS

One milliliter of the MSC/PBS solution was added to each of six 15-mL conical tubes, each containing  $10 \times 10^6$  cells and centrifuged for 7 min at 1500 rpm. The remaining media were aspirated from each tube, and 5 mL of each chelating agent was added to two different tubes with PBS serving as a control, yielding two samples each of sodium citrate [pH 7.8] at 55 mM, EDTA [pH 5.8] at 50 mM, and PBS, respectively. The conical tubes were placed on a rocking device at 4°C for 120 min, and cell viability was determined at 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, and 120 min by trypan blue exclusion. Cell counts were obtained by two different investigators, and the values were averaged. Viability was calculated based on the number of living cells divided by total cell number.

### Swine MSC encapsulation in alginate, sodium citrate chelation, and MSC recovery

As instructed in the alginate recovered cellular method,  $60 \times 10^6$  MSCs were suspended in 6 mL of 2% LVG Pronova alginate stock solution in 0.9% saline. One milliliter of the alginate/MSc solution was subsequently divided into six 15-mL conical tubes each containing  $10 \times 10^6$  cells, and droplets of the solution were polymerized with the addition of 10 mL of 102 mM CaCl<sub>2</sub>. After 30 min, the CaCl<sub>2</sub> was aspirated, and the alginate/MSc solution was washed twice with PBS. MSC media (same as above) were added, the cells were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 4 days, and media were changed every other day. Following 4 days, the media were aspirated from each of the six conical tubes, and the alginate beads were depolymerized by the addition 10 mL of the calcium chelating-agent sodium citrate [pH 7.8] at a concentration of 55 mM. The conical tubes were placed on a rocking device at 4°C for 90 min to fully chelate the alginate. Cells were washed three times with PBS with 1% antibiotic-antimycotic solution and centrifuged for 8 min at 1500 rpm between each washing. Cell yield and viability were determined by trypan blue exclusion. Cell counts were obtained from two different investigators, the numbers were averaged, and cell viability was calculated by the amount of living cells divided by the total cell number.

### Alginate encapsulation and culture of human cells

To test the efficacy of this recovery method, human MSCs were encapsulated in alginate, differentiated with growth factors, and tested for the upregulation of cartilage-specific messenger RNA. Briefly,  $8 \times 10^6$  cells were added to 100  $\mu$ L of 2% sodium alginate—this was done for each of the hMSC, native chondrocyte, and HDF study groups. The alginate was polymerized by adding excess 102 mM CaCl<sub>2</sub> to each alginate construct. After polymerization, the constructs were placed in conical tubes with 8 mL of cell-type-specific media. The hMSC media were then supplemented with 10 ng/mL recombinant human TGF- $\beta_3$  (R&D Systems) and 100 ng/mL human recombinant IGF-1 (Peprotech). Individually, these factors are known to influence cartilage formation during embryogenesis and have been shown to exhibit synergistic effects in *in vitro* chondrogenesis.<sup>14–16</sup> All tubes

were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, and medium was changed every other day.

On days 0, 7, and 14, medium was removed from one tube of each cell type. The constructs were washed with PBS with 1% antibiotic-antimycotic and chelated in their separate tubes using a 55 mM sodium citrate solution as described earlier for the swine MSC studies. The cells were centrifuged into a pellet, washed three times with PBS, and counted.

### RNA isolation and reverse transcription

After chelation, RNA was extracted from the recovered cells according to the manufacturer's protocol using Absolutely RNA<sup>®</sup> Miniprep Kit (Stratagene). Isolated RNA was treated with DNase to ensure that residual DNA was destroyed before amplification. The purity and total RNA content of each sample were determined using spectrophotometric analysis of the OD<sup>260/280</sup> ratio; all samples had a purity index > 1.8. Reverse transcription was then performed using a Stratascript<sup>®</sup> QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene) according to the provided protocol.

