

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2005 - Thèse n° 128

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU TRAITEMENT DE LESIONS DU CARTILAGE FEMORAL PAR GREFFE DE CHONDROCYTES DANS UNE COLLE DE FIBRINE

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 7 décembre 2005
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Clément-Bouheddi Caroline
Née le 23 Avril 1981
à Lyon 9°



DEPARTEMENTS ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Directeur : Stéphane MARTINOT

Au 1^{er} JANVIER 2005

DEPARTEMENT	PH. EX	PAI	PA2	MC	Coefficient de 100%	ADJ	Chargés de cours et de travaux
DEPARTEMENT DES ANIMAUX DE COMPAGNIE Médecine, Toxicologie, Parasitologie Générale Parasitologie infectieuse Parasitologie & Maladies parasitaires Quadrats et Statistique des Animaux Législation & Jurisprudence Biochimie clinique	Y. RICHARD MC CHAIVE Q. BOUQUOISEAU Q. CHANTREBLET A. LACHRELTZ M. ALTIERS	E. CHATELAIN J.P. GENTYVIE J.P. MARQUE C. FRIERHEL IL. CADORE C. FLEURY	T. BOGER D. FAU E. VOUIER D. RIVAY T. MARCHEL E. SAVAYYA	V. ULTERBE-ALBIER 90 % A. KOTHO D. GRETZEL I. VINAYARD MP. CALLAULT-CARDINAL L. ZENGER A. GENTHER E. COLARDELLI	MC MC MC MC MC MC	C. CAMOZZO MC MC MC MC MC	BENNEROUANE R. N. GAY I. GILLOUX I. BURELOT C. GALLIT C. ECHEROU P. DURIEUX
DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES Zootechnie, Élevage & Économie rurale Histoire et Alimentation Héat & Patho de la Reproduction Patho. Aviculture de Production		M. FRANCK F. BARDYASO P. BEZELLE	M. BACIALI-BRETH T. ALLOONBOURNA R. FRIKHA M.A. ARCAINGHILL D. LE GRAND	P. LEBLANC D. GRANCHER L. ALVES-DE-OLIVEIRA G. BICHSEL-ANDRANO S. BUEFF P. GREEN D. WATRELOT-VIREUX P. BELLU D. PIN M. HEDONNARD J. SONET	MC MC MC MC MC MC	L. MOUWER <	

REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr. JP. CARRET qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse et le Pr. D. FAU qui a consenti à participer à ce jury.

Je tiens à remercier le Pr. E. VIGUIER qui a accepté de m'encadrer dans ce travail et qui a participé activement aux interventions et le Dr. M. PIPERNO qui est à l'origine de cette étude.

Je remercie également le Pr. T. ROGER qui nous a permis d'utiliser le laboratoire de Médecine et de Chirurgie Expérimentales qu'il dirige.

Merci au Pr. O. DAMOUR et à Mlle E. FARGERÉ qui ont effectué la culture cellulaire, à Mme M. BILLO et Mr N. GADOT qui ont respectivement participé à cette étude lors de l'immunohistologie et l'histologie.

Je tiens aussi à remercier le Dr R. CARRARO et Mr. C. CHAMBOURNIER pour leur aide précieuse lors des interventions à l'ENVL.

Je suis tout particulièrement reconnaissante au Dr A. BOUHEDDI qui a contribué largement à cette étude et m'a toujours encouragée dans ce travail, et à mes parents, mes sœurs Anne et Florence, Stéphane et Fabien, ainsi que tout le reste de ma famille.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	8
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	9
I. STRUCTURE DU CARTILAGE ARTICULAIRE	11
A. <u>Aspect macroscopique</u>	11
B. <u>Le développement des os longs et la formation du cartilage</u>	11
C. <u>Histologie du cartilage articulaire</u>	14
II. LES COMPOSANTS DU CARTILAGE ARTICULAIRE	16
A. <u>Les chondrocytes</u>	16
B. <u>Les protéoglycannes</u>	18
C. <u>Les collagènes</u>	19
1. Structure générale	19
2. Les collagènes du cartilage articulaire	21
3. Organisation et fonction des collagènes dans le cartilage	22
D. <u>Autres constituants de la matrice extracellulaire</u>	22
III. LES DIFFERENTS SYSTEMES DE CULTURE DES CHONDROCYTES	23
A. <u>Les différents systèmes de culture</u>	23
B. <u>Les conditions de culture</u>	25
IV. PATHOLOGIES ARTICULAIRES ET TRAITEMENTS ACTUELS	25
A. <u>Pathologies ostéoarticulaires</u>	25
B. <u>Traitements cliniques actuels</u>	27
1. Traitements hygiéniques et médicaux	27
2. Traitements chirurgicaux	28

PARTIE EXPERIMENTALE	31
<i>JUSTIFICATIFS</i>	31
<i>OBJECTIFS</i>	31
<i>MATERIEL ET METHODES</i>	32
I. MATERIEL	32
A. <u>Modèle expérimental : la brebis</u>	32
B. <u>Matériel chirurgical</u>	33
C. <u>Matériel pour la culture de chondrocytes</u>	33
D. <u>Matériel pour la partie histologique</u>	34
E. <u>Matériel pour la partie immunohistologique</u>	35
II. METHODOLOGIE	37
A. <u>Prélèvement du cartilage des brebis</u>	37
B. <u>Extraction et culture des chondrocytes</u>	39
C. <u>Implantation des chondrocytes</u>	40
D. <u>Euthanasie et prélèvement des condyles fémoraux</u>	46
E. <u>Préparation histologique des lames</u>	46
F. <u>Marquages immunohistologiques</u>	47
G. <u>Lecture et évaluation des lésions macroscopiques et histologiques</u>	49
<i>RESULTATS</i>	51
I.RESULTATS DE LA CULTURE CELLULAIRE	51
II.RESULTATS CLINIQUES	51
III.RESULTATS ICRS MACROSCOPIQUES	52
IV.RESULTATS HISTOLOGIQUES SELON L'ECHELLE ICRS	61
V.RESULTATS DES MARQUAGES IMMUNOHISTOLOGIQUES	64

<i>DISCUSSION</i>	65
I. DISCUSSION DES RESULTATS	65
A. <u>Macroscopiques</u>	65
B. <u>Histologiques</u>	65
C. <u>Immunohistologiques</u>	67
II. DISCUSSION DE LA METHODOLOGIE	67
A. <u>Choix du modèle animal</u>	67
B. <u>Prélèvement du cartilage</u>	67
C. <u>Culture cellulaire</u>	67
D. <u>Intervention chirurgicale</u>	68
E. <u>Evaluation macroscopique</u>	68
F. <u>Histologie et évaluation histologique</u>	69
G. <u>Immunohistologie</u>	69
CONCLUSION	70
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	72
ANNEXE 1 TABLEAU DES LESIONS MACROSCOPIQUES	78
ANNEXE 2 PHOTOS HISTOLOGIQUES	79

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INDEX DES FIGURES

Figure 1	10
Figure 2	10
Figure 3	12
Figure 4	13
Figure 5	15
Figure 6	17
Figure 7	20
Figure 8	24

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1	33
Tableau 2	53
Tableau 3	53
Tableau 4	54
Tableau 5	54
Tableau 6	55
Tableau 7	62
Tableau 8	62
Tableau 9	63
Tableau 10	63
Tableau 11	64

INDEX DES PHOTOS

Photo 1	38
Photo 2	38
Photo 3	40
Photo 4	41
Photo 5	42
Photo 6	44
Photo 7	45
Photo 8	45
Photo 9	45
Photo 10	45
Photo 11	52
Photo 12	52
Photo 13	52
Photo 14	52
Photo 15	61
Photo 16	61
Photo 17	61
Photo 18	66

INDEX DES SCHEMAS

Schéma 1	42
Schéma 2	43

INDEX DES GRAPHIQUES

Graphique 1	56
Graphique 2	57
Graphique 3	58
Graphique 4	59
Graphique 5	60

INTRODUCTION

Chez l'Homme, l'articulation du genou est soumise à des contraintes mécaniques constantes car elle porte tout le poids de l'individu. Elle est continuellement sollicitée lors de la locomotion et d'autant plus lors de l'exercice physique. Celui-ci ayant pris dans notre société une part importante, on constate une incidence croissante des lésions traumatiques méniscales, ligamentaires et cartilagineuses au niveau de cette articulation. Ces dernières, décelables par arthroscopie ou IRM, ne se réparent pas et n'ont pas de traitement connu.

Ceci pose un problème considérable chez le sujet jeune car ces lésions, non seulement entraînent des douleurs et une invalidité, mais sont aussi génératrices d'arthrose précoce et parfois sévère pour laquelle le traitement usuel est le remplacement prothétique. Or ce traitement n'est pas souhaitable pour les sujets jeunes du fait de la durée de vie limitée de ces prothèses.

Les problèmes de réparation du cartilage articulaire sont en rapport avec sa structure unique : en effet, il contient des cellules hautement spécialisées, les chondrocytes, incluses dans une matrice extracellulaire dense composée principalement de fibres de collagène de type II, IX et XI et de protéoglycannes sulfatés. Le cartilage articulaire est un tissu sans innervation ni vascularisation nourri par imbibition à partir du liquide synovial. Sur le plan fonctionnel, le cartilage est soumis à des contraintes mécaniques importantes pour assurer l'amortissement des chocs et limiter le frottement des articulations. Sur le plan pathologique, il est le siège de syndromes de type dégénératif pouvant conduire à un blocage des articulations. A la suite d'une lésion, le cartilage néoformé ne restitue pas la totalité des propriétés mécaniques nécessaires à sa fonction car il présente un réseau de fibres contenant des collagènes de type I et II correspondant à un fibrocartilage.

Sur le plan thérapeutique, il n'existe pas actuellement de médicaments ou de méthodes de réparation permettant la régénération d'un cartilage articulaire fonctionnel. De nombreuses études ont été menées à cette fin notamment celle utilisant l'implantation de chondrocytes autologues, méthode de Brittberg, aujourd'hui utilisée et celle de greffes ostéochondrales en mosaïque.

Notre étude porte sur une amélioration de la méthode de Brittberg. En effet, les chondrocytes autologues sont ici ensemencés dans une colle de fibrine.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Le cartilage est un tissu hautement spécialisé qui possède une double spécificité : d'une part, il s'agit d'un tissu avasculaire et non innervé, d'autre part, il est composé d'un seul type de cellule, le chondrocyte assurant la synthèse d'une matrice extracellulaire responsable des propriétés mécaniques du cartilage. Les chondrocytes présentent un taux de renouvellement cellulaire réduit et maintiennent la stabilité de la matrice extracellulaire en synthétisant à la fois les molécules la composant et les enzymes susceptibles de la dégrader. Chez l'homme adulte, on distingue trois types de cartilage (figure 1) (Mallein-Gerin et *al.*, 1996) selon composition de la matrice extracellulaire, c'est-à-dire :

1. Le cartilage hyalin ou articulaire. Il est situé à la surface de l'os et en regard du liquide synovial (figure 2). Il est constitué d'une matrice extracellulaire importante, riche en collagènes de type II, IX et XI et en protéoglycannes. Cette matrice est produite par un nombre relativement restreint de chondrocytes. La composition biochimique de la matrice extracellulaire rend compte des propriétés mécaniques de ce cartilage. La transmission, l'amortissement et la distribution des charges extrêmement importantes sont alors possibles grâce à la forte pression osmotique. Enfin, ce cartilage assure le glissement des pièces osseuses entre elles avec un coefficient de friction très bas.

2. Le fibrocartilage est structurellement un intermédiaire entre un tissu conjonctif classique et un cartilage hyalin. Il est très riche en fibres de collagène ; ces fibres permettent une bonne résistance aux tractions et aux compressions : il constitue les disques intervertébraux et les zones d'insertion des tendons.

3. Le cartilage élastique est caractérisé par la présence de fibres élastiques et constitue le pavillon de l'oreille, la trompe d'eustache, l'épiglotte et certains cartilages du larynx.

Compte tenu de l'objet de ce travail, il ne sera traité dans cette revue bibliographique que le cas du cartilage articulaire.

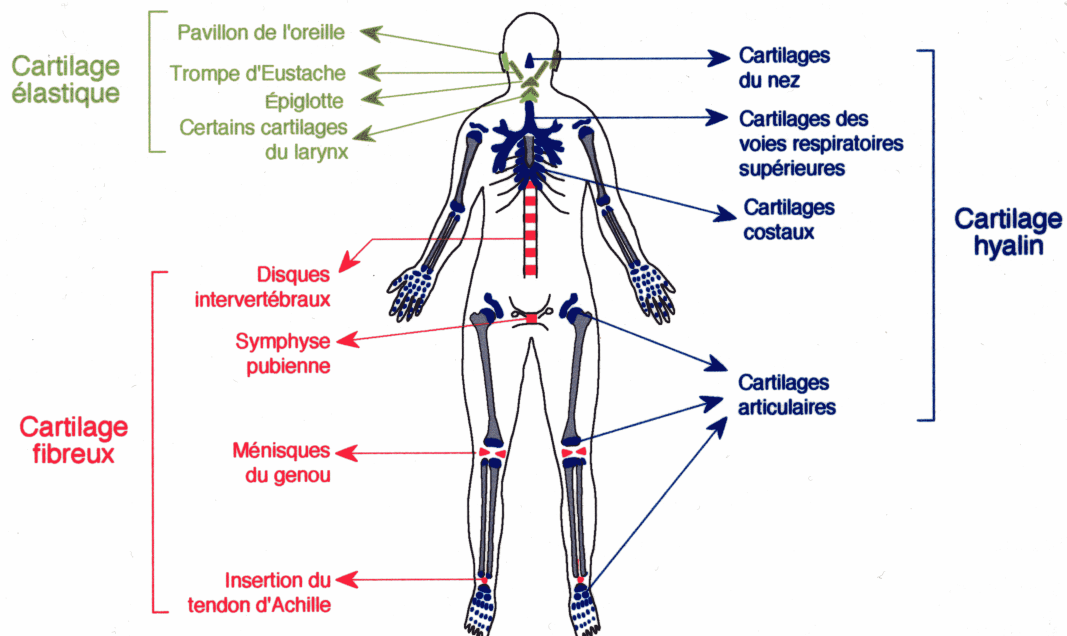


Figure 1 : Schéma de la topographie des cartilages chez l'homme.

Le cartilage hyalin est présent au niveau des articulations, du nez, des voies respiratoires supérieures, des côtes. Le cartilage fibreux est présent au niveau des disques intervertébraux, de la symphyse pubienne, des ménisques des genoux, de l'insertion des tendons d'Achille. Le cartilage élastique est présent au niveau des pavillons des oreilles, de la trompe d'Eustache, de l'épiglotte, et du larynx

(Mallein-Gerin et Van Der Rest, 1996).

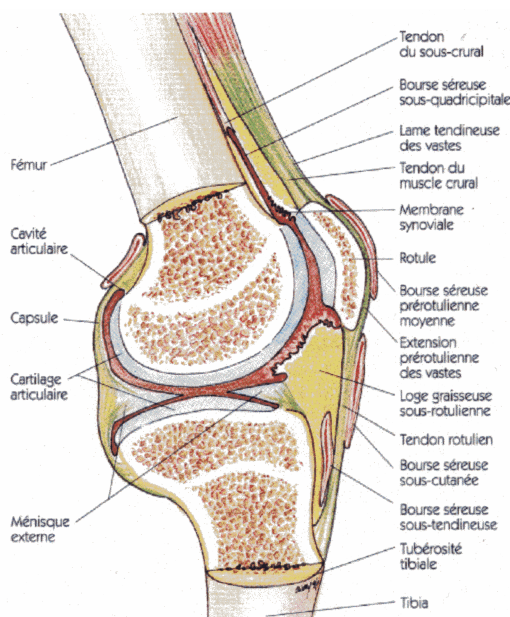


Figure 2 : Représentation schématique d'une coupe parasagittale externe du genou

(Atlas de l'arthrose, E. Vignon, 1995)

I. STRUCTURE DU CARTILAGE ARTICULAIRE

A. Aspect macroscopique

Le cartilage articulaire normal apparaît blanc, brillant et légèrement translucide. Sa richesse en protéoglycannes lui donne un indice de réfraction élevé qui ne rend pas visibles les fibres de collagène d'où son qualificatif de hyalin. L'épaisseur du cartilage varie d'une articulation à l'autre. Elle est de l'ordre de 2 à 4 mm pour une hanche, de 6 à 7 mm pour un genou. Le cartilage est constitué de deux éléments : les chondrocytes et la matrice extracellulaire. Le principal composant de cette matrice est l'eau (environ 75% de son poids) qui est retenue en son sein grâce au pouvoir hydrophile des protéoglycannes.

B. Le développement des os longs et la formation du cartilage articulaire

Au cours du développement embryonnaire, les cellules mésenchymateuses préchondrogéniques se condensent et se différencient en chondrocytes (Martin et *al.*, 1998). Ces cellules mésenchymateuses synthétisent les collagènes de type I, III, et V retrouvés dans tous les tissus conjonctifs classiques. La différenciation des chondrocytes se traduit par l'inhibition des synthèses des collagènes de type I, III et V et par la production des collagènes de type II, IX et XI et du protéoglycanne agrécanne (Hall et *al.*, 1983). La formation du cartilage est aussi une étape transitoire importante de la formation des os longs (figure 3). En effet, ceux-ci se forment par ossification enchondrale. Au cours de ce processus, les chondrocytes poursuivent leur différenciation en s'hypertrophiant. Cette maturation est caractérisée par l'expression de collagène de type X, de phosphatase alcaline et par une réduction de la synthèse des collagènes spécifiques du cartilage. La matrice extracellulaire se calcifie progressivement. La formation du minéral requiert deux phases :

- L'accumulation d'ions calcium et phosphore qui forment une solution métastable,
- Des variations infimes de l'environnement provoquent alors le dépôt des premières aiguilles d'apatite (figure 4).

Ensuite la minéralisation se développe rapidement par nucléation secondaire utilisant les premiers cristaux. Les cellules provoquent la minéralisation en favorisant la formation de solutions métastables dans les zones de non-recouvrement du collagène ou dans des vésicules matricielles. Les chondrocytes meurent progressivement selon un processus d'apoptose (Gibson et *al.*, 1995) et facilitent donc la formation d'une matrice osseuse produite par les ostéoblastes. Les chondrocytes hypertrophiques pourraient aussi se différencier en cellules de type ostéoblastique. Gentili et *al.* (1993) ont démontré *in vitro* cette transformation en utilisant des chondrocytes aviaires. Une division asymétrique des chondrocytes hypertrophiques se produit : une cellule-fille meurt par apoptose et l'autre engendre des cellules ostéoblastiques (Roach et *al.*, 1995). Les synthèses de collagène de type I, d'ostéopontine, d'ostéonectine, de la protéine sialique de l'os (*bone sialoprotein*) sont aussi détectées *in vivo* par immunohistochimie et par hybridation *in situ* mais cette transdifférenciation n'a pas encore été réellement démontrée *in vivo*.

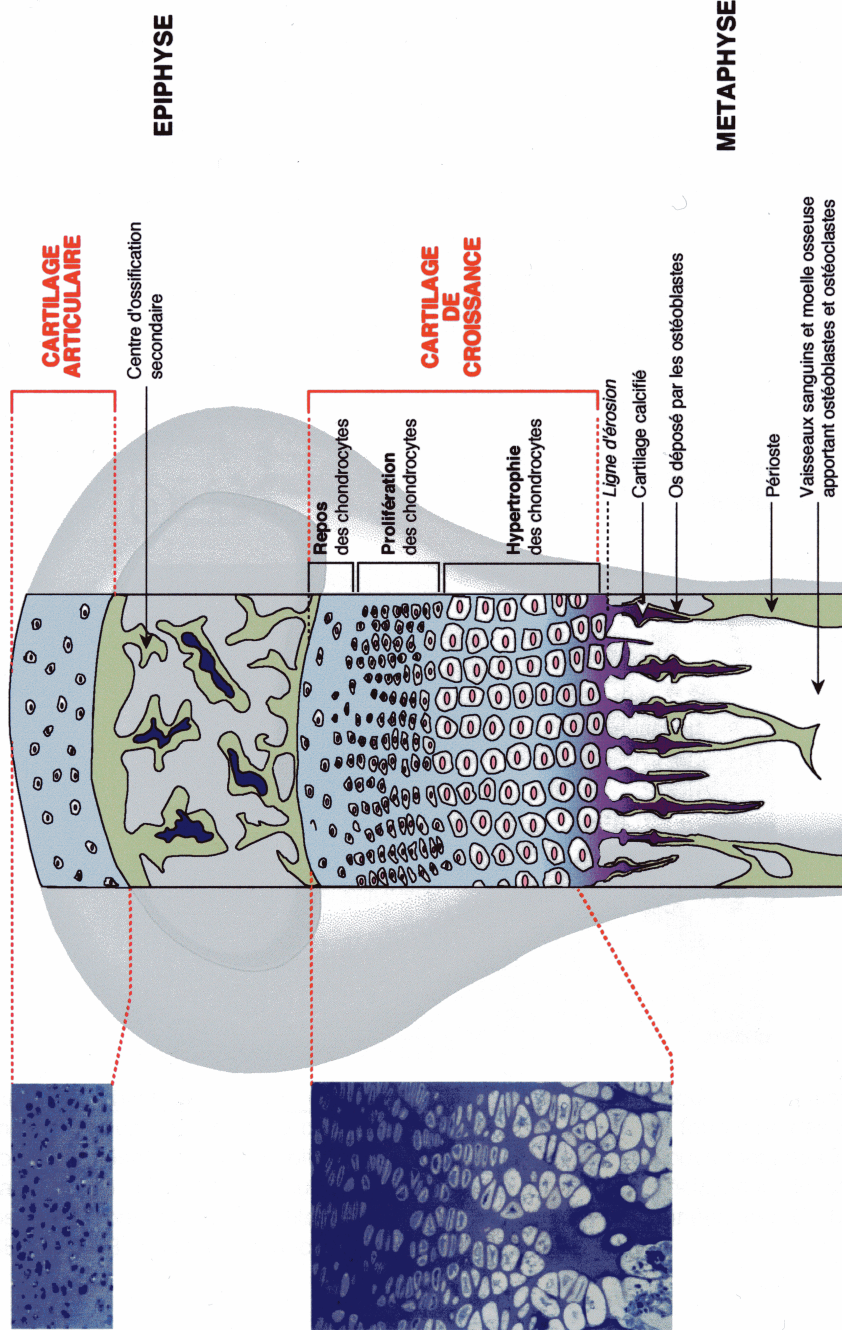


Figure 3 : Représentation schématique du cartilage épiphysaire en développement. Les chondrocytes sont organisés en colonnes avec une matrice extracellulaire dense. Au cours de la croissance, un processus d'ossification provoque une minéralisation de la matrice cartilagineuse. A l'âge adulte, le cartilage de croissance disparaît complètement (Mallein-Gerin & van der Rest, 1996 ; photos de cartilage bovin foetal données par C. M. Serre, INSERM U403, Faculté Laënnec, Lyon).

