

Titre: Étude de l'angiogenèse et de la distribution des cellules souches mésenchymateuses dans des défauts ostéochondraux chez le lapin
Title: mesenchymateuses dans des défauts ostéochondraux chez le lapin

Auteur: Colleen Mathieu
Author:

Date: 2012

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Mathieu, C. (2012). Étude de l'angiogenèse et de la distribution des cellules souches mésenchymateuses dans des défauts ostéochondraux chez le lapin
Citation: [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/1061/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1061/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Caroline D. Hoemann
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE DE L'ANGIOGENÈSE ET DE LA DISTRIBUTION DES CELLULES
SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES DANS DES DÉFAUTS
OSTÉOCHONDRAUX CHEZ LE LAPIN

COLLEEN MATHIEU

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)
DÉCEMBRE 2012

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

ÉTUDE DE L'ANGIOGENÈSE ET DE LA DISTRIBUTION DES CELLULES SOUCHES
MÉSENCHYMATEUSES DANS DES DÉFAUTS OSTÉOCHONDRAUX CHEZ LE LAPIN

présenté par : MATHIEU Colleen

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès Sciences Appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. BUSCHMANN Michael, Ph.D, président

Mme HOEMANN Caroline, Ph.D, membre et directrice de recherche

M. CALDERONE Angelo, Ph.D, membre

DÉDICACE

à ma mère, mon père, ma sœur et mon frère,

à ma famille et mes amis des deux continents

REMERCIEMENTS

À ma directrice, Caroline Hoemann :

Merci de m'avoir offert cette opportunité de travailler avec vous sur les techniques de réparation du cartilage, un domaine de recherche des plus passionnantes;

Merci pour votre motivation, votre enthousiasme, votre appui et votre patience tout au long de mon projet, ainsi que pour vos nombreux conseils;

Merci d'avoir cru en mon potentiel et de m'avoir permis de présenter mes résultats dans le cadre des congrès CCTC et ICRS à Montréal, ainsi qu'au congrès CS&SCR à Philadelphie;

Merci tout simplement pour le savoir et le savoir-faire que vous m'avez offert.

Aux membres du Jury, Dr. Michael Buschmann & Dr. Angelo Calderone :

Mes sincères remerciements pour le temps et les efforts investis dans l'évaluation critique de mon travail.

À nos collaborateurs :

Pour leurs judicieux conseils à différentes étapes de ce projet de maitrise, merci à :

Dr. Georges-Étienne Rivard, *CHU Sainte-Justine, Montréal, QC*

Dr. Hani El-Gabalawy, *University of Manitoba, Winnipeg, MB*

À mes collègues et amis du Laboratoire du JAB :

Pour leurs contributions techniques indispensables au cours de mon projet de maîtrise, de nombreux conseils techniques et l'aide avec l'interprétation de certaines données,
merci à Gaoping Chen et Viorica Lascau-coman

Pour un soutien incontestable au cours de ma maîtrise et leur sympathique compagnie au
Laboratoire, merci à

Anik Chevrier	Monica Nelea
David Fong	Geneviève Picard
Jessica Guzmán-Morales	Nicolas Tran-Khanh
Charles-Hubert Lafantaisie-Favreau	Julie Tremblay

Au reste de l'équipe de la Chaire de recherche en génie tissulaire :

Pour les agréables moments passés ensemble, pour les connaissances partagées et pour
votre compagnie au laboratoire ou encore autour d'un café, merci à

Mohamad-Gabriel Alameh	Adele Changoor	Rabeb Mouna Derbali
Marianne Ariganello	Hongmei Chen	Vincent Pickenhahn
Rosa Beig Agah	Vincent Darras	Isabelle Richard
Mohamed Benhammadi	Xian Li	Jun Sun
Simon Bolduc-Beaudoin	Diogo Lopes De Jesus	Daniel Veilleux
Yuan Chang	Catherine Marchand	

À ma famille :

Merci à ma famille de m'avoir appuyé dans mes études et de m'avoir toujours encouragé
à me dépasser;

Merci encore à mes parents de m'avoir appuyé dans mon choix d'entreprendre mes études
à 6000 km de la maison;

Merci à mon grand-père, qui éprouve tant de fierté pour les études que j'ai accomplies.

RÉSUMÉ

Les défis majeurs de la recherche orthopédique actuelle sont la restauration, le maintien et l'amélioration des tissus du système musculo-squelettique, afin de remédier aux déficiences causées par des maladies, telles que l'arthrite rhumatoïde et l'arthrose. En 2011, plus de 16 % de la population canadienne recensée souffrait de ces maladies, ayant donc à endurer des douleurs articulaires et une mobilité réduite des articulations affectées.

À cause de l'absence de vaisseaux sanguins dans le cartilage et la faible densité cellulaire, le processus de réparation tissulaire n'est amorcé que difficilement au niveau de lésions du cartilage. Diverses techniques chirurgicales ont donc été développées pour stimuler la réparation ou la régénération du cartilage, incluant par exemple les transplantations de chondrocytes autologues et les techniques de stimulation de la moelle osseuse. Ces dernières sont parmi les plus utilisées et la stimulation de la moelle osseuse définit des techniques chirurgicales basées sur la microfracture ou la micropéforation du cartilage et de l'os sous-jacent. Dans ce cas, la réparation est possible grâce à la création de canaux, qui permet la formation d'un caillot sanguin et l'infiltration des cellules souches mésenchymateuses, à partir des dommages causés au système vasculaire de l'os sous-chondral. Cependant, de nombreuses études ont démontré que le cartilage résultant était un mélange de cartilage hyalin et de cartilage fibreux, dont les propriétés mécaniques sont insuffisantes pour restaurer la mobilité initiale de l'articulation.

Comme montrée dans de précédents travaux entrepris au laboratoire, la combinaison des techniques de micropéforation avec un implant composé de chitosan, de glycéroolphosphate et de sang autologue permet d'améliorer la qualité du cartilage réparé. Ceci est possible grâce au recrutement de plusieurs populations cellulaires au site de la lésion, comme les neutrophiles et les macrophages, et à travers divers mécanismes biologiques, incluant l'angiogenèse et la chondrogenèse.

Il a été démontré que la solidification *in situ* de l'implant pouvait être accélérée par l'ajout de facteurs de coagulation. Les facteurs testés sont la thrombine (IIa), le facteur VIIa recombiné humain (rhFVIIa) et le facteur tissulaire (TF). Ils ont été ajoutés à l'implant chitosan-GP/sang, afin d'accélérer la solidification *in situ* au cours de l'application clinique, qui pourrait rendre possible la livraison de l'implant par arthroscopie.

Dans un modèle lapin de microperforation, l'implant chitosan-GP/sang solidifié *in situ* par la thrombine permet d'améliorer la qualité du cartilage réparé vis-avis la thrombine seule (Marchand et al., 2012). Cependant, l'effet précis des facteurs de coagulation sur l'angiogenèse et les mécanismes de réparation tissulaire doivent encore être étudiés. Dans cette étude, les deux hypothèses suivantes sont posées :

- L'ajout de facteurs de coagulation, notamment la thrombine (IIa), le facteur VIIa recombiné humain (rhFVIIa) et le facteur tissulaire (TF) + rhFVIIa, à la solution de chitosan, de glycéroolphosphate et de sang autologue, engendre plus d'angiogenèse dans l'os sous-chondral des microperforations en réparation par rapport à la microperforation seule, à 3 semaines postchirurgie dans un modèle lapin de la stimulation de la moelle.
- L'utilisation de l'implant chitosan-GP/sang, avec les techniques de stimulation de la moelle osseuse, attire un plus grand nombre de cellules souches mésenchymateuses (MSC) aux lésions microperforées, comparativement à l'utilisation des techniques de stimulation de la moelle osseuse seules.

Pour répondre à ces hypothèses, les objectifs de cette étude sont les suivants :

- Évaluer l'effet de l'implant chitosan-GP/sang coagulé dans la lésion avec la thrombine (IIa), du facteur VIIa recombiné humain (rhFVIIa) et du facteur tissulaire (TF) + rhFVIIa sur la réparation du cartilage induite par la microperforation, par rapport à la microperforation seule, à partir de la quantification stéréographique des vaisseaux sanguins et des données histomorphométriques de la matrice extracellulaire du tissu de granulation;
- Proposer des anticorps qui se lient aux cellules souches humaines et qui peuvent être utilisés en immunohistochimie pour détecter des MSC dans les tissus de lapin NZW et dans des coupes ostéochondrales;
- Localiser les MSC dans les lésions microperforées dans le cartilage, pour une meilleure compréhension du processus de réparation du cartilage.

Dans la première partie de ce projet de mémoire, l'effet de l'implant chitosan-GP/sang avec ou sans un facteur de coagulation a été étudié à travers une méthode stéréographique. Cette

dernière permet de récolter des données quantitatives reproductibles, qui peuvent être comparées aux données d'études passées et d'études futures. L'augmentation de la densité de surface et de volume des vaisseaux sanguins pour des implants avec IIa ou rhFVIIa ajouté montrent que ces facteurs de coagulation peuvent stimuler plus d'angiogenèse dans l'os sous-chondral au cours de la réparation induite par microperforation. Il a également été démontré que l'implant chitosan-GP/sang retarde le dépôt des fibres de collagènes (de type I et de type II) dans la matrice extracellulaire.

Dans la deuxième partie de ce mémoire, les anticorps contre la β -caténin, la nestin et l'actine α SMA ont été utilisés pour des tests d'immunohistochimie, afin de détecter les cellules souches mésenchymateuses dans les tissus d'études animales *in vivo*. Malgré l'absence de signal positif avec les anticorps anti- β -caténin et anti-nestin, l'actine α SMA a été détectée dans divers tissus du lapin NZW, incluant les tissus fœtaux, les tissus adultes du foie, du poumon, de la peau, du placenta, de la trochlée intacte ou en réparation. Les résultats obtenus dans les tissus de trochlée en réparation montrent que les cellules exprimant l'actine α SMA sont localisées sur les bords de la microperforation, ainsi qu'à la surface du tissu de granulation. Bien que des tests supplémentaires soient nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes impliquant les MSC, les colorations IHC effectuées indiquent que les cellules α SMA-positives sont des « bone lining cells » et qu'elles sont impliquées dans le processus de remodelage et réparation de l'os, et dans les « pre-chondrogenic foci » survenant à l'intersection du tissu de granulation et de l'os nouvellement formé. Les pre-chondrogenic foci, qui sont formés à la surface des plaques sous-chondrales, sont les structures précoce du cartilage articulaire régénéré.

Dans son ensemble, cette étude a permis des informations supplémentaires sur l'implication de l'angiogenèse et des cellules souches mésenchymateuses lors de la réparation du cartilage et de l'os sous-chondral. Elle bénéficie aux progrès de la recherche dans ce domaine en démontrant que l'angiogenèse et les MSC sont des éléments détectable et quantifiable dans le tissu de granulation des lésions microperforées du cartilage, avant l'émergence des « chondrogenic foci ». Des études futures devraient être en mesure d'optimiser l'implant chitosan-GP/sang par la sélection d'additifs, comme les facteurs de coagulation, qui peuvent améliorer l'efficacité et la durabilité de la réparation du cartilage. L'un des buts majeurs est de pouvoir engendrer la formation d'un cartilage « purement » hyalin à travers la promotion de l'angiogenèse et du recrutement des MSC pour restituer le cartilage à son état sain initial.

ABSTRACT

The major challenges of current orthopedic research are the restitution, preservation and improvement of the musculoskeletal system, in treating degenerative diseases such as osteoarthritis and rheumatoid arthritis. In 2011, these diseases affected more than 16% of the population in Canada, leading patients to suffer articular pain and reduced mobility of the joint.

The absence of repair in focal lesions of articular cartilage can be explained by the avascular nature of the cartilage tissue and its low cellular density. Hence various surgical techniques were developed to trigger the repair of the cartilage and the subchondral bone, as for example autologous chondrocyte transplantation or bone marrow stimulation. The latter surgical technique uses microfracture or microdrilling in the cartilage and bone tissues and is one of the most commonly used. It creates access channels to the subchondral bone to allow the formation *in situ* of a blood clot and the migration of mesenchymal stem cells, through the rupture of subchondral vasculature. But studies have shown that the produced cartilage is a mixture of fibrous and hyaline cartilage, which cannot sustain the same loads as intact hyaline cartilage in the joint. Thus a chitosan-based implant was developed to induce more hyaline cartilage repair and ensure the residency of the otherwise fragile blood clot in the cartilage defect.

Previous work in our laboratory has shown that combining bone marrow stimulation techniques with a solution of chitosan, glycerol phosphate and autologous blood enhances the cartilage quality through mechanisms involving various cellular populations, such as neutrophils and macrophages, and different repair processes, such as angiogenesis and chondroinduction.

It was shown that the *in situ* solidification of the chitosan-GP/blood implant can be accelerated by the addition of the coagulation factors, such as thrombin (IIa), tissue factor (TF) and recombinant human Factor VIIa (rhFVIIa). These coagulation factors were added to the chitosan-based implant to accelerate *in situ* solidification of the implant for clinical application, which could potentially allow implant delivery by arthroscopic injection.

In a rabbit microdrill model, thrombin-solidified implant improved cartilage repair over thrombin-treatment alone. However, the precise effect of coagulation factors on angiogenesis and the repair process has yet to be elucidated. Thus, the purpose of this study was to test the following two hypotheses:

- The addition of coagulation factors, including thrombin (IIa), tissue factor (TF) and recombinant human Factor VIIa (rhFVIIa), to the chitosan-GP/blood implant enhances subchondral angiogenesis in repairing microdrilled defects, compared to microdrilling alone, at 3 weeks post-operative in a rabbit model of cartilage repair.
- The use of a chitosan-GP/blood implant with microdrilling attracts more mesenchymal stem cells to the microdrilled cartilage defect, in comparison to bone marrow stimulation techniques alone.

To test these hypotheses, the study's principal aims were:

- To evaluate the effect of the chitosan-GP/blood implant coagulated in the microdrilled lesion with coagulation factors, including thrombin (IIa), tissue factor (TF) + rhFVIIa and recombinant human Factor VIIa (rhFVIIa), on cartilage repair compared to microdrilling-alone, through blood vessel stereology and extracellular matrix histomorphometry data;
- To identify the antibodies that recognize human stem cell markers that can be used for immunohistochemistry in NZW rabbit tissues and ostéochondral samples;
- To locate the MSC in the microdrilled defects and to better understand the cartilage repair process.

In the first part of this study, the effect of the chitosan-GP/blood implant with or without added coagulation factor was investigated through a stereological method. It results in quantitative reproducible data, which allows comparison to data from previous and future studies. The observed increase in blood vessel surface and volume density for implant with either thrombin or recombinant factor rhFVIIa, indicates that these coagulation factors enhance subchondral angiogenesis in the chitosan-induced cartilage repair. It is also shown that the chitosan-GP/blood implant delays collagen (type I and type II) deposition in the extracellular matrix.

In the second part of this study, antibodies for β -catenin, nestin and α SMA were used in immunohistochemistry tests in rabbit tissues in order to detect mesenchymal stem cells in tissues collected from *in vivo* studies. Although positive signals for β -catenin and nestin were not obtained, α SMA was detected in various tissues, including foetal tissue, adult lung, skin, liver,

placenta, ostéochondral repairing and intact tissue from NZW rabbit animal models. Results in repairing ostéochondral tissue also demonstrated the presence of α SMA expressing cells at the edges of the microperforated subchondral bone defect and at the surface of the granulation tissue in NZW rabbit ostéochondral sections. Further tests would be necessary to full understand the mechanisms implicating mesenchymal stem cells, but the IHC results do show that α SMA expressing cells are bone lining cells and that they are implicated in the bone remodelling and repair processes, and are present in “pre-chondrogenic foci” structures occurring at the interface between the granulation tissue and the newly formed bone. Chondrogenic foci that form along the repairing subchondral bone plate are the precursor structures that regenerate hyaline articular cartilage.