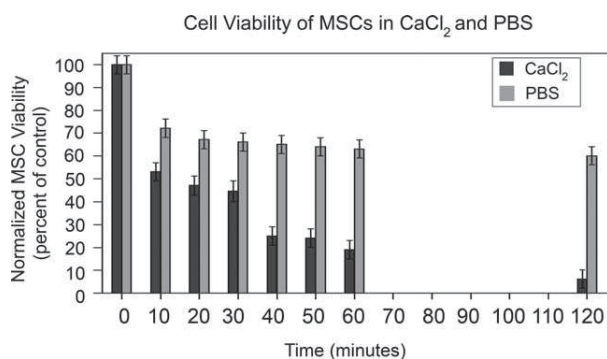
### Real-time PCR analysis

Singleplex reactions were set up on ice, in triplicate, using Stratagene Brilliant<sup>®</sup> QPCR master mix (Stratagene), according to the provided protocol. Predesigned, sequence-specific TaqMan<sup>®</sup> primer/probe assays for COL2A1 (NM\_001844, 70 bp, exon 1/exon 2; Applied Biosystems, Hs00156568\_m1), COL1A1 (NM\_000088, 66 bp, exon 1/exon 2; Applied Biosystems, Hs00164004\_m1), sox9 (NM\_000346, 102 bp, exon 2/exon 3; Applied Biosystems, Hs00165814\_m1), and  $\beta$ -actin (Applied Biosystems, 4333762T) were used for the qPCR amplification at each time point for each cell type. ROX reference dye was included in every reaction. The hMSC and chondrocyte sample groups were calibrated to the control group of human dermal fibroblasts cultured simultaneously under equivalent conditions. All samples were normalized to the housekeeping gene,  $\beta$ -actin, which can exhibit less variability than other commonly used housekeeping genes such as GAPDH.<sup>17</sup> Each amplification included a set of control wells to rule out DNA contamination: a No Template Control for each primer/probe assay, and a No Reverse Transcription Control (No-RT) assay for each RNA sample. Standardized curves were created for each primer/probe assay, confirming efficiencies of greater than 95% for all assays run. qPCR was performed with a Stratagene MX4000<sup>®</sup> qPCR machine, with the following cycling conditions: one 10-min cycle at 95°C, followed by 40 cycles each consisting of 30 s at 95°C, 1 min at 55°C, and 30 s at 72°C. Results were analyzed using the MX4000 software according to the 2<sup>- $\Delta\Delta C_T$</sup>  method.

## RESULTS

### MSC suspension in calcium chloride

The results revealed that 102 mM CaCl<sub>2</sub> [pH 7.2], used as the current standard for alginate polymerization, left 53% MSCs viable after 10 min, the standard period of time for alginate bead formation (Fig. 1). After 30 min, the amount



**FIGURE 1.** Viability of MSCs in calcium chloride (black bars) and PBS (gray bars) normalized to % of control (PBS).

of time needed to fully polymerize the larger alginate constructs used in this study, only 45% of the MSCs were alive. After 2 h-time, generally, all the MSCs left in CaCl<sub>2</sub> were dead (7% living), whereas cell viability in PBS remained fairly constant following an initial unexplained decrease after the 10-min reading.

#### Live/dead assay

After averaging the values from the five sodium alginate hydrogel samples, the Live/Dead cell viability/cytotoxicity assay revealed that 94% of the MSCs were alive in alginate following 15 days of *in vitro* culture (Fig. 2). Thus, sodium alginate alone does not yield the degree of cytotoxicity discovered following chelation and the completion of the alginate recovered cellular method.