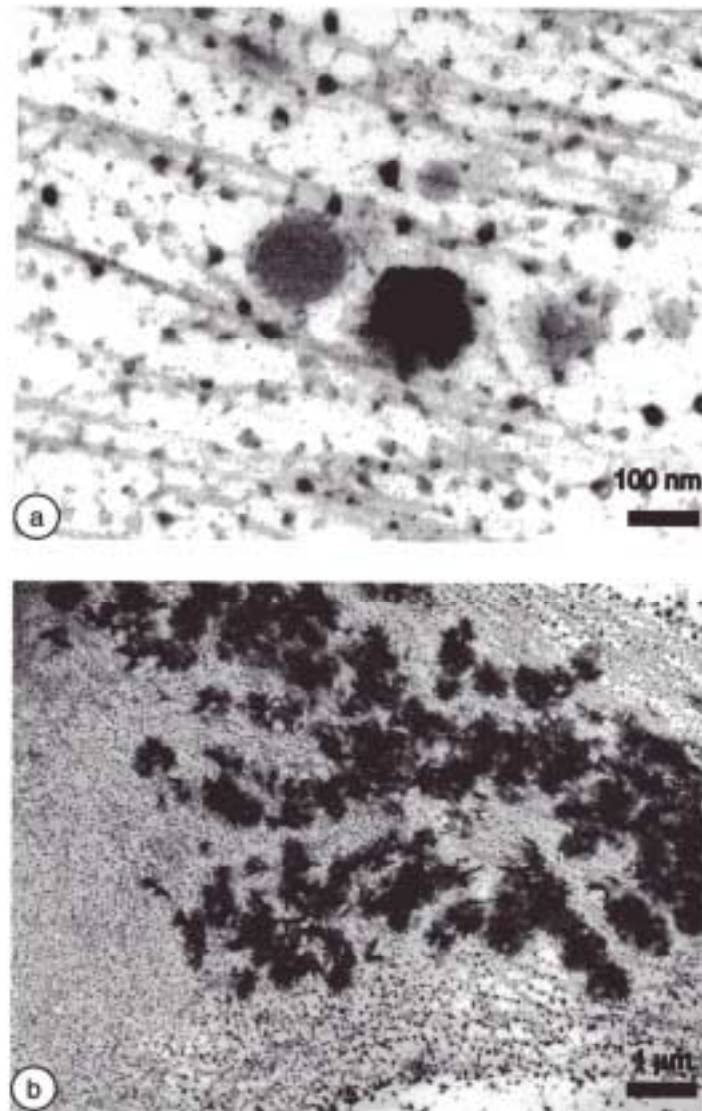


Figure 4 : La biominéralisation de la matrice cartilagineuse.

Au cours du développement, la minéralisation de la matrice cartilagineuse est une étape de la formation des os longs. La biominéralisation débute soit au niveau des zones de non-recouvrement des fibrilles de collagènes ou dans des vésicules matricielles (figure a), par précipitation du calcium et phosphore sous forme d'apatite (figure b).

(Photographies données par C.M. Serre, INSERM U403, Faculté Laënnec, Lyon)

C. Histologie du cartilage articulaire

Les chondrocytes ainsi que les collagènes, les protéoglycannes et d'autres protéines sont organisés dans un ordre défini. La matrice extracellulaire, formant le cartilage, change de composition et de propriétés en fonction de sa position par rapport à la surface articulaire. C'est ainsi que quatre zones peuvent être différenciées depuis la surface articulaire jusqu'à l'os sous-chondral en fonction de leur composition, activité métabolique et propriétés biomécaniques. De même, les chondrocytes ont une forme, une taille et une orientation différentes dans chaque zone. Des études histologiques et mécaniques (Aydellote et *al.*, 1992 et Buckwalter et *al.*, 1990) ont montré que ces différentes zones successives sont fondamentales sur le plan fonctionnel car elles sont susceptibles de répondre différemment aux charges mécaniques. Les quatre zones du cartilage articulaire sont (figure 5) :

1. La zone superficielle en contact avec le liquide synovial, elle sert de surface de glissement. Elle représente environ 5 à 10% de la hauteur totale du cartilage. Cette zone est séparée en deux couches :

La zone de contact avec le liquide synovial est composée d'un film de microfibrilles avec peu de protéoglycannes et aucune cellule,

Une zone plus profonde contenant des chondrocytes plats et ellipsoïdaux, disposés parallèlement à la surface articulaire. Ils synthétisent une quantité plus importante de collagène et une plus faible quantité de protéoglycannes que les chondrocytes des autres zones.

Les concentrations en fibronectine et en eau sont plus élevées dans cette zone. Les chondrocytes synthétisent du collagène de type II, IX et XI. Les fibrilles de collagène sont orientées parallèlement à la surface articulaire ce qui contribue fortement aux propriétés mécaniques du tissu en apportant une plus grande résistance aux tensions et aux pressions que dans les zones plus profondes. La zone superficielle protège le cartilage sous-jacent des forces de déchirement générées lors de l'activité articulaire (Roth et *al.*, 1980). La suppression de cette zone, chez l'animal, augmente la perméabilité du tissu et la charge supportée par la matrice extracellulaire sous-jacente durant la compression. La déchirure et le remodelage de ce tissu est le premier changement détectable dans l'induction expérimentale d'une ostéoarthrose (Guilak et *al.*, 1994). En outre, la surface articulaire limite l'accès du cartilage au système immunitaire en bloquant, entre autre, la pénétration des immunoglobulines. Une déchirure de cette zone peut donc exposer des constituants natifs ou dégradés du cartilage, stimuler le système immunitaire et induire à plus ou moins long terme une dégradation du cartilage.

2. La zone de transition constitue la deuxième couche du cartilage. Elle est formée de fibres de collagène de type II, IX et XI qui s'entrecroisent obliquement en un réseau non orienté moins dense que celui de la surface articulaire. L'épaisseur de cette zone représente environ 40 à 45 % de l'épaisseur totale du cartilage. La quantité d'eau est plus faible que dans la zone superficielle. Les chondrocytes, de morphologie ronde, sont plus actifs dans cette zone que dans la zone supérieure, comme l'indique la taille supérieure de leur réticulum endoplasmique et de leur appareil de Golgi.

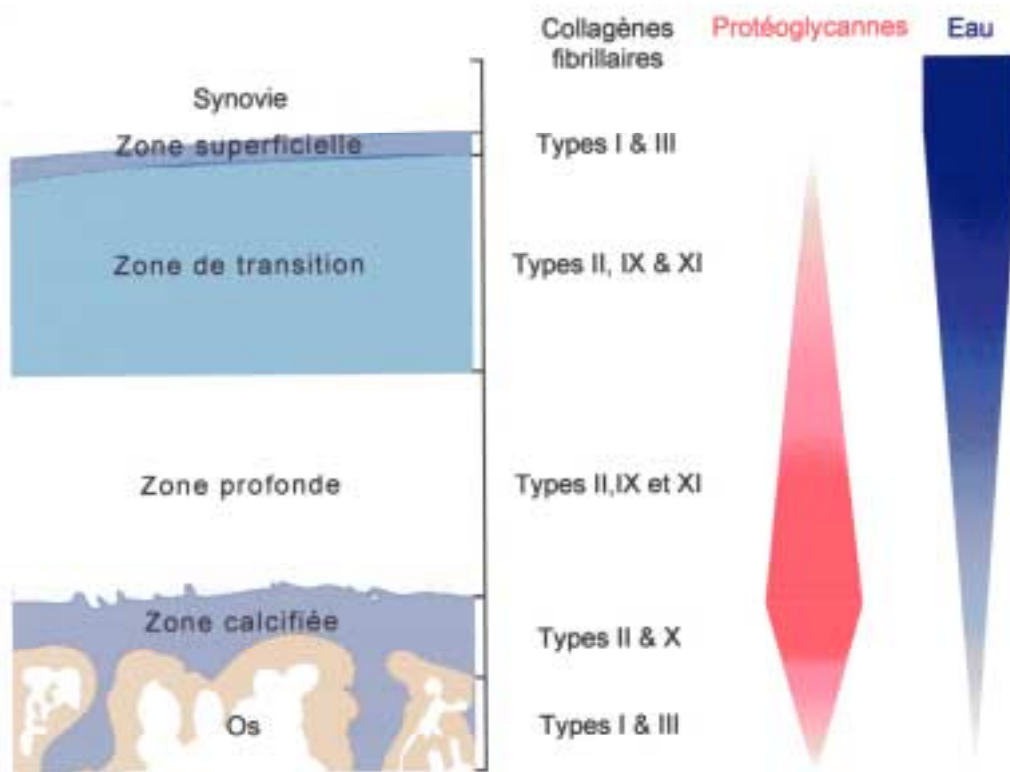


Figure 5 : Représentation schématique du cartilage articulaire adulte.

Quatre couches sont décrites dans le cartilage articulaire adulte selon le type et l'orientation des fibres de collagène, la quantité de protéoglycannes et d'eau ainsi que la forme et l'activité des chondrocytes

(Atlas de l'arthrose, J.P. Pujol, 1995).

3. La zone profonde du cartilage contient des fibres de collagène de type II, IX et XI orientées de façon perpendiculaire à la surface et des chondrocytes sous forme de colonnes également perpendiculaires à la surface. Elle représente 40 à 45 % de l'épaisseur totale du cartilage. Cette zone contient la plus grande quantité de protéoglycannes et la plus faible proportion d'eau.

4. La zone calcifiée est en contact avec la plaque osseuse sous-chondrale à laquelle elle amarre le cartilage et représente 5 à 10 % de l'épaisseur totale du cartilage. Elle correspond à une zone où le cartilage est en voie de calcification (apatite) et où les chondrocytes sont hypertrophiques. Elle est séparée de la zone profonde par une couche protéique basophile nommée « tide-mark ». Celle-ci correspond à un enchevêtrement extrêmement dense de fibres de collagène. Sa composition précise reste à être déterminée (Omege et *al.*, 1995).

II. LES COMPOSANTS DU CARTILAGE ARTICULAIRE

Nous décrirons successivement les chondrocytes, les protéoglycannes, les collagènes et diverses glycoprotéines (figure 6).

A. Les chondrocytes

Le chondrocyte est le seul type cellulaire rencontré dans le cartilage articulaire. L'ensemble des chondrocytes n'occupent que le dixième du volume total. De plus, cette densité cellulaire dépend de la profondeur du cartilage. La zone superficielle comporte le plus de cellules. Il semble exister un nombre fixe de chondrocytes qui décroît à partir de 20 ans chez l'homme. Cette densité cellulaire est variable en fonction de l'individu et, pour un même individu, du type d'articulation considéré. Elle pourrait être un facteur dans les processus d'arthrose.

Les chondrocytes sont riches en lysosomes, en mitochondries et en vacuoles de glycogène. Ils utilisent essentiellement le glucose comme substrat énergétique. En raison du caractère avasculaire du cartilage, il reçoit peu d'oxygène et doit donc privilégier la voie de la glycolyse anaérobie (Muir et *al.*, 1986). En plus, il doit consommer une quantité importante de glucose qu'il convertit en glucosamine pour réaliser la synthèse des protéoglycannes. Il est important de souligner que les chondrocytes sont capables de produire la matrice extracellulaire mais également les enzymes capables de la détruire. Dans des cas pathologiques, ils peuvent aussi produire des cytokines pro-inflammatoires provoquant la destruction du cartilage par augmentation de la synthèse et de l'activité des métalloprotéinases (Shlopov et *al.*, 1997), de hyaluronidases (Flannery et *al.*, 1998) et d'une ou des agrécannases.

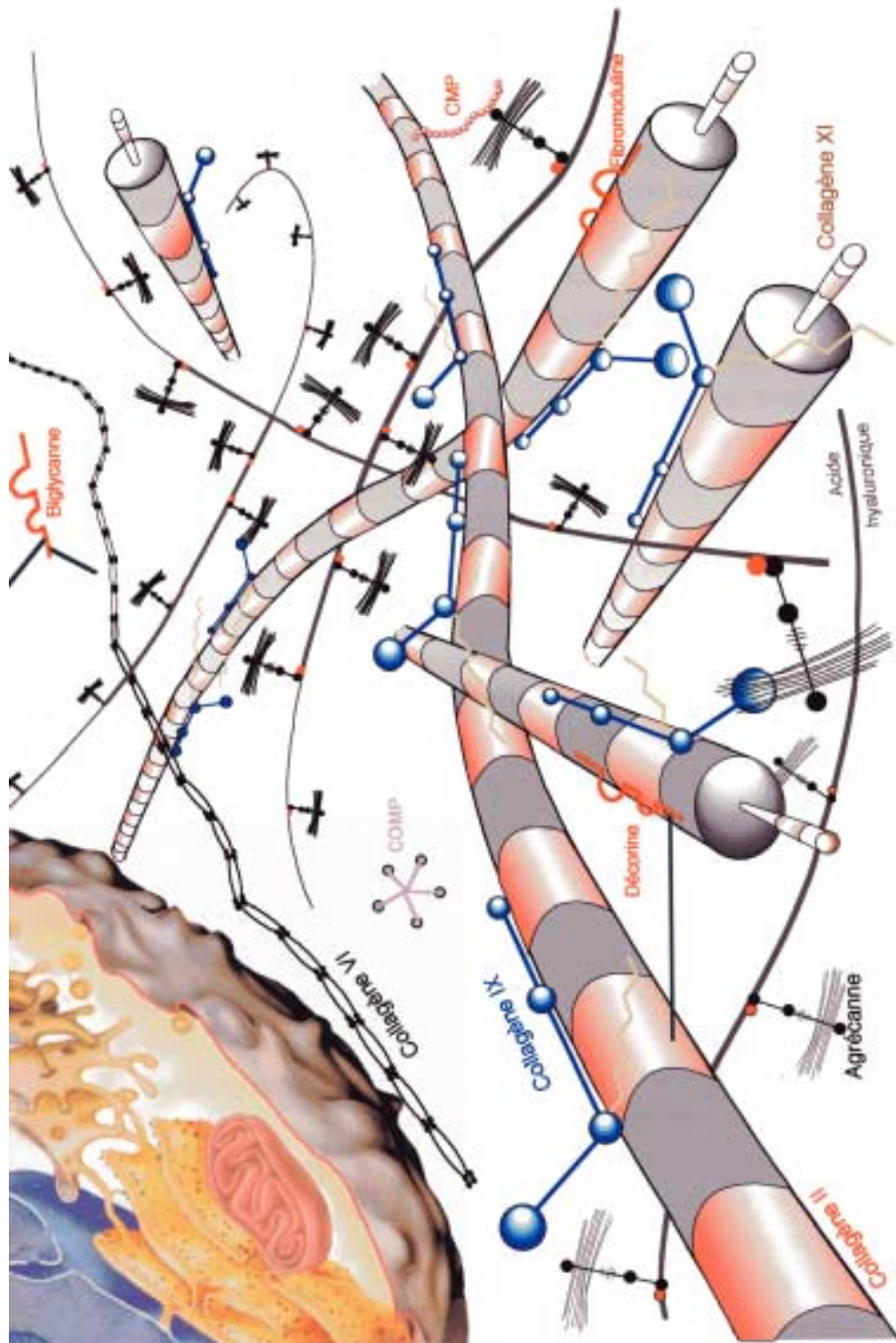


Figure 6 : Le chondrocyte et sa matrice extracellulaire. Le cartilage est composé d'un seul type de cellule: le chondrocyte. Celui-ci produit une matrice cartilagineuse composée de collagènes de type II, IX et XI, de protéoglycannes (agrécanne, biglycanne, décorine, fibromoduline), et diverses autres protéines (COMP). (Mallein-Gerin & van der Rest, 1996)

Les chondrocytes sont séparés de la matrice extracellulaire de type cartilage par un espace péricellulaire particulier. Cet espace n'est pas une lacune comme cela était précédemment supposé mais un espace clef où le pH est plus acide (pH de 6,1) que dans le reste du tissu (pH de 7,4). Les enzymes lysosomiales (cathepsines B) qui y sont libérées, étant activées par le pH acide, peuvent donc dégrader la matrice extracellulaire (Adolphe et *al.*, 1992). De plus, dans cet espace péricellulaire, les protéoglycannes et les collagènes présents, comme par exemple le collagène de type VI (Marcelino et *al.*, 1995), sont utilisés pour réaliser l'ancrage des chondrocytes à la matrice par l'intermédiaire de protéines membranaires. L'anchoring CII est une protéine d'attachement qui interagit avec le collagène de type II (Mollenhauer et *al.*, 1984). Des protéoglycannes insérés dans la membrane plasmique des chondrocytes peuvent aussi servir de lien entre la cellule et la matrice extracellulaire. Ces protéoglycannes sont composés d'un sulfate d'héparanne et d'une protéine axiale appartenant à la famille des syndécannes (Bernfield et *al.*, 1992) ou des glypicannes.

Une particularité des chondrocytes est que leur métabolisme est en permanence influencé par les conditions physico-chimiques qui règnent dans cet espace péricellulaire (Maroudas et *al.*, 1986 ; Wilkins et Hall, 1995). Ainsi, l'application cyclique de forces sur des fragments de cartilage retentit sur le pH qui règne dans cet espace mais également sur la forme des chondrocytes. Il en résulte une modification des microfilaments d'actine du cytosquelette qui peut induire ou modifier l'expression de certains gènes. Il existe donc un lien direct entre les conditions physiques et physico-chimiques qui règnent autour des chondrocytes et de leur activation métabolique (Sommarin et *al.*, 1989).

B. Les protéoglycannes

La fonction des protéoglycannes est de retenir l'eau dans le cartilage ce qui confère à ce tissu ses propriétés mécaniques. Les protéoglycannes sont composés d'une protéine axiale ou porteuse (core protein) et d'une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycannes (GAG). Il n'existe que quelques types de structures de GAG (Yanagishita et *al.*, 1993). Ce sont des polysaccharides composés d'une répétition de disaccharides contenant un sucre aminé (hexosamine) et d'un sucre de type hexuronique (ou galactose dans le cas du sulfate de kératane) (Roughley et *al.*, 1994). Ces sucres forment un polysaccharide non branché chargé négativement par le groupement carboxylique ou par le groupement sulfate qui repousse les charges négatives environnantes et attire les cations. Il existe 5 types de chaînes de glycosaminoglycannes : les sulfates de chondroïtine (CS), le sulfate de dermatane (DS), le sulfate d'héparanne (HS), le sulfate de kératane (KS) et l'acide hyaluronique (HA). Il est à noter que HA est le seul GAG ne possédant pas de groupement SO_4^{2-} et n'étant pas lié à une chaîne protéique. Tous ces GAG sont retrouvés dans le cartilage en concentration variable en fonction de la zone du cartilage considérée.

Le cartilage articulaire contient deux classes de protéoglycannes : d'une part des protéoglycannes formant de larges agrégats, d'autre part des protéoglycannes de petites tailles. L'agréganne, constituant 90% des protéoglycannes du cartilage, est composé d'une protéine axiale de 220 kDa sur laquelle sont fixées de façon covalente une centaine de CS et une trentaine de KS (masse totale d'environ 2200 kDa). Elle se lie avec HA de façon non-covalente au niveau de sa région NH_2 -terminale. Cette interaction est stabilisée par une protéine de liaison. Plus de 300 molécules d'agrégannes peuvent s'associer autour d'un squelette d'HA et constituer un ensemble pouvant atteindre 10 micromètres (Buckwalter et *al.*, 1985) et créant de larges domaines hydrodynamiques entre les fibres de collagène. Du fait de leur taille, ces

protéoglycannes sont retenus dans la matrice extracellulaire durant les déformations subies par le cartilage. La perte de ces macromolécules conduit à la disparition des propriétés mécaniques du tissu et est observée lors de l'arthrose. Au cours du vieillissement, il se produit une diminution de la quantité de ces macromolécules du fait du ralentissement du métabolisme des cellules et d'un taux de renouvellement plus court des protéoglycannes (1 à 3 ans suivant les articulations) (Sandy et *al.*, 1992) que du collagène. De ce fait, les propriétés mécaniques du cartilage se détériorent ce qui peut expliquer la dégénérescence arthrosique survenant avec le vieillissement.

Le cartilage contient aussi de larges protéoglycannes non agrégés qui ressemblent en structure et en composition à l'agrécanne. Ces molécules représentent moins de 10% de la masse de protéoglycannes et pourraient correspondre à de l'agrécanne dégradé (Buckwalter et *al.*, 1994).

Les petits protéoglycannes ne représentent que 3% environ du tissu cartilagineux. Généralement ils ne sont pas spécifiques du cartilage mais participent à la formation de la matrice extracellulaire. Parmi eux, la décorine, le biglycane et la fibromoduline interagissent avec les fibres de collagène (Roughley et *al.*, 1994). A noter que le collagène de type IX est considéré comme un protéoglycane car il peut porter une chaîne de GAG de type chondroïne sulfate. La décorine et la fibromoduline ont été décrites comme régulant le diamètre des fibrilles de collagène durant la fibrillogenèse (Font et *al.*, 1998). De plus, la décorine comporte un site de liaison spécifique avec un facteur de croissance : le TGF- β , Transforming Growth Factor β (Facteur de croissance transformant β) (Yamaguchi et *al.*, 1990), et ainsi peut agir sur le métabolisme et sur la prolifération des chondrocytes. La fonction du biglycane n'est pas très bien connue. Il est principalement localisé dans la région péricellulaire des chondrocytes et peut interagir avec le collagène de type VI (Roughley et *al.*, 1994). D'un point de vue général, ces molécules se lient aux autres macromolécules et influencent probablement l'organisation de la matrice extracellulaire et la fonction des chondrocytes, les petits protéoglycannes pouvant influencer l'activité des cytokines dans le cartilage (Hildebrand et *al.*, 1994).

C. Les collagènes

Avant de décrire les collagènes spécifiques du cartilage articulaire, la structure générale commune aux 19 types distincts de collagènes identifiés dans divers tissus chez les mammifères est présentée dans la figure 7.

1. Structure générale

Chaque molécule de collagène est composée de trois chaînes peptidiques caractérisées par une séquence Gly-X-Y répétitive où dans 30% des cas X est une proline et Y une hydroxyproline. Cette structure primaire a pour conséquence la formation d'une hélice gauche de type polyproline. L'association avec deux autres chaînes conduit à la formation d'une super hélice droite. Cette structure dans sa forme native (structure tertiaire « colled-coil ») est extrêmement résistante à la protéolyse, excepté lorsque celle-ci implique des collagénases (enzymes de la famille des métallo protéinases). Pas moins de 35 chaînes α ont été rapportées et codées chacune par un seul et unique gène. Ces chaînes se combinent soit avec elles-mêmes pour former un homotrimère soit avec au moins une chaîne différente pour former un hétérotrimère. Dans les conditions physiologiques, les collagènes de type I, II, III, V et XI s'organisent pour former des fibrilles, lesquelles s'associent entre elles pour former des fibres (figure 7). Les collagènes sont sécrétés sous la forme de procollagènes. Les extrémités NH₂ et COOH- terminales de ces procollagènes présentent des domaines appelés propeptides.

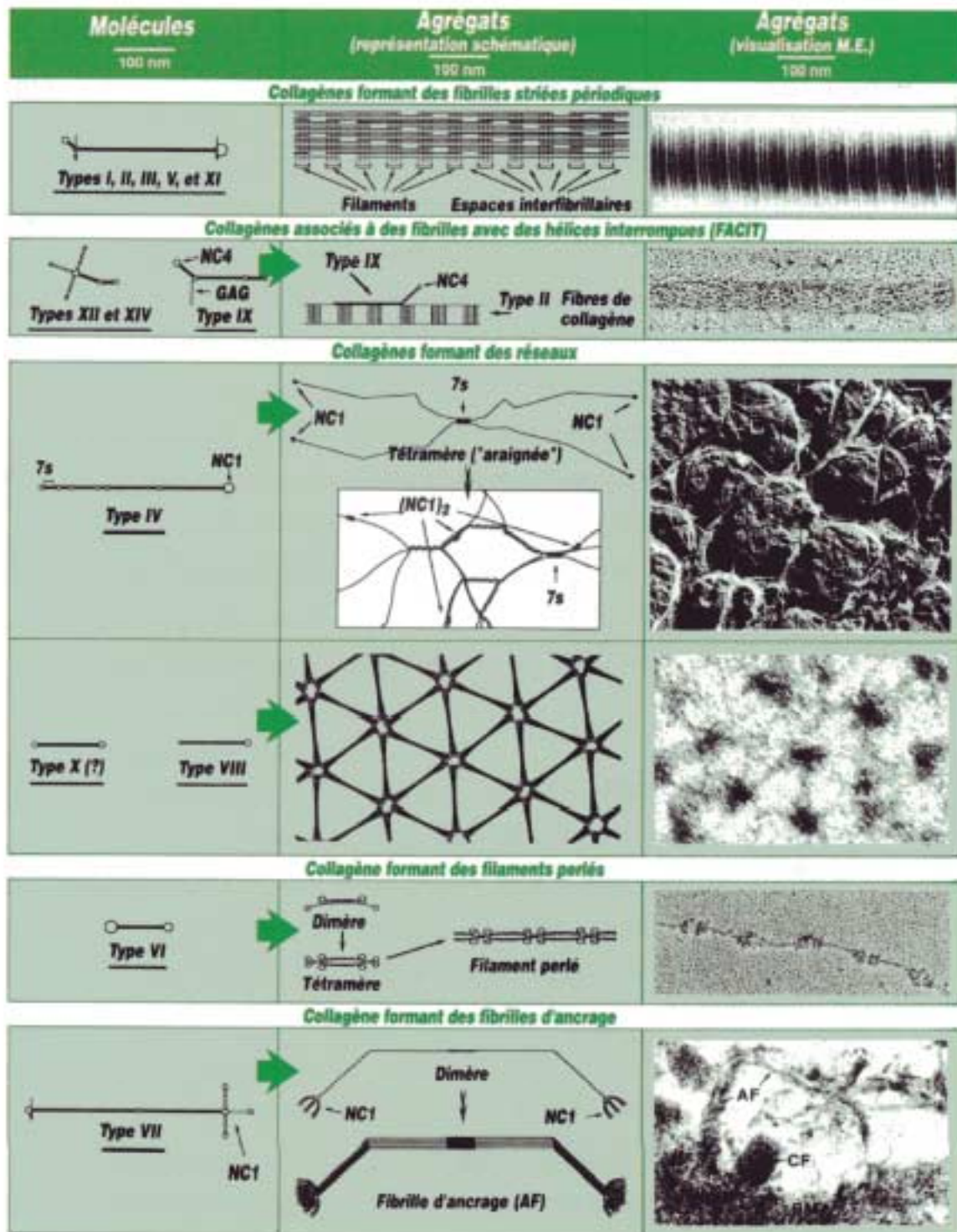


Figure 7 : Structure moléculaire et assemblages supramoléculaires des collagènes

(van der Rest et Garrone, 1991).