Altogether, this study allowed a better understanding of the implication of angiogenesis and mesenchymal stem cells in subchondral bone and cartilage repair. It benefits research in the field, as it shows that angiogenesis and mesenchymal stem cells are important process that can be located and quantified in the drilled defect granulation tissue, before the emergence of chondrogenic foci. Future studies should be able to determine which additive, such as coagulation factor, can enhance the chitosan-GP/blood implant efficiency and generation “pure” articular cartilage through the promotion of subchondral angiogenesis and mesenchymal stem cell recruitment in repairing drilled defects.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	IX
TABLE DES MATIÈRES	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XVI
LISTE DES FIGURES	XVII
LISTE DES ÉQUATIONS.....	XX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXI
LISTE DES ANNEXES	XXIII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE	4
1.1 Les tissus « squelettiques »	4
1.1.1 Le cartilage articulaire.....	4
1.1.2 L'os.....	10
1.1.3 Développement du cartilage articulaire et des os.....	14
1.2 La Réparation tissulaire.....	17
1.2.1 Les étapes générales, exemple de réparation tissulaire pour les lésions cutanées	17
1.2.2 Réparation dans l'os et le cartilage	20
1.3 Arthrites.....	22
1.3.1 Maladies dégénératives du cartilage	22
1.3.2 Arthrose dans le genou.....	23
1.4 Génie tissulaire - Implant chitosan-GP/blood	25

1.4.1	Le Chitosan et son effet sur la réparation tissulaire	25
1.4.2	Modèle animal <i>in vivo</i> : le lapin.....	26
1.4.3	Techniques de quantification et leurs limites	27
CHAPITRE 2	DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT	33
2.1	Hypothèse générale du mémoire	34
2.1.1	Objectifs généraux du mémoire	34
2.2	Hypothèses spécifiques de l'article	34
2.2.1	Objectifs spécifiques de l'article	35
2.3	Hypothèses spécifiques de l'étude de détection des MSC	35
2.3.1	Objectifs spécifiques de cette étude	36
CHAPITRE 3	STEREOLOGICAL ANALYSIS OF SUBCHONDRAL ANGIOGENESIS INDUCED BY CHITOSAN AND COAGULATION FACTORS IN MICRODRILLED ARTICULAR CARTIAGE DEFECTS	37
3.1	Présentation de l'article	38
3.2	Abstract	39
3.3	Key words:	39
3.4	Introduction	40
3.5	Materials and Methods	42
3.5.1	Materials and implant generation	42
3.5.2	<i>In vivo</i> articular bone marrow stimulation rabbit model.....	43
3.5.3	Histology	44
3.5.4	Blood vessel stereology.....	45
3.5.5	Histomorphometric analysis of repair tissue collagen type II, collagen type I and GAG content	47

3.5.6 Statistical analysis	48
3.6 Results	48
3.6.1 Blood vessel stereology an effect of clotting factors on angiogenesis.....	48
3.6.2 Chitosan implant and thrombin delayed drill hole bone repair and chitosan implant delayed collagen deposition	53
3.7 Discussion	56
3.8 Acknowledgements	59
3.9 Role of the authors	59
3.10 Role of the funding source	59
3.11 Conflict of Interest Statement	60
3.12 References	60
CHAPITRE 4 DÉTECTION DES CELLULES STROMALES ET DES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSE PAR IMMUNOHISTOCHIMIE	65
4.1 Introduction	65
4.2 Matériels et méthodes.....	66
4.2.1 Études <i>in vivo</i> de réparation du cartilage chez le lapin et <i>in vivo</i> des tissus des fœtus lapin	66
4.2.2 Matériels	68
4.2.3 Histologie et procédure d'immunohistochimie	69
4.3 Résultats	72
4.3.1 β -catenin et nestin (Rat-401) ne sont pas détectés dans les tissus ostéochondraux de Lapin NZW ou les cultures de cellules primaires MSC humaines	72
4.3.2 Immunohistochimie avec la nestin (10C2) donne un signal positif dans le placenta de lapin NZW et un signal négatif dans les tissus fœtaux 22J et adulte de lapin NZW.	74
4.3.3 α SMA est détectée dans une variété de tissus fœtaux et adultes de lapin NZW.....	76

4.3.4 αSMA est détecté dans les précurseurs des « chondrogenic Foci » attachés aux parois du défaut ostéochondraux en réparation dans un modèle <i>in vivo</i> de lapin NZW	81
CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE	90
CONCLUSION	93
RÉFÉRENCES	95
ANNEXES	106

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1. Experimental design of the in vivo cartilage repair study 21 days post-operative in NZW Rabbit, with alternating left-right treated knee.	42
Tableau 3.2 : Experimental design for the analysis of angiogenesis in the two distal holes of each cartilage defect.	45
Tableau 4.1 : Description des tissus analysés par immunohistochimie pour la présence de MSC	67
Tableau 4. 2 : Listes des anticorps sélectionnés pour la détection des MSC par IHC et témoins	69
Tableau 4. 3 : Liste des tests IHC effectués pour la détection de β -catenin et nestin (Rat-401) dans les tissus de lapin NZW et les cellules primaires MSC humaines.	72
Tableau 4.4 : Détails du test IHC effectué avec l'anticorps anti-nestin (10C2).	74
Tableau 4. 5 : Liste des tests IHC effectués et des conditions ajustées dans les tissus fœtaux et adulte de lapin NZW et des biopsies de tissus humains.....	76

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 : Schéma du squelette et des différents types de cartilage dans le corps humain. Image publiée dans le livre de référence (Marieb & Hoehn, 2010). Le cartilage hyalin ou articulaire est représenté en bleu, le cartilage élastique en vert et le cartilage fibreux en rouge.	5
Figure 1-2 : Schéma de la structure moléculaire des protéoglycane. Image publiée dans l'article (Gray, Standring, Ellis, & Berkovitz, 2005)	7
Figure 1-3 : Schéma de la structure du cartilage articulaire avec l'organisation spatiale des fibres de collagènes. Image modifiée et publiée dans (Junqueira & Mescher, 2010).....	9
Figure 1-4 : Schéma de la structure d'un os long et des tissus osseux qui le compose, l'os compact et l'os spongieux. Image publiée dans le livre (Marieb & Hoehn, 2010).....	11
Figure 1-5 : Schéma de l'organisation cellulaire au cours du remodelage du tissu osseux. Image publiée et modifiée dans l'article (Fuchs et al., 2009).	13
Figure 1-6 : Schéma de la section transversale d'un embryon de souris après la phase de gastrulation avec l'organisation du mésoderme, de l'ectoderme et de l'endoderme. Schéma également indiquant l'origine tissulaire des principaux composants du squelette. Image publiée dans le chapitre de livre (Lories & Luyten, 2013).....	14
Figure 1-7 : Schéma des étapes du développement des os longs. Image publiée dans (Junqueira & Mescher, 2010).....	16
Figure 1-8 : Schéma des voies de coagulation du sang. Image publiée dans l'article (Davie, 2003; Davie, Fujikawa, & Kisiel, 1991)	18
Figure 3-1 : Articular cartilage repair model before and after coagulation factor-enhanced implant delivery.....	44
Figure 3-2 : Stereological analysis of blood vessels.	47
Figure 3-3 : Macroscopic defect appearance and corresponding microscopic features.....	49
Figure 3-4 : Depth-dependent variation in blood vessel density in repairing drill holes.	52
Figure 3-5 : Average blood vessel densities of all depths and conditions for <i>Top-down</i> measures of Lv (A), Vv (B) and Sv (Castello's method, C and Griffith's method, D) for drill only	

(Drl), chitosan implant only (Imp), and implant solidified with rhFVIIa (rhFVIIa), tissue factor and rhFVIIa (TF+VIIa) or thrombin (IIa).....	53
Figure 3-6 : Histomorphometry of GAG, Col-I and Col-II in the drill hole granulation tissue at 21 days post-operative.....	55
Figure 3-7 : Blood vessel localisation and collagen type I and type II deposition.....	56
Figure 4-1 : Schéma des interactions entre les éléments de la méthode Avidin-Biotine (Key, 2009).....	71
Figure 4-2 : Photo au microscope optique, des résultats obtenus avec l'IHC usant les anticorps β -catenin (PY654, DSHB) et Nestin (Rat-401, DSHB). Aucun signal spécifique aux antigènes ciblés n'a pu être observé.....	73
Figure 4-3 : Image au microscope optique de l'IHC avec l'anticorps anti-nestin (10C2) dans des biopsies de tissu humain et de lapin NZW adulte, utilisé comme tissus de contrôle dans de nombreuses études.....	75
Figure 4-4 : Image au microscope optique de l'IHC avec les anticorps anti-nestin (10C2) dans le tissu distal du fémur d'un fœtus 22J de lapin NZW.....	76
Figure 4-5 : Image au microscope optique de l'IHC avec l'anticorps anti- α SMA dans des biopsies de tissu de lapin NZW adulte, utilisé comme tissus de contrôle dans de nombreuses études.....	78
Figure 4-6 : Images microscopiques du test IHC d'optimisation de la contre-coloration dans un tissu de trochlée de lapin NZW.....	79
Figure 4-7 : Résultats des IHC pour la détection d' α SMA et la déposition de Col-I et Col-II dans le membre postérieur gauche des trois fœtus de lapin NZW étudié.....	80
Figure 4-8 : Schéma du motif général de coloration pour la détection d' α SMA et de déposition de Col-I et Col-II à l'extrémité distale du fémur chez un fœtus après 22 jours de gestation.	81
Figure 4-9 : Images microscopique des résultats d'IHC avec α SMA dans des coupes ostéochondrales de jeunes lapins NZW, avec la plaque de croissance. (A-C) à la surface du cartilage articulaire, (D-F) au niveau de la plaque de croissance.....	82

Figure 4-10 : Coloration par IHC avec α SMA dans une coupe sagittale de trochlée intacte (control) d'un lapin squelettiquement mature.....	83
Figure 4-11 : Images au microscope optique des cellules exprimant α SMA (A, E & I, coupe#5-26) comparativement aux colorations IHC de Col-1 (B, F & J, coupe#5-27) et de Col-2 (C, G & K, coupe#5-29), ainsi que la coloration SafO/Fast Green (D, H & L, coupe#6-3) au niveau d'un « chondrogenic Foci » émergent du tissu osseux à la base de la lésion cartilage microperforée, traitée avec l'implant chitosan-GP/sang, à 3 semaines post-chirurgicale.	84
Figure 4-12 : Images au microscope optique des cellules exprimant α SMA (A, E & I, coupe#10) comparativement aux colorations IHC de Col-1 (B, F & J, coupe#9) et de Col-2 (C, G & K, coupe#8), ainsi que la coloration SafO/Fast Green (D, H & L, coupe#1) à l'interface entre le tissu de granulation et la matrice osseuse nouvellement formée, à 3 semaines post-chirurgicale dans une lésion cartilage microperforée et traité avec rhFVIIa ajouté à l'implant chitosan-GP/sang.....	85
Figure 4-13 : Immunhistochimie avec l'anticorps anti- α SMA dans des échantillons ostéochondraux de trochlée de lapin NZW traité ou non avec un implant chitosan-GP/sang présolidifié, 3 semaines après l'opération de microperforation. Les flèches bleues indiquent le signal positif à la surface du tissu de granulation. Les flèches noires indiquent un signal positif dans les chondrocytes et les « bone lining cells » (K) ainsi que dans les cellules fusiformes (M, N & O) du tissu de granulation.	87
Figure 4-14 : Expression de l'actine α SMA à différents grossissements (A, E & I, coupe#3-6) dans un tissu de cartilage stimulé par microperforation seulement, comparé au dépôt des macromolécules de la matrice extracellulaire, Col-I (B, F & J, coupe#3-8), Col-II (C, G & K, coupe#3-11) (E) et GAG (D, H & L, coupe#3-9) au cours de l'ossification endochondrale.	88
Figure 4-15 : Immunhistochimie avec l'anticorps anti- α SMA dans des échantillons ostéochondraux de trochlée intacte d'un lapin NZW squelettiquement immature (A, E & I), ainsi que deux échantillons ostéochondraux de lapin NZW mature, le premier d'une trochlée intacte (B, F & J) et le second d'une trochlée traitée avec un implant chitosan-GP/sang, 1 jour après l'opération de microperforation (C-D, G-H & K-L).	89

LISTE DES ÉQUATIONS

Equation 1.1 : Densité de longeur.....	28
Equation 1.2 : Densité de volume	28
Equation 1.3 : Densité de surface (Castello).....	28
Equation 1.4 : Densité de surface (Griffith).....	29

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Fétus 22J	fétus à 22 jours de gestation (<i>fœtus at 22 days of gestation</i>)
ABC	Complexe Avidin-biotine (<i>avidin-biotin complex</i>)
ACT	greffe de chondrocytes autologues (<i>autologous chondrocyte transplantation</i>)
αSMA	actine alpha de muscle lisse (<i>alpha smooth muscle actin</i>)
AP-red	Avidin-biotine peroxydase « rouge » (<i>avidin-biotin peroxydase red</i>)
β-catenin	beta-caténine (<i>beta-catenin</i>)
BV	Vaisseau sanguin (<i>blood vessel</i>)
Col-I	Collagène de type I (<i>type I collagen</i>)
Col-II	Collagène de type II (<i>type II collagen</i>)
DDA	degré de désacétylation (<i>degree of deacetylation</i>)
ECM	Matrice extracellulaire (<i>extracellular matrix</i>)
GAG	Glycosaminoglycane (<i>glycosaminoglycan</i>)
GP	Disodium glycéroolphosphate (<i>β-Glycerol phosphate disodium salt</i>)
I _{BV}	Nombre d'intersections entre les parois des vaisseaux sanguins et les lignes tests <i>(Number of intersection point between the blood vessel wall and the test lines)</i>
IgG	Immunoglobuline de type G (<i>immunoglobulin G</i>)
IgM	Immunoglobuline de type M (<i>immunoglobulin M</i>)
IHC	Immunohistochimie ou immunomarquage (<i>immunohistochemistry</i>)
IIa	Alpha-Thrombine (<i>α-thrombin</i>)
Lv	Densité de longueur (<i>length density</i>)
MCP-1	(monocyte chemoattractant protein-1)
MSC	Cellule souche mésenchymateuse (<i>mesenchymal stem cell</i>)

MW	Poids moléculaire (<i>molecular weight</i>)
NZW	Lapin néo-zélandais (<i>New-Zeland White rabbit</i>)
P _{BV}	Nombre de points d'une grille contenus dans les vaisseaux sanguins (<i>Number of intersections of a grid in the blood vessels</i>)
PBS	Solution tampon phosphate saline (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PG	Protéoglycane (<i>proteoglycans</i>)
rhFVIIa	Facteur de coagulation VIIa humain recombiné (<i>recombinant human factor VIIa</i>)
RT	Température pièce (<i>room temperature</i>)
Sv	Densité de surface (<i>surface density</i>)
TF	Facteur tissulaire (<i>tissue factor</i>)
TBS	Solution tampon Tris saline (<i>Tris buffered saline</i>)
Vv	Densité de volume (<i>volume density</i>)

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 – Descriptive time-point table of embryogenesis events in NZW rabbit	106
ANNEXE 2 – Photodocumentation des fœtus de lapin NZW à la nécropsie et à la cryogénisation pour l'étude de détection des MSC.....	109
ANNEXE 3 – Acceptation du renouvellement du protocole d'expérimentation animale	110

INTRODUCTION

L'augmentation de l'espérance de vie a conduit à un nombre plus élevé de maladies dégénératives des tissus ou des organes. L'arthrite est une de ces maladies, elle a affecté plus de 4.7 millions de personnes en 2011 au Canada (Statistics Canada, 2012) et ce chiffre continue d'augmenter. On compte aujourd'hui plus de 100 variantes de cette maladie, dont le tissu ciblé est le cartilage, l'os et les autres tissus associés aux articulations synoviales, mais les plus communes sont l'arthrose et l'arthrite rhumatoïde. Bien que les mécanismes de détérioration du cartilage diffèrent, ces maladies causent des douleurs importantes dans les articulations et mènent, dans les cas les plus avancés, à une mobilité réduite de l'articulation, handicapant le patient dans ses activités quotidiennes.

Dans une articulation, le rôle du cartilage est de diminuer la friction et d'absorber les chocs lors du mouvement du squelette. Lorsque celui-ci est aminci ou détruit, comme dans le cas de l'arthrose à travers une combinaison d'usure et d'abrasion (« wear & tear »), ses propriétés mécaniques sont considérablement altérées, et le cartilage n'est alors pas en mesure de remplir ses fonctions. Le cartilage est un tissu caractérisé par l'absence de vaisseaux sanguins, lymphatiques et de fibres nerveuses. Lorsqu'il est endommagé, le manque de saignement dans la lésion diminue grandement la capacité du cartilage à se réparer. Il existe donc aujourd'hui une grande variante de traitements pour remédier à cette faiblesse.

La stimulation de la moelle osseuse par microperforation est une technique chirurgicale induisant le saignement au niveau du cartilage en créant une communication entre le cartilage et l'os sous-chondral. La formation du caillot sanguin au niveau du cartilage et de l'os sous-chondral permet donc d'initialiser les mécanismes de réparation tissulaire et mène à la régénération de cartilage grâce à l'implication des cellules de l'os sous-chondral (Hoemann, Hurtig, et al., 2005; Steadman, J. Richard, Rodkey, & Briggs, 2010). Il a toutefois été démontré que le cartilage résultant est un mélange de cartilage articulaire et cartilage fibreux, qui ne possède pas les propriétés mécaniques nécessaires pour rétablir la mobilité de l'articulation (Kaul, Cucchiari, Remberger, Kohn, & Madry, 2012).

Ainsi, un implant acellulaire, à base d'une solution de chitosan, de glycérophosphate (GP) et de sang autologue, a été développé au laboratoire et des études précédentes ont démontré qu'il permettait une meilleure adhérence du caillot sanguin créé par la microperforation, une

meilleure qualité de cartilage, un recrutement plus important des acteurs cellulaires de la réparation et l'implication de mécanismes de base de l'angiogenèse (Chevrier, Hoemann, Sun, & Buschmann, 2007, 2011; Hoemann et al., 2010; Hoemann et al., 2007; Marchand et al., 2012).

Néanmoins, cet implant présente quelques inconvénients par rapport à son application en clinique, notamment un risque des dommages des surfaces articulaires augmenté par l'arthroscopie, qui expose le cartilage à l'air pendant 15 minutes pendant une solidification lente *in situ* lors de l'opération chirurgicale. Pour remédier à cette limite, des facteurs de coagulation ont été ajoutés à l'implant chitosan-GP/sang dans un modèle lapin préclinique et ont permis de diminuer de moitié le temps de solidification chez le lapin. Les facteurs de coagulation sont connus pour leur implication dans les mécanismes de réparation tissulaire, mais leur effet exact dans le cadre de la réparation du cartilage n'a pas encore été suffisamment investigué.

La première partie de ce mémoire porte donc sur l'évaluation de l'effet des facteurs de coagulation sur les premières étapes de la réparation du cartilage, induite par la technique de microperforation combinée avec un implant chitosan-GP/sang. La quantification des vaisseaux sanguins par stéréographie est utilisée dans le but de comprendre l'effet des facteurs de coagulation sur la formation du nouveau tissu dans un modèle de réparation de cartilage chez le lapin néo-zélandais blanc (NZW). La phase de la réparation ciblée est la phase de prolifération, dans le but de comprendre l'effet des facteurs de coagulation sur la formation du nouveau tissu.

Dans la deuxième partie de ce projet, une technique d'immunohistochimie sera développée et optimisée afin de détecter les cellules souches mésenchymateuses dans des tissus de lapin NZW. Le but final sera alors de déterminer la localisation et la distribution de ces cellules dans le tissu osseux et le tissu de granulation lors de la réparation du cartilage.

Organisation générale du mémoire

Le présent document est divisé en 4 chapitres principaux. Le premier chapitre fait part d'une revue critique de la littérature dans le domaine de ce projet de maîtrise. Cette revue recense l'ensemble des notions requises pour la compréhension du raisonnement suivi pour les études et expériences effectuées, ainsi que pour la bonne compréhension de nos résultats.

Le chapitre 2 présente la démarche de l'ensemble du travail par rapport aux hypothèses et aux objectifs posés.

Dans le chapitre 3, nous présentons l'article soumis au journal *Osteoarthritis and Cartilage*, actuellement en révision, sur la quantification stéréographique de l'angiogenèse dans un modèle *in vivo* de réparation du cartilage et de l'os sous-chondral. Ce chapitre comporte en détail le matériel utilisé, nos méthodes employées et les résultats obtenus.

Le chapitre 4 présente le développement de la méthode d'immunohistochimie des cellules souches mésenchymateuses dans des tissus fœtaux et adultes de lapin, ainsi que les résultats obtenus.