#### Swine MSC suspension in sodium citrate, EDTA, and PBS

After the standard 20 min in chelating buffer sodium citrate at a concentration of 55 mM, cell viability was 46%. Following 100 min, the amount of time necessary for complete alginate construct dissolution and cell recovery in this experiment (as opposed to smaller alginate beads used in other studies<sup>5</sup>), only 27% of the MSCs remained viable. After 120 min, less than 25% of the MSCs were living in solution (Fig. 3). Following 20 min in 50 mM EDTA, cell viability was 12%. After 100 min of chelation, only 4% of the MSCs were living. Following 120 min in EDTA, virtually, all the MSCs were dead. MSCs in PBS were used as a control and maintained a fairly constant viability following an initial unexplained decrease after the 10-min reading. Viability values for PBS were not charted at 80 and 100 min. Figure 4 demonstrates the comparative cytotoxicities of the potential chemical agents used during the alginate recovered cellular method at the aforementioned concentrations with PBS serving as a control. As a chelating agent, 55 mM sodium citrate at yielded far less cell death than 50 mM EDTA. CaCl<sub>2</sub> is currently the only standard agent used in the polymerization of alginate.

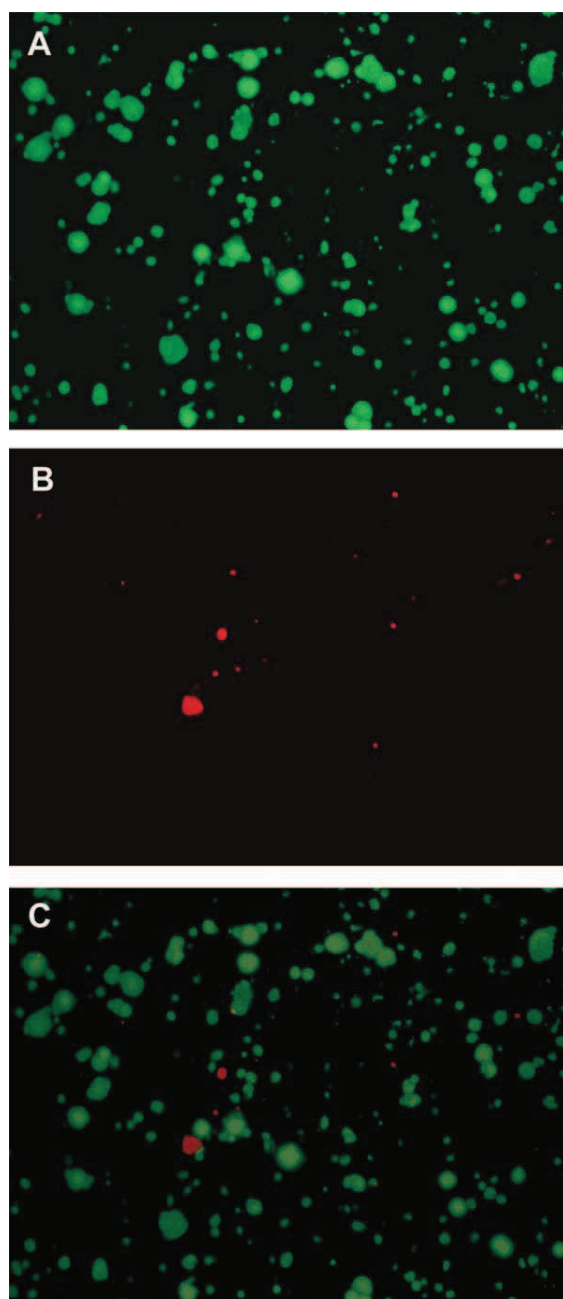
#### MSC encapsulation in alginate, sodium citrate chelation, and MSC recovery

The results from the alginate recovered cellular method portion of the study revealed similarly disappointing cellular viabilities. Averaging the values from the six alginate-MSC constructs, the following results were collected (Fig. 4). After 102 mM CaCl<sub>2</sub> [pH 7.3] polymerization for 30 min (to obtain complete construct formation), 4 days of *in vitro* alginate hydrogel culture, and subsequent 90-min 55 mM sodium citrate [pH 7.7] chelation (to obtain complete construct dissolution), 29.3% of the MSCs were viable with respect to the initial number of cells per sample. Large numbers of MSCs are needed to evaluate cell recovery; therefore, no attempt was made to quantify the recovery of human MSCs. Rather, the human cells were used to evaluate the production of cartilage specific markers after differentiation *in vitro* and following chelation.