Ces domaines sont clivés par des protéases spécifiques lors de la sécrétion des collagènes afin de pouvoir former les fibrilles de collagènes. Après l'élimination des propeptides, il reste de courtes extensions non collagéniques (NC) aux extrémités des collagènes. Ce sont les télépeptides composés de 10 à 15 acides aminés. Ces domaines sont aussi les principaux sites antigéniques des collagènes. Contrairement aux portions hélicoïdales, les domaines NC et les chaînes α dénaturées sont sensibles à la dégradation par un ensemble varié d'enzymes (par exemple pepsine ou trypsine).

Il existe d'autres types de collagènes. Ceux-ci sont différents des collagènes fibrillaires par la présence de larges domaines NC à l'une ou aux deux extrémités NH₂ et COOH terminales et de courts domaines NC pouvant interrompre la triple hélice. Les collagènes sont classés en fonction de la structure quaternaire qu'ils peuvent former : les collagènes de type IX, XII et XIV sont étroitement associés à des fibrilles de collagène. Ces collagènes sont donc appelés des collagènes FACIT (Fibre-Associated Collagens with Interrupted Triple helices). Le collagène de type VI forme des tétramères qui s'associent en filaments perlés. Les molécules de collagène de type X s'associent entre elles pour former des réseaux hexagonaux.

2. Les collagènes du cartilage articulaire

Cinq collagènes (II, VI, IX, X et XI) ont été identifiés dans le cartilage articulaire en quantité suffisante pour permettre leur isolement de ce tissu ou de milieux de culture de chondrocytes. Excepté pour le collagène de type X, ces collagènes sont aussi retrouvés dans l'humeur vitrée de l'œil, la cornée au cours de son développement ainsi que dans le fibrocartilage et le cartilage élastique. Le collagène de type X a été trouvé dans le fibrocartilage composant les ménisques humains, de lapin (Bluteau *et al.*, sous presse) et de souris (Eerola *et al.*, 1998).

Le collagène de type II, un homotrimère composé de trois chaînes $\alpha_1(\text{II})$, est la protéine collagénique la plus abondante trouvée dans le cartilage et constitue 80 à 85 % du contenu en collagènes. Les collagènes de type IX et XI correspondent à 3 et 10 % suivant la source du cartilage (nature de l'articulation et espèce) et l'âge du donneur (Cremer *et al.*, 1998).

Les collagènes de type XI et II sont des collagènes fibrillaires car leur structure hélicoïdale n'est pas interrompue par un domaine NC. Le collagène de type IX est composé de trois chaînes différentes : $\alpha_1(\text{IX})$, $\alpha_2(\text{IX})$ et $\alpha_3(\text{IX})$. Les chaînes $\alpha_3(\text{IX})$ et $\alpha_1(\text{II})$ sont codées par le même gène mais la chaîne $\alpha_3(\text{IX})$ présente un haut degré de glycosylation démontrant des différences dans les processus post-traductionnels. Le collagène de type XI montre des similitudes avec le collagène de type V en raison d'une grande homologie de séquence entre $\alpha_1(\text{XI})$ et $\alpha_1(\text{V})$ ainsi qu'entre $\alpha_2(\text{XI})$ et $\alpha_2(\text{V})$ (Mayne *et al.*, 1993).

Le collagène de type IX possède un large domaine globulaire NC du côté NH₂ terminal de la chaîne $\alpha_1(\text{IX})$ et deux courts segments NC qui interrompent la triple hélice. L'un de ces segments sur la chaîne $\alpha_2(\text{IX})$ possède un site de liaison avec une chaîne de glycosaminoglycanes.

Le collagène de type X est un homotrimère plus court que les collagènes de type II et XI. Il est particulièrement abondant dans les zones où les chondrocytes sont hypertrophiques, spécialement au niveau de la métaphyse et des sites de fracture (Schmid *et al.*, 1990). La présence du collagène de type X est transitoire durant la formation des os. Cependant il a été observé de petites quantités de collagène de type X dans la zone de surface de cartilage adulte normal (Robins *et al.*, 1988).

Le collagène de type VI a été trouvé dans le cartilage articulaire : des formes homotrimériques et hétérotrimériques existent et contiennent de courts domaines en triple hélice et un domaine globulaire terminal représentant les 2 / 3 de la molécule (Ronzière et *al.*, 1993).

3. Organisation et fonction des collagènes dans le cartilage.

Le collagène de type II forme la structure de base des fibrilles hétéropolymériques du cartilage. Les fibrilles de collagène s'organisent en un réseau tridimensionnel. Le collagène de type XI est principalement localisé à l'intérieur des fibrilles où il est lié de façon covalente au collagène de type II via les réticulations faisant intervenir des hydroxylysines. Dans les fibrilles de petit diamètre, la proportion de collagène de type XI est plus importante que dans celles ayant un plus gros diamètre. Il en est de même pour le collagène de type V dans les fibrilles de collagène de type I dans les tissus non cartilagineux. Ces deux molécules interviennent donc dans l'organisation tridimensionnelle des fibrilles et probablement en régulent le diamètre.

Le collagène de type IX est localisé à l'extérieur des fibrilles : le domaine globulaire NC4 et la région hélicoïdale COL3 contiguë sont orientés à l'extérieur des fibrilles et interagissent avec d'autres molécules de l'espace périfibrillaire. Des réticulations lient les chaînes de collagène de type IX avec les télopeptides des collagènes de type II et XI ainsi qu'avec d'autres chaînes de collagène de type IX (Diab et *al.*, 1996). Les fonctions du collagène de type IX ne sont pas connues. Il peut jouer un rôle dans l'espacement de fibrilles distinctes, la liaison entre fibrilles et l'interaction avec les protéoglycannes. Le collagène de type VI est retrouvé à deux niveaux : à la surface du cartilage et dans l'espace péricellulaire et il pourrait intervenir dans l'adhérence des chondrocytes à la matrice extracellulaire (Marcelino et *al.*, 1995). Le collagène de type VI ne paraît pas lié de façon covalente avec d'autres collagènes.

La distribution du collagène de type X dans le cartilage est particulière par rapport aux autres collagènes : il est déposé sous forme d'un tapis autour des chondrocytes hypertrophiques ; ce tapis représentant vraisemblablement la forme dans laquelle il est sécrété. Il a de plus été détecté à la surface du cartilage articulaire.

D. Autres constituants de la matrice extracellulaire

Les protéines non collagéniques du cartilage ont été moins étudiées que les collagènes. Les protéines actuellement décrites appartiennent à la famille des protéines d'adhérence comprenant, entre autres, l'annexine V, l'anchoring CII présente à la surface des chondrocytes, la COMP (Cartilage Oligo Meric Protein) qui a valeur de marqueur du renouvellement et de la dégradation de la matrice extracellulaire, la thrombospondine, la tétranectine, la ténascine et la fibronectine (Buckwalter et *al.*, 1998). Dans un cartilage normal, la synthèse de ces protéines est modeste mais peut considérablement augmenter dans certaines situations pathologiques. Ces protéines jouent un rôle important dans les interactions entre les chondrocytes et la matrice extracellulaire et donc dans les phénomènes d'adhésion et de migration des chondrocytes. La liaison avec les chondrocytes se réalise par des protéines transmembranaires : les intégrines. Ces protéines sont reliées au cytosquelette par leur côté cytosolique et peuvent induire des mécanismes de transduction du signal et activer les gènes.

III. LES DIFFERENTS SYSTEMES DE CULTURE DE CHONDROCYTES

Les chondrocytes sont sensibles à des facteurs solubles mais aussi à des facteurs environnementaux tels que les conditions de culture. Le type de support, les conditions de pH, d'oxygénation et d'agitation influencent le métabolisme des chondrocytes.

A. Les différents systèmes de culture

Les chondrocytes en culture en monocouche sur plastique (figure 8) perdent rapidement leur caractère différencié (expression des collagènes, synthèse de protéoglycannes, morphologie) (Benya et *al.*, 1986), c'est pourquoi d'autres systèmes de culture ont été développés.

Le système de culture en haute densité cellulaire, permet de conserver selon la composition du milieu de culture, les marqueurs du phénotype cartilage (Freyria et *al.*, 1995). Dans ce système, les cellules sont placées en multicouches puis elles sont progressivement enrobées dans une matrice extracellulaire néosynthétisée abondante. Ce système de culture présente l'avantage d'être simple d'utilisation et permet de récupérer facilement le matériel biologique pour les analyses du phénotype.

Le support de culture paraît avoir une action sur le phénotype des chondrocytes en culture. En effet, lorsque les chondrocytes sont cultivés sur un film de collagène, ils conservent une morphologie ronde normale mais également l'expression des marqueurs de différenciation et se multiplient plus rapidement que sur plastique (Bates et *al.*, 1987). La culture en suspension, en inclusion ou organotypique sont d'autres moyens de limiter la perte du phénotype des chondrocytes. Ceux-ci sont cultivés sur ou dans des gels d'agarose (Benya et *al.*, 1982), d'alginate (Guo et *al.*, 1989), de collagène (Kimura et *al.*, 1984) ou maintenus dans leur tissu d'origine. Ils conservent une morphologie ronde et l'expression des collagènes de type II, IX et XI. Par contre, la prolifération est réduite et le taux de synthèse est faible ce qui limite les applications en médecine humaine, où le matériel biologique est disponible en faibles quantités.

Les supports poreux sont une avancée technique importante car ils permettent de placer les chondrocytes au cœur du support et d'apporter aux chondrocytes un squelette qui va guider leur prolifération et leur organisation afin de former un tissu le plus proche possible du cartilage articulaire. Dans ce cas, les chondrocytes ont la possibilité de se multiplier et de fabriquer une matrice extracellulaire ayant une composition biochimique en collagènes et en protéoglycannes proche de la composition physiologique (Freed et *al.*, 1998).

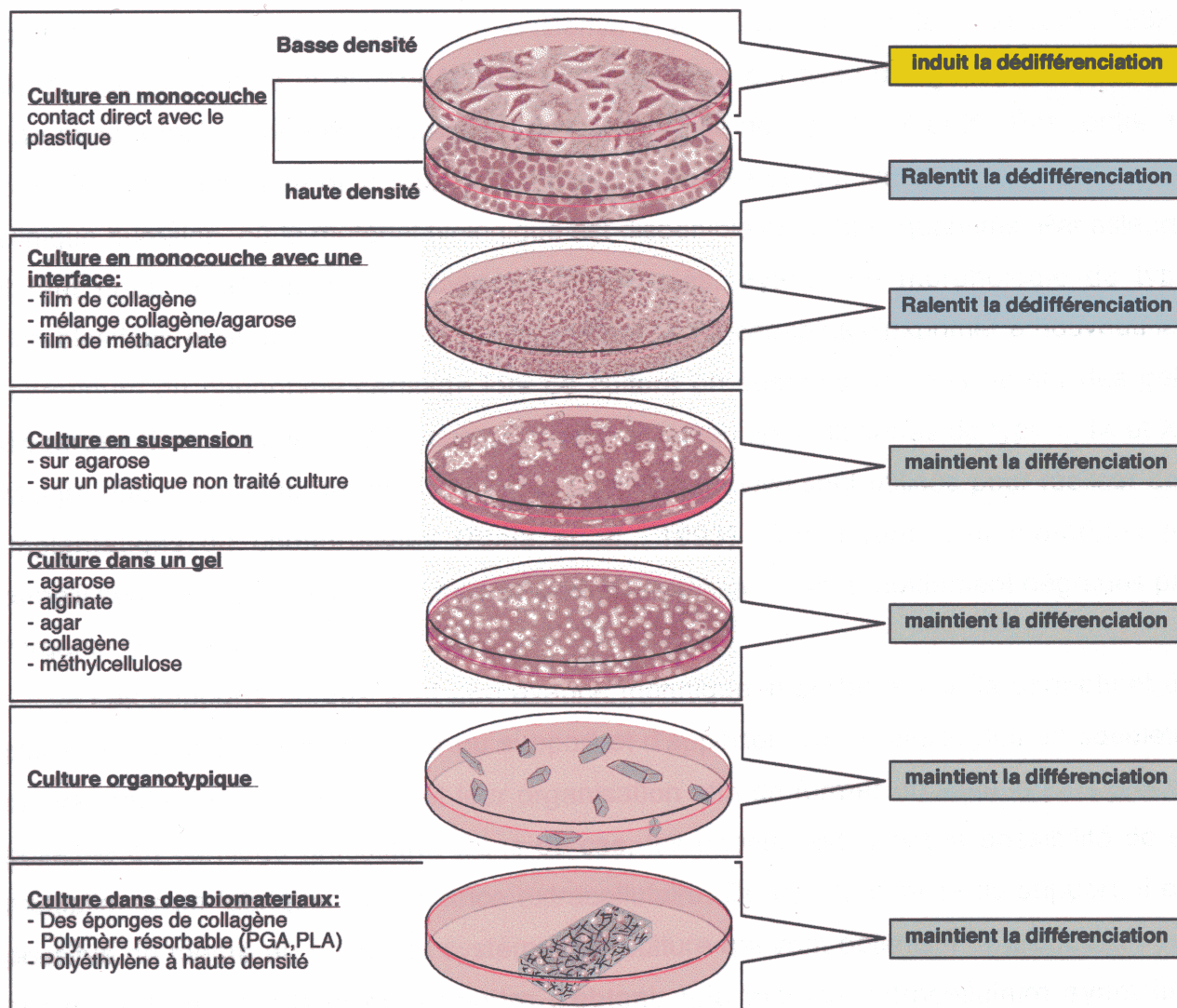


Figure 8 : Les différents systèmes de culture de chondrocytes avec les effets généralement observés sur le phénotype des chondrocytes.

(Mallein-Gerin et *al.*, 1996)

B. Les conditions de culture

Les conditions d'agitation sont très importantes car elles conditionnent la qualité de la matrice extracellulaire obtenue (Obradovic et *al.*, 1999). En effet, si le système d'agitation provoque des turbulences, il induit des déchirures du matériau et un enrichissement de la matrice extracellulaire en fibres de collagènes. Celles-ci ont pour rôle de résister au déchirement, mais ne sont pas nécessaires en grande quantité pour obtenir les propriétés adéquates de résistance à la pression. Une agitation laminaire génère des forces hydrodynamiques qui compriment le biomatériau. Dans ces conditions de culture, la quantité de GAG produite par les cellules est plus importante et la composition de la matrice extracellulaire se rapproche de celle du cartilage articulaire (Vunjak-Novakovic et *al.*, 1999). Cependant, actuellement les propriétés mécaniques du tissu obtenu *in vitro* ne sont pas totalement identiques à celles du cartilage. Ceci peut être dû

au type de cellules employées pour la formation du nouveau tissu mais peut aussi être dû aux conditions de culture qui ne sont pas identiques au milieu naturel du cartilage.

Parmi les conditions de culture qui influencent la formation de la matrice extracellulaire, le pH, l'oxygénation et la pression de CO₂ sont très importants. Dans le cartilage articulaire, les chondrocytes sont adaptés à des conditions d'hypoxie (Ysart et Mason et *al.*, 1994). Les conditions de pH sont régulées en culture par la pression de CO₂. Elles influencent la synthèse de glycosaminoglycannes (Urban et *al.*, 1993). Lorsque la pression d'oxygène diminue pour atteindre les valeurs présentes dans le cartilage, la synthèse de collagène de type II et de protéoglycannes est inhibée (O'Discroll et *al.*, 1997). Par ailleurs, dans ces conditions, le taux d'agrégation des protéoglycannes est augmenté (Clark et *al.*, 1991). En résumé, le taux d'oxygène et le pH doivent être fixés à une valeur optimale pour promouvoir la formation d'un néotissu *in vitro*.

En conclusion de ces données parfois contradictoires, il apparaît nécessaire d'utiliser un support tridimensionnel pour la culture de chondrocytes car il permet de guider la prolifération des cellules ainsi que l'organisation de la matrice extracellulaire. Néanmoins, il semble impératif de définir les conditions de pH, d'oxygénation et d'agitation afin de favoriser une composition de la matrice extracellulaire la plus proche possible de celle du cartilage.

IV. PATHOLOGIES ARTICULAIRES ET TRAITEMENTS CLINIQUES ACTUELS

A. Pathologies ostéoarticulaires

Les pathologies ostéoarticulaires constituent un groupe très varié de problèmes articulaires à caractère gênant voire handicapant pour les patients. L'arthrose est l'une des pathologies les plus communes affectant un pourcentage important des personnes âgées de 65 ans et plus. L'arthrose est considérée comme un syndrome et non une pathologie, cette notion intégrant le fait que l'on regroupe de nombreuses expressions pathologiques (Michel, 1998). Les défauts cartilagineux peuvent résulter aussi bien d'une charge anormale sur un cartilage sain que d'une charge normale sur un tissu fragilisé. Quelles que soient les causes de la pathologie, le

patient est particulièrement handicapé par les douleurs et les difficultés à se déplacer qu'elle génère.

Du fait de la structure d'une articulation, les pathologies peuvent provenir du cartilage mais aussi de l'os sous-chondral et de la synovie. Les détériorations que subit le cartilage se répercutent donc sur les deux autres tissus : les chondrocytes sont capables de réagir aux cytokines pro-inflammatoires provenant du liquide synovial inflammatoire et de dégrader la matrice extra-cellulaire par un ensemble de métalloprotéinases et de hyaluronidases (Flannery et al., 1998). Une détérioration de l'os sous-chondral provoque une augmentation des forces appliquées sur le cartilage et une usure de celui-ci. Les facteurs étiologiques de l'arthrose sont :

- L'obésité et/ou un excès d'utilisation des articulations
- Un traumatisme (fractures ou microtraumatismes répétitifs, luxation des ménisques)
- Des troubles métaboliques dont les mécanismes d'action ne sont pas évidents
- La sénescence
- Les hormones sexuelles, comme par exemple lors de la postménopause
- Le terrain génétique (par exemple les nodosités d'Heberden, dysplasie épiphysale)
- La dérégulation immunitaire.

Lors des traumatismes, le cartilage peut également être lésé. La classification de Beguin et Locker (1983) définit quatre stades d'atteinte pathologique selon la profondeur des déformations. Le diagnostic des pathologies du cartilage se fait par arthroscopie, par examens radiographiques ou par imagerie par résonance magnétique (IRM). Cependant, ces techniques manquent de résolution et les atteintes du cartilage sont probablement plus fréquentes que celle effectivement diagnostiquées. Ainsi des lésions articulaires anciennes non préalablement diagnostiquées sont retrouvées dans 30 à 60 % des pathologies aiguës et chroniques du cartilage. Cependant, il faut noter que chez l'animal, de petites lésions du cartilage affectant toute la profondeur du tissu sont capables de se réparer spontanément chez certains sujets en croissance. Le pourcentage ne dépassant pas cependant 10 à 20 %.

B. Traitements cliniques actuels

Le traitement des lésions cartilagineuses doit être le plus précoce possible afin de diminuer le risque d'arthrose.

Le cartilage endommagé peut être :

- Soulagé par la mise en repos de l'articulation ou par une ostéotomie correctrice,
- Réparé par un phénomène de régénération tissulaire spontané ou assisté,
- Abrasé,
- Remplacé par une greffe ou une prothèse.

1. Traitements hygiéniques et médicaux

- Perte de poids, relâchement des muscles et des articulations.
- Mise en décharge : souvent les chondropathies ont un point commun, une pression intra-articulaire trop élevée, entraînant pour le cartilage une surcharge mécanique néfaste. De plus, il a été démontré que dans des conditions de pression moindre, l'activité métabolique du chondrocyte s'accroît et favorise la régénération matricielle.
- Mouvement passif continu : le mouvement est indispensable à l'imbibition du cartilage alors que l'immobilisation complète d'un membre provoque son amincissement et une diminution de son contenu en protéoglycannes.
- Mouvement passif intermittent : d'après les travaux de Buckwalter (2003), il augmente le volume de réparation sous-chondrale ou osseuse dans les défauts ostéochondraux au niveau de genoux de singe. De plus, le mouvement passif intermittent stimule un peu plus l'expression de collagène de type II dans la réparation du tissu chondral et produit une concentration plus élevée de tissu hyalin que lors d'immobilisation de l'articulation. Par contre, il permet une moins bonne restauration de la surface articulaire de la patelle.
- Physiothérapie : La stimulation électrique ou par laser de la formation du cartilage a été testée. La stimulation électrique par pulsation provoque une augmentation des synthèses protéiques des chondrocytes sans que cela puisse être relié à une réponse au stress des chondrocytes (MacGinitie et *al.*, 1994). Les traitements au laser ne mettent pas en évidence de différence entre les groupes « contrôles » et « traités ». Ce type de mécanisme de stimulation du cartilage n'est pas utilisé dans le traitement symptomatique de l'arthrose (Reed et *al.*, 1994).
- Agents pharmacologiques :
 - ✓ Anti-arthrosiques synthétiques d'action rapide :
 - Anti-inflammatoires stéroïdiens : action à tous les étages de la cascade pathogénique qui aboutit à la dégradation du cartilage lors d'arthrose et contrarient l'action de la phospholipase au début du cycle inflammatoire. Mais l'utilisation des corticoïdes reste controversée car des doses fortes ont un effet cytotoxique sur les chondrocytes. Ceci se traduit par une diminution de synthèse chondrocytaire du collagène et des protéoglycannes ainsi que du contenu de la matrice en protéoglycannes. A doses faibles, ils ont un effet chondroprotecteur en désamorçant les processus enzymatiques de dégradation.
 - Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : blocage de la transformation de l'acide arachidonique en médiateurs de l'inflammation par le biais de « la voie des cyclo-oxygénases » (COX). La cyclo-oxygénase existe sous deux formes (COX-1 et COX-2). La COX-1 permet la formation des prostaglandines endogènes protectrices de divers tissus et organes : estomac et rein notamment. La COX-2 produit les prostaglandines impliquées dans la genèse de l'inflammation. La toxicité rénale et gastro-intestinale (chez le chien) est attribuée à l'inhibition des prostaglandines endogènes, il semblerait donc plus intéressant d'utiliser des anti-COX-2. Mais la COX-1 intervenant aussi dans le processus inflammatoire et la COX-2 étant très spécifique de chaque espèce, il est préconisé d'utiliser des AINS dont le rapport COX-1/COX-2 est jugé intéressant. Certains AINS ont une action plus prononcée car ils agissent aussi sur « la voie de la lipo-oxygénase » en empêchant la libération des leucotriènes (LOX). Ils ont aussi un pouvoir analgésique.