Pour conclure ce projet de maîtrise, ces quatre chapitres sont suivis d'une discussion générale sur les travaux effectués et une conclusion, récapitulant les résultats obtenus et proposant nos recommandations pour de futures études.

CHAPITRE 1 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Les tissus « squelettiques »

Dans le système musculo-squelettique, l'os et le cartilage sont les tissus associés au squelette et sont ainsi désignés comme étant les tissus « squelettiques ». Comme tous les tissus de l'organisme, ils ont pour rôle de permettre la locomotion et de protéger les organes internes, tels que le cerveau ou encore la moelle épinière (Widmaier, Raff, & Strang, 2004). Ils peuvent remplir ce rôle grâce à leur composition et leur structure qui offrent rigidité, durabilité et résistances aux diverses charges mécaniques que subit le squelette quotidiennement (Sarwark, 2010).

1.1.1 Le cartilage articulaire

L'essentiel des informations présentées dans cette section provient de quatre références (Buckwalter & Mankin, 1998; Hoemann et al., 2011; Junqueira & Mescher, 2010; Sophia Fox, Bedi, & Rodeo, 2009). Des références spécifiques sont ajoutées, si la source de l'information diffère de celles mentionnées ci-dessus.

Le cartilage est un tissu conjonctif du système musculo-squelettique dépourvu de vaisseaux sanguins, de vaisseaux lymphatiques et de nerfs. Ce tissu est caractérisé par une matrice extracellulaire riche en collagènes, en protéoglycane et une population cellulaire spécifique, les chondrocytes. Il est divisé en trois types différents : le cartilage fibreux, le cartilage élastique et le cartilage articulaire (ou hyalin) (**Figure 1-1**).

Le cartilage articulaire est trouvé dans les articulations synoviales, telles que le genou, et diffère des deux autres types par sa composition macromoléculaire matricielle, sa structure et son organisation, selon les requis fonctionnels de chaque tissu.

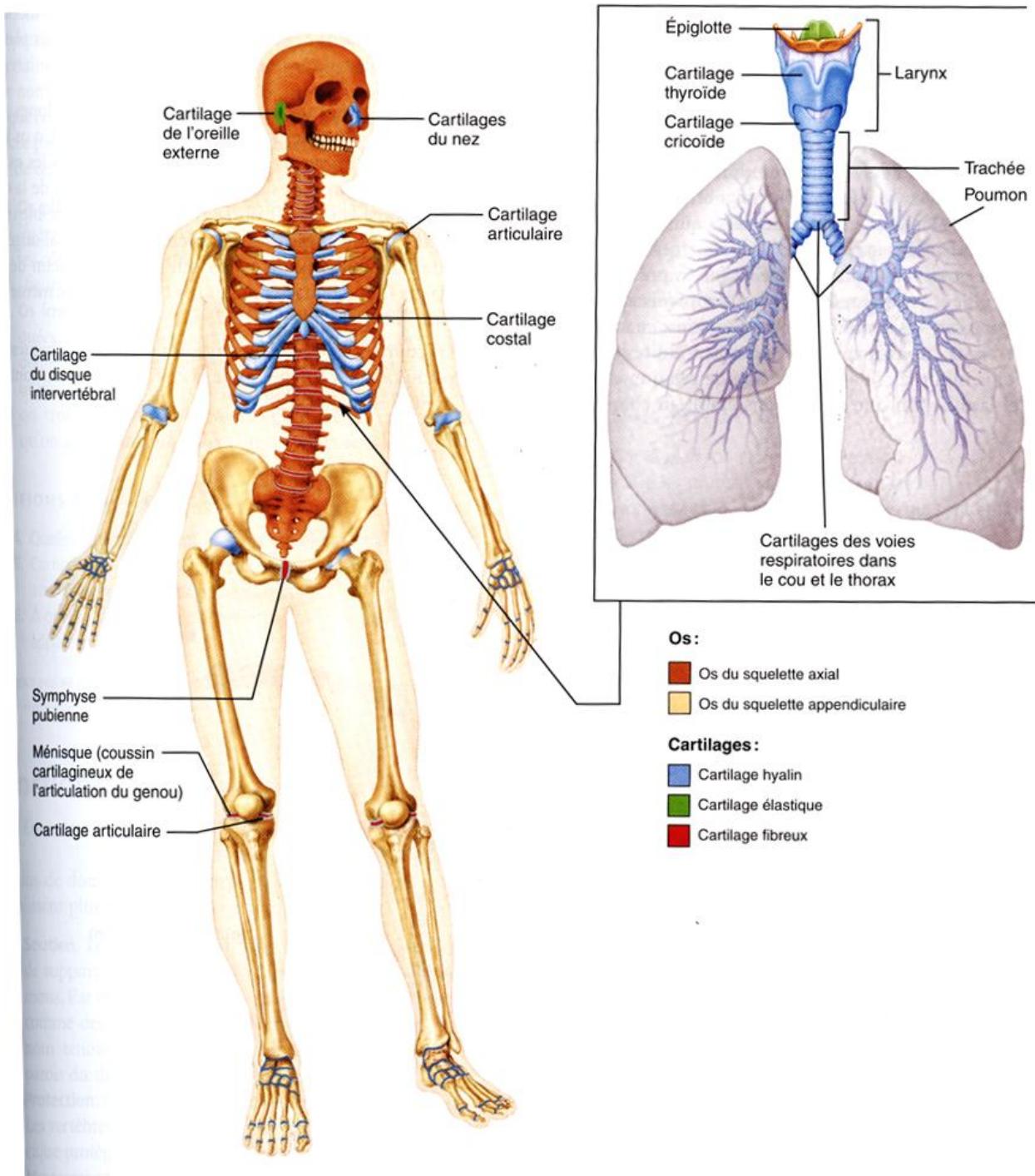


Figure 1-1 : Schéma du squelette et des différents types de cartilage dans le corps humain. Image publiée dans le livre de référence (Marieb & Hoehn, 2010). Le cartilage hyalin ou articulaire est représenté en bleu, le cartilage élastique en vert et le cartilage fibreux en rouge.

1.1.1.1 Composition

Le cartilage articulaire a pour rôle spécifique de réduire la friction dans les articulations synoviales et d'absorber les chocs générés par les mouvements du squelette. Il peut remplir ce rôle grâce à la composition en eau et en macromolécules structurelles de sa matrice extracellulaire (ECM), notamment des fibres de collagène de type II, des protéoglycans et d'autres protéines.

La macromolécule la plus abondante est le collagène de type II, constituant jusqu'à 40-60% du poids sec du cartilage. Les molécules de collagène type II (Col-II) sont rassemblées sous forme de fibres, contenant des traces de collagène de type IX et type XI (Eyre, D., 2002). Le réseau créé par les fibres de collagène donne au cartilage sa forme et ses propriétés de résistance au cisaillement et à la compression. Col-II diffère d'autres types de collagène, notamment du collagène de type I (Col-I), par ces importants niveaux d'hydroxylysines, qui le rend alors plus hydrophile (Jeffrey & Watt, 2003). La disposition des molécules de collagènes en fibres permet de fonder une solide infrastructure moléculaire dans laquelle peuvent s'insérer d'autres composantes de la matrice extracellulaire, notamment les protéoglycans.

Les protéoglycans (PG) sont des macromolécules constituées d'une protéine centrale à laquelle s'attachent des molécules de glycosaminoglycans (GAG), prenant ainsi la forme d'un goupillon. Dans la matrice cartilagineuse, ces molécules sont rassemblées en agrégat autour de molécules d'acide hyaluronique en formant des liaisons non covalentes avec l'aide de protéine de liaisons (**Figure 1.2**).

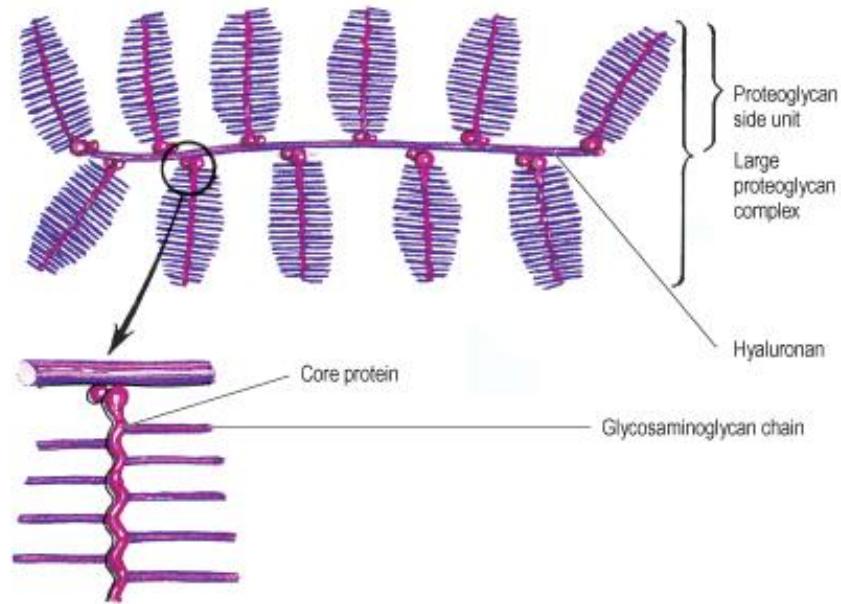


Figure 1-2 : Schéma de la structure moléculaire des protéoglycans. Image publiée dans l'article (Gray, Standring, Ellis, & Berkovitz, 2005)

Grâce aux charges négatives des GAG, l'eau peut être retenue dans la matrice extracellulaire du cartilage. Les PG aident le contrôle des flux entrant et sortant de l'eau lors des compressions et décompressions du tissu.

L'eau représente près de 80 % du poids humide du cartilage et permet par ses mouvements à travers l'architecture des macromolécules de donner au tissu la capacité d'absorber les ondes-chocs et d'agir comme ressort mécanique. L'eau a un deuxième rôle qui est d'aider la diffusion de l'oxygène, des nutriments et des déchets. En effet, le cartilage articulaire étant dépourvu de vaisseaux sanguins, l'oxygène et les nutriments diffusent de la membrane synoviale et à travers la matrice extracellulaire pour atteindre les chondrocytes, la seule population cellulaire présente dans le cartilage.

Les chondrocytes n'occupent que 1 % du volume total du cartilage articulaire, mais ils ont la fonction de synthétiser les macromolécules de l'ECM lors de la formation du cartilage et lors de son entretien. En effet, chez un individu squelettiquement mature, ces cellules ne remplacent que les macromolécules dégradées, n'augmentent pas le volume du cartilage et ne se divisent que très rarement. Les chondrocytes se caractérisent également par une forme typiquement sphérique et s'entourent de la matrice cartilagineuse qu'elles fabriquent, ce qui les empêche de former des

interactions cellules-cellules. Leur ancrage dans la matrice cartilagineuse est possible grâce à quelques protéines de l'ECM, telles que la fibronectine.

L'activité métabolique dans le cartilage est relativement faible, à la fois par la diffusion limitée d'oxygène et de nutriments à travers le fluide interstitiel due à l'absence de vaisseaux sanguins dans ce tissu et par la faible densité cellulaire. Il ne faut pas cependant confondre la faible activité métabolique des chondrocytes avec leur potentiel métabolique. De nombreuses études *in vitro* ont prouvé que les chondrocytes avaient un grand potentiel de prolifération, de division et de synthèse de matrice cartilagineuse.

Il est néanmoins important de noter que les chondrocytes ont une organisation précise dans la matrice cartilagineuse. La localisation et la forme des chondrocytes est notamment dictée par la structure des macromolécules de l'ECM qui est dépendante de la profondeur dans le tissu cartilage à partir de la surface articulaire.

1.1.1.2 Structure et organisation

Les propriétés spécifiques du cartilage sont le résultat d'une synthèse hautement structurée et organisée des fibres de collagène et des protéoglycans par les chondrocytes dans la matrice cartilagineuse. Les changements de concentrations macromoléculaires, de morphologie cellulaire, d'organisation, d'épaisseur et de propriétés mécaniques permettent de diviser le cartilage articulaire en quatre zones distinctes (**Figure 1.3**) (Eyre, D., 2002; Pearle, Warren, & Rodeo, 2005).

La première zone et la plus fine des zones est la zone superficielle, elle occupe environ 10-20% de l'épaisseur du cartilage (Pearle et al., 2005). Elle est responsable des propriétés de résistance au cisaillement et à la compression du cartilage. Et cette zone est typiquement constituée de deux couches : un mince feuillet translucide fait de petits polysaccharides et dépourvu de cellules, et en dessous une couche composée d'une dense matrice de fibres de collagènes. Dans cette zone, les chondrocytes prennent une forme légèrement elliptique parallèlement à la surface du cartilage et synthétisent une forte concentration de fibres de collagène selon le même axe. Cette disposition offre les propriétés mécaniques spécifiques connues, mais limite également le transfert de molécules entre le fluide intrinsèque du cartilage et le fluide synovial. Il faut également noter que l'eau et les fibronectines sont également en

quantité importante dans cette zone, mais que la concentration de protéoglycane est relativement faible.

La deuxième zone, dite transitionnelle, sert de pont anatomique intermédiaire entre la zone superficielle et la zone profonde. Les fibres de collagène sont en moindre quantité et sont disposées de manière oblique par rapport à la surface du cartilage et les chondrocytes ont davantage une forme sphérique. Cette zone correspond à environ 40-60% de l'épaisseur du cartilage articulaire chez l'humain (Pearle et al., 2005).

Dans la troisième zone, appelée zone profonde, les fibres de collagène sont en plus faible concentration que dans la zone superficielle, mais elles sont plus épaisses et sont orientées selon un axe perpendiculaire à la surface du cartilage. Selon la même orientation, les chondrocytes de formes sphériques s'alignent en colonne dans la matrice de cette zone et synthétisent majoritairement des protéoglycane. Par sa structure, cette zone occupe 30 % de l'épaisseur du cartilage et procure au cartilage sa capacité de résistance à la compression (Pearle et al., 2005).

Enfin, la zone profonde est délimitée par la « tidemark » de la dernière zone, qui est le cartilage calcifié. Dans cette zone, les fibres de collagène sont ancrées dans le tissu osseux, afin de permettre la transition du cartilage vers l'os sous-jacent, appelé l'os sous-chondral.

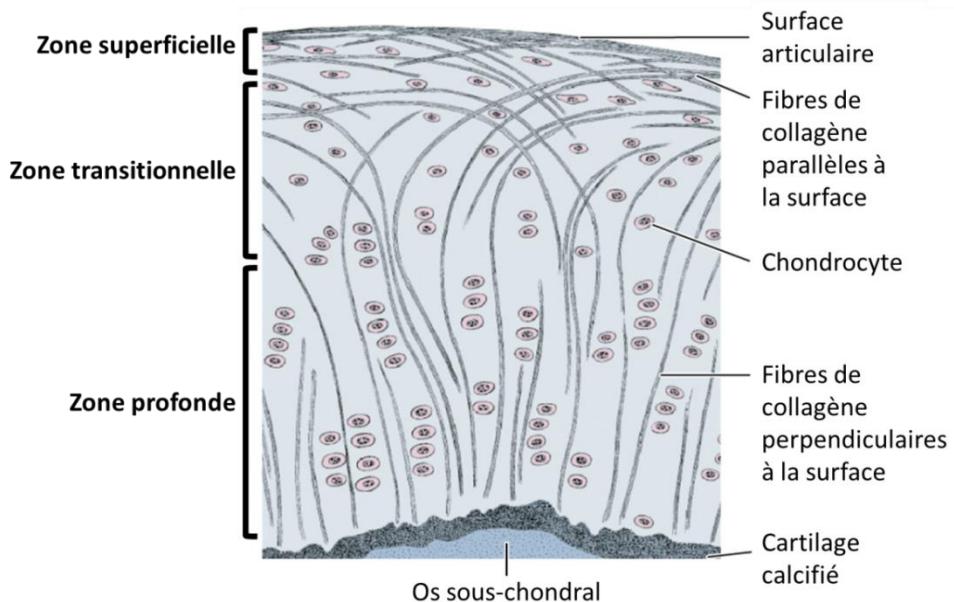


Figure 1-3 : Schéma de la structure du cartilage articulaire avec l'organisation spatiale des fibres de collagène. Image modifiée et publiée dans (Junqueira & Mescher, 2010).

1.1.2 L'os

L'essentiel des informations présentées dans cette section provient de quatre références (Fuchs, Warden, & Turner, 2009; Junqueira & Mescher, 2010; Miller & Hart, 2008; Raggatt & Partridge, 2010). Des références spécifiques sont ajoutées, si la source de l'information diffère de celles mentionnées ci-dessus.

Dans le système musculo-squelettique, le rôle des os est de soutenir le poids du corps créé par la pesanteur, de procurer la rigidité nécessaire à la locomotion et de servir de site d'attache pour les muscles, les tendons et les ligaments. La structure squelettique joue également le rôle important de protection des organes internes, par exemple le cerveau ou la moelle épinière. Les os remplissent également des fonctions métaboliques, telles que la formation des cellules sanguines ou encore une fonction de réservoir pour le calcium et les phosphates inorganiques.

Cette variété de fonctionnalité se retrouve dans une importante variété de formes des tissus osseux, par exemple les os longs. La structure de ces derniers se divise en deux parties : la diaphyse, zone centrale de forme tubulaire composée d'os compact, et l'épiphyse, située à chaque extrémité de l'os long formée d'os spongieux (**Figure 1-4**). L'os compact et l'os spongieux sont les deux types de tissus osseux existants qui se distinguent par leur composition et surtout par leur structure.

1.1.2.1 Composition et structure

L'os compact et l'os spongieux ont, tous deux, la même composition organique et inorganique, mais diffèrent par leur structure et l'organisation de leur matrice intracellulaire.

Parmi les composantes organiques, on compte des cellules osseuses, les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes, et une matrice organique, composée de fibres de collagènes (Col-I), de protéoglycans et de glycoprotéines, constituant ensemble entre 25 % et 50 % du tissu osseux. Le tissu restant est composé d'éléments inorganiques, de minéraux dont le plus abondant est l'hydroxyapatite, occupant entre 50 % et 70 % du volume.