**Type 1 collagen (COL1).** The native chondrocytes maintained a stable level COL1 gene expression throughout the *in vitro* culture period, with relative expression levels of -1.01, -1.31, and -1.29 on days 0, 7, and 14, respectively [Fig. 5(A)]. The native chondrocytes maintained a stable level of COL1 expression that was consistently lower than the expression by the HDF. On the other hand, the relative COL1 expression by the hMSC group was higher than the HDF with values of 3.83, 1.77, and 2.74 on days 0, 7, and 14, respectively.

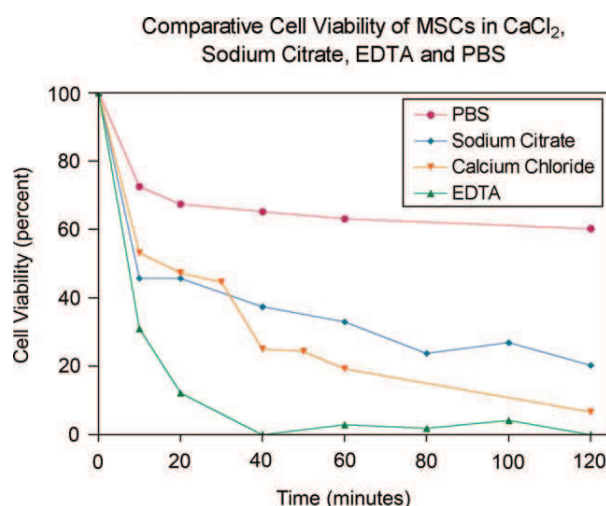
**Type 2 collagen (COL2).** The native chondrocyte group exhibited a stable level of gene expression for COL2 throughout the 2-week culture period [Fig. 5(B)]. On a logarithmic scale, the relative expression of the COL2 gene by the native chondrocytes exceeded that of the dermal fibroblasts by 5.97, 4.39, and 5.37 orders of magnitude on days 0, 7, and 14, respectively. Stated differently, the expression of COL2 by the native chondrocytes exceeded that of the HDF by a range of 4.39–5.97 orders of magnitude. The COL2 gene expression levels of the hMSCs, while initially lower than those expressed by the HDF study group, increased throughout the culture period to a level exceeding that of the native chondrocytes. On a logarithmic scale, the expression of COL2 by the hMSC group relative to that of the HDF group was -0.161, 1.83, and 5.55 on days 0, 7, and 14, respectively.

**Sox9.** Both chondrocytes and hMSCs showed an increase in the levels of sox9 gene expression throughout the culture period [Fig. 5(C)]. Sox9 levels were undetectable in the chondrocyte sample at day 0 but had increased to a relative expression of 1.00 and 2.60 on days 7 and 14, respectively. This increase correlates with the dip and subsequent increase in COL2 expression levels between day 0 and day 7. The hMSC demonstrated relative expression levels of 0.51, 0.37, and 2.61 on days 0, 7, and 14, respectively.



**FIGURE 2.** Confocal images of porcine MSC-seeded sodium alginate hydrogel sections co-stained with the LIVE/DEAD® viability/cytotoxicity assay kit at 15 days. (A) A 200- $\mu$ m alginate slice loaded with 8  $\mu$ M calcein-AM/4  $\mu$ M ethidium homodimer-1 and excited with light of 488 nm (green emission) to show viable cells. (B) The same 200- $\mu$ m alginate slice loaded with 8  $\mu$ M calcein-AM/4  $\mu$ M ethidium homodimer-1 and excited with light of 532 nm (red emission) to show the dead cells. (C) Overlay of images (A) and (B) showing that the majority of the cells are alive in the alginate hydrogel.