✓ Anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente :

▪ Glucosamine et chondroïtine-sulfate (CS) : les glycosaminoglycannes, dont la CS, interviennent dans la constitution des protéoglycannes et de l'acide hyaluronique. La glycosamine est un précurseur des glycosaminoglycannes et stimule la synthèse chondrocytaire des glycosaminoglycannes, des protéoglycannes, et du collagène. L'administration orale de glucosamine à des lapins atteints d'ostéoarthrose a montré des effets partiels détectables mais ne prévient pas l'apparition de fibrillations et/ou l'érosion du cartilage articulaire (Tiraloché et *al.*, 2005). La CS diminue, sur les modèles cellulaires *in vitro* l'activité enzymatique catabolique du cartilage arthrosique et stimule les synthèses de glycosaminoglycannes et de collagène.

▪ Le pentosane polysulfate : il n'existe pas sous forme injectable en France mais dans d'autres pays. L'administration se fait par voie sous-cutanée, intra-musculaire ou intra-articulaire. Il permet la modulation de l'activité des cytokines, la préservation du contenu en protéoglycannes du cartilage lors de modèle expérimental d'arthrose et la stimulation de la synthèse en acide hyaluronique de la membrane synoviale.

▪ Acide hyaluronique : c'est une protéine de base du cartilage et de la synovie. Il est administré en intra-articulaire lors d'arthrose modérée après ponction et infiltration de l'articulation avec un corticoïde. Il est très bien toléré et a une durée d'action assez longue (9 mois en moyenne). On pensait au départ que son action était purement mécanique en augmentant la viscosité de la synovie et en limitant les frottements de surfaces cartilagineuses. Il a probablement un mécanisme d'action beaucoup plus complexe qu'un simple lubrifiant, il est possible qu'il ait un effet biochimique direct (Iwata et *al.*, 1993). En effet, il ne persiste que quelques semaines dans l'articulation ce qui n'explique pas sa durée d'action prolongée. Dans les modèles expérimentaux d'ostéoarthrose, il a été démontré que l'acide hyaluronique pénétrait dans le cartilage articulaire défectueux et le protégeait des protéolyses ultérieures (Smith et *al.*, 1987). On évoque aussi une action anti-radicaux libres, une inhibition de la migration leucocytaire et macrophagique et une activité chondroprotectrice. Goldberg et Buckwalter (2005) affirment que les infiltrations d'acide hyaluronique intra-articulaires, non seulement diminuent les symptômes mais modifient aussi la structure du genou atteint et la vitesse de progression de l'ostéoarthrose.

▪ Facteurs de croissance : ils peuvent être injectés au niveau intra-articulaire. Otsuka et *al.* (1997) ont démontré que le facteur de croissance basique des fibroblastes ou bFGF stimule la formation de cartilage lors de la réparation d'une lésion cartilagineuse chez le lapin. Les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) sont caractérisés par leur capacité à induire, de novo, la formation d'os à des sites orthotopiques et ectopiques. Il a été démontré que la BMP₂ est capable d'induire l'expression du collagène de type X dans des chondrocytes murins, c'est-à-dire de provoquer la maturation terminale du chondrocyte associée à l'ossification enchondrale.

2. Traitements chirurgicaux.

• **Lavage articulaire** : il est pratiqué lors d'arthrose en poussée inflammatoire prolongée avec une articulation gonflée par un épanchement important et ne rétrocedant pas aux anti-inflammatoires, ponction et infiltration de cortisone. Le renouvellement du liquide synovial permet alors d'éliminer les médiateurs de l'inflammation produits par la membrane synoviale du milieu intra-articulaire. La douleur est alors diminuée.

• **Débridement ou « shaving »** : cela consiste en l'élimination des zones cartilagineuses lésées. Cette technique permet l'augmentation de l'effet bénéfique du lavage articulaire.

• **Stimulation sous-chondrale** : l'abrasion de la plaque osseuse, les perforations de Pridie ou les microfractures de l'os sous-chondral aboutissent après un délai de 4 à 6 mois à la formation d'un fibrocartilage. Celui-ci n'apporte cependant pas toutes les propriétés mécaniques du tissu original (Buckwalter et *al.*, 1994). En exposant l'os sous-chondral, une détérioration des vaisseaux sanguins de ce tissu est provoquée. Ceci entraîne la formation d'un caillot de fibrine et le recrutement de cellules mésenchymateuses provenant de la moelle osseuse. Ces cellules prolifèrent et se différencient en cellules dont la morphologie est de type chondrocytaire. L'aspect macroscopique de ce cartilage est semblable à celui du cartilage normal mais sa composition en collagènes et en protéoglycannes diffère. Ce tissu de réparation se dégrade avec le temps. Cette technique permet donc une réduction des symptômes dans le cas d'un défaut articulaire localisé mais un certain nombre d'échecs ont été rapportés (de l'ordre de 30-40%). Le taux de réussite dépend de beaucoup de facteurs comme l'âge du patient, le degré d'arthrose et le degré d'activité (Bert et *al.*, 1993). Une étude effectuée sur des primates a permis de mettre en évidence des résultats significatifs avec une réparation de cartilage à douze semaines après microfractures sur des lésions chondrales fémorales (Gill et *al.*, 2005)

• **Grefe de périoste ou de périchondre** : La greffe de tissus non cartilagineux apporte à la fois des cellules et une matrice extracellulaire. Ces greffes sont généralement réalisées avec du tissu autologue provenant de zones non portantes (périoste, périchondre). Les observations cliniques des greffes de périchondre montrent de meilleurs résultats avec des patients jeunes qu'avec des personnes plus âgées (Seradge et *al.*, 1984). Il paraît donc plus difficile de faire produire du cartilage avec une surface articulaire fonctionnelle par des chondrocytes ou des cellules souches mésenchymateuses provenant de patients âgés. La greffe de périoste consiste à prélever un morceau de périoste dont la taille dépend de la surface à couvrir. La face profonde du périoste qui contient les cellules souches capables de se différencier en chondrocytes est tournée vers l'os sous-chondral préalablement avivé. Le défaut est rempli de colle biologique puis le périoste est suturé aux pourtours du cartilage. La greffe de périoste autologue associée à un mouvement passif continu a montré de bons résultats, chez l'homme, à long terme basés sur la diminution de la douleur de l'articulation, la mobilité de cette articulation, l'activité des patients et la radiographie (Yang et *al.*, 2004).

En ce qui concerne le traitement de défauts ostéochondraux de genou de lapin par la greffe de cellules périchondrales, il permet la formation d'un os souschondral inconsistent avec un taux de réussite élevé.

• **Matrices synthétiques** : elles sont développées à partir de différentes substances telles que le collagène, des fibres de carbone ou des gels de glycosaminoglycannes. Ces substances peuvent être utilisées seules ou avec un apport de chondrocytes pour servir de support à la migration et à la prolifération cellulaire.

• **Greffes ostéochondrales** : de bons résultats ont été obtenus avec des allogreffes ostéochondrales. Cependant, du fait des risques de transmission de maladies virales et de l'incertitude concernant le maintien des propriétés du tissu transplanté, les recherches ont plutôt été orientées vers l'utilisation d'autogreffes et notamment en mosaïque (mosaicplasty). Cette méthode permet par l'utilisation de petits cylindres ostéochondraux mis côte à côte de respecter le rayon de courbure de la surface articulaire et donc la congruence. L'intérêt de cette technique est représentée par l'intégration de la partie spongieuse de la greffe qui fusionne avec le lit spongieux receveur et par l'intégration du cartilage transplanté au cartilage hyalin adjacent par l'intermédiaire d'un fibrocartilage se formant entre les différentes zones à partir du sol sous-

chondral avivé. Les autogreffes en mosaïque ont été mises au point puis développées par L. Hangody en Hongrie depuis le début des années 1990. Après plus de 10 ans d'études cliniques sur les autogreffes ostéochondrales en mosaïque, Hangody montre que cette technique paraît être une bonne alternative pour le traitement de défauts chondraux et ostéochondraux de petite et moyenne tailles sur les surfaces portantes du genou et d'autres articulations (Hangody et al., 2004). De même, Marcacci et al. (2005) démontrent que de meilleurs résultats sont obtenus chez des patients jeunes présentant des lésions des condyles latéraux de moins de 2,5 cm et de grade III ou IV (classification Outerbridge).

• **Implantation de chondrocytes autologues** : la méthode mise au point par Brittberg consiste en la greffe de chondrocytes autologues extraits de cartilage prélevé par arthroscopie au niveau d'une zone non portante de la même articulation dans des défauts cartilagineux. Elle nécessite le prélèvement d'un greffon de périoste suturé de façon étanche aux pourtours du défaut pour contenir les chondrocytes.

Visna et al (2003) ont obtenu de très bons résultats (58% des patients) en améliorant cette méthode grâce à une colle de fibrine. Cette technique sera plus particulièrement détaillée puisqu'elle fait l'objet de mon travail.

L'évaluation macroscopique, histologique et immunohistologique de la réparation de défauts cartilagineux de fémurs de lapins par cette méthode a montré une différence significative avec formation de cartilage hyalin par rapport à une réparation naturelle (Szeparowicz et al., 2004).

La comparaison de Bentley et al (2003) a montré de meilleures réparations des lésions cartilagineuses de genoux avec l'implantation de chondrocytes autologues par rapport à la méthode de mosaïcplasty ; il en est de même pour l'étude de LaPrade effectuée sur un an. Mais, dans l'étude comparative entre l'implantation de chondrocytes autologues et la transplantation de cylindres ostéochondraux (Horas et al, 2003), il a été démontré que, même si les deux méthodes permettent une amélioration des symptômes, histologiquement, les défauts traités avec les chondrocytes autologues sont comblés par du fibrocartilage alors que les transplants de cylindres ostéochondraux permettent la formation d'un cartilage hyalin.

L'étude menée sur deux ans de l'implantation de chondrocytes autologues comparée aux microfractures n'a pas montré de différences macroscopiques et histologiques significatives entre ces deux méthodes, ni d'association entre les résultats histologiques et la clinique (Knutsen et al, 2004).

PARTIE EXPERIMENTALE

Cette partie expérimentale est un travail de collaboration entre le Pr. E. VIGUIER (Laboratoire de chirurgie expérimentale de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon dirigé par le Pr. T. ROGER), , le Pr. O. DAMOUR (Laboratoire des Substituts Cutanés, fédération de biochimie, Hôpital E. Herriot), et le Dr M. PIPERNO (Service de rhumatologie des Hôpitaux Lyon Sud).

Mlle E. FARGERE a effectué son travail de thèse en pharmacie sur la culture chondrocytaire, le Dr. A. BOUHEDDI a accompli son mémoire de DEA sur la partie chirurgicale de 1 à 3 mois, et moi, Mme C. CLEMENT-BOUHEDDI ai effectué le travail de la partie chirurgicale de 3 à 6 mois. Pour de nombreuses interventions, l'étude a été réalisée en équipe.

JUSTIFICATIFS

Afin d'éviter la fuite des cellules dans l'articulation, Brittberg propose d'implanter des chondrocytes autologues sous un volet périosté suturée au cartilage sain adjacent. Cette technique rallonge de manière importante le temps opératoire.

L'utilisation d'une colle biologique dans laquelle seraient inclus les chondrocytes juste avant la greffe permettrait une fixation plus rapide du volet périosté et une adhérence des cellules. Des travaux préliminaires ont montré que l'utilisation de cette colle n'affecte pas *in vitro* la viabilité et la prolifération des cellules : les chondrocytes ont déjà été cultivés avec succès dans des colles de fibrine, ils sont viables après 4 semaines de culture *in vitro* au sein d'un gel de fibrine (Meinhart et *al*, 1999)

Nous proposons d'administrer dans des lésions standardisées des condyles fémoraux de mouton la suspension de chondrocytes directement dans une colle de fibrine.

OBJECTIFS

L'objectif de notre étude est de mettre au point un protocole expérimental chez le mouton pour l'implantation de cellules cartilagineuses maintenues par une colle de fibrine et d'évaluer la formation de cartilage à partir du modèle animal en vue d'une application chez l'Homme.

MATERIEL ET METHODES

L'expérimentation animale n'a été réalisée qu'après avoir validé toutes les étapes de l'étude *in vitro* ou sur cadavre .

Un site original de prélèvement a été choisi afin de ne pas interférer avec les lésions réalisées ultérieurement.

La culture de chondrocytes de mouton a été mise au point et la viabilité des cellules a été contrôlée dans le milieu de culture ainsi que dans la colle de fibrine, agent de fixation dans la lésion.

De plus, la technique de réalisation des lésions a été validée après étude sur le cadavre. L'adhésion de la colle de fibrine à la surface de la perte de substance du cartilage a été vérifiée après mise en mouvement des articulations de moutons sur une cinquantaine de cycle extension-flexion. La prise du gel et l'adhérence ont été optimisées sur cadavre en adaptant les concentrations.

L'abord chirurgical pour l'implantation est un abord classique et standard. Il a été réalisé de très nombreuses fois avant la réalisation de cette étude.

I. MATERIEL

A. Modèle expérimental : la brebis

9 brebis réparties en 3 lots de 3 brebis ont été utilisées pour évaluer la qualité du cartilage à 1 mois, 3 mois et 6 mois de l'implantation des chondrocytes autologues.

Ces brebis étaient des jeunes adultes (leur âge varie entre un et deux ans) et elles avaient un poids de 46 à 55 kg. Elles sont identifiées par leur numéro sanitaire selon le tableau suivant :

Mois 1	Mois 3	Mois 6
Brebis 20930 ; 7015 ; 2387	Brebis 232 ; 44 ; 58	Brebis 214 ; M95 ; R095

Elles ont été mises en stabulation dans 3 box ; un lot par box et sont alimentées au foin et au concentré de céréales et luzerne.

B. Matériel chirurgical

Matériel chirurgical stérile pour une brebis	Quantité
Boîte de chirurgie de base	1
Grand buster (champs barrière)	1
Petit buster	1
Tambour(5 champs plats, un fenêtré et compresses)	1
Casaques	2
Vicryl 2-0	3
PDS II 3-0	1
PDS II décimal 0,7	1
Ecarteurs de Gelpi	2
Elévateur périosté	1
Biopsie punch 6mm	1
Biopsie punch 8mm	1
Biopsie punch 4mm	1
Lames de bistouris	2
Vetrap stérile	1
Versol (NaCl) 250mL	1
NaCl perfusion 1L	1

Tableau 1 : Matériel chirurgical utilisé pour le prélèvement du cartilage et l'implantation des chondrocytes

(Le matériel signalé au rouge est utilisé uniquement pour l'implantation).

C. Matériel pour la culture des chondrocytes :

- Petit matériel stérile à usage unique
 - Scalpel
 - Pince
 - Boîte de pétri
 - Pipettes de 2, 5, 10 et 25ml
 - Barreau aimanté
 - Tubes Falcon 50ml
 - Filtres 0,22 μ et 0,70 μ
 - Pipettes pasteur
 - Fiole + bouchon
 - Plaques 12 puits, flasques de 25, 75 et 175 cm²

○ Autre matériel :

- Agitateur magnétique
- Pipettes de 20 et 1000 μ l
- Hotte à flux laminaire
- Etuve à 37°C, 5% CO₂
- Centrifugeuse
- Bleu trypan, montage lame lamelle
- Microscope optique
- Pipette boy.

○ Milieux :

Pour l'extraction :

- Trypsine chondro
- Mélange DMEM/HAM (Dulbelcco's Modified Eagles Medium): le volume total dépend de la quantité de cartilage
- Collagénase (lot 70025623) : 12mg dans 20ml de DMEM.

Pour la culture : (pour 500ml de milieu)

- 250ml de DMEM
- 250ml de HAM
- 250 μ l de vitamine C
- 2,5ml de gentamicine (Laboratoire Panpharma)
- 1ml de fungizone (Laboratoire Bristol-Myers-Squibb)
- 50ml de sérum autologue.

Pour la trypsination :

- Trypsine EDTA
- Milieu chondro.

D. Matériel pour la partie histologique

○ Pour la décalcification :

- Acide nitrique 6 %

○ Pour l'inclusion dans la paraffine :

- Cassettes en plastique
- Automate ASP 300 Leica
- Formol 10%
- Ethanol 90%
- Ethanol absolu
- Méthylcyclohexane
- Paraffine

- Pour la préparation des coupes histologiques :
 - Microtome RM 2145 Leica
 - Lames
 - Eau albuminée à 1%
 - Platine chauffante
 - Etuve

- Pour la coloration :
 - Automate autostainer hms70 (Microm France)
 - Méthylcyclohexane
 - Alcool absolu
 - Eau courante
 - Hématoxyline de Harris
 - Alcool acide : alcool absolu 650 mL+ HCl 1N 50 mL
 - Carbonate de lithium
 - Phloxine 1%
 - Alcool 70°
 - Safran alcoolique 0.5%

- Pour le montage :
 - Lamelles
 - Colle Pertex

E. Matériel pour la partie marquage immunohistologique

Pour le marquage:

- Déparaffinage des lames:
 - Xylène
 - Xylène-Alcool 99%
 - Alcool 99%
 - Alcool-Eau distillée
 - Eau distillée courante

- Rinçage
 - Milieu TBS

- Pour le démasquage des sites antigéniques des collagènes I:
 - Pepsine
 - Etuve sèche
 - Eau distillée

- Pour le démasquage des sites antigéniques des collagènes II:
 - Hyaluronidase
 - Milieu TBS

- Marquage à l'anticorps primaire:
 - Collagènes I: Anticorps monoclonal de lapin anti-collagène I (Santa Cruz, Ref SC8783)
 - Collagènes II: Anticorps monoclonal de souris anti-collagène II
 - Agrécannes: Anticorps polyclonal de chèvre anti-agrécane D20, SC16492 goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology)
 - Anticorps anti-IgG de chèvre (Rabbit IgG anti-goat Z0454)
 - Milieu TBS-BSA 3%

Pour le rinçage:

- Milieu PBS-Tween 20 0,2%

Pour la révélation:

- Milieu TBS-BSA 3%
- Eau oxygénée 5%
- Milieu PBS-Tween 20 0,2%
- Anticorps secondaires:
 - ~ Collagènes I: Anti-corps de chèvre anti-lapin (DakoCytomation, kit EnVision+® System, Ref K4002)
 - ~ Collagènes II: Anti-corps de chèvre anti-souris (DakoCytomation, kit EnVision+® System, Ref K4000)
 - ~ Agrécannes: . Anti-corps de chèvre anti-lapin (DakoCytomation, kit EnVision+® System, Ref K4002)
 - . Peroxydase
- Milieu TBS
- Substrat chromogène DAB (DAKO Liquid DAB+, Substrat Chromogen System)
- Coloration Hématoxyline de Harris
- Ammoniac 0,24%
- Milieu de montage DAKO (DakoCytomation Faramount Aqueous Mounting Medium, Ref S3025)
- Lames
- Lamelles

Pour la lecture:

- Microscope optique

II. METHODOLOGIE

Les différentes étapes de l'expérimentation consistent en :

1. Prélèvement du cartilage au niveau du condyle huméral chez 9 brebis réparties en 3 lots. (ENVL Unité de Médecine et Chirurgie Expérimentales)
2. Extraction, mise en culture des chondrocytes autologues (Laboratoire de Substituts Cutanés, Hôpital E. Herriot)
3. Implantation des cellulesensemencées dans une colle de fibrine au niveau du défaut cartilagineux des condyles fémoraux avec et sans volet périosté (ENVL)
4. Euthanasie, étude macroscopique et prélèvement à 1, 3 et 6 mois. (ENVL)
5. Etude histologique (Laboratoire Anipath, Laënnec) et immunohistologique pour typage de collagène.

A. Prélèvement du cartilage chez les brebis

Préparation des brebis :

- Mise à jeun des brebis 48 heures avant l'intervention pour éviter les fausses déglutitions dues à des reflux ruminiaux au moment de l'anesthésie.
- Préparation du membre opéré : intervention sur le coude gauche, tonte de tout le membre gauche la veille de l'intervention.

Protocole anesthésique :

- Prémédication à la xylazine (Rompun®, Laboratoire Bayer Pharma) à 0,22mg/kg en IM,
- Injection de 1g d'atropine en IV,
- Induction au Thiopental sodique (Nesdonal®, Laboratoire Merial) à 15 mg/kg en IV (un cathéter veineux est posé au membre antérieur droit),
- Entretien à l'anesthésie gazeuse au masque à l'Halothane 2% (Halothane®, Belamont Laboratoires)

Monitoring :

Un capnomètre est utilisé au moment de l'anesthésie.

Antibioprophylaxie

Amoxicilline (Clamoxyl LA®, Laboratoire Pfizer) en IM (5mL par brebis)

Gestion de la douleur :

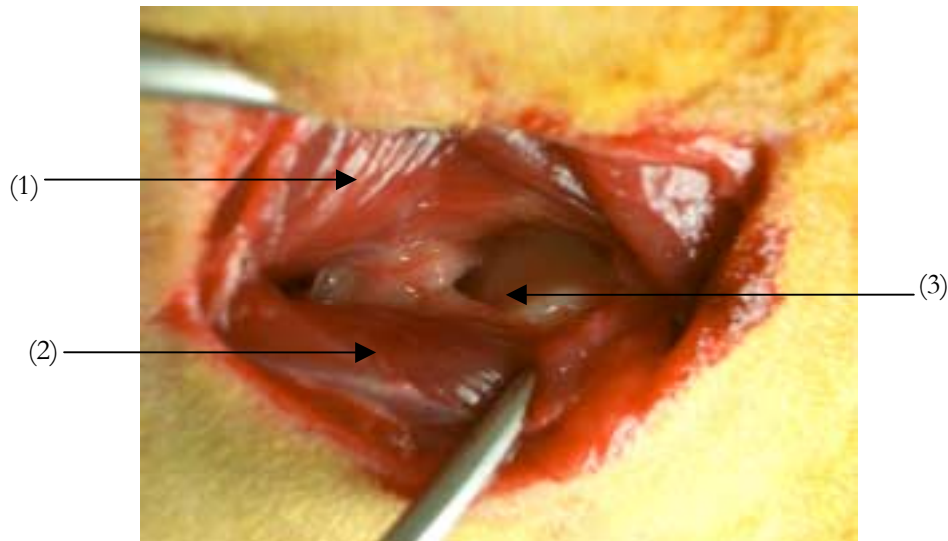
Morphine à 0.2 mg/kg en IM dès la fin de l'intervention et 4 heures après.

Temps préparatoires :

- Nettoyage chirurgical du site opératoire à la Bétadine® savon et solution,
- Pose de champs stériles et préparation du matériel chirurgical.

Temps opératoires :

- La voie d'abord est une voie latérale du coude.



© C. Clément-Bouheddi

Photo 1 : Arthrotomie du coude gauche chez une brebis par voie d'abord latérale.

- Incision de la peau à un cm en avant de l'épicondyle externe, dissection du tissu sous-cutané, passage entre le muscle extenseur commun des doigts (1) et le muscle extenseur latéral des doigts.(2).
- Arthrotomie de la capsule articulaire du coude et mise en évidence de la surface porteuse du condyle huméral externe (3) par extension du coude.
- Prélèvement de plusieurs lambeaux de cartilage (3 de 0.5 x 0.5x 0.05) à l'aide d'une lame de bistouri N° 11.
- Conditionnement des prélèvements dans du sérum physiologique stérile.



© C. Clément-Bouheddi

Photo 2 : Cartilage prélevé, conditionné dans du sérum physiologique stérile.

- Suture de la capsule articulaire, des plans musculaires, du tissu sous-cutané et de la peau à l'aide d'un fil résorbable Vicryl ® 2-0.

Temps postopératoires :

- Mise en place d'un pansement collé,
- Transport de l'animal dans le box de réveil,
- Antibiothérapie : injection de Clamoxyl LA® en IM à J2 et J4.
- Un examen clinique des brebis a été effectué tous les jours et les points ont été retirés 12 jours après l'intervention.