Les ostéoblastes et les ostéoclastes sont localisés dans la partie « molle » du tissu osseux, la moelle des pores des travées, alors que les ostéocytes sont incrustés dans la matrice minéralisée des travées, la partie « minérale » de l'os. Ces composantes organiques du tissu osseux permettent ainsi de former, ajuster et maintenir la matrice extracellulaire.

Parmi les éléments organiques de cette matrice, les fibres de collagènes, en prédominance Col-I, sont les composantes les plus abondantes et confèrent ainsi au tissu osseux sa flexibilité et sa grande résistance à la pression, la tension et la torsion. Les glycoprotéines sont en moindre quantité, mais elles ont un important rôle métabolique, tel que la fixation des cristaux d'hydroxyapatite aux fibres de collagène et le contrôle de l'activité métabolique des ostéoblastes et ostéoclastes.

La structure de l'os compact représente plus de 80 % de la masse des os chez l'humain. Il se caractérise par une structure composée de cylindres denses, appelés ostéons, formés de lamelles de fibres de collagène autour du canal de Havers, centre du cylindre qui fournit l'espace nécessaire pour le passage des vaisseaux sanguins et des neurofibres (**Figure 1-4**).

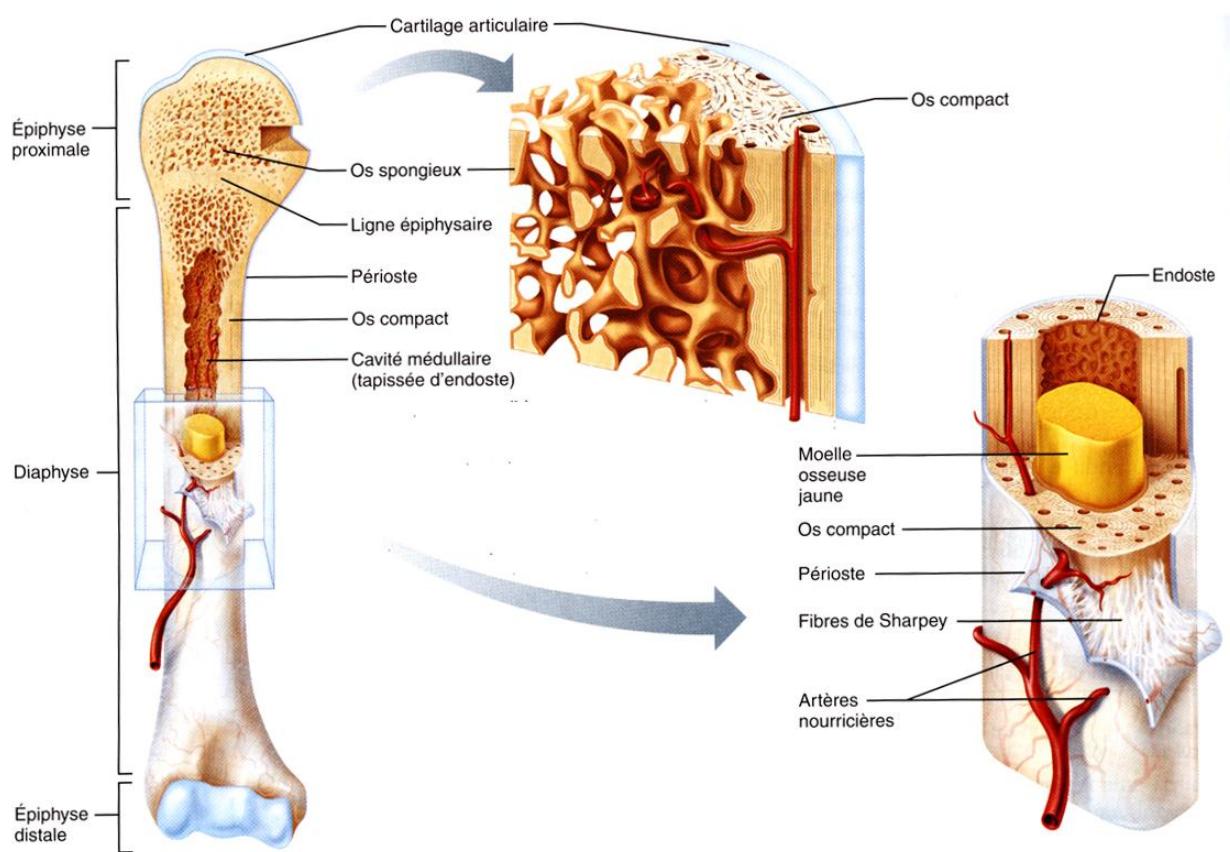


Figure 1-4 : Schéma de la structure d'un os long et des tissus osseux qui le compose, l'os compact et l'os spongieux. Image publiée dans le livre (Marieb & Hoehn, 2010)

L'os spongieux a une structure beaucoup moins organisée en « nids d'abeille ». Composé de travées, il est en mesure de résister à des forces appliquées dans toutes les directions et de distribuer les charges absorbées par le cartilage articulaire vers le reste de la structure osseuse. Les travées ne reflètent aucune organisation précise, cependant leur disposition dans l'os spongieux est ajustée par les cellules du tissu osseux pour mieux subvenir aux contraintes appliquées (**Figure 1-4**), ce processus d'ajustement est appelé « remodelage de l'os ».

1.1.2.2 Remodelage du tissu osseux par ses cellules

Le tissu osseux est en constante « reconstruction » : les ostéoblastes et les ostéoclastes travaillent tout au long de la vie d'un individu au remaniement des travées dans le but d'adapter ce tissu à son environnement, par exemple dans le cas de variations de charges sur l'articulation.

Les ostéoblastes, différenciés des cellules souches mésenchymateuses, sont retrouvés dans le tissu osseux sous plusieurs formes : ils peuvent être immatures, chargés de la sécrétion de facteurs ostéoclastiques, en phase de différenciation ou matures. Ces cellules sont les producteurs des macromolécules organiques de la matrice osseuse, telles que Col-I et les PG, et sont impliquées dans le processus de minéralisation (Raggatt & Partridge, 2010).

Les ostéoclastes dérivent des cellules myéloïdes et sont spécifiquement responsables de la résorption de la matrice osseuse. Ces cellules, volumineuses et multinucléées, se distinguent par l'expression du récepteur de calcitonine et de l'acide phosphatase résistante au tartrate (Fuchs et al., 2009).

Lors du remodelage du tissu osseux, les ostéoblastes et ostéoclastes s'assemblent en une structure organisée, définie comme une « basic multicellular units » (**Figure 1-5**). Cette unité crée un microenvironnement isolé, qui permet de faciliter la coordination de formation de la matrice par les ostéoblastes et de sa résorption par les ostéoclastes, tout en assurant une perturbation minimale du volume de l'os.

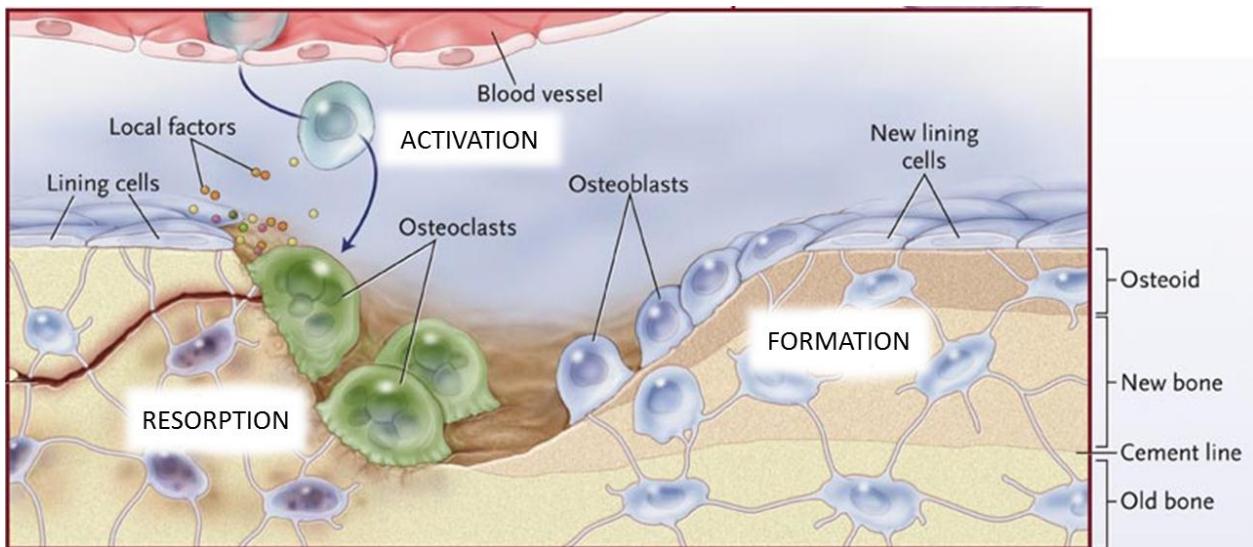


Figure 1-5 : Schéma de l'organisation cellulaire au cours du remodelage du tissu osseux. Image publiée et modifiée dans l'article (Fuchs et al., 2009).

Le remodelage débute par une phase d'activation, initiée par un stimulus mécanique (dommages structurels dans la matrice) ou chimique (hormone, telle que l'estrogène). Dans le cas d'un stimulus mécanique, ce sont les ostéocytes, cellules imbriquées dans la matrice minérale osseuse, qui perçoivent les changements mécaniques grâce à leurs nombreuses extensions cytoplasmiques et sécrètent les facteurs nécessaires pour la formation d'ostéoclastes.

La deuxième phase est celle de résorption, caractérisée par la réponse des ostéoblastes aux signaux des ostéocytes et la sécrétion de chémoattractants (notamment MCP-1 et RANKL) par les ostéoblastes en réponse, pour le recrutement et la prolifération d'ostéoclastes. Ces derniers sont alors en mesure d'effectuer la résorption de la matrice osseuse.

La prochaine phase est celle de formation de la matrice osseuse, initiée par les éléments libérés par la dégradation de la matrice signalant le recrutement des ostéoblastes. Il s'installe alors un équilibre, de sorte à avoir une quantité égale de matrices formée et résorbée. Lorsque le remodelage prend fin, les ostéoblastes peuvent s'insérer dans la matrice et se différencier en ostéocytes, sinon elles s'inactivent et se posent à la surface de la matrice osseuse. On les appelle alors « bone lining cells » et elles semblent servir de précurseur pour de prochaines séances de remodelage.

1.1.3 Développement du cartilage articulaire et des os

L'essentiel des informations présentées dans cette section provient de quatre références principales (Hall, 2005; Hoemann, Lafantaisie-Favreau, Lascau-Coman, Chen, & Guzman-Morales, 2012; Junqueira & Mescher, 2010; Miller & Hart, 2008). Des références spécifiques sont ajoutées, si la source de l'information diffère de celles mentionnées ci-dessus.

Le processus de remodelage du tissu osseux est semblable à celui de formation des os lors du développement embryonnaire et fœtal.

Chez les mammifères, la formation du squelette s'amorce par la formation du tissu cartilagineux, dont ensuite une partie s'ossifie pour donner les tissus osseux et former la structure caractéristique des os. Lors du développement embryonnaire, l'ancrage du blastocyste dans la paroi de l'utérus mène à la formation des trois couches tissulaires de la gastrulation : l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme (**Figure 1-6**). Il faut noter que le squelette appendiculaire, comprenant les os des membres supérieurs et inférieurs, provient du mésoderme et des cellules souches mésenchymateuses.

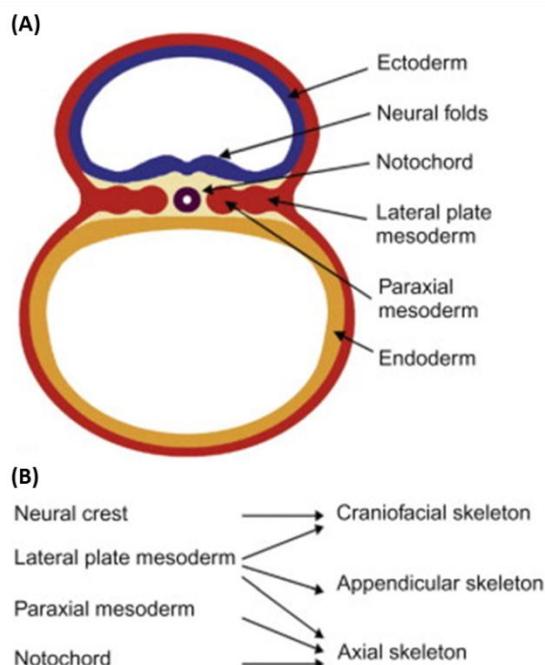


Figure 1-6 : Schéma de la section transversale d'un embryon de souris après la phase de gastrulation avec l'organisation du mésoderme, de l'ectoderme et de l'endoderme. Schéma

également indiquant l'origine tissulaire des principaux composants du squelette. Image publiée dans le chapitre de livre (Lories & Luyten, 2013)

L'étape marquant le début de la formation des os du squelette appendiculaire est l'apparition des « limb buds », structures tubulaires à travers lesquelles sont distribuées uniformément les cellules souches mésenchymateuses (MSC) non différenciées (Rivas & Shapiro, 2002). Ces structures permettent l'isolation des MSC des autres tissus dans un milieu structuré où elles peuvent poursuivre leur prolifération jusqu'à un volume précis. Une fois ce dernier atteint, les MSC non différenciées commencent une condensation, où elles se regroupent en un point du « limb bud » et diminuent considérablement la distance entre chaque cellule, ce qui permet d'amorcer la chondrogenèse. Les « limb buds » permettent ainsi de concentrer l'expression des gènes et des facteurs de différenciation en un point. Ceci facilitant l'obtention d'un « squelette cartilagineux », qui a grossièrement la forme du squelette mature et de transformer le mésenchyme en cartilage hyalin (**Figure 1-7**).

Alors que le volume des « limb buds » continue d'augmenter, le cartilage hyalin formé va commencer une première ossification.

L'ossification est le processus responsable de la transformation du cartilage hyalin en tissu osseux et peut se produire par deux mécanismes différents, endochondrale ou intramembranaire. Dans le cas des os longs, deux ossifications endochondrales se produisent à des temps différents : la première forme la diaphyse et le deuxième pour crée l'épiphyse à chaque extrémité de l'os. Il est important de noter que l'ossification se produit toujours en coordination avec l'invasion des vaisseaux sanguins dans le tissu (Boyce, Zuscik, & Xing, 2013). Cette étape correspond à la conversion de la matrice cartilagineuse en matrice osseuse par les ostéoblastes et au début de sa calcification de l'os trabéculaire. La seconde ossification se produit à chacune des extrémités de l'os long et forme les épiphyses et la mince couche de cartilage articulaire à la jonction de l'articulation. Les épiphyses sont alors séparées de la diaphyse par la plaque de croissance, qui permet l'élongation de l'os au cours de la croissance du fœtus, mais également après la naissance.

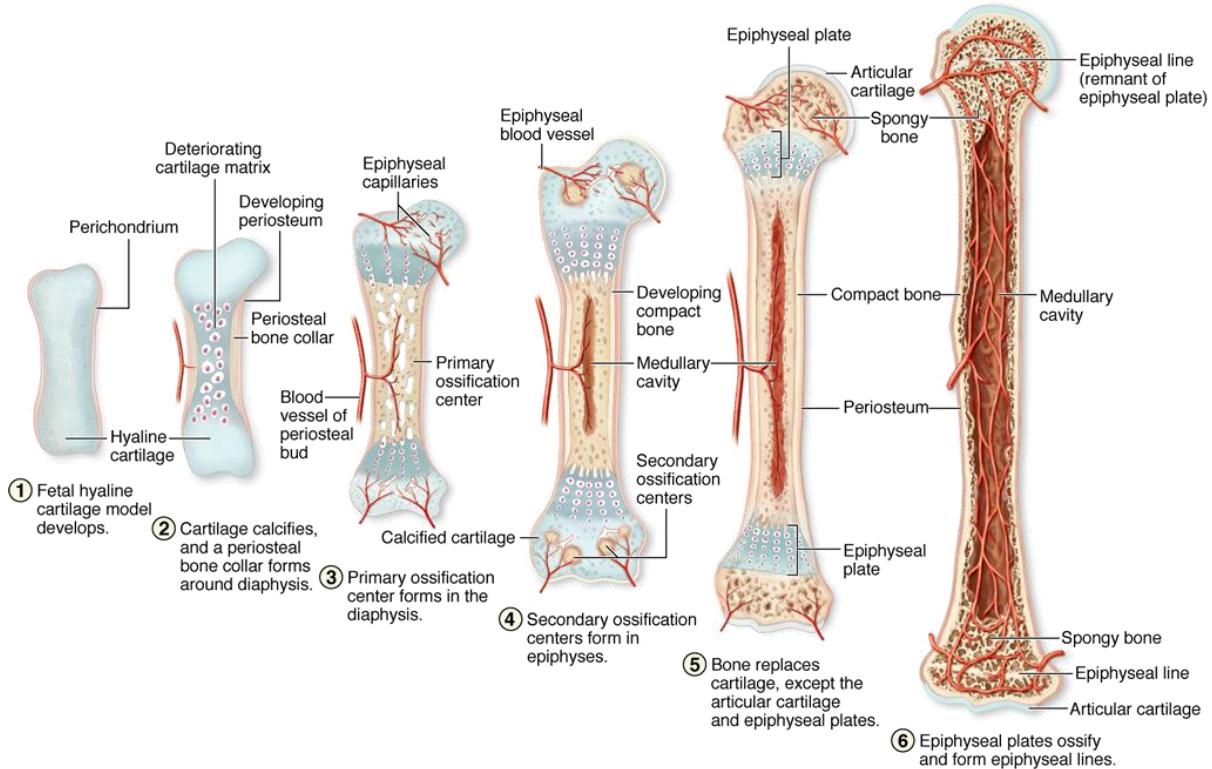


Figure 1-7 : Schéma des étapes du développement des os longs. Image publiée dans (Junqueira & Mescher, 2010).

Le développement des os est terminé lorsque la plaque de croissance s'ossifie et forme la ligne épiphysaire entre la diaphyse et l'épiphyse.