**COL2:COL1 ratio.** The COL2:COL1 expression ratios for the native chondrocyte group were similar for the constructs harvested on days 0, 7, and 14 with logarithmic values of 6.98, 5.70, and 6.66, respectively (Fig. 6). The hMSC ratios

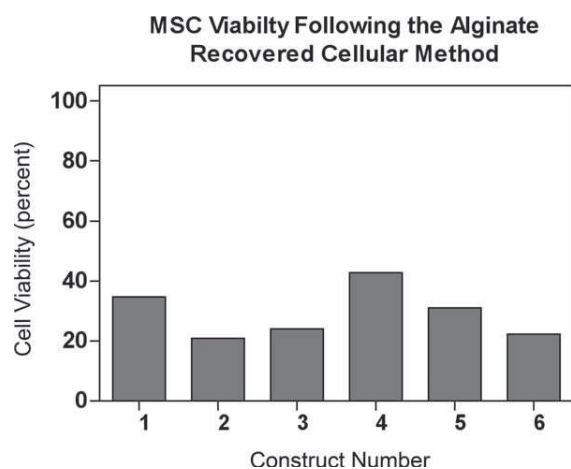


**FIGURE 3.** Comparative analysis of calcium chloride (alginate polymerizing agent), sodium citrate (chelating buffer), EDTA (chelating buffer), and PBS (control). Cell viability is determined by living cells divided by total cell number. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

(log value) were lower than those of the chondrocytes at every time point. On day 0, the hMSCs were expressing an excess of COL1 with a COL2:COL1 ratio of  $-3.99$ . By day 7, the ratio had reversed to a value of  $0.063$ , which then increased to  $2.82$  on day 14. Over the 2 weeks of *in vitro* culture, the COL2/COL1 ratio increased by nearly seven orders of magnitude, reflecting the substantial upregulation of COL2 and to a lesser extent, a downregulation of COL1.

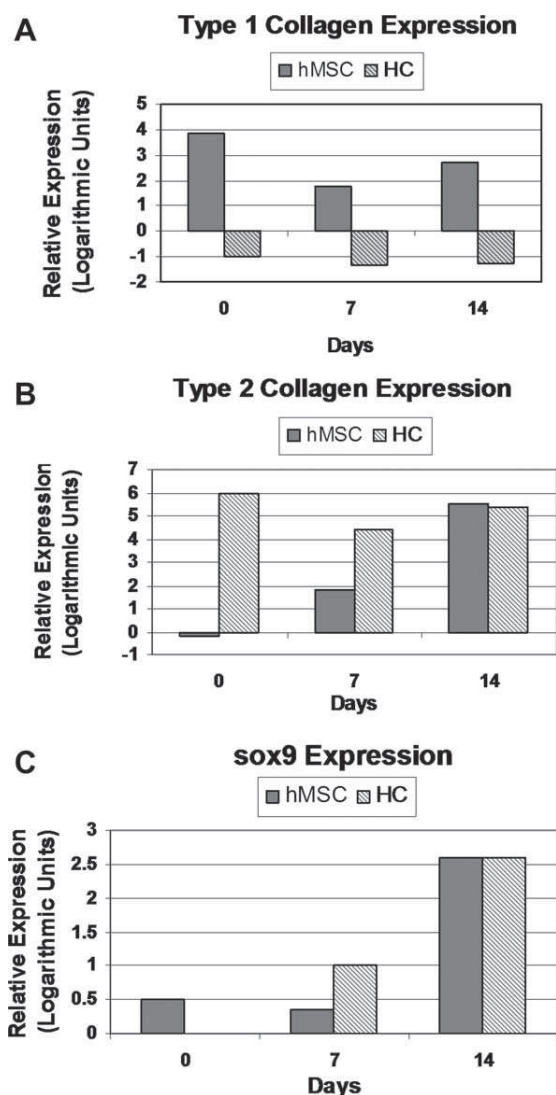
## DISCUSSION

As the limited capacity of cartilage for self-repair has been widely recognized, tissue engineering offers a method for expanding cells of the target tissue combining cultured cells and subsequent transplantation of the cells on a scaffold. In addition, it has opened up new avenues by which physicians