C. Extraction et culture des chondrocytes

L'extraction et la culture des chondrocytes ont été effectuées par Mlle E. FARGERE dans le cadre de sa thèse de pharmacie.

- Transport du prélèvement:

Le cartilage est transporté dans un poudrier stérile (de type vacutainer) contenant du sérum physiologique.

- Extraction et culture des chondrocytes en monocouche:

Les cellules sont isolées le plus rapidement possible après le prélèvement (généralement entre 2 et 4 heures suivant l'opération).

Dès son arrivée au laboratoire, le cartilage est découpé puis lavé. Il est ensuite placé 30 minutes sous agitation dans une étuve puis est ensuite digéré toute une nuit à 37°C sous agitation.

Après une nuit dans la collagénase, les cellules sont filtrées à travers un tamis cellulaire Falcon® 70µm puis lavées avec le mélange DMEM/HAM.

Les cellules sont dénombrées au bleu Trypan, au moyen d'une cellule de Malassez puisensemencées à la densité de 10 à 15 000 cellules par cm² dans une flasque de surface appropriée.

Les cellules sont alors incubées dans une étuve. à 37°C en atmosphère saturée d'humidité. Le milieu de culture est changé tous les 2 jours, jusqu'à ce que les cellules soient à confluence.

Les cellules sont alors traitées par de la trypsine EDTA, comptées au bleu Trypan et réensemencées à la densité de 10 à 15000 cellules/cm² dans une ou des flasques de surfaces appropriées.

Les cultures sont ainsi conduites jusqu'à obtenir le nombre de cellules suffisantes pour l'implantation (5 millions de cellules/cm² sont généralement admis).

Quelques heures avant l'opération, les cellules sont traitées par de la trypsine EDTA puis conservées dans une quantité suffisante de milieu de culture, dans un tube stérile.

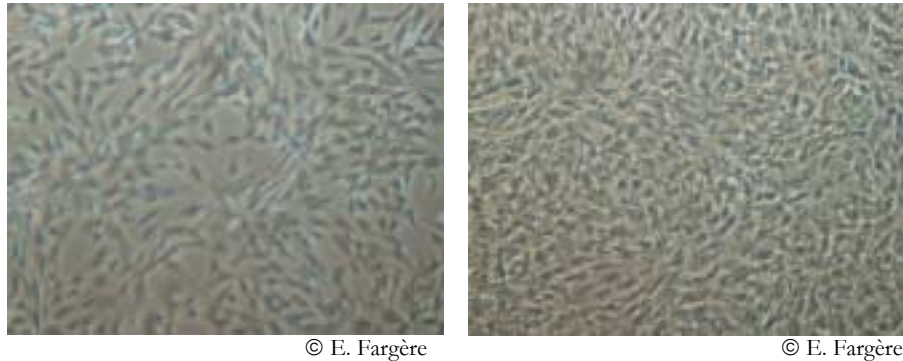


Photo 3 : Des chondrocytes en culture à J4 (à gauche) et à J7 (à droite) vu en microscope optique X 100

■ Conservation des chondrocytes dans la thrombine BERIPLAST®

La thrombine reprise dans la solution mère de CaCl_2 , est diluée au 1/5^{ème} dans du Ringer.

Les chondrocytes après trypsination sont remis en suspension dans la thrombine Bériplast®. Le nombre de cellules est compté après 1h, 6h, 24h et 48h.

Les cellules sont conservées dans les conditions de transport soit entre 15 et 37°C.

Après 48 h, les cellules sont comptées et remises en culture, chaque tube étantensemencé à la même densité cellulaire de 15 000 cellules par cm^2 . A J7, + ou - 3, les cellules sont trypsinées et comptées et le taux de croissance déterminé.

C. Implantation des chondrocytes

Préparation des brebis :

Les brebis ont été mises à jeun 48 heures avant l'intervention.

Protocole anesthésique :

- Prémédication à la xylazine (Rompun®) à 0,22mg/kg en IM,
- Induction au Thiopental sodique (Nesdonal®) à 15mg/kg en IV. (un cathéter veineux est posé au membre antérieur droit),
- Entretien gazeux, intubation trachéale et pose de sonde gastrique pour éviter les fausses déglutitions dues à des reflux ruminiaux au moment de l'anesthésie.

Monitoring :

Un capnomètre est utilisé pour l'aide à la surveillance de l'anesthésie. Celle-ci est considérée comme risquée en raison de la nature de l'intervention sur les deux genoux qui impose une durée importante d'anesthésie et de l'espèce animale, en effet les ruminants sont des animaux sensibles à l'anesthésie à cause des risques élevés liés à la météorisation.

Antibioprophylaxie :

Clamoxyl LA® en IM (5 mL)

Temps préparatoires :

- Préparation des deux membres opérés: tonte des deux membres postérieurs du tarse au bassin,
- La brebis est mise en décubitus dorsal, les deux postérieurs sont suspendus et un nettoyage chirurgical du site opératoire est pratiqué,
- Pose de champs stériles et préparation du matériel chirurgical.



© C. Clément-Bouheddi

Photo 4 : Préparation chirurgicale des deux membres postérieurs en vue de l'arthrotomie des deux genoux.

Temps opératoires :

Abord médial de l'articulation du genou : incision cutanée curviligne allant du tiers distal de la diaphyse fémorale à la crête tibiale en longeant caudalement, à quelques millimètres, la rotule et le ligament tibio-patellaire, incision du fascia médial du genou et arthrotomie selon la même ligne. Luxation latérale de la rotule et flexion du genou pour mettre à nu les deux condyles fémoraux.

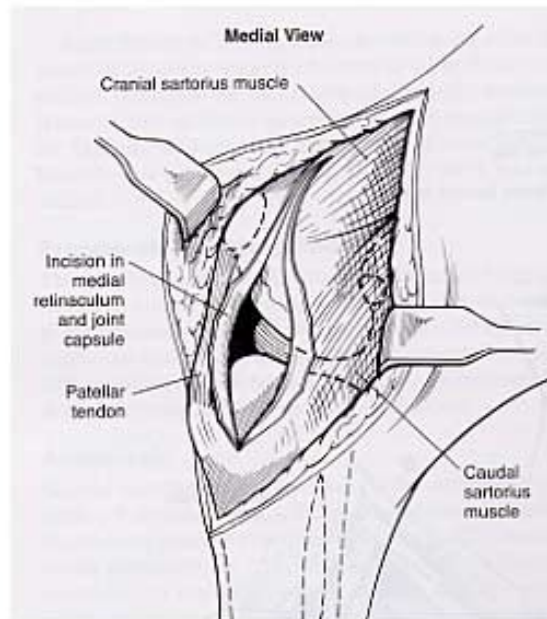


Schéma 1 : Voie d'abord médiale de l'articulation du genou chez la brebis



© C. Clément-Bouheddi

Photo 5 : Mise à nu des deux condyles fémoraux après luxation latérale de la rotule et flexion du genou.

Le schéma des lésions effectuées sur les condyles fémoraux est le suivant :

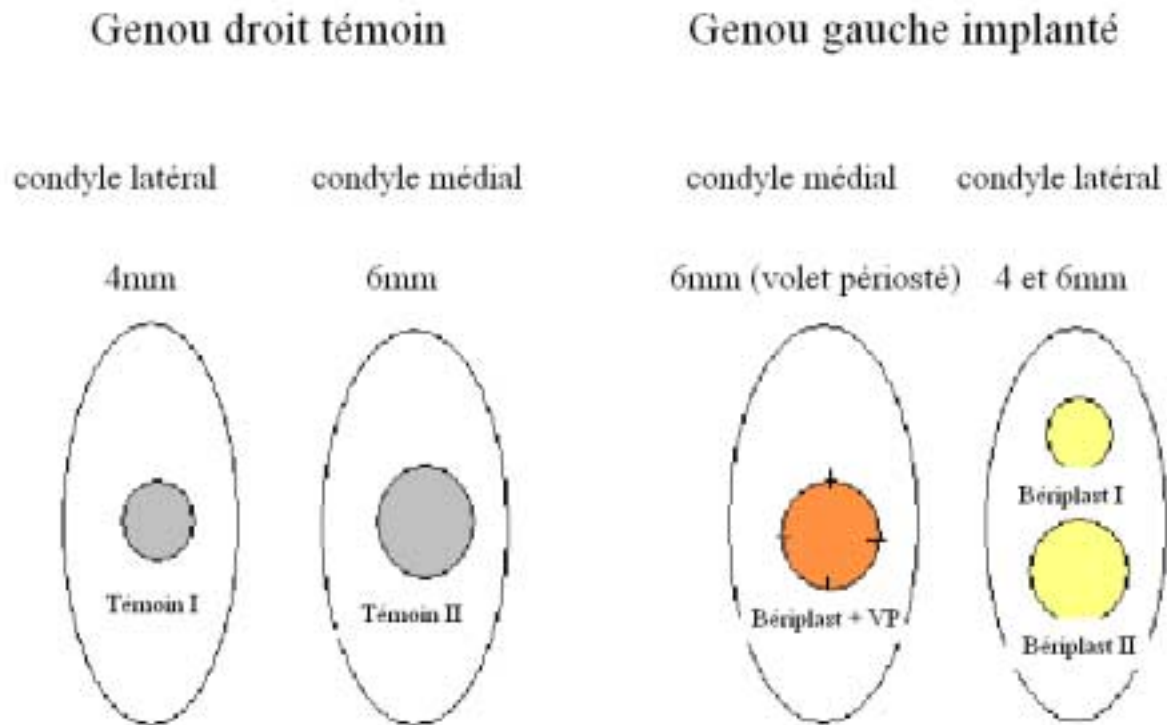


Schéma 2: Lésions des condyles fémoraux

Genou droit témoin :

Réalisation sur le condyle latéral d'une perte de substance chondrale de 4 mm (Témoin I) et sur le condyle médial d'une perte de substance de 6 mm (Témoin II) à l'aide d'un trocart à « biopsie punch » pour délimiter le pourtour de la lésion. La profondeur est évaluée lors du contact contre l'os chondral. La section du cartilage est alors stoppée. Le volet cartilagineux est décollé de la zone de contact avec l'os chondral et soulevé à l'aide d'un élévateur à périoste de petite taille afin de ne pas perforer la plaque osseuse.

Genou gauche implanté :

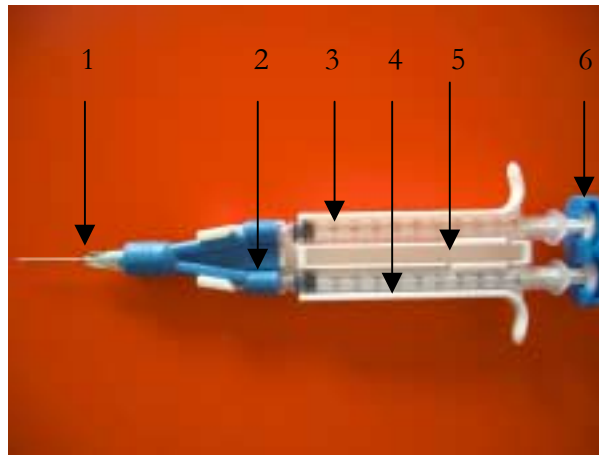
➤ *Condyle médial :*

- Réalisation d'une perte de substance chondrale de 6 mm .
- Prélèvement du périoste caudalement à la crête tibiale à l'aide d'un trocart à « biopsie punch » de 8 mm et d'un élévateur à périoste.
- Fixation du volet périosté (VP) sur la lésion chondrale de 6 mm par 4 sutures à points simples à l'aide d'un monofilament résorbable PDS® décimal 0,7

▪ Les cellules cartilagineuses sont déposées dans la préparation de Bériplast®. Le dispositif d'implantation est constitué de deux seringues juxtaposées et reliées à la même aiguille. La première seringue contient les chondrocytes ajoutés à la thrombine, la deuxième contient de la fibrine. Lors de l'utilisation, ce dispositif permet le mélange du contenu des deux seringues dans l'aiguille et le dépôt sous le volet périosté.

Avant chaque dépôt de la solution dans les lésions, l'évaluation de la durée de la prise du mélange est réalisée. La coagulation du gel apparaît entre 30 et 40 secondes à température corporelle.

Le dépôt du mélange est effectué dans les puits lésionnels jusqu'à comblement. La surface du gel est en continuité avec la surface cartilagineuse saine. Lors de l'application sous-périostée, l'aiguille est placée entre deux points sous le lambeau périosté, le mélange est injecté jusqu'à débordement



© C. Clément-Bouheddi

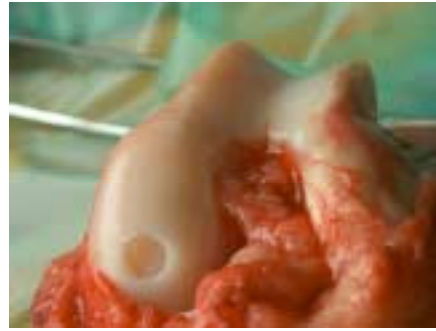
Photo 6 : Dispositif Bériplast utilisé lors de l'implantation des chondrocytes :

- 1 : Canule d'application
- 2 : Raccord mélangeur en Y
- 3 : Seringue à tuberculine à graduation rouge (pour la solution de thrombine
contenant les chondrocytes)
- 4 : Seringue à tuberculine à graduation bleue (pour la solution de fibrine)
- 5 : Porte-seringue
- 6 : Poussoir



© C. Clément-Bouheddi

Photo 7



© C. Clément-Bouheddi

Photo 8

Photos 7 et 8 : Réalisation d'une perte de substance chondrale de 6 mm au niveau de la zone portante d'un condyle fémoral de brebis à l'aide d'un trocar à «biopsie punch» et d'un élévateur à périoste.



© C. Clément-Bouheddi

Photo 9



© C. Clément-Bouheddi

Photo 10

Photo 9 : Prélèvement du périoste caudalement à la crête tibiale à l'aide d'un trocar à « biopsie punch » de 8 mm et d'un élévateur à périoste.

Photo 10 : Fixation du volet périosté sur la lésion chondrale de 6 mm par 4 sutures à points simples à l'aide d'un monofilament résorbable PDS® décimal 0,7.

➤ *Condyle latéral :*

- Réalisation sur le condyle latéral de pertes de substance chondrale : une de 4 mm et une de 6 mm.
- Dépôt et mélange directement dans les lésions du Bériplast® après injection simultanée des deux produits:
 - lésion de 4 mm nommée Bériplast I
 - lésion de 6 mm nommée Bériplast II
- Suture de la capsule articulaire, du fascia médial à l'aide de PDS® 3-0,
- Suture sous-cutanée et de la peau à l'aide du Vicryl® 2-0 .

Temps postopératoires :

- Mise en place d'un pansement collé,
- Transport de l'animal dans le box de réveil,
- Analgésie : injection de Morphine O,2 mg/kg en IM à l'extubation, et 4 heures après.
- Antibiothérapie : injection de Clamoxyl LA ® en IM à J2 et J4.

D. Euthanasie et prélèvement des condyles fémoraux

Les brebis implantées sont euthanasiées par injection létale de T61® en IV (Barbiturique) à un, trois ou six mois selon les lots après une sédation à la xylazine.

Un examen macroscopique est réalisé après arthrotomie des deux genoux basé sur le score macroscopique ICRS (International Cartilage Repair Society : congrès de Göteborg, 2000). Les condyles fémoraux sont prélevés après dissection et section, ils sont conservés dans une solution de formol tamponnée à 10%.

E. Préparation histologique des lames

Les prélèvements sont alors acheminés dans du formol jusqu'au laboratoire d'histologie Anipath à la faculté Laënnec.

Ils sont alors recoupés car la décalcification doit être effectuée sur des pièces les plus petites possibles. Après fixation dans du formol pendant au minimum 24 heures, celles-ci sont plongées dans de l'acide citrique 6% pendant une à deux semaines selon leurs tailles.

L'étape suivante est la coupe des différentes zones témoins dans plusieurs plans parallèles dont le premier passe par le centre de chaque lésion. Les blocs ainsi obtenus sont alors placés dans des cassettes en plastique. Ensuite, l'inclusion des prélèvements dans la paraffine s'effectue grâce à plusieurs bains : formol, éthanol, méthylcyclohexane, paraffine.

Ces manipulations sont effectuées par un automate ASP 300 (Leica).

Les blocs ainsi obtenus sont alors tranchés grâce à un microtome RM 2145 (Leica) : appareil muni d'un couteau et d'un mécanisme d'avancement de sa base sur laquelle est placé le bloc.

Les coupes de 5 µm sont alors étalées sur lame. L'étape suivante est la coloration des coupes histologiques, ici aussi un automate autostainer hms70 (Microm France) réalise les bains dans les différentes cuves contenant des colorants : méthylcyclohexane, alcool absolu, eau courante, hématoxyline de Harris, alcool acide, carbonate de lithium, phloxine 1%, alcool 70, safran alcoolique.

L'hématoxyline permet la coloration des noyaux en bleu, la phloxine la coloration des cytoplasmes en rose et le safran celle des fibres et du collagène en jaune.

Les lames sont ensuite déparaffinées. Les différentes étapes sont les mêmes que pour l'inclusion dans la paraffine mais dans le sens inverse.

Une lamelle est alors fixée sur la lame avec une colle spéciale (pertext).

F. Marquages immunohistologiques

Les techniques immunohistologiques permettent d'observer l'expression de différents marqueurs exprimés par les cellules grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre ces marqueurs.

Nous avons choisi d'observer l'expression :

- de collagène II et d'agrécanes, spécifiques des chondrocytes et constituants majeurs du cartilage hyalin,
- ainsi que celle du collagène I, synthétisé par les chondrocytes du fibrocartilage ou par des chondrocytes après culture en monocouche, normalement absent du cartilage hyalin, afin de voir si les chondrocytes sont capables de se redifférencier pour former du cartilage hyalin.

Principe:

Pour cela, différents anticorps ont été utilisés en fonction du type de marqueur à identifier :

➤ **Agrécanes :**

- 1^{ère} étape : marquage

L'anticorps primaire utilisé est un anticorps polyclonal de chèvre anti-agrécanes (D20, SC-16492 goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology).

Un second anticorps de lapin anti-IgG chèvre (Rabbit IgG anti-goat, Z0454).

- 2^{ème} étape : étape de révélation

▪ L'anticorps secondaire utilisé, couplé à la peroxydase, est un anticorps de chèvre anti-lapin (DakoCytomation, kit EnVision+® System, Ref K4002).

▪

➤ **Collagène I :**

- 1^{ère} étape : marquage

L'anticorps utilisé est un anticorps monoclonal de lapin anti-collagène I (Santa Cruz, Ref SC8783).

- 2^{ème} étape : étape de révélation

L'anticorps secondaire utilisé, couplé à la peroxydase, est un anticorps de chèvre anti-lapin (DakoCytomation, kit EnVision+® System, Ref K4002).

➤ **Collagène II :**

- 1^{ère} étape : marquage : marquage

L'anticorps utilisé est un anticorps monoclonal de souris anti-collagène II.

- 2^{ème} étape : étape de révélation

L'anticorps secondaire utilisé, couplé à la peroxydase, est un anticorps de chèvre anti-souris (DakoCytomation, kit EnVision+® System, Ref K4000).

Méthodologie

Les marquages sont effectués sur des coupes de 5µm d'épaisseur obtenues à partir de blocs contenant l'échantillon préalablement fixé en formaline

Le marquage est réalisé en deux temps :

- La première étape consiste en une série de bains successifs (xylène, alcool, eau distillée et eau courante) permettant de déparaffiner les lames.

▪ Les lames sont ensuite rincées pendant 10 minutes dans un bain de TBS.

Pour la mise en évidence du collagène II, un démasquage (mise en évidence des sites antigéniques) par la hyaluronidase est réalisé durant 15 à 25 minutes à 42°C (étuve sèche).

Elles sont ensuite rincées pendant 10 minutes dans un bain de TBS.

Pour le collagène I, un démasquage par la pepsine est réalisé, durant 10 minutes, les lames étant placées à l'étuve sèche à 42°C. Elles sont ensuite rincées pendant 10 minutes dans un bain d'eau distillée.

Aucun démasquage n'est réalisé pour la mise en évidence des agrécanes.

L'anticorps primaire est ensuite déposé sur chaque lame, à raison de 50 µl par coupe et incubés durant la nuit entière à température ambiante, en chambre humide et à l'obscurité.

- Le lendemain, toutes les coupes sont rincées. Suite à cette étape, le protocole diffère quelque peu selon le marqueur à identifier :

○ Collagènes I et II :

Les coupes sont rincées pendant 20 minutes de façon à inhiber les peroxydases endogènes. L'anticorps secondaire est ensuite déposé sur les coupes et incubé durant 45 minutes dans une chambre humide à l'obscurité et à température ambiante.

○ Agrécanes :

Ne disposant pas d'anticorps secondaire anti-chèvre, il a été nécessaire d'ajouter une étape supplémentaire.

Un anticorps d'origine lapin anti-chèvre est déposé sur les coupes et incubé durant 45 minutes dans une chambre humide à l'obscurité et à température ambiante. L'anticorps secondaire est ensuite déposé et incubé durant 45 minutes dans une chambre humide, à l'obscurité.

Un dernier rinçage dans un bain de TBS est réalisé pour toutes les lames et une contre coloration à l'hématoxyline de Harris est effectuée .

Les coupes sont séchées puis montées entre lame et lamelle et observées au microscope optique. Pour chaque marqueur, un contrôle sans anticorps (= contrôle négatif : tampon TBS BSA 3%) et un contrôle positif (utilisation d'un coupe de cartilage hyalin sain) sont effectués.

G. Lecture et évaluation des lésions macroscopiques et histologiques

Evaluation macroscopique :

Nous avons utilisé le score ICRS (Mainil-Varlet et *al.*,2002) qui permet d'apprécier macroscopiquement la réparation du cartilage articulaire après greffe de chondrocytes, en se basant sur :

- Le pourcentage de couverture des lésions induites :
 - 100% : 4 points
 - >75% : 3 points
 - >50% : 2 points
 - >25% : 1 point
 - <25% : 0 point

- L'intégration aux bords de la lésion attribue également de 0 à 4 points :
 - Intégration parfaite : 4 points
 - Sillon inférieur à 1 mm de large : 3 points
 - $\frac{3}{4}$ d'intégration : 2 points
 - $\frac{1}{2}$ d'intégration : 1 point
 - $\frac{1}{4}$ d'intégration : 0 point.

- La qualité macroscopique de la réparation est également cotée :
 - Cartilage normal : 4 points
 - Fibrillations : 3 points
 - Fissures profondes : 1 point
 - Dégénérescence complète : 0 point.

La somme des différents items aboutit à une cotation en quatre grades, du meilleur au moins bon :

- Grade I : 12 points
- Grade II : 11 à 8 points
- Grade III : 7 à 4 points
- Grade IV : 3 points ou moins.

Evaluation histologique :

Nous avons utilisé l'échelle visuelle histologique de l'ICRS (Mainil-Varlet et *al.*, 2002) qui est une méthode simple permettant d'évaluer les procédures de réparation du cartilage.

Critères morphologiques :

1. Surface :
 - Régulière, continue 3
 - Discontinue, irrégulière 0

2. Matrice :
 - Hyaline 3
 - Mélange hyaline/fibrocartilage 2
 - Fibrocartilage 1
 - Tissu fibreux 0

3. Répartition cellulaire :
 - En colonne 3
 - Mélange en colonne/groupées 2
 - Groupées 1
 - Cellules individuelles désorganisées 0

4. Viabilité de la population cellulaire
 - Prédominance de cellules viables 3
 - Viabilité partielle 1
 - Cellules viables inférieures à 10% 0

5. Os sous-chondral :
 - Normal 3
 - Remodelé 2
 - Nécrosé/ Tissu de granulation 1
 - Détaché/Fracture/Cal de fracture 0

6. Minéralisation :
 - Normale 3
 - Anormale/Localisation inappropriée 0

Les scores individuels ne doivent pas être additionnés mais reportés séparément.