Bien que la croissance des os cesse chez l'adulte, de nombreuses études ont montré qu'il était possible d'isoler une population cellulaire avec un fort potentiel de prolifération et de différenciations (Jones, English, Emery, & McGonagle, 2002; Montjovent et al., 2009; Tuan, Boland, & Tuli, 2003). Cette population de cellules a été identifiée comme une variante des cellules souches mésenchymateuses embryonnaires, qui, théoriquement, peut servir à la réparation du tissu osseux et du cartilage chez l'adulte et est étudiée pour de nombreuses applications dans le domaine biomédical.

1.2 La Réparation tissulaire

1.2.1 Les étapes générales, exemple de réparation tissulaire pour les lésions cutanées

La réparation tissulaire est un phénomène bien connu et souvent décrit au niveau de plaies cutanées. À part quelques exceptions, les tissus endommagés suivent tous les mêmes étapes, soit l'hémostase, la réponse inflammatoire, la prolifération et le remodelage. Chacune de ces étapes est orchestrée dans le but de réparer et restaurer le tissu endommagé à ses fonctions initiales.

1.2.1.1 L'hémostase et la réponse inflammatoire

Lorsqu'une lésion est créée dans un tissu, l'organisme répond immédiatement en amorçant l'hémostase dans le but d'arrêter la perte de sang et de fluides du tissu et des vaisseaux sanguins sectionnés. Au cours de cette phase, trois événements se produisent : la constriction vasculaire, la formation d'un bouchon plaquettaire et la coagulation du sang.

Lorsque l'endothélium des vaisseaux sanguins est physiquement rompu, la production normale des vasodilatateurs, l'oxyde nitrique et la prostacycline (aussi appelée prostaglandine I₂ ou PGI₂), est interrompue, conduisent à la constriction vasculaire et à l'activation des plaquettes (Batty & Smith, 2010; Eyre, L. & Gamlin, 2010). Ces dernières forment des agrégats qui adhèrent aux parois des BV endommagés et initient la cascade de coagulation.

La cascade de coagulation est divisée en trois voies d'activation : la voie intrinsèque, la voie extrinsèque et la voie commune (**Figure 1-8**). La voie intrinsèque est initiée par l'activation du facteur de coagulation XII par la kininogène et par la prékallicréine. Elle peut être activée par les surfaces endothéliales endommagées (Dahlback, 2000).

La voie extrinsèque est la voie d'activation de la coagulation observée *in vivo* et elle est activée par le facteur tissulaire (TF), une protéine réceptrice transmembranaire extravasculaire, lors de la rupture de l'endothélium des vaisseaux sanguins. Ce facteur va ensuite se lier au facteur de coagulation VIIa, le complexe alors formé va permettre à son tour activer le facteur Xa de coagulation. Ce facteur marque le début de la voie commune de coagulation, au cours de laquelle le facteur Xa se lie à la prothrombine pour produire de la thrombine et ensuite de la fibrine (Adams & Bird, 2009; Batty & Smith, 2010). À l'issue des cascades de coagulation, un

échafaudage de macromolécules de fibrines constitue le caillot sanguin afin de soutenir l'infiltration des cellules inflammatoires et souches et poursuivre la réparation tissulaire (Shaw & Martin, 2009).

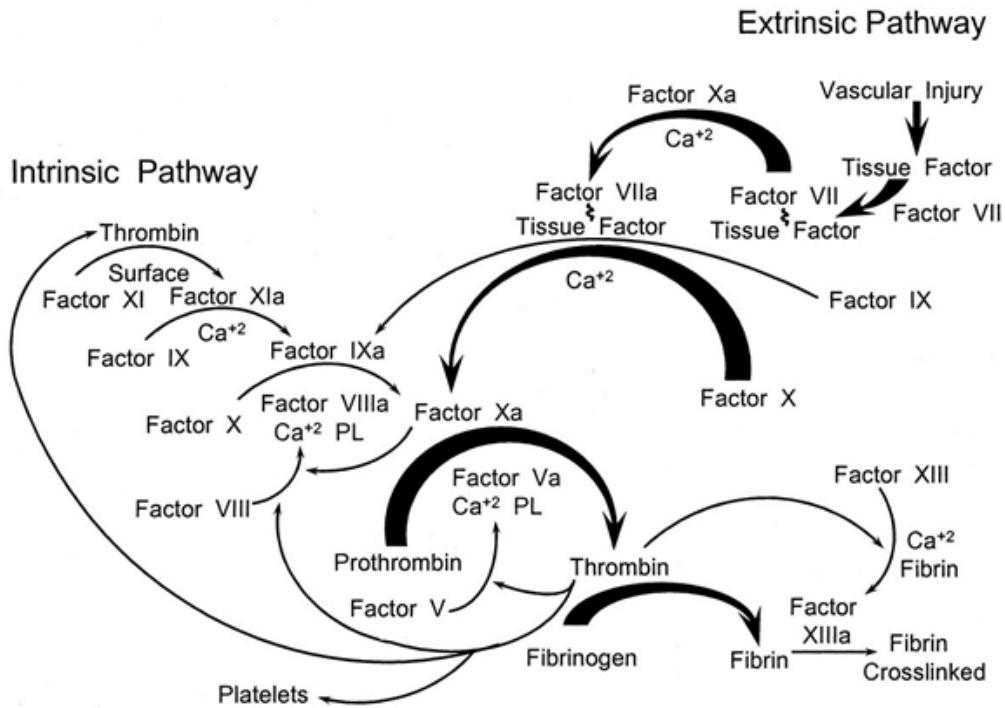


Figure 1-8 : Schéma des voies de coagulation du sang. Image publiée dans l'article (Davie, 2003; Davie, Fujikawa, & Kisiel, 1991)

Parallèlement aux cascades de coagulation, des cellules du système immunitaire sont recrutées sur le site de la blessure et amorcent ainsi la réponse inflammatoire. Les neutrophiles sont les premières cellules sur place, provenant directement de flux sanguin des BV endommagés, et par l'extravasation à travers des vaisseaux avoisinants. Ils ont pour rôle de protéger l'organisme des entités étrangères et sécrètent des facteurs pour le recrutement d'autres cellules, telles que les monocytes et les macrophages. À l'exception de certains macrophages résidents dans le tissu, les macrophages sont formés par la différenciation des monocytes recrutés de la circulation sanguine par l'infection ou le trauma (Eming, Krieg, & Davidson, 2007). Une fois sur le site du traumatisme, les macrophages sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, telles que les interleukines IL-1 et IL-6, en plus de leur rôle phagocytaire. L'action des macrophages et des neutrophiles permet alors le recrutement d'un plus grand nombre de cellules du système immunitaire, mais permet également d'amorcer l'angiogenèse et la migration des

cellules souches ou progénitrices, et ainsi de passer à la phase de prolifération (Werner & Grose, 2003).

1.2.1.2 La prolifération

Cette phase de la réparation se caractérise par la migration et la prolifération des cellules progénitrices ou cellules souches, ainsi que par l'initiation de l'angiogenèse et de la cicatrisation. La séquence des évènements est la plus étudiée dans la réparation de la peau.

Les cellules inflammatoires sur le site de la lésion sécrètent de nombreux signaux, incluant ceux pour facteurs proangiogéniques. En réponse à ces signaux, il se produit une infiltration de vaisseaux sanguins, de vaisseaux lymphatiques et de fibres nerveuses dans le site de réparation.

Le développement du système circulatoire dans un nouveau tissu se divise en deux phénomènes : l'angiogenèse, qui est le développement de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants, et la vasculogenèse, qui est la création spontanée d'un réseau de capillaires dans un tissu dépourvu d'un système sanguin (Jain, 2003). Les vaisseaux sanguins permettent l'approvisionnement en nutriments et en oxygène des tissus du corps humain, ainsi que le traitement des déchets métaboliques. Il est donc indispensable qu'ils soient rétablis rapidement pour la viabilité des tissus.

Avec l'action des macrophages, les fibroblastes infiltrent le caillot sanguin et commence à remplacer l'échafaudage fibrine avec une matrice extracellulaire et un tissu de granulation, dans laquelle peuvent s'infiltrer et migrer les cellules endothéliales (i.e., l'angiogenèse) et les cellules souches. Une fois infiltrées dans l'échafaudage de macromolécules, les cellules progénitrices ou les cellules souches sont en mesure de proliférer, de se différencier, et de produire la matrice extracellulaire caractéristique du tissu en réparation (Gurtner, Werner, Barrandon, & Longaker, 2008; Werner & Grose, 2003). Dans les lésions cutanées, cette phase se caractérise par la réépithérialisation. Des kératinocytes migrent dans le tissu de granulation et restaurent la fonction de l'épiderme. Ces cellules sont dérivées soit des cellules souches à la base des follicules pileux à proximité, soit de la couche basale sous-jacente (Martin, 1997). Elles prolifèrent sur les bords de la lésion puis migrent pour former une première monocouche à la surface de la lésion. Dans un même temps, les fibroblastes, sous la stimulation des macrophages, se différencient en myofibroblastes et effectuent la contraction de la matrice. La lésion est alors protégée de

l'environnement extérieur et les cellules de la matrice sous-jacente se préparent pour la phase suivante de différentiation.

1.2.1.3 Le remodelage

Le remodelage est l'étape de restauration du tissu à son état normal en effectuant la transition du tissu de granulation à la cicatrisation, puis à la restauration du tissu endommagé (Shaw & Martin, 2009). Dans le cas de lésions cutanées, cette phase se caractérise par l'arrêt de la prolifération des kératinocytes, qui vont ensuite se positionner dans les différentes couches du nouvel épithélium. Le réseau de vaisseaux sanguins se raffine et murit pour une meilleure fonctionnalité. La matrice extracellulaire est, quant à elle, réorganisée, par exemple par la synthèse contrôlée de fibres de collagène, afin de restaurer l'architecture macromoléculaire du derme. Cette phase se caractérise également par l'arrêt des procédés de la réparation tissulaire. La majorité des cellules endothéliales, des monocytes, des macrophages et des neutrophiles entreprennent l'apoptose ou quittent le site de réparation vers le système vasculaire. Il en est de même pour les myofibroblastes, qui laissent une matrice principalement constituée de collagène et d'autres molécules de l'ECM.

Pour finaliser la restauration de l'épiderme à son état initial, les appendices épidermiques, tels que les follicules pileux et les glandes sébacées, doivent également être régénérés.

1.2.2 Réparation dans l'os et le cartilage

Contrairement au cartilage, l'os est un tissu hautement vascularisé et en constant remodelage, ce qui lui permet de se réparer sans cicatrisation et de régénérer l'os endommagé. Lorsqu'une rupture de la structure squelettique survient, elle engendre la rupture du système vasculaire de la matrice osseuse et initie la formation d'un caillot sanguin. Comme dans des lésions cutanées, ceci initie le processus de réparation tissulaire (**section 1.2.1**), avec la libération de multiples facteurs et le recrutement des cellules de l'inflammation.

Dans les lésions de l'os, ce sont les cellules souches mésenchymateuses qui migrent vers le site de la lésion et qui contribuent à la restauration et la régénération du tissu (Richter, 2009). Elles sont attirées par le processus de coagulation vers le site de la lésion et se différencient en cellules précurseurs des chondrocytes et des ostéoblastes. Comme pour la formation des os lors du développement embryonnaire, la réparation du tissu osseux débute par la formation d'un tissu

cartilagineux (Baldini, Cenni, Ciapetti, Granchi, & Savarino, 2009). Du tissu de granulation, il se forme des condensats de chondrocytes, aussi appelés « chondrogenic foci », qui produisent une matrice de Col-II et de GAG puis se différencient en chondrocytes hypertrophiés (Chevrier et al., 2011). Des enzymes phosphatases et protéases sont sécrétées par les chondrocytes, afin de minéraliser la matrice nouvellement formée. Ceci initie le processus d'ossification endochondrale qui s'accompagne de la différenciation des MSC en ostéoblastes et de l'invasion des vaisseaux sanguins. L'organisation cellulaire de ce processus de réparation est semblable à celle de la plaque de croissance lors du développement osseux (Hoemann et al., 2012).

1.2.2.1 Cellules souches mésenchymateuses chez l'adulte

Les cellules souches sont souvent associées au développement embryonnaire, mais elles sont également présentes dans les tissus adultes.

Plusieurs tissus chez l'adulte, ont la capacité de se régénérer, par exemple à la suite d'une blessure ou du vieillissement des cellules (Pittenger et al., 1999). Dans les tissus osseux, on distingue deux populations de cellules souches (Bianco, Reginucci, Gronthos, & Robey, 2001). La première population est celle des cellules souches hématopoïétiques, qui est chargée de la production des cellules sanguines. Et des études *in vitro* ont démontré qu'il existe une deuxième population de cellules multipotentes, qui peut être obtenue avec l'extraction de la moelle osseuse. Il a été déterminé que ces cellules sont en fait ces cellules souches mésenchymateuses. Les tissus issus de la différenciation des MSC sont les tissus cartilagineux, osseux, adipeux (Cheng, Yang, Rifas, Zhang, & Avioli, 1994; Jaiswal, Haynesworth, Caplan, & Bruder, 1997; Yoo et al., 1998), ainsi que musculaires et des tendons (Jones et al., 2002; Mareddy, Crawford, Brooke, & Xiao, 2007).

Pour leurs propriétés, les cellules souches mésenchymateuses sont donc le sujet de nombreuses recherches dans le domaine de la réparation du cartilage (Richter, 2009). Lors de la réparation du cartilage et de l'os sous-chondral, elles doivent migrer vers le site de la lésion, proliférer pour renouveler le tissu perdu et remplacer les cellules en nécrose, et surtout elles doivent adopter le profil cellulaire adéquat lors de leur différenciation. Sans leur implication dans le processus de réparation tissulaire, les tissus osseux et cartilagineux ne pourraient pas être restaurés à leurs états initiaux.

Les cellules souches sont généralement trouvées dans le tissu même, par exemple les cellules souches épithéliales dans le tissu cutané, ou dans un autre tissu qui sert de réservoirs à cellules souches, comme la moelle osseuse pour les cellules hématopoïétiques (Pittenger et al., 1999). Bien que les MSC soient régulièrement extraites de la moelle osseuse pour des études *in vitro*, leur localisation *in vivo*, avant leur recrutement au site de blessure, n'est toujours pas connue.

La compréhension de la réparation tissulaire du cartilage et le traitement des maladies reliées à l'absence ou la mauvaise réparation du cartilage nécessitent une poursuite des investigations sur les mécanismes de ce processus et sur l'interaction des différentes cellules impliquées.

1.3 Arthrites

Les informations présentées dans cette section proviennent principalement de deux articles (Buckwalter & Mankin, 1997; Pearle et al., 2005), de deux livres (Kumar, Abbas, Aster, & Robbins, 2013; Roach & Tilley, 2008) et du site internet de la Société de l'arthrite. Lorsque la référence diffère de celles mentionnées ci-après, elle sera citée dans le texte.

1.3.1 Maladies dégénératives du cartilage

Au Canada, en 2011, plus de 4.7 millions de personnes (de plus de 15ans) ont été diagnostiqués pour de l'arthrite, soit près de 16.1 % de la population canadienne (Statistics Canada, 2012). L'arthrite est une maladie de détérioration des tissus cartilagineux et les tissus avoisinants dans les articulations et comprend plus de 100 types différents allant de la dégénérescence associée à l'âge (arthrose) à celle associée à une infection aiguë (arthrite rhumatoïde). Les symptômes résultants vont des douleurs articulaires jusqu'à la perte de mobilité des articulations, malgré le fait que ces maladies surviennent dans des conditions différentes et souvent dans des articulations différentes. L'arthrite rhumatoïde est souvent observée dans les articulations des mains et les coudes, alors que l'arthrose s'observe principalement au niveau de la hanche de du genou (Jeffrey & Watt, 2003).

L'arthrose est une maladie non inflammatoire, asymétrique, de détérioration du cartilage articulaire par usure et abrasion. Elle est principalement causée par une prédisposition génétique, l'âge ou encore l'obésité, mais elle peut également survenir à la suite d'un choc ou une blessure

dans l'articulation, induisant un changement dans sa mécanique ou sa dynamique. Il s'agit d'une condition progressive et irréversible, caractérisée par l'amincissement du cartilage articulaire jusqu'à son usure totale et la détérioration de l'os sous-chondral. Une échelle du grade I au grade IV permet de diagnostiquer l'avancée de cette maladie par évaluation qualitative de l'étendue de la dégénération du cartilage. Les symptômes de l'arthrose sont typiquement des douleurs lors du mouvement des articulations atteintes dues principalement à la friction créée par la surface irrégulière du cartilage endommagé et parfois la présence de débris cartilagineux dans l'articulation. Avec la progression de la maladie, la perte totale du cartilage articulaire mène à des déformations de l'articulation handicapant et réduisant considérablement l'amplitude de mouvement de l'articulation.

1.3.2 Arthrose dans le genou

1.3.2.1 L'articulation du genou

L'articulation du genou chez l'humain est une articulation synoviale et concerne le fémur, le tibia et la rotule. Considérant la structure de l'articulation du genou, on y distingue trois compartiments : le compartiment médial (inclus le plateau médial du tibia et le condyle fémoral médial), le compartiment latéral (inclus le plateau médial du tibia et le condyle fémoral médial) et le compartiment patella-fémoral (qui inclut la rotule et la trochlée).

Dans le genou, l'arthrose est la forme d'arthrite la plus communément observée. Le compartiment médial est le plus souvent ciblé par l'arthrose, aboutissant en une déformation « genu varum » pour laquelle les jambes sont arquées vers l'extérieur. Comme étudié dans de nombreuses études *in vivo* animales, l'arthrose peut également être observé dans le compartiment patella-fémoral et le compartiment latéral, notamment dans le cas de blessure ou de choc.

1.3.2.2 Les traitements dans le genou contre l'arthrose

L'arthrose est considérée comme une maladie irréversible, car le cartilage chez l'adulte n'est pas en mesure de se réparer de manière spontanée. Il existe donc divers traitements, soit pour traiter les symptômes de l'arthrose, soit pour induire la réparation du cartilage. Ces traitements varient de la prescription de médicament ou de physiothérapie, à des opérations chirurgicales pour l'induction de la réparation du cartilage, qui peut aller jusqu'à l'insertion d'une articulation artificielle du genou.

L'utilisation des traitements palliatifs, tels que les injections de cortisone ou d'acide hyaluronique, permet de soulager ponctuellement le patient contre la douleur ou encore de ralentir la progression de la maladie, mais aucune étude ne semble montrer un effet direct de régénération ou réparation du cartilage endommagé.