**FIGURE 4.** Viability of MSCs of six different constructs following the alginate recovered cellular method.





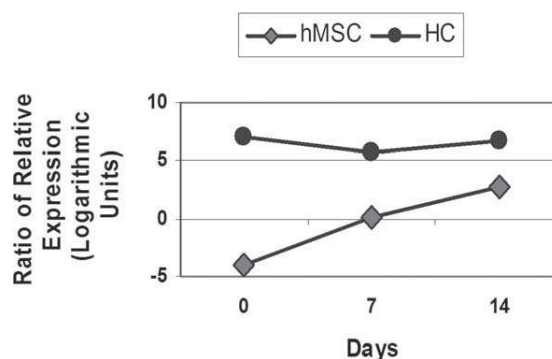
**FIGURE 5.** The qRT-PCR results for hMSCs and human chondrocytes (HC) that were chelated from the alginate matrix on days 0, 7, and 14. Human dermal fibroblasts (HDF) are used as the reference cell type for expression and is zero on these charts. (A) Message for type 1 collagen is high in hMSC at time zero and declines during differentiation in comparison to HDF. Chondrocytes have less expression of type 1 collagen than HDF as expected. (B) Type 2 collagen expression by hMSC increases by several orders of magnitude over time and the chondrocytes show stable expression from day 0 to 14. (C) Sox 9 expression increases for both hMSC and chondrocytes over the 14 days *in vitro*.

can selectively transplant cells as opposed to whole tissues and organ transplantation. Tissue-engineered cartilage might someday provide novel, minimally invasive approaches to address osteoarthritis, joint surface lesions caused by trauma, and craniofacial abnormalities. Critical to the success of a tissue-engineering approach is acquiring adequate numbers of cells for implantation. Although limited numbers of chondrocytes can be obtained from uninvolved sites, MSCs might offer a favorable alternative if they can be cultured and differentiated in an efficient manner.

Alginate is currently studied as a promising 3D scaffold for *in vitro* cartilage engineering using both chondrocytes as well as MSCs.<sup>9</sup> MSCs provide the theoretical benefit of a larger pool of proliferative cells over “aged” chondrocytes.<sup>18</sup> However, alginate’s ability to serve as a matrix for cartilage integration *in vivo* remains questionable. Fibrin gel polymer has been shown to be a better scaffold for cellular healing and collagen type II integration between devitalized cartilage discs in a porcine model.<sup>19</sup> Thus, *in vitro* cell culture in alginate requires subsequent chelation and cell recovery for *in vivo* use in alternative scaffolds that achieve better tissue integration. As the current study reveals, the methods of CaCl<sub>2</sub> alginate polymerization with sodium citrate or EDTA chelation, used in previously published studies, are greatly cytotoxic to MSCs. For cartilage engineering to reach feasibility in human subjects, the yield of viable MSCs needed for successful tissue repair must be increased. At best, Current models achieve insufficient amounts of engineered neo-cartilage to reach this end. Thus, with the promise of alginate as a medium for *in vitro* MSC culture and differentiation, the chemical agents used in these processes must be altered to improve cell viability. Additionally, some argue that the proliferative and self-renewal capacities of MSCs are greatly limited and seem to decrease with age. According to Heng et al.,<sup>20</sup> bone marrow derived MSCs are in fact a highly heterogeneous population, with only a limited proportion of cells (perhaps ~ 1 in 100,000) having the capability to differentiate into the chondrogenic lineage. If this is the case, then alginate-recovered MSC survival becomes all the more paramount to reach the number of living cells necessary for viable cell therapy.