RESULTATS

I. RESULTATS DE LA CULTURE CELLULAIRE

A la suite des quatre semaines de culture, les chondrocytes ont été extraits avec un pourcentage de viabilité supérieur à 80% et cultivés avec un taux de croissance voisin de 0,3 donnant une prolifération suffisante pour permettre de greffer les brebis (5 millions par cm² sont généralement admis.). Le doublement de population (PD) et le taux de croissance (TC) sont calculés grâce aux formules suivantes :

$$\text{PD} = \frac{\ln \left[\frac{n \text{ cellules après trypsination}}{n \text{ cellules ensemencées}} \right]}{\ln 2}$$

$$\text{TC} = \frac{\text{PD}}{n \text{ jours de culture}}$$

Etant donné que l'on obtient 5 millions de chondrocytes par cm² et que le total des trois lésions à implanter (2 de 6 mm et 1 de 4 mm) représente 0,7 cm², le total de cellules nécessaire par brebis est de 3,5 millions.

II. RESULTATS CLINIQUES

La récupération des animaux a été parfaite aussi bien après prélèvement de cartilage que suite à l'implantation des chondrocytes avec appui des membres opérés le soir même.

Aucune boiterie n'a été signalée lors des contrôles à un, deux et trois semaines.

III. RESULTATS ICRS MACROSCOPIQUES



© C. Clément-Bouheddi



© C. Clément-Bouheddi

Photos 11 et 12 : Autopsie des deux genoux témoin à gauche et implanté à droite de la brebis 7015 à 1 mois.



© C. Clément-Bouheddi



© C. Clément-Bouheddi

Photos 13 et 14: Autopsie des deux genoux témoin à gauche et implanté à droite de la brebis 214 à 6 mois.

Genou droit:

Témoin I : lésion 4 mm
Témoin II : lésion 6 mm

Genou gauche:

Bériplast + VP : lésion 6 mm implantée avec Bériplast® et volet périosté
Bériplast I : lésion 4 mm implantée avec Bériplast®
Bériplast II : lésion 6 mm implantée avec Bériplast®

Ces photos ont été prises lors de l'autopsie un mois (photos 11 et 12) et six mois (photos 13 et 14) après implantation. On note alors un recouvrement partiel des lésions par du tissu cicatriciel dont la nature sera définie ultérieurement par l'histologie.

Elles serviront ensuite pour une lecture en aveugle par une deuxième personne.

Tableaux des résultats macroscopiques selon le score ICRS macroscopique

	Animaux	Mois 1				Mois 3				Mois 6			
		20930	7015	2387	Moyenne	232	44	58	Moyenne	214	M95	R095	Moyenne
Genou D	Témoin I	1	2	2	1.7	1	3	2	2	2	1	2	1.7
	Témoin II	1	1	1	1	2	1	1	1.3	1	1	2	1.3
Genou G	Bériorplast +VP	1	1	2	1.3	2	2	2	2	2	2	3	2.3
	Bériorplast I	1	1	2	1.3	2	2	1	1.7	3	1	2	2
	Bériorplast II	1	1	1	1	3	1	1	1.7	3	1	3	2.3

Tableau 2: Pourcentage de couverture des lésions induites pour les lésions témoins et implantées à 1 mois, 3 mois et 6 mois selon le score ICRS macroscopique.

Score ICRS : 100% : 4 >50% : 2 <25% : 0
 >75% : 3 >25% : 1

Genou droit:

Témoin I : lésion 4 mm
 Témoin II : lésion 6 mm

Genou gauche:

Bériorplast +VP : lésion 6 mm implantée avec Bériorplast® et volet périosté
 Bériorplast I : lésion 4 mm implantée avec Bériorplast®
 Bériorplast II : lésion 6 mm implantée avec Bériorplast®

	Animaux	Mois 1				Mois 3				Mois 6			
		20930	7015	2387	Moyenne	232	44	58	Moyenne	214	M95	R095	Moyenne
Genou D	Témoin I	2	2	2	2	2	3	2	2.3	1	1	2	1.7
	Témoin II	1	1	1	1	2	2	1	1.7	1	1	2	1.3
Genou G	Bériorplast +VP	2	3	3	2.7	3	3	3	3	2	2	2	2
	Bériorplast I	1	2	2	1.7	3	3	3	3	3	2	3	2.7
	Bériorplast II	1	2	2	1.7	2	3	3	2.7	2	2	2	2

Tableau 3: Intégration du tissu néoformé au cartilage périphérique pour les lésions témoins et implantées à 1 mois, 3 mois et 6 mois selon le score ICRS macroscopique.

Score ICRS : Intégration parfaite : 4 ¾ d'intégration : 2 ¼ d'intégration : 0
 Sillon inférieur à 1 mm de large : 3 ½ d'intégration : 1

Genou droit:

Témoin I : lésion 4 mm
 Témoin II : lésion 6 mm

Genou gauche:

Bériorplast +VP : lésion 6 mm implantée avec Bériorplast® et volet périosté
 Bériorplast I : lésion 4 mm implantée avec Bériorplast®
 Bériorplast II : lésion 6 mm implantée avec Bériorplast®

	Animaux	Mois 1				Mois 3				Mois 6			
		20930	7015	2387	Moyenne	232	44	58	Moyenne	214	M95	R095	Moyenne
Genou D	Témoin I	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	1.5
	Témoin II	2	1	1	1.3	2	1	2	1.7	1	1	1	1
Genou G	Bériplast +VP	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2.3
	Bériplast I	2	2	3	2.3	3	4	2	3	3	1	1	1.7
	Bériplast II	1	2	2	1.7	3	3	2	2.7	2	1	3	2

Tableau 4: Apparence macroscopique pour les lésions témoins et implantées à 1 mois, 3 mois et 6 mois selon le score ICRS macroscopique.

Score ICRS : Normal : 4 Petites mais larges fissures : 1
 Fibrillations : 3 Dégénérescence complète : 0
 Fissures éparses et superficielles : 2

Genou droit:

Témoin I : lésion 4 mm
 Témoin II : lésion 6 mm

Genou gauche:

Bériplast +VP : lésion 6 mm implantée avec Bériplast® et volet périosté
 Bériplast I : lésion 4 mm implantée avec Bériplast®
 Bériplast II : lésion 6 mm implantée avec Bériplast®

	Animaux	Mois 1				Mois 3				Mois 6			
		20930	7015	2387	Moyenne	232	44	58	Moyenne	214	M95	R095	Moyenne
Genou D	Témoin I	5	6	6	5.7	5	8	6	6.5	4	3	6	4.3
	Témoin II	4	3	3	3.3	6	4	4	4.7	3	3	5	2.7
Genou G	Bériplast +VP	6	7	8	7	8	8	8	8	7	6	7	6.6
	Bériplast I	3	5	7	5	8	9	6	7.7	9	4	6	6.3
	Bériplast II	3	5	5	4.3	8	7	6	7	7	4	8	6.3

Tableau 5: Total des cotations attribuées pour les lésions témoins et implantées à 1 mois, 3 mois et 6 mois selon le score ICRS macroscopique.

Genou droit:

Témoin I : lésion 4 mm
 Témoin II : lésion 6 mm

Genou gauche:

Bériplast +VP : lésion 6 mm implantée avec Bériplast® et volet périosté
 Bériplast I : lésion 4 mm implantée avec Bériplast®
 Bériplast II : lésion 6 mm implantée avec Bériplast®

	Animaux	Mois 1				Mois 3				Mois 6			
		20930	7015	2387	Moyenne	232	44	58	Moyenne	214	M95	R095	Moyenne
Genou D	Témoin I	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	3.3
	Témoin II	3	4	4	3.7	3	3	3	3	4	4	3	3.7
Genou G	Bériplast +VP	3	3	2	2.7	2	2	2	2	3	3	3	3
	Bériplast I	4	3	3	3.3	2	2	3	2.3	4	3	3	3.3
	Bériplast II	4	3	3	3.3	2	3	3	2.7	3	3	2	2.7

Tableau 6 : Score ICRS macroscopique attribué pour les lésions témoins et implantées à 1 mois, 3 mois et 6 mois

Score ICRS : Du meilleur au moins bon :

- ❖ Grade I : 12 points ;
- ❖ Grade II : 11 à 8 points;
- ❖ Grade III : 7 à 4 points ;
- ❖ Grade IV : ≤ 3 points

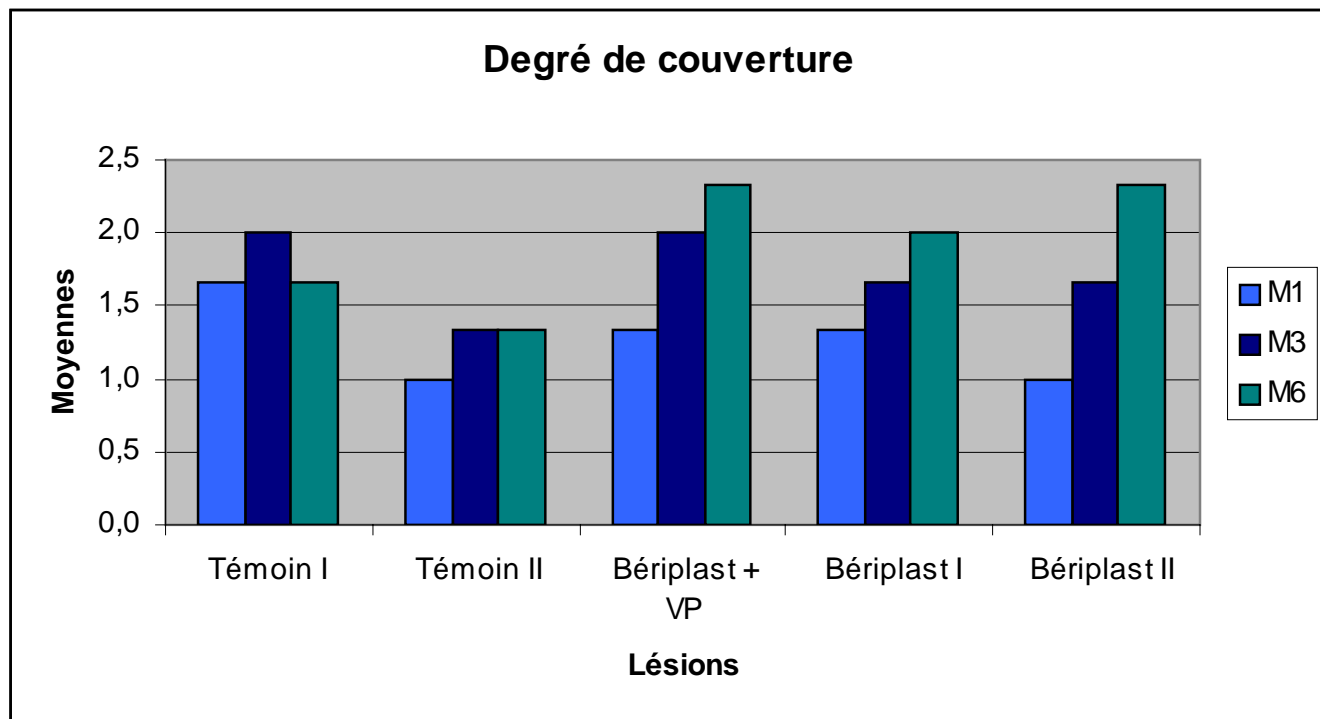
Le score le plus faible correspond à la meilleure réparation

Genou droit:

Témoin I : lésion 4 mm
Témoin II : lésion 6 mm

Genou gauche:

Bériplast +VP : lésion 6 mm implantée avec Bériplast® et volet périosté
Bériplast I : lésion 4 mm implantée avec Bériplast®
Bériplast II : lésion 6 mm implantée avec Bériplast®



Graphique 1 : Comparaison du pourcentage de couverture des lésions induites pour les lésions témoins et implantées à 1 mois (M1), 3 mois (M3) et 6 mois (M6)
Selon le tableau 2

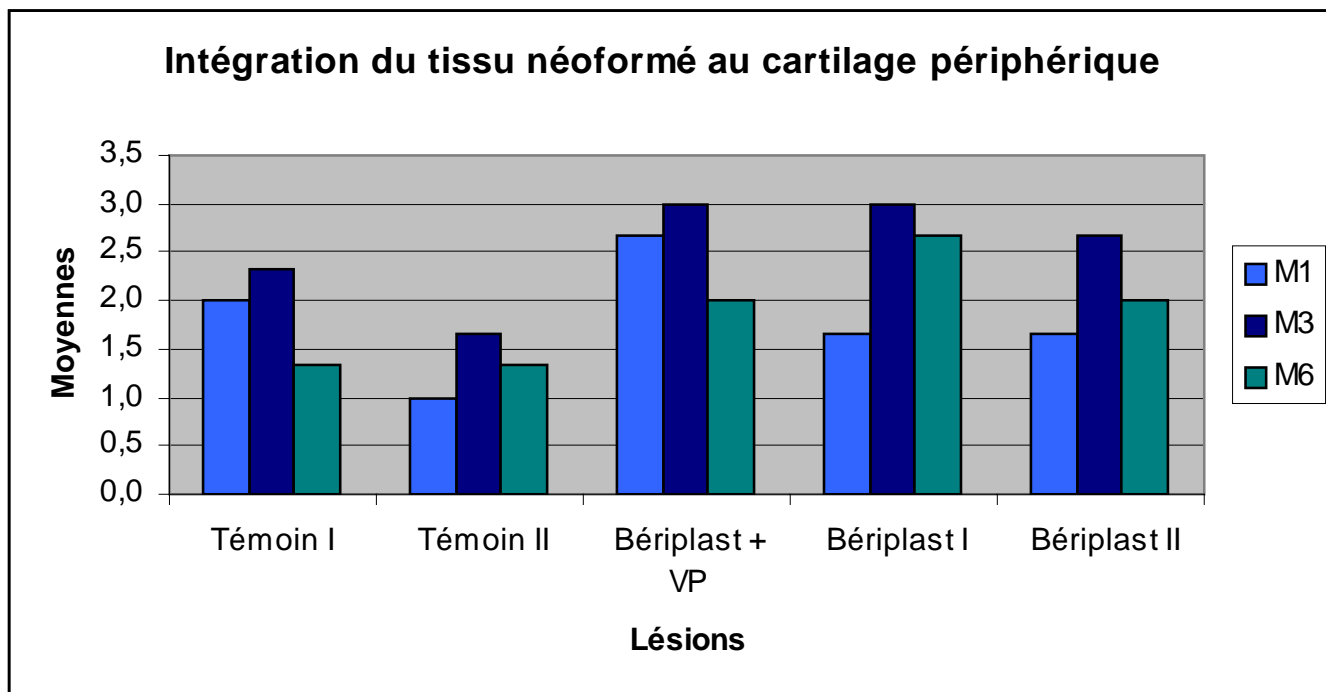
Score ICRS : 100% : 4 >50% : 2 <25% : 0
 >75% : 3 >25% : 1

Genou droit:

Témoin I : lésion 4 mm
 Témoin II : lésion 6 mm

Genou gauche:

Bériplast + VP : lésion 6 mm implantée avec Bériplast® et volet périosté
 Bériplast I : lésion 4 mm implantée avec Bériplast®
 Bériplast II : lésion 6 mm implantée avec Bériplast®



Graphique 2 : Comparaison de l'intégration du tissu néoformé au cartilage périphérique pour les lésions témoins et implantées à 1 mois (M1), 3 mois (M3) et 6 mois (M6)
Selon le tableau 3

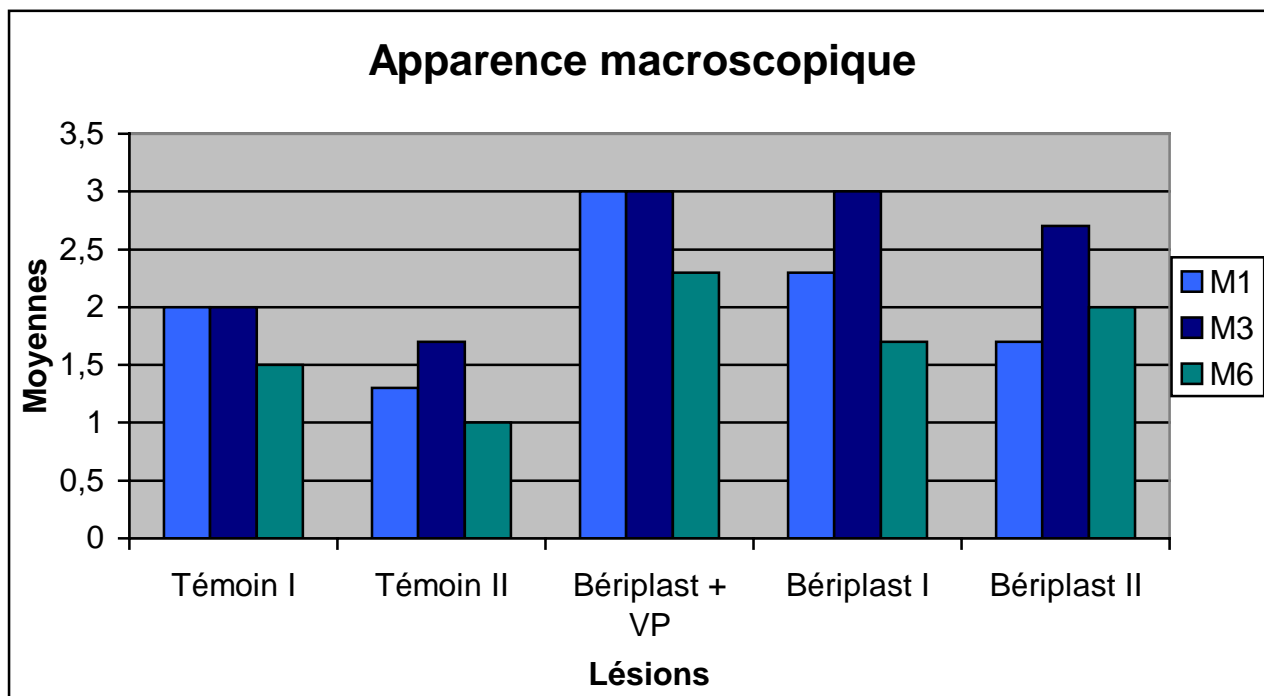
Score ICRS : Intégration parfaite : 4 $\frac{3}{4}$ d'intégration : 2 $\frac{1}{4}$ d'intégration : 0
 Sillon inférieur à 1 mm de large : 3 $\frac{1}{2}$ d'intégration : 1

Genou droit:

Témoin I : lésion 4 mm
 Témoin II : lésion 6 mm

Genou gauche:

Bériplast +VP : lésion 6 mm implantée avec Bériplast® et volet périosté
 Bériplast I : lésion 4 mm implantée avec Bériplast®
 Bériplast II : lésion 6 mm implantée avec Bériplast®



Graphique 3 : Comparaison de l'apparence macroscopique des lésions témoins et des lésions implantées à 1 mois (M1), 3 mois (M3) et 6 mois (M6)
Selon le tableau 4

Score ICRS :

Normal : 4

Fibrillations : 3

Fissures éparses et superficielles : 2

Petites mais larges fissures : 1

Dégénérescence complète : 0

Genou droit:

Témoin I : lésion 4 mm

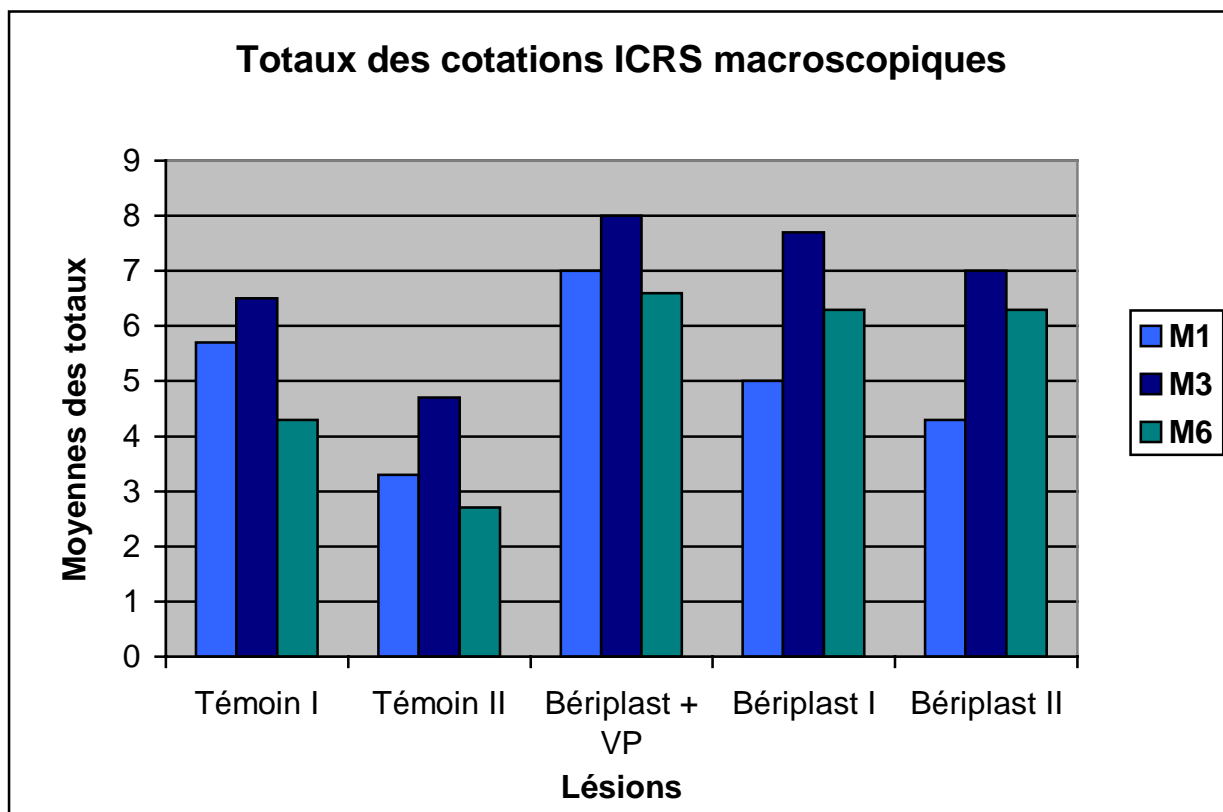
Témoin II : lésion 6 mm

Genou gauche:

Bériplast + VP : lésion 6 mm implantée avec Bériplast® et volet périosté

Bériplast I : lésion 4 mm implantée avec Bériplast®

Bériplast II : lésion 6 mm implantée avec Bériplast®



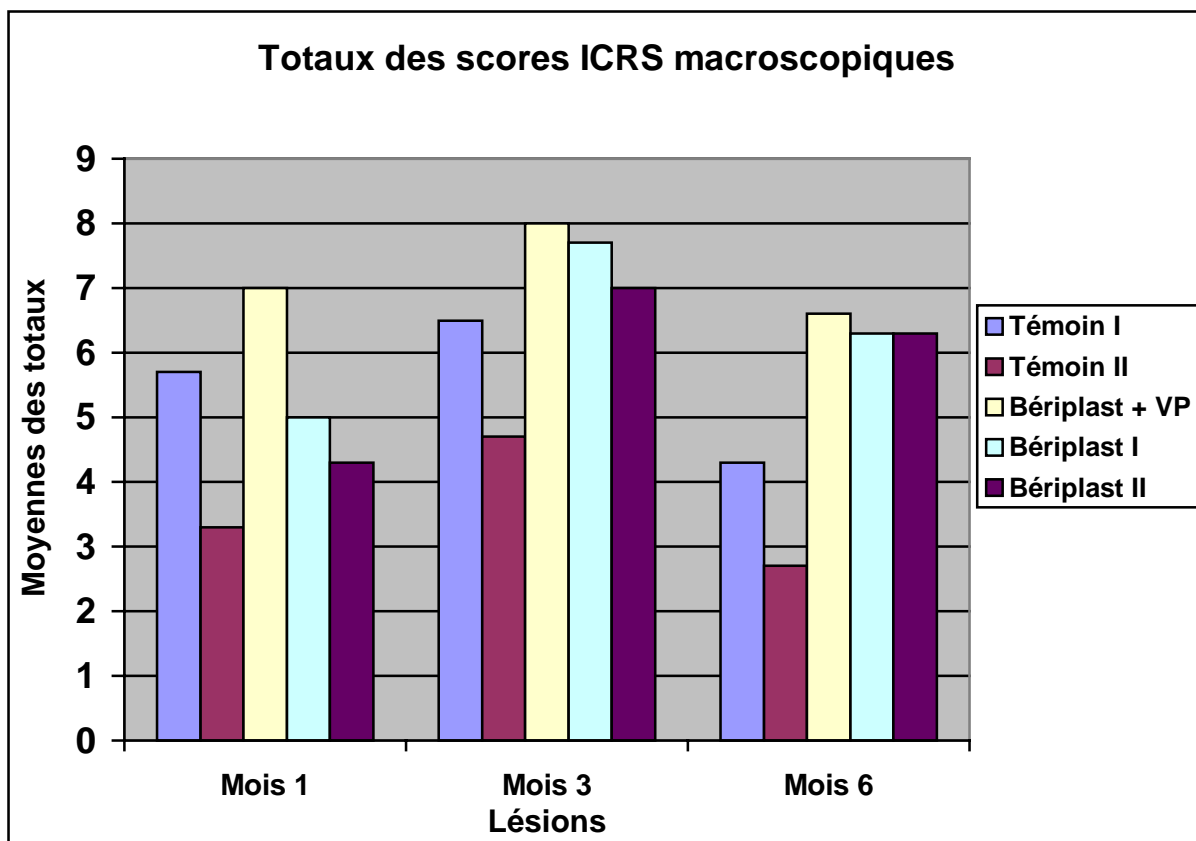
Graphique 4: Comparaison des totaux des cotations de chaque critère ICRS macroscopique pour les lésions témoins et implantées à 1 mois, 3 mois et 6 mois
Selon le tableau 5

Genou droit:

Témoin I : lésion 4 mm
 Témoin II : lésion 6 mm

Genou gauche:

Bériplast + VP : lésion 6 mm implantée avec Bériplast® et volet périosté
 Bériplast I : lésion 4 mm implantée avec Bériplast®
 Bériplast II : lésion 6 mm implantée avec Bériplast®



Graphique 5: Comparaison à 1 mois, 3 mois et 6 mois des totaux des scores ICRS macroscopiques obtenus pour chaque lésion témoin ou implantée.
Selon le tableau 5

Genou droit:

Témoin I : lésion 4 mm
Témoin II : lésion 6 mm

Genou gauche:

Bériplast + VP : lésion 6 mm implantée avec Bériplast® et volet périosté
Bériplast I : lésion 4 mm implantée avec Bériplast®
Bériplast II : lésion 6 mm implantée avec Bériplast®

IV. RESULTATS HISTOLOGIQUES SELON L'ECHELLE VISUELLE ICRS

Lors de l'observation des lames sous microscope, des photos ont été prises :



© A.Bouheddi

Témoin II



© A.Bouheddi

Bériplast + VP



© A.Bouheddi

Bériplast II

Photos 15, 16 et 17: Coupes histologiques de la brebis 20930 à 1 mois : lésions de 6 mm
Coloration Hématoxyline-Phloxine-Safran. Grossissement X100.