Parce que le remplacement total du genou pour une articulation artificielle est par convention le dernier recours, diverses techniques chirurgicales ont été développées dans le but de réparer ou régénérer le cartilage articulaire, telles que la greffe de chondrocytes autologue ou la stimulation de la moelle osseuse par microfracture ou microperforation. Ces techniques ont toutes en commun une étape de retrait mécanique du cartilage endommagé à l'aide d'une curette, dans le cas de certaines techniques la couche de cartilage calcifié est également retirée. Parmi les techniques chirurgicales utilisées en clinique aujourd'hui, on distingue ensuite deux tendances, la première est l'usage de cellules souches mésenchymateuses ou de chondrocytes et la seconde est l'usage d'implant acellulaire.

La greffe de chondrocytes autologues (ACT) est un exemple des techniques chirurgicales à base cellulaire. Une biopsie de cartilage est prise lors d'une arthroscopie d'une région du cartilage non-portante, afin de récupérer des chondrocytes du patient et de cultiver *in vitro* des cellules autologues. Et pour finir, ces dernières sont déposées sur la lésion de cartilage visée soit sous une couche de périoste fixé sur la lésion, ou sur un échafaudage biomatériaux qui est fixé sur place par les points de suture (Mandelbaum et al., 1998; Mithoefer, McAdams, Williams, Kreuz, & Mandelbaum, 2009).

La stimulation de la moelle osseuse par microperforation correspond au second type, c'est-à-dire les techniques chirurgicales acellulaires. Une fois le cartilage endommagé et la couche de cartilage calcifié débridés de la lésion, l'os sous-chondral est microperforé ou microfracturé, afin de créer des canaux d'accès entre le cartilage et les cellules stromales de l'os et pour stimuler le saignement de la plaie (Mithoefer et al., 2006).

Malgré la popularité de ces techniques, il s'avère que le tissu de réparation est de courte durabilité. Des implants ou des biomatériaux qui améliorent la réponse aux microfractures et microperforation sont couramment cherchés afin d'améliorer la durabilité du cartilage réparé.

1.4 Génie tissulaire - Implant chitosan-GP/blood

Le génie tissulaire consiste aujourd’hui en la création de substituts biologiques ou biocompatibles pouvant restaurer, maintenir ou améliorer des tissus de l’organisme.

Les recherches effectuées au laboratoire se concentrent sur la restauration et la reconstitution des fonctionnalités du cartilage endommagé, dans le cadre de l’arthrose du genou. Dans cette optique, un implant à base de chitosan, polysaccharide dérivé de la chitine, a été développé. Cet implant se compose d’un mélange de chitosan, de GP et de sang autologue et est combiné aux techniques chirurgicales de stimulation de la moelle osseuse.

Plusieurs études chez le lapin ont démontré que l’implant chitosan-GP/sang permet l’amélioration la qualité, la durabilité et les propriétés du cartilage réparé comparativement aux techniques chirurgicales seules (Chevrier et al., 2007; Hoemann et al., 2007). Cependant, le cartilage résultant de ce traitement est un mélange de cartilage fibreux et de cartilage hyalin (Hoemann et al., 2007; Marchand et al., 2012). Ainsi, les travaux poursuivis dans ce domaine du génie tissulaire visent donc à optimiser la composition et la structure de l’implant dans le but de régénérer du cartilage purement hyalin.

1.4.1 Le Chitosan et son effet sur la réparation tissulaire

Le chitosan est un dérivé partiellement désacétylé (à 50 %-90 %) de la chitine, second polysaccharide naturel le plus abondant au monde après la cellulose trouvée dans l’exosquelette des arthropodes (Rinaudo, 2006; Suh & Matthew, 2000). Ce biopolymère est aujourd’hui très utilisé dans le domaine des biomatériaux pour ses propriétés biocompatible, biodégradable et antibactérienne, ainsi que par sa nature cationique et hydrophile (Hoemann, Sun, Legare, McKee, & Buschmann, 2005; Liu, Ma, Mao, & Gao, 2011). Grâce à ses propriétés, il a été montré dans de nombreuses études que le chitosan permet la stimulation de la réparation tissulaire, par exemple en catalysant une plus importante activité des macrophages, des neutrophiles et des autres granulocytes (Suh & Matthew, 2000).

Dans le cas de la réparation du cartilage et de l’os sous-chondral, les études ont montré que la combinaison d’un implant chitosan-GP/sang avec la technique de microfracture ou microperforation aboutissait à un cartilage hyalin de meilleure qualité que celui obtenu avec la microperforation seule, car il génère un recrutement plus important de macrophages, de

neutrophiles, ainsi que des cellules stromales régénératrices du tissu osseux et cartilagineux (Chen, G. et al., 2011; Chevrier et al., 2007; Hoemann et al., 2010; Hoemann, Hurtig, et al., 2005).

Il a aussi été démontré que les propriétés du chitosan variaient selon son degré de déacétylation (DDA) et son poids moléculaire (MW, en kilodalton). Pour un 80 % DDA, le chitosan était biodégradable en 6-8 semaines et induisait le remodelage et la réparation dans l'os sous-chondral, tandis que 95 % DDA entraîne la résidence de l'implant durant plusieurs mois et diminue l'ostéogenèse (Chevrier et al., 2007; Simard et al., 2009; Suh & Matthew, 2000). Le poids moléculaire, quant à lui, influence les propriétés mécaniques et la biocompatibilité (Dutta, Rinki, & Dutta, 2011; Liu et al., 2011).

Par conséquent, lors du développement d'un implant à base de chitosan, il est important d'évaluer les propriétés requises et d'en déduire les caractéristiques souhaitées, notamment les valeurs de DDA et MW.

1.4.2 Modèle animal *in vivo* : le lapin

Les dispositifs biomédicaux développés pour la réparation et la régénération du cartilage, tels que les implants chitosan-GP/sang, sont classés dans la classe III selon le *Règlement des instruments médicaux* du gouvernement canadien (Minister of Health, 2011). Pour être homologués, des études doivent être entreprises pour démontrer l'efficacité et la sécurité de l'application de ces instruments chez patients. Les implants polymériques, céramiques ou métalliques, par exemple l'implant chitosan-GP/sang, font partie de cette classe d'instruments médicaux et peuvent être évalués dans des modèles animaux.

Pour la réparation du cartilage *in vivo*, l'étude d'un modèle animal lapin est recommandée pour la conception et le développement de différentes formulations de l'implant (Hurtig et al., 2011). Les avantages de ce modèle animal sont un coût relativement faible, un élevage et une manipulation facile de l'animal et l'atteinte de la maturité squelettique en 7-9 mois (Ahern, Parvizi, Boston, & Schaer, 2009). De plus, ce modèle animal est l'un des plus fréquemment utilisés dans ce domaine de la recherche. Il y a donc un grand nombre de références qui facilitent le développement de nouvelles technologies.

1.4.3 Techniques de quantification et leurs limites

Pour évaluer l'effet de l'implant chitosan-GP/sang sur les mécanismes de réparation, plusieurs techniques de quantification et de détection ont été utilisées dans le cadre de ce projet de maîtrise.

1.4.3.1 Histomorphométrie

L'histomorphométrie des tissus osseux et cartilagineux est l'étude de la forme, de la structure et de l'organisation de tissu à partir d'images au microscope de coupes histologiques (Revell, 1983). L'histomorphométrie permet de quantifier d'effet de l'implant chitosan-GP/sang sur la réparation du cartilage à travers divers paramètres, incluant l'épaisseur du tissu réparé, le volume du tissu de granulation ou de la moelle osseuse, les pourcentages de dépôt de collagène de type I et de type II, ainsi que le pourcentage de GAG (Hoemann et al., 2011; Hoemann et al., 2007).

Cette méthode permet ainsi d'estimer l'efficacité et les changements apportés par l'implant chitosan-GP/sang comparativement à l'application de la microperforation seule, ou encore elle permet de comparer différentes formules de l'implant entre elles. Les variables histomorphométriques peuvent également être évaluées par le biais de programmes informatiques, qui diminuent considérablement le temps de collecte des données et facilitent leur analyse.

1.4.3.2 Stéréographie

La stéréographie est une méthode mathématique d'évaluation des paramètres de longueur, surface et de volume d'une structure ou d'un élément en trois dimensions (3D) défini dans une matrice à partir d'une représentation en deux dimensions (2D), tel qu'une image de microscope optique ou électronique. Cette méthode n'est pas à confondre avec la tomographie, elle ne permet pas d'avoir une représentation 3D de l'élément, mais elle permet d'estimer les paramètres géométriques de manière quantitative et d'obtenir des données stéréographiques reproductibles et comparables.

L'angiogenèse, définie comme le développement des vaisseaux sanguins, peut être évaluée par la quantification des vaisseaux sanguins à travers les paramètres stéréographiques. Les vaisseaux sanguins sont des structures distinctes des tissus environnants grâce à la

composition de leur paroi et leur rôle de séparer le flux sang des tissus, pour un meilleur contrôle des échanges entre ces deux environnements. Selon ces critères, ils peuvent donc être quantifiés par stéréographie dans le tissu de granulation, servant ici de volume de référence.

Les paramètres stéréographiques les plus communément évalués sont la densité de longueur (L_V), la densité de surface (S_V) et la densité de volume (V_V). L_V est calculée par le ratio du nombre de vaisseaux sanguins (Q_{BV}) sur l'aire (A_{ref}) de l'image microscopique. L'équation utilisée est la suivante :

$$\boxed{\text{Équation 1.1 : Densité de longueur, } L_V = 2 * \frac{Q_{BV}}{A_{ref}}}$$

Pour évaluer V_V , il est nécessaire de premièrement d'apposer un quadrillage sur la photo microscopique, par exemple de $5.97 \mu\text{m} \times 5.97 \mu\text{m}$. Ce dernier permet d'obtenir un nombre de points « contenus » dans les vaisseaux sanguins (P_{BV}) de taille variable (capillaires et artères), qui est ensuite divisé par le nombre total de points du quadrillage (P_{TOT}). Cette densité suit la formule suivante :

$$\boxed{\text{Équation 1.2 : Densité de volume, } V_V = \frac{\sum P_{BV}}{\sum P_{TOT}}}$$

S_V est déterminée par l'application de lignes de test ou un quadrillage sur l'image numérique, selon le choix du chercheur. Cette densité est calculée à partir du nombre d'intersections entre les parois des vaisseaux sanguins et les lignes tests (I_{BV}) divisées par la longueur totale des lignes de tests. Cependant, S_V peut être calculé selon deux méthodes distinctes, celle de Castello ou celle de Griffith (Griffiths, Burke, & Lucocq, 1993; Mathieu-Castello, 1987). Dans la première, le volume de référence dans lequel est estimée la surface des BV est le tissu de granulation, caractérisant donc la tortuosité des vaisseaux et le taux d'échange. L'équation de S_V pour la méthode de Castello est :

$$\boxed{\text{Équation 1.3 : Densité de surface (Castello), } S_V = 2 * \frac{I_{BV}}{L_{TOT}}}$$

où la longueur totale correspond à la largeur de l'image microscopique fois le nombre de lignes apposées sur l'image avec un espacement de $5.97 \mu\text{m}$.

La deuxième méthode (Griffith) procure une estimation du ratio surface-volume des vaisseaux sanguins, avec le volume de référence défini par le volume des vaisseaux sanguins. S_V est alors calculé par le ratio du nombre d'intersections I_{BV} et le nombre de points P_{BV} avec l'équation suivante :

Équation 1. 4 : Densité de surface (Griffith),
$$\boxed{S_V = 2 * \frac{I_{BV}}{P_{BV}}}.$$

Pour l'application de ces paramètres, la structure étudiée doit avoir une distribution isotrope dans sa matrice de référence. Lorsque cette condition n'est pas respectée, la densité de longueur et la densité de surface (de Castello et de Griffith) sont sujettes à un biais. Pour remédier à ce problème, diverses techniques d'échantillonnage aléatoire sont recommandées. Il est également possible dans le cas de la densité de surface d'apposer des lignes sinusoïdales, au lieu de lignes horizontales ou verticales (Garcia, Breen, Burugapalli, Dockery, & Pandit, 2007). La densité de volume est la seule variable qui n'est pas affectée par l'orientation de la structure étudiée.

1.4.3.3 Immunohistochimie et détection des MSC

Les cellules souches mésenchymateuses, comme toutes cellules d'un organisme, peuvent être identifiées à l'aide de différents marqueurs qu'elles possèdent à leur surface ou encore par les protéines et molécules qu'elles synthétisent. L'immunohistochimie est une technique de détection à l'aide d'anticorps produit contre des marqueurs précis des cellules ciblées.

La détection des MSC présente toutefois un défi, puisque dans le cas des MSC, aucun récepteur exclusif n'a été trouvé. Les marqueurs des MSC utilisés et décrits dans la littérature, sont souvent partagés par les lignées cellulaires descendantes des MSC ou encore permettent seulement d'identifier l'état différencié des MSC à la suite d'un certain stimulus (Jones et al., 2002; Pittenger et al., 1999).

La cytométrie en flux est une technique fréquemment qui peut être utilisée pour identifier les MSC. Ces cellules sont identifiées à l'aide d'anticorps combinés avec un fluorochrome, distinctifs sous faisceau lumineux. Les anticorps sélectionnés sous spécifiques aux marqueurs des cellules recherchées. Les MSC provenant de la moelle osseuse sont conventionnellement identifiées à travers l'expression des récepteurs et des marqueurs des suivants : ALCAM/CD166,

CD29, CD44, CD54, CD71, CD90/Thy-1, CD105/endoglin/SH2, CD106/VCAM-1Notch-1, SH3, SH4, SB10, STRO-1. Elles sont également triées par l'absence des marqueurs hématopoïétiques, GPA, CD4, CD7, CD14, CD16, CD21, CD34, CD45 (Grogan, Miyaki, Asahara, D'Lima, & Lotz, 2009; Jones et al., 2002; Lee et al., 2004; Montjovent et al., 2009; Pittenger et al., 1999; Rallapalli, Bishi, Verma, Cherian, & Guhathakurta, 2009; Tuan et al., 2003).

Cependant, les récepteurs exprimés par les MSC sont partagés par de nombreuses autres populations cellulaires et ne peuvent pas être utilisés en immunohistochimie pour l'identification définitive des MSC dans des tissus. Des études se concentrent donc sur l'identification de protéines ou molécules caractéristiques de la prolifération ou de la migration des cellules (Chen, Y. et al., 2007; Skalli et al., 1986). Ces processus biologiques sont entrepris par un nombre plus limité de cellules chez l'adulte et peuvent donc être plus facilement appliqués à la détection des cellules souches, tels que les MSC dans le cas de la réparation du cartilage et de l'os.

Afin de détecter les cellules visées, plusieurs protéines différentes peuvent être ciblées. Ces molécules peuvent être des marqueurs en surface, des protéines exprimées ou localisées dans le cytoplasme ou encore des protéines exprimées dans le noyau. Les anticorps testés dans le cadre de cette étude sont les anticorps anti- β -catenin, anti-Nestin et anti- α SMA.

1.4.3.3.1 β -catenin

La protéine β -catenin est exprimée au cours de deux processus cellulaires différents dans l'organisme : les jonctions d'adhésion cellulaire cadherin/catenin et la voie de signalisation Wnt. Comme coactivateur de la voie signalisation Wnt, la β -catenin est un potentiel marqueur pour la détection des MSC. La voie de signalisation Wnt est impliquée dans le développement embryonnaire, mais également dans les mécanismes de régénération de plusieurs tissus adultes (Clevers, 2006; Daugherty & Gottardi, 2007). En temps normal, la β -catenin est localisée dans le cytoplasme où elle est soit utilisée lors de jonctions cellulaires adhérentes, soit détruite après la phosphorylation pour le contrôle l'activation de la voie de signalisation Wnt (Daugherty & Gottardi, 2007). En effet, lorsque cette voie de signalisation est activée, il survient une translocation de la β -catenin dans le noyau de la cellule, ce qui permet la « reprogrammation » de la cellule.

Il a été montré que la β -caténin est exprimée dans différents tissus adultes humains (Clevers, 2006; Eberhart & Argani, 2001) : la matrice osseuse (os spongieux) et le cartilage, follicules pileux, le mésenchyme entourant les tubules rénaux, la base des cryptes de l'épithélium de l'intestin où se trouve les cellules souches, et parfois aussi le pancréas ou le cerveau (CNS). De nombreux articles et plusieurs revues mentionnent l'utilisation de l'anticorps anti- β -caténin dans divers domaines, tels que l'oncologie, dans le but de détecter des cellules souches ou des cellules en prolifération. Ainsi, il est raisonnable de penser que β -caténin est exprimé dans les cellules stromales de la moelle osseuse ou les cellules souches mésenchymateuses.

1.4.3.3.2 La nestin

La nestin, une protéine appartenant aux filaments intermédiaires, est principalement exprimée dans les cellules ayant une grande capacité de prolifération (Michalczyk & Ziman, 2005). Les filaments intermédiaires sont en fait impliqués dans la division cellulaire et ils aident notamment à orchestrer le désassemblage, la division et la reconstitution du cytoplasme et des compartiments du noyau, avec l'aide des filaments d'actine et les microtubules. La nestin est exprimée dans les cellules progénitrices des systèmes neuronaux (central et périphérique), dans les cellules progénitrices de muscle squelettique et cardiaque, dans les bourgeons dentaires et les cellules progénitrices de la peau dans les « hair follicles sheath » (Beguin, Gosselin, Mamarbachi, & Calderone, 2012; Calderone, 2012; Teranishi et al., 2007).

Comme la β -caténin, la nestin est un marqueur protéique de cellules souches en prolifération et devrait être exprimée dans les cellules souches mésenchymateuses. Il existe les anticorps qui reconnaissent la forme humaine et rat par IHC.

1.4.3.3.3 α SMA

Bien que l'actine soit l'une des protéines eucaryotes les plus fréquentes, elle est exprimée sous six isoformes, incluant l'isoforme α SMA-1. L'actine α SMA est exprimée dans les cellules musculaires lisses qui constituent les parois des artères et des veines, plusieurs tissus du système digestif (paroi de l'intestin), les parois des voies respiratoires (trachée) et les voies urinaires/génitales (Daintith & Martin, 2010; Skalli et al., 1986). L'actine α SMA est localisée plus précisément dans le cytoplasme des cellules.