This study showed that sodium alginate itself does not cause the great degree of cytotoxicity encountered in the alginate recovered cellular method. When individual buffer solutions were used with MSCs alone in the absence of alginate, substantial cell death was charted. Alginate could in fact provide a protective barrier for the MSCs from the

### Collagen Type 2 : Collagen Type 1 Ratio



**FIGURE 6.** The ratio of Type 2:Type 1 collagen shows a steady state pattern for chondrocytes and that the hMSCs show an increasing amount of expression for Type 2 collagen with respect to Type 1 collagen.

various chemical agents. The experiments using human MSCs showed that the cells could be differentiated in the alginate using TGF- $\beta_3$  and IGF-1. It was possible to use the chelation method to recover the cells. The qRT-PCR data demonstrated that the recovered differentiated hMSCs had upregulated the production of messenger RNA for collagen type II to levels commonly seen in native human chondrocytes.

A distinguishing feature of alginate is that it forms a gel upon the addition of calcium and reverses back to liquid form when a chelating agent is added, allowing for the recovery of cells for *in vivo* implantation in scaffolds more suitable for tissue integration. However, the chemical buffers used in alginate construct formation are cytotoxic in their current form. Further investigations are needed to characterize and optimize the chemical buffers essential to the process of MSC chondrodifferentiation and chelation in alginate. This study suggests that alternative polymerizing and chelating agents must be discovered in order for the chondrogenesis of MSCs recovered from alginate encapsulation to remain a viable method of cartilage tissue engineering in the future.

## REFERENCES

- Randolph MA, Yaremchuk MJ. Tissue engineering of cartilage. *Clin Plast Surg* 2003;30:519-537.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
- Homicz MR, Schumacher BL, Masuda K, Thonar EJ, Sah RL, Watson D. Human septal chondrocyte redifferentiation in alginate, polyglycolic acid scaffold, and monolayer culture. *Laryngoscope* 2003;113:25-32.
- Von der Mark K, Von der Mark H, Muller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 1977;267:531-532.
- Vacanti CA. Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin Plast Surg* 1994;21:445-462.
- Chia SH, Klein TJ, Thonar EJ, Masuda K, Sah RL, Watson D. Tissue-engineered human nasal septal cartilage using the alginate-recovered-chondrocyte method. *Laryngoscope* 2004;114:38-45.
- Chia SH, Schumacher BL, Thonar EJ, Masuda K, Sah RL, Watson D. Characterization of human nasal septal chondrocytes cultured in alginate. *J Am Coll Surg* 2005;200:691-704.
- Ma HL, Lin SY, Chen YL, Lo WH. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res A* 2003;64:273-281.
- Yang IH, Kim YH, Sun HJ, Kim SJ, Lee JW. Comparison of phenotypic characterization between "alginate bead" and "pellet" culture systems as chondrogenic differentiation models for human mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J* 2004;45:891-900.
- Masuda K, Hejna MJ, Thonar EJ. A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: The alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method. *J Orthop Res* 2003;21:139-148.
- Bosnakovski D, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: Influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. *Biotechnol Bioeng* 2006;93:1152-1163.
- Pittenger MF, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
- Mehlhorn AT, Kaiser S, Lepski G, Finkenzeller G, Stark GB, Sudkamp NP. Mesenchymal stem cells maintain TGF- $\beta$ -mediated chondrogenic phenotype in alginate bead culture. *Tissue Eng* 2006;12:1393-1403.
- Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, O'Driscoll SW. Combined effect of insulin-like growth factor 1 and transforming growth factor- $\beta$ 1 on peri-osteal mesenchymal stem cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarth Cartil* 2003;11:55-64.
- Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, Tanaka J, Bunyaratvej A. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:914-919.
- Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, Johnstone B, Shimer K, Chytil A, Horton WA, Moses HL, Spagnoli A. Effect of IGF-1 in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF- $\beta$  signaling. *J Bone Miner Res* 2006;21:626-636.
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-193.
- Mackay AM, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998;4:415-428.
- Peretti GM, Bonassar LJ, Kirchoff CH, Yaremchuk MJ, Randolph MA. Review of injectable cartilage engineering using fibrin gel in mice and swine models. *Tissue Eng* 2006;12:1151-1168.
- Heng BC, Lee EH. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. *Stem Cell* 2004;22:1152-1167.