On note une formation plus importante de fibrocartilage au niveau de la lésion traitée par Bériplast® et volet périosté (Bériplast + VP, photo 16) que pour la lésion témoin non traitée (Témoin II, photo 15) et la lésion traitée par Bériplast® seul (Bériplast II, photo 17)

Les photos des lésions de toutes les brebis sont représentées en annexe 2.

Tableaux des résultats histologiques selon le score ICRS histologique

	Mois 1			Mois 3			Mois 6		
Animaux	20930	7015	2387	232	44	58	214	M 95	R 095
Surface	0	0	0	0		0	0	3	0
Matrice	0	0	0	1		0	1	0	0
Répartition cellulaire	0	1	1	0		0	1	0	1
Viabilité cellulaire	0	3	3	3		3	3	3	3
Os souschondral	0	2	2	2		1	3	1	1
Cartilage calcifié	0	3	3	0		0	3	3	3

Tableau 7 : Résultats des scores ICRS histologiques du témoin I (lésion 4 mm non traitée)

La présence de cartilage natif au niveau du témoin I de la brebis 44 n'a pas permis de notation pour cette lésion.

Score ICRS histologique (rappel):

Critères ICRS histologiques			Scores	Critères ICRS histologiques			Scores
Surface	Régulière, continue		3	Viabilité de la population cellulaire	Plus de cellules viables		3
	Discontinue, irrégulière		0		Viabilité partielle		1
Matrice	Hyaline		3		Cellules viables <10%		0
	Hyaline + fibrocartilage		2	Os sous chondral	Normal		3
	Fibrocartilage		1		Remodelé		2
	Tissu fibreux		0		Nécrosé/tissu granulation		1
Répartition cellulaire	En colonne		3		Détaché/fracture/cal		0
	En colonne + groupées		2	Minéralisation	Normale		3
	Groupées		1		Anormale/lieu inapproprié		0
	Cellules individuelles désorganisées		0				

	Mois 1			Mois 3			Mois 6		
Animaux	20930	7015	2387	232	44	58	214	M 95	R 095
Surface	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Matrice	0	0	0	1	2	0	2	1	0
Répartition cellulaire	0	1	1	0	0	0	2	1	0
Viabilité cellulaire	0	3	3	3	3	3	3	3	3
Os souschondral	0	2	1	3	3	1	3	3	2
Cartilage calcifié	0	3	3	0	3	0	3	3	3

Tableau 8 : Résultats des scores ICRS histologiques du témoin II (lésion 6 mm non traitée).

	Mois 1			Mois 3			Mois 6		
Animaux	20930	7015	2387	232	44	58	214	M 95	R 095
Surface	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Matrice	2	0	0	1	2	0	2	1	0
Répartition cellulaire	2	0	0	0	0	0	2	1	0
Viabilité cellulaire	3	3	0	3	3	0	3	3	3
Os souschondral	2	2	1	3	3	0	3	3	2
Cartilage calcifié	3	3	0	0	3	0	3	3	3

Tableau 9 : Résultats des scores ICRS histologiques des lésions traitées par Bériplast® + Volet périosté.

Score ICRS histologique (rappel):

Critères ICRS histologiques			Scores	Critères ICRS histologiques			Scores
Surface	Régulière, continue		3	Viabilité de la population cellulaire	Plus de cellules viables		3
	Discontinue, irrégulière		0		Viabilité partielle		1
Matrice	Hyaline		3		Cellules viables <10%		0
	Hyaline + fibrocartilage		2	Os sous chondral	Normal		3
	Fibrocartilage		1		Remodelé		2
	Tissu fibreux		0		Nécrosé/tissu granulation		1
Répartition cellulaire	En colonne		3		Détaché/fracture/cal		0
	En colonne + groupées		2	Minéralisation	Normale		3
	Groupées		1		Anormale/lieu inapproprié		0
	Cellules individuelles désorganisées		0				

	Mois 1			Mois 3			Mois 6		
Animaux	20930	7015	2387	232	44	58	214	M 95	R 095
Surface	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Matrice	0	0	1	0	0	0	1	1	1
Répartition cellulaire	0	0	1	0	0	0	1	1	1
Viabilité cellulaire	0	0	3	0	3	0	3	3	3
Os souschondral	0	0	1	1	0	0	3	3	1
Cartilage calcifié	0	0	0	0	0	0	3	3	3

Tableau 10 : Résultats des scores ICRS histologiques des lésions traitées par Bériplast® (lésion 4 mm).

	Mois 1			Mois 3			Mois 6		
Animaux	20930	7015	2387	232	44	58	214	M 95	R 095
Surface	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Matrice	0	0	0	0	2	0	1	0	0
Répartition cellulaire	0	0	1	0	2	0	1	0	0
Viabilité cellulaire	0	0	3	0	3	3	3	3	3
Os souschondral	0	0	1	1	0	0	3	3	1
Cartilage calcifié	0	0	3	0	0	0	3	3	3

Tableau 11 : Résultats des scores ICRS histologiques des lésions traitées par Bériplast® (lésion 6 mm).

Score ICRS histologique (rappel):

Critères ICRS histologiques		Scores	Critères ICRS histologiques		Scores
Surface	Régulière, continue	3	Viabilité de la population cellulaire	Plus de cellules viables	3
	Discontinue, irrégulière	0		Viabilité partielle	1
Matrice	Hyaline	3		Cellules viables <10%	0
	Hyaline + fibrocartilage	2	Os sous chondral	Normal	3
	Fibrocartilage	1		Remodelé	2
	Tissu fibreux	0		Nécrosé/tissu granulation	1
	En colonne	3		Détaché/fracture/cal	0
Répartition cellulaire	En colonne + groupées	2	Minéralisation	Normale	3
	Groupées	1		Anormale/lieu inapproprié	0
	Cellules individuelles désorganisées	0			

V. RESULTATS DES MARQUAGES IMMUNOHISTOLOGIQUES

Le marquage sur du cartilage a été mis au point. Mais devant les mauvais résultats histologiques, il a été décidé de ne pas faire les analyses immunohistologiques après traitement.

DISCUSSION

Les objectifs espérés n'ont pas été atteints, en effet le cartilage hyalin attendu n'a pas été observé. La colle de fibrine semble être à l'origine de ces résultats et la fibrine ne serait alors pas le biomatériau le mieux adapté pour la réparation de lésions de cartilage.

I. DISCUSSION DES RESULTATS

A. Macroscopiques

L'apparence macroscopique de l'ensemble des lésions est proche de celui d'un tissu fibreux le plus souvent et parfois d'un fibrocartilage, mais jamais d'un cartilage hyalin.

- Les graphiques 1, 2 et 3 nous permettent de comparer les résultats aux différents temps.

Ainsi le degré de réparation des lésions témoins est meilleur à trois mois qu'à six mois. On peut penser que la vitesse de réparation est très importante au départ puis diminue ensuite. L'amélioration de ce critère est en revanche constant pour les lésions traitées.

En ce qui concerne l'intégration du tissu néoformé au cartilage périphérique et l'apparence macroscopique, on constate que l'obtention des résultats préférables à 3 mois.

L'intégration du tissu néoformé au cartilage périphérique est aussi meilleure à 3 mois mais on observe bien que les lésions traitées obtiennent des scores supérieurs à ceux des lésions non traitées.

- En observant les graphiques 4 et 5, on remarque que sur l'ensemble des brebis, les lésions traitées présentent des scores ICRS plus élevés et notamment celles traitées par Bériplast® et volet périosté.

On peut aussi noter que les lésions témoins I et II, toutes deux non traitées, n'ont pas la même réparation. En effet, le meilleur score de réparation est observé pour la lésion la plus petite (Témoin I). On peut donc supposer que plus le diamètre de la lésion est réduit, meilleure sera la réparation. Il en est d'ailleurs de même pour les lésions traitées par Bériplast® : la lésion de 4 mm (Bériplast I) a obtenu un meilleur scores ICRS que celle de 6 mm (Bériplast II).

Les lésions de la brebis 44 traitées par Bériplast® ont l'aspect d'une lésion infectieuse localisée ou d'une nécrose d'origine indéterminée.

B. Histologiques

Lors de l'étude des lames histologiques, nous n'avons obtenu que du fibrocartilage, sans chondrocytes ce qui correspond aux résultats de l'étude comparative de Horas et *al* (2003). Il n'a jamais été observé de cartilage hyalin. La surface était toujours irrégulière, les cellules étaient désorganisées et des clusters n'ont jamais été observés. Les cellules présentes étaient viables mais ces cellules étaient représentées principalement par des fibroblastes.

De plus, nous n'avons jamais noté de différences réelles entre les lésions implantées et les lésions témoins.

De nombreuses lésions présentaient un os sous-chondral remodelé voir nécrosé et parfois fracturé. En dehors de la brebis 44 pour laquelle cette nécrose de l'os sous-chondral peut être expliquée par la présence d'une infection de l'articulation, nous n'avons pas d'explication pour ces lésions osseuses. En effet, lors des interventions chirurgicales, l'os sous chondral n'a jamais été touché et aucun saignement n'a été observé.

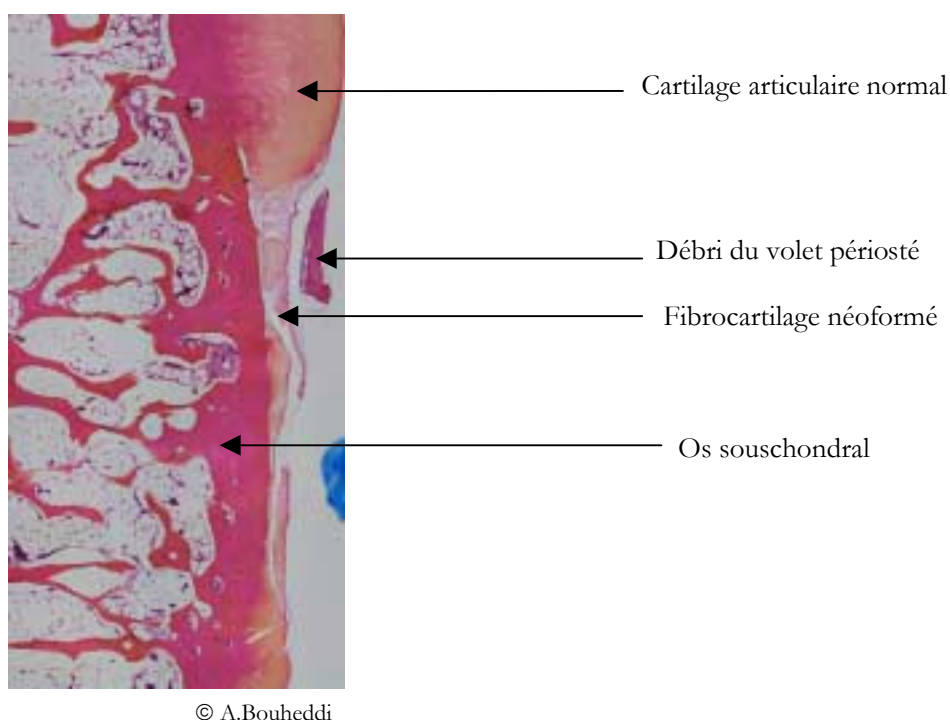


Photo 18: Coupe histologique de la lésion traitée par Bériplast+VP de la brebis 44 à 3 mois. Vue au microscope optique. Coloration HPS. Grossissement X 100

On note le reste du volet périosté et une formation de fibrocartilage. L'os sous-chondral est intact.

L'absence de cartilage hyalin pourrait être expliquée par la présence de fibrine, qui ne serait alors pas un biomatériau adéquat pour la réparation des lésions cartilagineuses. Les résultats obtenus lors de l'étude menée chez la chèvre par Job et *al.* en 1999 mènent à la même observation. Il en est de même pour le travail expérimental utilisant une colle de fibrine (Tisseel®) au niveau de défauts ostéochondraux chez le lapin. Il a été observé que la colle de fibrine retarde la réparation naturelle ostéochondrale et que même l'ajout d'hormone de croissance à cette colle n'a aucun effet sur le processus de cicatrisation (Brittberg et *al.*, 1997). Dans ces deux études, l'adhésion de la colle de fibrine était provoquée par l'abrasion de l'os

sous-chondral jusqu'au lit vasculaire et non par fixation d'un volet périosté et l'on sait que la pénétration de l'os sous chondral stimule les cellules souches de la moelle osseuse et entraîne la formation d'un fibrocartilage (Kim *et al*, 1991). Cependant, une étude menée sur le cheval a obtenu de très bons résultats avec un tissu de réparation proche du cartilage natif, en utilisant une attache en acide polylactique afin de fixer le gel de fibrine de manière à ne pas pénétrer l'os sous-chondral. C'est ce qui a justifié l'utilisation de la fibrine dans notre travail.

C. Immunohistologiques

Les travaux immunohistologiques n'ont pas été exploités.

II. DISCUSSION DE LA METHODOLOGIE UTILISEE LORS DE CE TRAVAIL DE RECHERCHE

A. Choix du modèle animal

Nous avons choisi comme modèle animal la brebis, en effet la taille de l'articulation du genou permet de réaliser correctement les lésions nécessaires à cette expérimentation contrairement à des modèles plus petits comme le lapin (Bacenkova *et al*, 2001). De plus, les coûts de l'animal et de l'entretien de ces animaux sont relativement restreints par rapport à ceux d'un animal plus grand comme le cheval modèle animal utilisé par Litzke *et al*. (2004) lors de transplantation de chondrocytes autologues.

B. Prélèvement du cartilage

Dans cette étude, nous avons choisi de prélever le cartilage au niveau de l'articulation du coude. Ainsi, lors de l'implantation des chondrocytes, le genou ne présentait aucune lésion antérieure qui peuvent engendrer une inflammation, de l'arthrose pouvant perturber la cicatrisation et donc les résultats. Dans la méthode décrite par Brittberg *et al* en 1994, le cartilage prélevé pour la culture de chondrocytes provient de l'articulation du genou, au niveau de laquelle aura lieu l'implantation. Dans la cas de notre étude, les zones de prélèvement auraient limité ensuite le nombre et le positionnement des lésions.

La voie d'abord pratiquée lors de cette intervention (cf. Matériel et méthode) n'a jamais été décrite auparavant : l'incision est réduite, aucune section musculaire n'est effectuée tout en permettant un bon abord du condyle latéral de l'humérus. Ceci permet une récupération très rapide avec un appui correct le jour même.

C. Culture cellulaire

La procédure utilisée pour la culture de chondrocytes extraits de cartilage de brebis est identique à celle utilisée pour les chondrocytes humains (Harrison *et al*, 2000). L'utilisation de la colle de fibrine lors de l'implantation des chondrocytes a nécessité des travaux préliminaires réalisés par Meinhart *et al* (1999) qui ont montré que cette colle n'affecte pas la viabilité et la prolifération des cellules.

D. Intervention chirurgicale

Même si les anesthésies et les interventions chirurgicales n'ont pas posé de difficulté particulière, le choix d'intervention sur les deux genoux peut être discutable. C'est une discussion souvent abordée en chirurgie orthopédique des membres. Dans notre cas le protocole imposait l'intervention sur les deux genoux car il est préférable d'avoir le même animal comme témoin.

Il n'y pas eu de modification du protocole interventionnel entre les animaux de cette étude : l'abord chirurgical a été effectué de façon identique pour tous les animaux par la même équipe chirurgicale. La seule variation concerne la durée de l'intervention chirurgicale. Les principales causes de pertes de temps ont été la réalisation de lésions cartilagineuses conformes au protocole sans perforation de la plaque sous-chondrale, et la gestion du Bériplast® lors de l'implantation cellulaire, en effet il a fallu maîtriser la concentration pour obtenir un volume facilement applicable. Mais, au cours des différentes interventions, ces techniques ont été de mieux en mieux maîtrisées et la durée de l'opération a pu être diminuée.

Lors de la création des lésions au niveau des condyles fémoraux, le décollement du cartilage a été une étape minutieuse qui a nécessité l'emploi d'un trocart à biopsie punch afin de tracer la lésion, puis d'un élévateur périosté. Cette technique a permis d'accéder au plan de clivage optimal afin de conserver l'os sous-chondral à l'exception des lésions de la brebis 44 pour lesquelles les résultats histologiques mettent en évidence la présence de cartilage natif au niveau de la lésion de 4 mm non traitée (témoin I).

Le dispositif Bériplast® avec la concentration cellulaire réalisée par le laboratoire de culture cellulaire s'est révélé fonctionnel. On signalera certains points qui pourront aider ultérieurement d'autres équipes : l'application doit être rapidement effectuée et par petites quantités car le contenu du Bériplast® une fois mélangé ne peut être réutilisé et l'aiguille doit être changée à chaque implantation afin d'éviter l'obstruction de l'aiguille par la fibrine.

L'utilisation de la colle de fibrine a permis la fixation du volet périosté par quatre points au lieu de huit à dix points dans d'autres études (Brittberg M., 1999) . La réalisation des points à l'aide de fils de très petit calibre (7-0) est une intervention délicate d'autant plus longue que le nombre de points est élevé.

La récupération des brebis implantées a été très rapide, un appui correct des deux membres postérieurs était obtenu entre un et deux jours après l'intervention. L'immobilisation des deux membres opérés étant infaisable, les brebis ont été placées en box pour limiter une sollicitation importante des genoux .

E. Evaluation macroscopique

Il a été choisi d'évaluer les lésions macroscopiquement selon le score ICRS (ICRS : congrès de Göteborg, 2000) qui prend en compte la réparation du défaut, l'intégration du tissu néoformé au cartilage périphérique et l'apparence macroscopique. Ce score est particulièrement adapté aux lésions cartilagineuses.

Les lectures ont été effectuées en aveugle par deux personnes.

De plus, les sites de prélèvements du cartilage (condyle huméral latéral) ont alors été observés afin de noter toute inflammation ou présence d'ostéophytes. Aucune anomalie n'a été observée.

F. Histologie et évaluation histologique

La coloration choisie pour les prélèvements, la coloration HPS (Hématoxyline-Phloxine-Safran) est la plus adaptée pour la visualisation des différents tissus présents à la périphérie des lésions (Mainil-Varlet et *al.*, 2002). En effet, elle permet la coloration des noyaux en bleu (hématoxyline), des cytoplasmes en rose (phloxine) et des fibres et du collagène en jaune (safran).

Les lames obtenues ont alors été observées au microscope optique afin d'évaluer le degré de réparation des lésions cartilagineuses selon les critères ICRS histologiques : la continuité de la surface, la nature de la matrice extracellulaire, la distribution et la viabilité cellulaires, l'état de l'os sous-chondral, et le degré de minéralisation du cartilage.

G. Immunohistologie

Les marquages de collagènes II, d'agrécannes et de collagènes I permettent de différencier le cartilage hyalin du fibrocartilage. Ainsi, ils complètent les résultats histologiques.

Malheureusement, les résultats obtenus en histologie n'étant pas ceux escomptés au départ, il a été décidé de ne pas exploiter les travaux immunohistologiques.

CONCLUSION

Cette étude a été menée dans le but d'améliorer la méthode d'implantation de chondrocytes autologues au sein de défauts cartilagineux en utilisant une colle de fibrine.

La méthode chirurgicale a été convaincante puisque les techniques concernant le prélèvement du cartilage, la création des lésions et l'implantation ont été maîtrisées de façon à ce que les temps opératoires puissent être réduits. En ce qui concerne la culture cellulaire, l'application de la culture de chondrocytes humains à celle de chondrocytes de mouton a été réussie.

Cette recherche a été lourde nécessitant des technologies importantes et beaucoup de suivi (en temps) car elle a été réalisée sur un animal de grande taille, avec une partie importante de développement et de mise au point de nouvelles techniques. De plus elle a exigé de respecter un calendrier précis entre le prélèvement, la mise en culture, l'implantation au moment optimal, et l'euthanasie.

Malgré toutes les bonnes conditions mises en œuvre lors de cette étude, les résultats notamment histologiques n'ont pas été ceux que l'on pouvait attendre puisqu'il n'a été observé que du fibrocartilage. Macroscopiquement, on a obtenu une bonne couverture de fibrocartilage des lésions implantées par rapport aux témoins.

Même si nous n'avons pas obtenu les résultats escomptés, de nombreux points ont été construits et validés lors de ce travail et nous pouvons espérer la continuité de notre travail dans ce domaine de recherche par d'autres équipes.


Le Professeur responsable
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon


Le Président de la thèse


Vu et permis d'imprimer
Lyon, le 9 NOV. 2005
Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,
Professeur D. VITAL


Vu : Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
LE DIRECTEUR
Stéphane MARTINOT


MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE
Ecole Nationale
vétérinaire
LYON


UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD
LYON I

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adolphe M, Benya P : Different types of cultured chondrocytes : the *in vitro* approach to study of Biological regulation, in *Biological Regulation of the chondrocyte*, Adolphe Meds., CRC press Inc, Boca Raton, 105-139, (1992).