Toutefois, il a été démontré dans plusieurs études que des cellules stromales mésenchymateuses humaines et de lapin NZW extraites des tissus osseux et cultivées *in vitro* expriment l'αSMA (Cai, Marty-Roix, Hsu, & Spector, 2001; Funakoshi et al., 2010). Un anticorps monoclonal (clone 1A-4, IgG2a, obtenu à partir de l'immunogène décapeptide N-terminale du α-smooth muscle actin.) anti-αSMA était employé dans le cadre de cette étude pour la détection des MSC.

Pour le bon fonctionnement d'un test IHC utilisant un anticorps soulevé contre une protéine d'une autre espèce, il est important d'optimiser le protocole et de se rassurer des bons témoins positifs et négatifs. L'IHC est une procédure complexe, composée de plusieurs étapes qui influent sur le résultat final. Quand l'IHC est fait sur un tissu, la contre-coloration est importante pour visualiser les structures, mais peut bloquer les signaux immunopositifs si trop fort. L'optimisation de l'IHC pour chaque anticorps (beta-caténine, nestine, alpha-SMA) était effectuée donc à travers plusieurs tests.

CHAPITRE 2 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT

Il a été démontré qu'en combinant la technique de stimulation de la moelle osseuse de microperforation avec un implant chitosan-GP/sang, le tissu cartilagineux, résultant de la réparation tissulaire, est plus hyalin qu'avec l'usage de la technique chirurgicale seule, chez le lapin. Cependant, la solidification de cet implant nécessite entre 10 et 15 minutes, ce qui cause plusieurs inconvénients pour son application clinique.

Dans une étude passée, il a été démontré que le temps de solidification de l'implant pouvait être réduit de moitié avec l'ajout de facteur de coagulation : le facteur rhFVIIa humain recombiné (rhFVIIa), le facteur tissulaire (TF) avec rhFVIIa, et la thrombine (IIa). Ces facteurs de coagulation sont connus pour leurs effets positifs sur la guérison tissulaire et ils sont parmi les composants de plusieurs médicaments ou implants disponibles aujourd'hui sur le marché, notamment Tisseel® (thrombin, Baxter) et NovoSeven® (rhFVIIa, Novo Nordisk).

Toutefois, leur effet sur la réparation du cartilage dans une microperforation n'est pas complètement élucidé, notamment leur effet sur l'angiogenèse et l'attraction des MSC. Nous avons donc décidé d'évaluer l'effet sur la réparation de l'ajout des facteurs de coagulation à l'implant chitosan-GP/sang, par le biais de la quantification de l'angiogenèse, à trois semaines postopération et à travers la distribution des MSC.

Pour ce projet de maîtrise, les tissus de réparation résultant de la stimulation de la moelle osseuse par microperforation dans un modèle de lapin ont été analysés, sans et avec le dépôt d'un implant formé d'un mélange de chitosan, de GP, de sang autologue et avec l'ajout de facteurs de coagulation. Il a été montré que les implants IIa-chitosan-GP/sang génèrent un tissu cartilagineux de meilleure qualité que celui obtenu avec la technique chirurgicale seule à 6 mois post-chirurgie (Marchand et al., 2012). L'effet du rhFVIIa-chitosan-GP/sang et TF+rhFVIIa-chitosan-GP/sang sur la réparation n'est toutefois pas encore connu.

Il a déjà été démontré que l'implant chitosan-GP/sang stimule un plus grand taux d'angiogenèse dans le tissu de granulation à 2 semaines post-chirurgie, un plus grand taux de MSC dans le tissu de granulation sous-chondral à 3 semaines, et une meilleure réparation

cartilagineuse à 8 semaines après l'intervention chirurgicale (Chevrier et al., 2007; Hoemann et al., 2007).

2.1 Hypothèse générale du mémoire

Les implants de chitosan-GP/sang avec les facteurs de coagulation stimulent un plus grand taux d'angiogenèse et recrutement des MSC à 3 semaines par rapport à la chirurgie toute seule.

2.1.1 Objectifs généraux du mémoire

- 1) Déterminer l'effet des facteurs de coagulation rhFVIIa, TF et IIa sur l'angiogenèse et la réparation du cartilage, dans un modèle *in vivo* NZW lapin, de réparation du cartilage induite par microperforation combinée avec un implant chitosan-GP/sang
- 2) Développer la technique de détection des MSC dans un modèle *in vivo* NZW lapin adulte, avec l'identification des tissus contrôle appropriés, dans le but d'évaluer la distribution des MSC dans un modèle *in vivo* Lapin (adulte), de réparation du cartilage et de l'os sous-chondral.
- 3) Mettre au point la détection des souches mésenchymateuses dans les tissus de granulation ostéochondraux du lapin utilisant les anticorps qui reconnaissent les cellules souches humaines.

2.2 Hypothèses spécifiques de l'article

Dans cet article, nous posons la première hypothèse que des facteurs de coagulation suivants peuvent augmenter la densité vasculaire, induite par un implant chitosan-GP/sang lors de la réparation du cartilage, 3 semaines postchirurgie :

- rhFVIIa
- TF
- IIa

La deuxième hypothèse est que ces mêmes facteurs permettent de retarder la formation des « chondrogenic foci », phénomène représentatif de la condensation de chondrocytes, lors de la réparation de l'os sous-chondral.

Pour finir, nous supposons que les mécanismes de l'angiogenèse peuvent être élucidés par des mesures stéréographiques, de densité de longueur, de surface et de volume des vaisseaux sanguins, dans le tissu de granulation des microperforations en réparation.

2.2.1 Objectifs spécifiques de l'article

- 1) Évaluer l'effet des facteurs de coagulation, le facteur VIIa recombiné humain (rhFVIIa), le facteur tissulaire (TF) et la thrombine (IIa) sur l'angiogenèse, à partir des résultats des variables stéréographiques
- 2) Évaluer l'effet des facteurs de coagulations sur la déposition des fibres de collagène et la formation de « chondrogenic foci », à partir des données histomorphométriques.

2.3 Hypothèses spécifiques de l'étude de détection des MSC

Dans cette étude, nous posons l'hypothèse que les marqueurs suivants peuvent être utilisés pour détecter les cellules souches mésenchymateuses :

- β -catenin
- Nestin
- α SMA

Nous posons également l'hypothèse que ces mêmes marqueurs peuvent être utilisés pour la détection *in vivo* des MSC dans des tissus ostéochondraux de réparation de cartilage induit par un implant chitosan-GP/sang et la méthode de stimulation de la moelle osseuse.

Enfin, nous supposons également que les tissus fœtaux de lapin (après 22 jours de gestation) et les tissus d'une « femelle lapin » en gestation, tels que le placenta, peuvent être utilisés comme contrôle positif dans l'optimisation de la détection des MSC par immunohistochimie.

2.3.1 Objectifs spécifiques de cette étude

- 1) Identifier un marqueur spécifique pour la détection de MSC dans des coupes ostéochondrales adultes chez le lapin;
- 2) Déterminer les conditions optimales, comme la concentration d'anticorps primaire, pour chacun des anticorps testés et optimiser la technique si nécessaire;
- 3) Évaluer le tissu ou la biopsie, la plus appropriée comme contrôle positif ou négatif pour le développement de technique future de détection des MSC par IHC.

CHAPITRE 3 STEREOLOGICAL ANALYSIS OF SUBCHONDRAL ANGIOGENESIS INDUCED BY CHITOSAN AND COAGULATION FACTORS IN MICRODRILLED ARTICULAR CARTIAGE DEFECTS

¹Mathieu, Colleen, B.Ing., ²Chevrier, Anik, Ph.D.,^{2,3}Viorica Lascau-Coman, M.Sc.,

⁴Rivard, Georges Étienne, M.D., ^{+1,2,3}Hoemann, Caroline D., Ph.D.

¹Institute of Biomedical Engineering, École Polytechnique, Montréal, QC, Canada;

²Department of Chemical Engineering, École Polytechnique, Montréal, QC, Canada;

³Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomedicales (GRSTB)

⁴Division of Hematology and Oncology, CHU Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada.

⁺Correspondence should be addressed to

Professor Caroline D. Hoemann, Ph.D.,

Department of Chemical Engineering

Ecole Polytechnique, PO Box 6079, Station Centre-Ville, Montreal, QC,

Canada H3C 3A7. Tel : 1-514-340-4848; Fax : 1-514-340-2980;

E-mail : caroline.hoemann@polymtl.ca

3.1 Présentation de l'article

Ce chapitre présente l'article rédigé dans le cadre de ce mémoire et répond aux objectifs présentés dans le chapitre précédent.

Cet article a été soumis à la revue *Osteoarthritis and Cartilage* en date du 09 aout 2012 et resoumis suite à l'évaluation des pairs en date du 15 novembre 2012.

La contribution du premier auteur à la collecte et à l'analyse des résultats, à la rédaction et à la révision de cet article est évaluée à 90 %.

La description détaillée de la contribution de chaque auteur est la suivante :

Mathieu, Colleen, B.Ing. : développement et optimisation de la méthode de quantification par stéréographie, exécution de l'histochimie (Gomori, SafO) et l'immunohistochimie (Col-I et Col-II) des échantillons, génération des images en microscopie optique, collecte et analyse des données de stéréographie (densité de longueur, de surface et de volume), collecte et analyse des données d'histomorphométrie (Col-I, Col-II et SafO), compilation des données, exécution de l'analyse statistique, interprétation des résultats, revue de la littérature, rédaction et révision de l'article, génération des figures et des tableaux, réponse à la révision des pairs.

Chevrier, Anik, Ph.D. : développement de la méthode de quantification par stéréographie, collecte et interprétation des données, révision de l'article.

Viorica Lascau-Coman, M.Sc. : cryosection des échantillons, exécution de l'histochimie des échantillons, collecte des données, révision de l'article.

Rivard, Georges Étienne, M.D. : conception et planification de l'étude, révision de l'article.

Hoemann, Caroline D., Ph.D. : conception et planification de l'étude, supervision de l'exécution des chirurgies, collecte des échantillons et les données à la nécropsie, compilation et interprétation des données, exécution de l'analyse statistique, génération des figures et des tableaux, révision de l'article, réponse à la révision des pairs.

3.2 Abstract

Objective : Cartilage repair elicited by bone marrow stimulation can be enhanced by a chitosan-GP/blood implant, through mechanisms involving therapeutic inflammatory angiogenesis. The implant is formed by *in situ* coagulation, which can be accelerated by adding coagulation factors. We hypothesised that coagulation factors enhance subchondral angiogenesis in repairing drilled defects.

Design : Full-thickness cartilage defects were created bilaterally in 12 skeletally mature rabbit knee trochlea, microdrilled, then allowed to bleed as a control (N=6) or treated with chitosan-GP/blood implant (N=6), or implant solidified with thrombin, tissue factor (TF) with recombinant human Factor VIIa (rhFVIIa), or rhFVIIa alone (N=4 each condition). At 3 weeks post-operative, quantitative stereology was used to obtain blood vessel length (Lv), surface (Sv), and volume density (Vv) at systematic depths in 2 distal microdrill holes. Collagen type I, type II and glycosaminoglycan percent stain in subchondral repair tissue was analyzed by histomorphometry.

Results: All drill holes showed a depth-dependent increase in blood vessel Lv, Sv and Vv ($p<0.0001$). Angiogenesis (Vv) was most stimulated by chitosan implant solidified with rhFVIIa or thrombin ($p<0.05$). Blood vessel stereology revealed these coagulation factor implants stimulated the formation of larger vessels rather than more blood vessels compared to drill-only controls. Col-I, Col-II, and GAG were significantly lower in all chitosan-treated defects compared to drill-only defects.

Conclusions : Subchondral angiogenesis is promoted by a combination of chitosan implant and rhFVIIa or thrombin. Chitosan implant delays chondrogenic differentiation, suppressed fibrosis, and promotes bone remodelling, which allows more blood vessel migration and woven bone repair towards the cartilage lesion area.

3.3 Key words:

Cartilage repair; blood vessel stereology; angiogenesis; bone marrow stimulation; chitosan; Factor VIIa; Tissue Factor; Thrombin

Running Headline: *Stereological analysis of subchondral angiogenesis*

3.4 Introduction

In wound repair, damaged tissue becomes infiltrated with a blood clot scaffold that supports the in-growth of immune cells and progenitor cells for the next stages of inflammation: granulation tissue formation, angiogenesis, and remodelling, followed by new tissue formation (reviewed in (Eming et al., 2007; Gurtner et al., 2008; Shaw & Martin, 2009; Stojadinovic, Carlson, Schultz, Davis, & Elster, 2008)). Bone marrow stimulation techniques for articular cartilage repair, such as microfracture and microdrilling, have been developed to create access channels between the cartilage lesion and subchondral bone cells (Hoemann et al., 2007; Insall, 1967; Meachim & Roberts, 1971; Steadman, J. Richard et al., 2010). Residency and adhesion of the blood clot to bone at the base of the cartilage lesion is believed to be an important factor for good repair (Steadman, J. R., Rodkey, Singleton, & Briggs, 1997). To improve the wound response to marrow stimulation, a stabilized blood clot implant was previously developed using a mixture of liquid chitosan, glycerol phosphate (GP) and autologous blood (chitosan-GP/blood) (Hoemann, Hurtig, et al., 2005; Hoemann et al., 2007). The implant coagulates *in situ* to form a hybrid clot with better residency and adhesion to bone and cartilage than bone-derived blood clot (Hoemann, Hurtig, et al., 2005; Rinaudo, 2006). Chitosan-GP/blood implant elicits a more hyaline cartilage repair tissue compared to surgical marrow stimulation alone, through a phase involving transient subchondral angiogenesis (Chevrier et al., 2007; Hoemann et al., 2010; Hoemann et al., 2007). Chitosan has been used in other contexts as a scaffold to promote chondrocyte cell adhesion or a carrier for chondrogenic factors (Hasanova et al., 2011; Li et al., 2012; Siu et al., 2012; Yang et al., 2012). However rapidly-degrading chitosan implants may be cleared prior to chondrocyte differentiation (Siu et al., 2012), and slowly-degrading chitosan scaffolds can persist and obstruct bone and cartilage repair (Abarrategi et al., 2010). Scaffold-guided subchondral angiogenesis is a novel repair paradigm intended to elicit both bone and cartilage repair.

Angiogenesis is the growth of new blood vessels from existing vessels while vasculogenesis is the pre-formation of tubular structures from hemangioblast precursors that subsequently anastomose with the blood vasculature (Jain, 2003). Angiogenesis is commonly studied in tissue regeneration and repair, since cells need a constant nutrient and oxygen supply to proliferate and survive. In bone fracture repair, two phases can be observed: acute inflammatory angiogenesis into granulation tissue which promotes intramembranous bone repair,

and catabolic angiogenesis into a cartilage callus which leads to endochondral bone formation (Chevrier et al., 2007, 2011; Hankenson, Dishowitz, Gray, & Schenker, 2011; Hoemann et al., 2010; Hoemann et al., 2012; Street et al., 2002). Inflammatory angiogenesis is a spontaneous and therapeutic fracture repair response that draws mesenchymal stem cells to the fracture site (Jain, 2003; Lolmede et al., 2009) and promotes woven bone repair, which is followed by the formation of chondrogenic foci (Chevrier et al., 2011; Shapiro, Koide, & Glimcher, 1993). Chondrogenic foci are the precursor structures of hyaline articular cartilage repair when they arise at the level of the bone plate. Treatments that stimulate acute inflammatory angiogenesis therefore have the potential to improve the osteochondral cartilage repair response.

Coagulation factors are known to promote angiogenesis, cell chemotaxis and proliferation *in vitro* (Fan et al., 2005; Kirilak et al., 2006; Maragoudakis, Tsopanoglou, & Andriopoulou, 2002; Ozaki et al., 2007), and thrombin (IIa), Tissue Factor (TF), and recombinant human Factor VIIa (rhFVIIa) can be used to accelerate *in situ* coagulation of the chitosan-GP/blood implant *in vivo* (Marchand, Rivard, Sun, & Hoemann, 2009). However the effect of coagulation factors on early angiogenesis in marrow stimulation repair is unknown. In this study, we tested the hypothesis that coagulation factors increase chitosan-GP/blood-induced blood vessel density, and delay the appearance of chondrogenic foci. We analyzed the effect of clot factors on chitosan-based repair at 3 weeks post-operative, when treatment differences are at their peak (Chevrier et al., 2007; Li et al., 2012).

Another goal of this study was to use stereology measures of to elucidate angiogenesis mechanisms in subchondral drill holes. Stereology is a mathematical method to estimate densities of 3D structures in a matrix with only its 2D representation (Baddeley, 2004; Chevrier et al., 2007; Dockery & Fraher, 2007; Griffiths et al., 1993; Jain, 2003). The referential matrix in this case, consists in microscopic drill hole granulation tissue images in histological sections (Dockery & Fraher, 2007; Garcia et al., 2007; Griffiths et al., 1993; Mandarim-de-Lacerda, 2003), from which one may analyze blood vessel length density (L_v , mm length of vessels per mm^3 field), surface density (S_v , mm^2 vessel perimeter per mm^3 field) and volume density (V_v , mm^3 area of vessels per mm^3 field). To account for an anisotropic shape of the repairing drill hole, a depth-wise sampling of the repair tissue in the middle of each hole was used to analyze the in-growth of blood vessels into the repairing defect.

3.5 Materials and Methods

3.5.1 Materials and implant generation

Purified human IIa (T4393, Sigma-Aldrich, ON, Canada, reconstituted at 100 U/mL, stored as frozen aliquots and diluted to 15 or 45 U/mL the day of surgery), TF (Innovin®, Product No. B4212-50, Dade/Cedarlane, Mississauga, ON, Canada, reconstituted in 2cc sterile Water For Injection, WFI), and rhFVIIa (Novonordisk, Copenhagen, Denmark) was reconstituted in WFI at 500 µg/mL and stored at -80°C until the day of surgery. TF with rhFVIIa was prepared by mixing 100 uL Innovin® with 5 µL 500 µg/mL rhFVIIa. Sterile 500 mM disodium β-glycerol phosphate/50 mM HCl pH 7.1 (GP : Lots CG5790601A1, CG5790606A) and certified autoclave-sterile 2.1% w/w chitosan-HCl solutions (pH 6.0, 81.0 and 81.7% DDA chitosan, dynamic viscosity 1100 to 1410 mPa.s, medical-grade, Lots CG3020602B, CG3020603A, CG3020612A) were from Biosyntech, Laval QC, Canada, now Piramal Healthcare, Laval QC, Canada. Chitosan-GP solutions were prepared in a sterile vial containing 3 or 6 depyrogenized stainless steel mixing beads the day of surgery, by combining 0.4 mL chitosan-HCl and 0.1 mL GP (“mini-kit”, for rabbits with bilateral implant treatment, see Groups 1 and 2a, **Tableau 3.1**), or 1.2 mL chitosan and 0.3 mL GP. Mini-kits were used for bilateral implants to minimize intra-operative whole blood collected from the rabbit. After trochlear defects were drilled, sterile autologous whole rabbit blood drawn intra-operatively for each implant was mixed at a 3:1 v/v ratio with chitosan-GP by manual shaking for 10 seconds, as described (Marchand et al., 2009).