Allende CA, Allende BT, Allende BL, Bitar I, Gonzalez G: Intercondylar distal humerus fractures surgical treatment and results, *Chir. Main.*, 23(2), 85-95, (2004).

Aydellote KA, Schumacher BL, Kuettner KE: Heterogeneity of articular chondrocytes, in *Articular Cartilage and Osteoarthritis*, New York, Raven Press, 237-249 (1992).

Bacenkova D, Rosocha J, Svihla R, Vasko G, Bodnar J, Repair of chondral defects of the knee using a combination of autologous chondrocytes and osteochondral allograft-an animal model. Part I: in vitro culture of autologous chondrocytes, *Acta. Chir. Orthop. Traumatol. Cech*, 68(6), 363-8, (2001).

Bates GP, Schor SL, Grant ME: A comparison of the effects of different substrates on chondrocyte morphology and the synthesis of collagen types IX and X, *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 23(5), 374-80, (1987).

Bentley G, Biant LC, Carrington RW, et al. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects of the knee. *J. Bone Joint Surg Am.*;85-A(11) :2259, (2003).

Benya PD, Padilla SR: Modulation of the rabbit chondrocyte phenotype by retinoic acid terminals type II collagen synthesis without inducing type I collagen: the modulated phenotype differs from that produced by subculture, *Dev. Biol.*; 118(1), 296-305, (1986).

Benya PD, Shaffer JD : Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels, *Cell.*, 30(1), 215-24, (1982).

Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M: Biology of the syndecans – a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans, *Ann. Rev. Cell. Bio.*, 8, 365-394, (1992).

Bert JM: Role of abrasion arthroplasty and debridement in the management of osteoarthritis of the knee, *Rheum. Dis. Clin. North Am.*; 19(3):725-39, (1993).

Brittberg M, Autologous chondrocyte transplantation, *Clin. Orthop.*, 367 Suppl:147-155, (1999).

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L, Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation, *N. Engl. J. Med.*, 331(14), 889-895, (1994).

Brittberg M, Sjögren-Janson E, Lindahl A, Peterson L: Influence of fibrin sealant (Tisseel®) on osteochondral defect repair in the rabbit knee. *Biomaterials*, 18:235-242, (1997).

Buckwalter JA, Lohmander S: operative treatment of osteoarthrosis: current practice and future Development, *J. Bone Joint Surg Am.*, 76A, 1405-1418, (1994a).

Buckwalter JA, Mankin HJ, Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions, 47, 477-486, (1998a).

Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum.*; 41, 1331-1342, (1998b).

Buckwalter JA, Martin JA, Olmstead M, Athanasiou KA, Rosenwasser MP, Mow VC. Osteochondral repair of primate knee femoral and patellar articular surfaces : implication for preventing post-traumatic osteoarthritis. *Orthop J.* ; 23 :66-74, (2003).

Buckwalter JA, Rosenberg LC, Hunziker EB: Articular composition, structure, Response to injury and methods of facilitation repair, in articular Cartilage and Knee Joint function , *Basic Science and Arthroscopy*, Bristol-Myers/Zimmer Orthopaedic Symposium, 19-56, New York Raven Press (1990).

Buckwalter JA, Rougley PJ, Rosenberg LC: Age-related changes in cartilage proteoglycans: quantitative electron Microscopy studies, *Microsc. Res. Tech.* 28, 398-408, (1994b).

Buckwalter JA, Kuttner K, and Thonar E: Age-related changes in cartilage proteoglycans: electron Microscopy studies. *J. Orthop. Res.* 3, 251-257, (1985).

Chu CR, Douchis JS, Yoshioka M, Sah RL, Coutts RD, Amiel D. Osteochondral repair using perichondrial cells. A 1-year study in rabbits, (2002).

Clark CC, Tolin BS, Brighton CT. The effect of oxygen tension on proteoglycan synthesis and aggregation in mammalian growth plate chondrocytes. *Orthop. Res.* 9(4), 477-84, (1991).

Cremer MA., Rosloniec EF., and Kang, AH. : The cartilage collagens : a review of their structure, organisation and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J. Mol. Med.* 76, 275-288, (1998).

Diab M, Wu JJ, Eyre DR, Collagen type IX from human cartilage: a structural profile of intermolecular cross-linking sites, *Biochem. J.* 314 (Pt 1), 327-32, (1996).

Eerola I, Salminen H, Lammi P, Lammi M, von der Mark K, Vuorio E, Saamanen AM: Type X collagen, a natural component of mouse articular cartilage: association with growth, aging, and osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* 41(7), 1287-95, (1998).

Flannery CR, Little CB, Hughes CE, and Caterson B: Expression and activity of articular cartilage hyaluronidase. *Biochemical and biophysical research communication.* 251, 824-829, (1998).

Font B, Eichenberger D, Goldschmidt D, Boutillon M, and Hulmes D: Structural requirements for fibromodulin binding to collagen and the control of type I collagen fibrillogenesis. *Eur. J. Biochem.* 254, 580-58, (1998).

Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ: Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage, *J Bone Joint Surg.* 84B (2):276-288, (2002).

Freed LE, Vunjak-Novakovic G: Culture of organized cell communities. *Adv. Drug Del. Rev.*, 33, 15-30, (1998).

- Freyria AM, Ronziere MC, Boutillon MM, Herbage D: Two-dimensional electrophoresis of intracellular and secreted protein synthesized by foetal bovine chondrocytes in high-density culture. *Electrophoresis*, 16, 1268-1272, (1995).
- Gentili C, Bianco P, Neri M, Mapheli M, Campanile G, Castagnola P, Cancedda R, Descalzi-Cancedda F: Cell proliferation, extracellular matrix mineralization, and ovotransferrin osteoblast-like cells, *J. Cell. Biol.*, 122, 703-712, (1993).
- Gibson GJ, Kohler WJ, Schaffner MB: Chondrocyte apoptosis in endochondral ossification of chick sterna, *Dev. Dyn.*, 203, 468-476, (1995).
- Gill TJ, McCulloch PC, Glasson SS, Blanchet T, Morris EA : Chondral defect repair after the microfracture procedure, *Am J Sports Med*, 16, (2005).
- Guilak F, Ratcliffe A, Lane N, Rosenwasser MP, Mow VC: Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis, *J. Orthop. Res.*, 12, 474-484, (1994).
- Goldberg VM, Buckwalter JA : Hyaluronans in the treatment of osteoarthritis of the knee : evidence of disease-modifying activity, *Osteoarthritis Cartilage*, 13(3):216-24 (2005)
- Guo JF, Jourdain GW, MacCallum DK: Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads, *Connect. Tissue Res.*, 19(24), 277-297, (1989).
- Hall BK: Cartilage, New York: Academic Press, 181-251, (1983).
- Hangody L, Rathonyi GK, Duska Z, Vasarhelyi G, Fules P, Modis L. Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am.*; 86-A Suppl 1, 165-72, (2004 Mar).
- Harrison PE, Ashton IK, Johnson WE, Turner SL, Richardson JB, Ashton BA, The in vitro growth of human chondrocytes, *Cell Tissue Bank*, 1(4), 255-260, (2000).
- Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E: Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycans, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta, *Biochem. J.*, 302, 507-534, (1994).
- Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schenttler R. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am.*, 85-A(2) :185-92. (2003).
- International Cartilage Repair Society : congrès de GÖTEBORG Mai 2000.
- Iwata H: Pharmacologic and clinical aspects of intraarticular injection of hyaluronate, *Clin. Orthop.*, 289, 285-291, (1993).
- Kim HKW, Moran ME, Salter RB. The potential for regeneration of articular cartilage defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. *J Bone Joint Surg*, 73-A, 1301-15. (1991)
- Kimura T, Yasui N, Ohasawa S, Ono K: Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures, *Clin. Orthop.*, 186, 231-239, (1984).

Knutsen G, Engebresten L, Ludvigsen TC, et al. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomised trial. *J Bone Joint surg Am.*; 86-A(3) :455-64, (2004 Mar).

Kumagai K, Saito T, Koshino T. Articular repair of rabbit chondral defect : promoted by creation of periarticular bony defect. *J Orthop Sci.*; 8(5) :700-6, (2003).

LaPrade RF. Autologous chondrocyte implantation was superior to mosaicplasty for repair of articular cartilage defects in the knee at one year. *J Bone Joint surg Br.*; 85(2) :223-30, (2003).

Litzke LE, Wagner E, Baumgaertner W, Hetel U, Josimovic-Alasevic O, Libera J, Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autolous chondrocyte transplantation, *Ann. Biomed. Eng.*, 32(1), 57-69, (2004).

MacGinitie LA, Gluzband YA, Grodzinsky AJ: Electric field stimulation can increase protein synthesis in articular cartilage explants. *J. Orthop. Res.*, 12(2), 151-160, (1994).

Mainil-Varlet P., Aigner T., Brittberg M., et al. The International Cartilage Repair Society (ICRS)-Histological Visual Scale. A Preliminary Report of the Histological End Point Committee. *European Cells and Materials Vol.4. Suppl.1*, 10,(2002).

Mallein-Gerin F, and van der Rest M: La culture de chondrocytes: outill d'analyse de la différenciation et de l'organisation moléculaire du cartilage. *Médecine /Sciences*, 12, 1087-1096, (1996).

Marcelino J, McDevitt CA : Attachment of articular cartilage chondrocytes to the tissue form of type VI collagen, *Biochem. Biophys. Acta*, 1249, 180-188, (1995).

Maroudas, Mizrahi J, Katz EP, Wachtel EJ, Soudry M: Physiochemical proprieties and functional behaviour of normal and ostéoarthritis humain cartilage, *Articular Cartilage Biochemistry* 3^o edition, Kuttener K, Schleyerbach R, Hascail VC, eds. Raven Press, New York, (1986).

Martin L, Padera RF, Vunjak-Novakovic G, Freed LE: In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous and bone- like tissues. *J. Orthop. Res.*, 16, 181-189, (1998).

Mayne R, Brewton RG: New members of the collagen superfamily. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5(5), 883-890, (1993).

Meinhart J, Fussenegger M, Höbling W: Stabilization of fibrin-chondrocyte constructs for cartilage reconstruction. *Ann Plast Surg*, 42, 673-678, (1999), 40, 413-421, (1998).

Michel B: introduction in Chondroïtin sulfate: update in Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 6, 2, (1998).

Mollenhauer J, Bee JA, Lizarde MA, van der Mark K: Role of anchorine CII, a 31000mol-wt membrane protein in the interaction of chondrocytes with the type II collagen. *J. Cell. Biol.*, 98,1572-1579, (1984).

Muir H, Hardingham TE: Cartilage matrix biochemistry. Textbook of Rheumatic Disease, Scott JT copeman's eds. Churchill Livingstone, Edinburgh, 177-198, (1986).

Obradovic B, Carrier RL, Vunjak-Novakovic G, and Free LE: Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 200-205, (1999).

O'Driscoll SW, Fitzsimmons JS, Commisso CN: Role of oxygen tension during cartilage formation by periostum. *J. Orthop. Res.*, 15(5),682-687,(1997).

Oemega T, and Thompson R: Histology and pathobiochemistry of the cartilage-bone in osteoarthritis. In Osteoarthritis disorders, K. Kuettner and V. Goldberg, eds. (Rosemond, Illinois: *The American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 205-217, (1995).

Otsuka Y, Mizuta H, Takagi K, et al.: Requirement of fibroblast growth factor signalling for regeneration of epiphyseal morphology in rabbit full-thickness defects of articular cartilage, *Develop. Growth. Differ.*, 39, 143-156,(1997).

Reed SC, Jackson RW, Glossop N, Randle J: An in vivo study of the effect of exciter laser irradiation on degenerate rabbit articular cartilage. *Arthroscopy*, 10,78-84,(1994).

Roach II, Erenpreisa J, Aigner T: Osteogenic differentiation of hypertrophy chondrocytes involves assymetric. Cell. Divisions and apoptosis, *J. Cell. Biol.*,131,483-494,(1995).

Robins SP: Functionnal properties of collagen and elastin. *Bailer's Clinical Rheumatology*, 2,1-35,(1988).

Ronzière MC, Ricard-Blum S, Tiollier J, Hartmann DJ, Garrone R, Herbage D: Comparative analysis of collagen solubilized from human foetal and normal and osteoarthritis adult cartilage, with emphasis on type VI collagen. *Biochim. Biophys. Acta*, 1038,222-230, (1993).

Roth V, Mow VC: The intrinsic tensile behaviour of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. *J. Bone nad. Joint Surg* 62A, 1102-1117,(1980).

Roughley PJ, Lee ER: Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc. Res. And Tech.*, 28, 385-397, (1994).

Sandy J: Extracellular metabolism of aggrecan. In *Articular cartilage and osteoarthritis*, K. Kuttener, R. Schleyerbach, J. Peyron and V. Hascail, eds, Raven Press, New York, 1-5,(1992).

Schmid T, Popp R and linsenmeyer T: Hypertrophic cartilage matrix: type X collagen, supramolecular assembly, and calcification. *Ann. NY Acad. Sci.*, 580,64-73,(1990).

Seradge H, Kutz JA, Kleinert HE, Lister GD, Wolff TW, Astasoy E: Perichondrial resurfacing arthroplasty in the hand. *J. Hand Surg. (Br)*, 9A,880-886,(1984).

Smith MM, Ghosh P: The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblast is influenced by the nature of the hyaluronate in the intracellular environment. *Rheumatol. Internat.*,7,113-122,(1987).

Sommarin Y, Larsson t, and heinegard D : Chondrocyte-matrix interactions. *Exp. Cell. Res.*, 184, 181-192, (1989).

Szeparowicz P, Popko J, Sawicki B, Wolczynski I, Biernacki M : Comparison of cartilage self repairs and repairs with costal and articular chondrocyte transplantation in treatment of cartilage defects in rats, *Rocz Akad Med Białymst*, 49 Suppl 1:28-30, (2004).

Tiraldo G, Girard C, Chouinard L, Sampalis J, Moquin L, Ionescu M, Reiner A, Poole AR, Laverty S : Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis, *Arthritis Rheum*, 52(4):1118-1128, (2005).

Urban JP, Hall AC, Gehl KA: Regulation of matrix synthesis rates by the ionic and osmotic environment of articular chondrocytes. *J. Cell. Physiol.*, 154(2), 262-270, (1993).

Van der Rest M, and Garrone R: Collagen family of proteins. *FASEB J.*, 5, 2814-2823, (1991).

Van Susante JLC, Buma P, Scudman L, Homminga GN, Van den Berg W, Veth RPH: Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat, *Biomaterials*, 1167-1175, (1999)

Visna P, Pasa L, Hart R, Kocis J, Cizmar I, Adler J. [In Process Citation]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.*; 70(6) :356-62, (2003).

Vunjak-Novakovic G, Martin I, Treppo BO, Grodzinsky AJ, Langer R, Freed LE : Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage, *J. Orthop. Res.*, 17, 130-138, (1999)

Walsh DA : Angiogenesis in osteoarthritis and spondylosis: successful repair with undesirable outcomes, *Curr. Opin. Rheumatol.*, 16(5), 609-15, (2004).

Yamaguchi Y, Mann DM, Ruolathi E: Negative regulation of transforming factor- β by the proteoglycan decorin. *Nature*, 346,281-284, (1990).

Yanagishita M: Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathologica Japonica*, 43,283-293, (1993).

Yang GY, Lu SB, Wang JF. Long-term clinical observation on the repair of large articular cartilage defects on the hip and the knee with autologeous periosteum ; *ZhongguoXiuFu Chong Jian Wai Ke ZA Zhi.*; 18(1) :8-11. (2004 Jan).

Ysart GE, Mason RM: Responses of articular cartilage explant cultures to different oxygen tensions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1221(1),15-20,(1994).

ANNEXE 1: TABLEAU DES LESIONS MACROSCOPIQUES. (© C. Clément-Bouheddi)

Témoin I: Lésion 4mm/ Témoin II: Lésion 6mm/ Bériplast + VP: Lésion 6mm implantée avec Bériplast® et volet périosté/ Bériplast I: Lésion 4mm implantée avec Bériplast®/ Bériplast II: Lésion 6mm implantée avec Bériplast®

R 095					
M 95					
214					
58					
44					
232					
2387					
7015					
20930					
	Témoin I	Témoin II	Bériplast + VP	Bériplast I	Bériplast II

ANNEXE 2: PHOTOS DES COUPES HISTOLOGIQUES DES LÉSIONS (© A.Bouheddi)

COLORATION HPS. GROSSISSEMENT X 100

Photos des coupes histologiques des brebis à un mois:



Témoin I
Brebis 20930

Témoin II

Bériplast+VP

Bériplast I

Bériplast II



Témoin I
Brebis 7015

Témoin II

Bériplast+VP

Bériplast I

Bériplast II



Témoin I
Brebis 2387

Témoin II

Bériplast+VP

Bériplast I

Bériplast II

Genou droit:

Témoin I : lésion 4 mm

Témoin II : lésion 6 mm

Genou gauche:

Bériplast +VP : lésion 6 mm implantée avec Bériplast® et volet périosté

Bériplast I : lésion 4 mm implantée avec Bériplast®

Bériplast II : lésion 6 mm implantée avec Bériplast®

Photos des coupes histologiques des lésions à 3 mois:



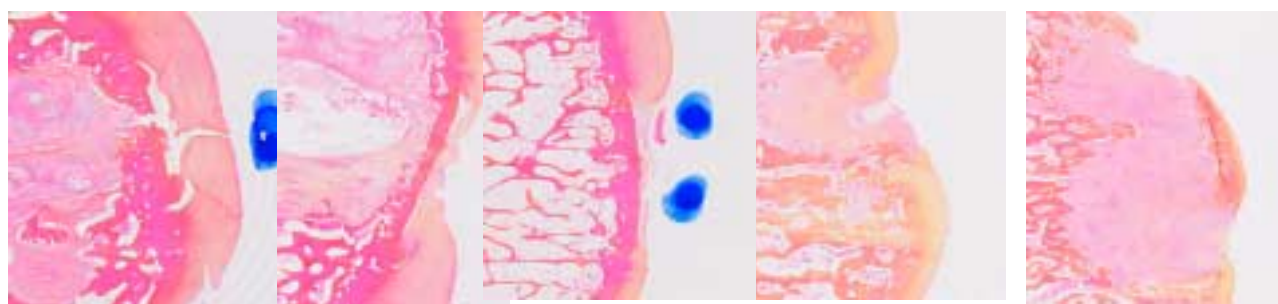
Témoin I
Brebis 232

Témoin II

Bériplast+VP

Bériplast I

Bériplast II



Témoin I
Brebis 44

Témoin II

Bériplast+VP

Bériplast I

Bériplast II



Témoin I
Brebis 58

Témoin II

Bériplast+VP

Bériplast I

Bériplast II

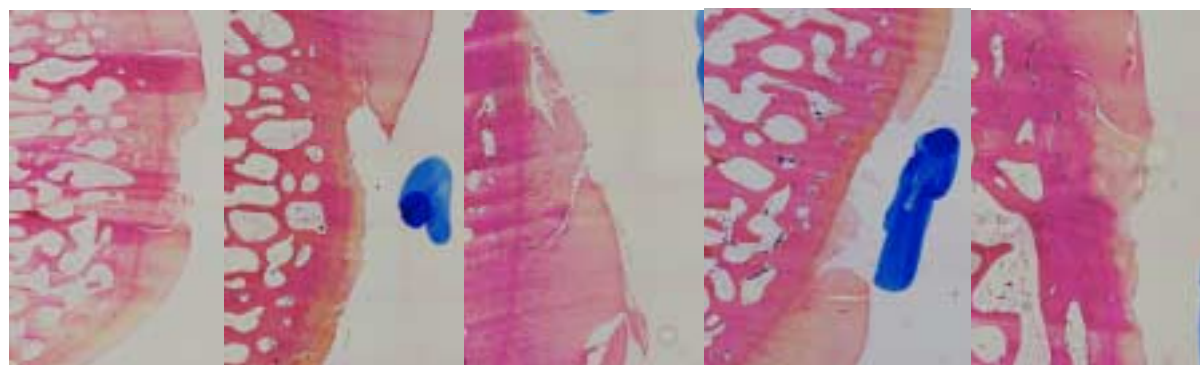
Genou droit:

Témoin I : lésion 4 mm
Témoin II : lésion 6 mm

Genou gauche:

Bériplast + VP : lésion 6 mm implantée avec Bériplast® et volet périosté
Bériplast I : lésion 4 mm implantée avec Bériplast®
Bériplast II : lésion 6 mm implantée avec Bériplast®

Photos des coupes histologiques des lésions à 6 mois.



Témoin I
Brebis 214

Témoin II

Bériplast + VP

Bériplast I

Bériplast II



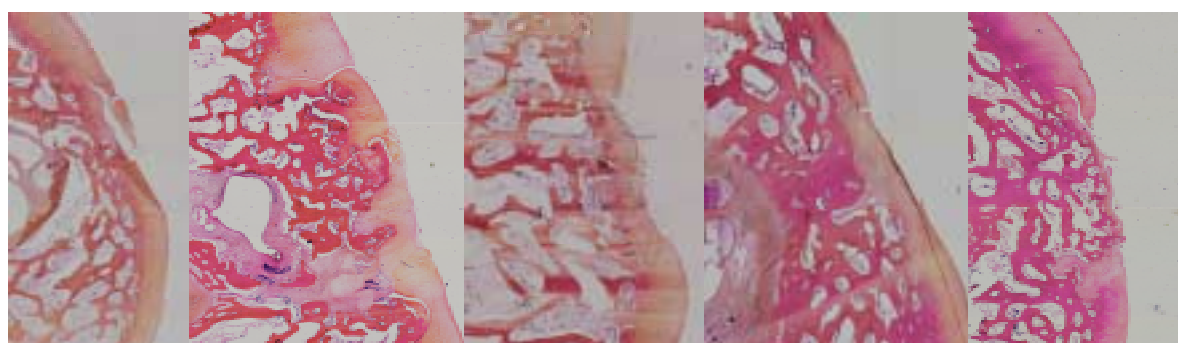
Témoin I
Brebis M 95

Témoin II

Bériplast + VP

Bériplast I

Bériplast II



Témoin I
Brebis R 095

Témoin II

Bériplast + VP

Bériplast I

Bériplast II

Genou droit:

Témoin I : lésion 4 mm

Témoin II : lésion 6 mm

Genou gauche:

Bériplast + VP : lésion 6 mm implantée avec Bériplast® et volet périosté

Bériplast I : lésion 4 mm implantée avec Bériplast®

Bériplast II : lésion 6 mm implantée avec Bériplast®

NOM PRENOM : CLEMENT-BOUHEDDI CAROLINE

TITRE : CONTRIBUTION A L'ETUDE DU TRAITEMENT DU CARTILAGE FEMORAL PAR GREFFE DE CHONDROCYTES DANS UNE COLLE DE FIBRINE

Thèse Vétérinaire : Lyon , 7 décembre 2005.

RESUME :

L'objectif de cette étude était de mettre au point un protocole expérimental chez le mouton permettant la réparation des lésions de cartilage en vue d'une application chez l'homme. Les chondrocytes ensemencés dans une colle de fibrine ont été implantés dans des défauts cartilagineux, avec ou sans volet périosté, au niveau de l'articulation du genou. La procédure de culture de chondrocytes humains a été appliquée à celle de chondrocytes extraits de cartilage de brebis provenant du condyle huméral latéral. Les prélèvements ont été effectués à 1, 3 et 6 mois après implantation. Les résultats ont été interprétés macroscopiquement et histologiquement selon le grade ICRS. Les défauts implantés ont obtenu de meilleurs résultats macroscopiques que les témoins, mais sur le plan histologique, il n'a été observé que du fibrocartilage. La colle de fibrine semble ne pas être un biomatériau adéquat pour la réparation des lésions cartilagineuses.

MOTS CLES :

**-Arthrose
-Chondrocytes
-Cartilage
-Greffe**

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur CARRET
1er Assesseur :	Monsieur le Professeur VIGUIER
2ème Assesseur :	Monsieur le Professeur FAU

DATE DE SOUTENANCE :

7 décembre 2005

ADRESSE DE L'AUTEUR :

20, rue du Docteur Casati
63170 AUBIERE