Tableau 3.1. Experimental design of the *in vivo* cartilage repair study 21 days post-operative in NZW Rabbit, with alternating left-right treated knee.

Group	Number of animals	Treated Knee	Control Knee
1	Female, N=2; Male, N=2	Implant with rhFVIIa†	Chitosan-GP/blood implant only
2a	Female, N=2*; Male N=1	Implant with TF + rhFVIIa§	Chitosan-GP/blood implant only
2 b	Female, N=1; Male, N=1	Implant with TF + rhFVIIa§	Drilled defect only
3	Female, N=3; Male, N=1	Implant with thrombin¶	Drilled defect only

*1 female rabbit in group 2a had an unscheduled death at 13 days post-operative, and was removed from the analysis.

- †10 µg/mL (200nM) rhFVIIa pre-mixed with whole blood prior to combining with chitosan-GP
- §3 µL of a mixture of 500 ng/mL TF + 5 µg/mL (100 nM) rhFVIIa pre-loaded on the drill defect prior to applying chitosan-GP, ~60s delay
- ¶3 µL of 15 or 45 U/mL thrombin pre-loaded on the drill defect prior to applying chitosan-GP, ~60s delay

3.5.2 In vivo articular bone marrow stimulation rabbit model

All protocols involving animals were approved by an institutional ethics committee for animal research according to Tri-Council guidelines, and analyzed 5 test conditions in 4 groups of skeletally mature animals, including, 12 retired breeder New Zealand White rabbits up to 24 months old and one 7 month-old naive spare (4.5 ± 0.7 kg, male and female, **Tableau 4.1**). As previously described (Marchand et al., 2009), rabbits were anesthetized and given small knee arthrotomies one at a time, to create bilateral 3.5mm x 4mm full-thickness cartilage defects (**Figure 3-1A**) that were microdrilled with six, 0.5 mm proximal and two, 0.9 mm diameter distal holes (Carbon Steel drill burrs, 19007-05, 19007-09, Fine Science Tools, Vancouver BC; **Figure 3-1B**), then left to bleed (controls, N=6 defects) or treated by *in situ* coagulation of ~25 µL liquid chitosan-GP/blood implant over the drill defect (N=6 defects) or applied in combination with a coagulation factor: 200 nM rhFVIIa pre-mixed into whole blood (N=4 defects), or 3 µL IIa (N=4 defects, **Figure 3-1C**), or 3 µL TF+rhFVIIa (N=5 defects) pre-applied to the defect surface (Marchand et al., 2009) (see **Tableau 3.1**). Knees were closed in 3 sutured layers, buprenorphine administered for 3 days (post-operative pain management) and rabbits allowed immediate unrestrained cage activity. One rabbit (a female retired breeder ~24 months old) had an unscheduled death at 13 days post-operatively, reducing the study to N=12 rabbits (**Tableau 3.1**). Macroscopic necropsy did not reveal any anatomical cause for death. Histopathology of kidney, GI tract, liver, spleen, and lung was reviewed by an independent pathologist at Université de Montreal, who concluded that he could not identify any microscopic finding that could explain the death of the animal. At 21 days post-operative rabbits were euthanized by intravenous pentobarbital injection under anesthesia. All knee joints were verified as free of exudates or infection at necropsy.

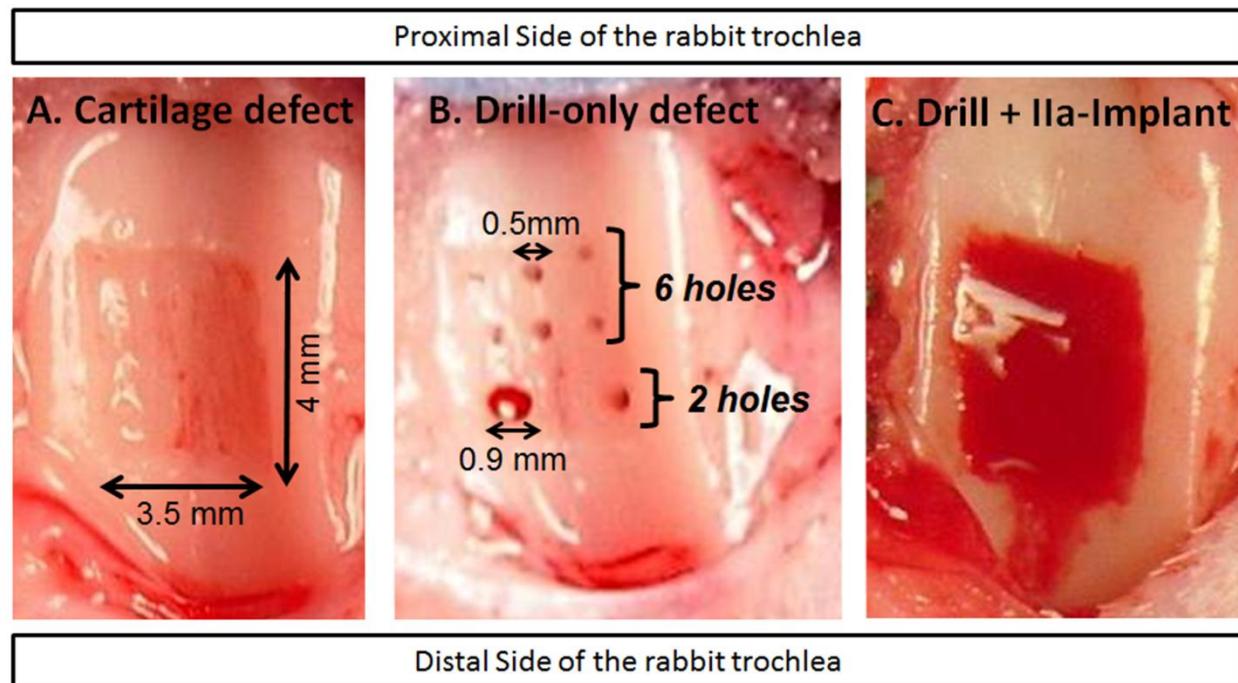


Figure 3-1 : Articular cartilage repair model before and after coagulation factor-enhanced implant delivery. In this example, (A) a full-thickness cartilage defect was created in the rabbit knee trochlea by debriding into the calcified layer, after which (B) microdrill holes (6 proximal 0.5 mm diameter, and 2 distal x 0.9 mm diameter) were created under constant irrigation with isotonic saline and finally (C) a IIa-chitosan-GP/blood implant was added and solidified over the microdrilled defect.

3.5.3 Histology

Femur ends were fixed in 4% paraformaldehyde/0.1% glutaraldehyde/100 mM cacodylate pH 7.2, decalcified in 0.5N HCl/0.1% paraformaldehyde, post-fixed for 2 to 3 days, trimmed transversely through the defect, equilibrated in sucrose, and embedded in Tissue-Tek OCT compound (Cedarlane, Hornby, ON, Canada). After generating the histological cryosections, it was discovered that the small proximal holes were only partly captured in many sections. Thus only cryosections collected through the middle of the two 0.9 mm drill holes were used (**Tableau 3.2**). Cryosections were stained with Gomori Trichrome solution pH 3.4 prepared with 0.6% (w/v) Chromotrope 2R (C-3143, Sigma, Oakville, Ontario, Canada), 0.3 % (w/v) Fast Green and 0.6% (w/v) phosphotungstic acid (P-4006, Sigma, Oakville, Ontario, Canada). Immunohistochemistry was performed with anti-collagen type I monoclonal I-8H5 (MAB6616,

Abnova, Walnut, CA, USA) and anti-collagen type II monoclonal II-II6B3 (Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB, Iowa, USA), with biotinylated anti-mouse secondary antibody and ABC-AP red substrate detection (Vector/Cedarlane, Mississauga, ON, Canada) and light hematoxylin counterstain. Sections were also stained with Safranin O/fast green/Weigert iron hematoxylin (Chevrier, Rossomacha, Buschmann, & Hoemann, 2005).

Tableau 3.2 : Experimental design for the analysis of angiogenesis in the two distal holes of each cartilage defect.

#	Condition	Description	Number of Knees (Female + Male)	Total number of distal drill hole defects analyzed per condition
1	Drl	Drilled control defect	N=4 + N=2	12
2	Imp	Chitosan-GP/blood implant only	N=3 + N=3	12
3	rhFVIIa	Implant with rhFVIIa †	N=2 + N=2	8
4	TF+rhFVIIa	Implant with pre-application of TF+ rhFVIIa	N=2 + N=2	8
5	IIa	Implant with pre-application thrombin	N=3 + N=1	8

3.5.4 Blood vessel stereology

Gomori-stained slides were blinded and 40x magnification digital images were systematically acquired at up to four specific depths in the middle of each drill hole using calibrated histomorphometric software (Northern Eclipse, Empix, Mississauga, ON, Canada). The drill hole edges and central axis were defined for each hole. *Top-down* measures used the surface of the granulation tissue as a reference line (**Figure 3-2A**, left schematic), to acquire images at 0.0 mm, 0.5 mm, 1.0 mm and 1.5 mm deep, excluding images that occurred in bone. This *Top-down* method slightly differs from a previous study where the projected tidemark was the top reference line and images were acquired at 0.5, 1.25 and 2.0 mm within the drill hole towards the bone (Chevrier et al., 2007). Because many blood vessels were observed at the base of the microdrill holes, a second method was tested: *Bottom-up*, which places the reference line at the base of the hole (**Figure 3-2A** right schematic), and acquires images at 100 µm from the bottom, and at 0.5mm intervals towards the surface (i.e., at 0.1, 0.6, 1.1, 1.6 mm, **Figure 3-2A**).

Subchondral blood vessels (BV) were scored when at least a few erythrocytes were present and enclosed in a defined structure of endothelial cells. Infrequent vessel structures missing erythrocytes were not taken in consideration (<2% of the total vessels scored), nor were clusters of erythrocytes clearly dissociated from endothelial cells. To quantify L_V (mm/mm^3 ; vessels/ mm^2), the number of BV cross-sections (Q_{BV}) in the image was counted, excluding vessels that crossed the two “forbidden lines”, in a total image area of 0.041mm^2 (**Figure 3-2B**), then the equation $L_V = 2*Q_{BV}/(\text{total area})$ (Garcia et al., 2007; Griffiths et al., 1993) was applied. For V_v (mm^3/mm^3), a $5.97\text{ }\mu\text{m} \times 5.97\text{ }\mu\text{m}$ grid with 1200 total points (P_T) was applied on each image. All points (grid intersections) overlapping the BV (P_{BV}) were counted to obtain $V_v = P_{BV}/P_T$ (Garcia et al., 2007; Griffiths et al., 1993) (**Figure 3-2C**). For blood vessel surface density (S_v , mm^2/mm^3 ; surface/mm) two approaches were used: Castello’s S_v method, where the granulation tissue matrix is the reference volume (Mathieu-Castello, 1987), and Griffith’s S_v , where the blood vessel is the reference volume (Griffiths et al., 1993). For Castello’s S_v ($\text{mm}^2 \text{ BV}/\text{mm}^3$ granulation tissue), a horizontal line grid with 30, 0.233mm lines at $5.97\text{ }\mu\text{m}$ spacing is randomly placed on the image (**Figure 3-2D**), and all intersections between the lines and the BV endothelial cell perimeter are quantified (I_{BV}). Since a horizontal line grid is used, Castello’s $S_v = 2*I_{BV}/(\text{Total length})$ (Garcia et al., 2007), with the total length of the test lines equal to the line length (0.233mm) times 30, the total number of horizontal lines. Griffith’s S_v method ($\text{mm}^2 \text{ BV}/\text{mm}^3 \text{ BV}$) employs the same $2*I_{BV}$ value but divided by P_{BV} , obtained by counting all grid intersections overlapping with blood vessels (**Figure 3-2C**), and Griffith’s $S_v = 2*I_{BV}/P_{BV}$ (Griffiths et al., 1993). The average S_v (Griffith’s) per hole was calculated strictly from fields that contained at least one blood vessel.

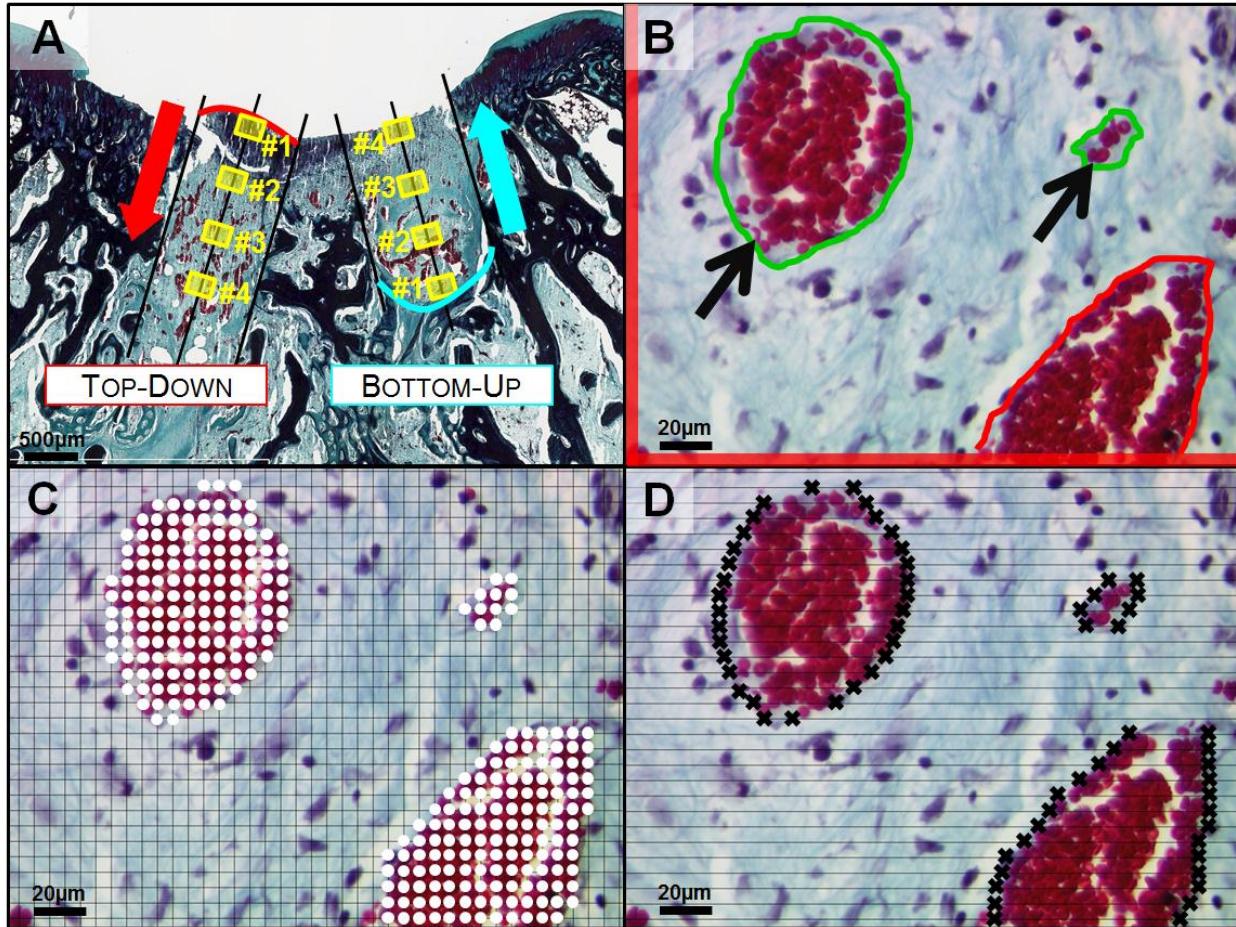


Figure 3-2 : Stereological analysis of blood vessels. Depth measurements and image acquisition within the drill hole tissue (A) for the Top-Down method (red) and the Bottom-Up method (blue); Blood vessel (BV) quantification in an example 40x magnification digital image showing measures of (B) the number of BV cross-sections (Q_{BV}) to calculate L_v (black arrows; forbidden lines and excluded BV in red), (C) the grid intersections (points) contained in BV (white dots, P_{BV}) to calculate V_v and also used as the reference volume to calculate S_v by Griffith's method, and (D) the number of intersections between the test lines and the BV wall (black crosses, I_{BV}) to calculate both Castello's and Griffith's S_v .

3.5.5 Histomorphometric analysis of repair tissue collagen type II, collagen type I and GAG content

Blinded sections were used to analyse drill hole soft tissue cross-sectional area and percent SafO, col-I and col-II staining by threshold analysis with the HSV color system

(Hoemann et al., 2007). Soft tissue within each hole was cropped from digital images using Northern Eclipse calibrated software to obtain Total Area (TA, mm²) by training the threshold on all colors, then the thresholds adjusted to total pink and red-stained area (TS), using thresholds for Col-II Hue[30;205] and Saturation[35;255]; for Col-I Hue[0;220] and Saturation[30;255] and for SafO Hue[20;210] and Saturation[50;255]. Percent stained area was obtained according to % stain = (TS)/TA (%) (Hoemann et al., 2011). Gomori stained sections were used to quantify hole depth, using calibrated line measures in the middle of the hole that spanned from the surface of the granulation tissue to new bone at the base of the defect.

3.5.6 Statistical analysis

The General Linear Model (GLM, Statistica, v.9, Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) was used to analyze the effect of treatment condition (N=8 to 12 drill holes per condition, see **Tableau 3.2**) and depth-level (N=3 levels per hole, 0, 0.5, and 1.0 mm from the reference line) as categorical predictors of each dependent variable Lv, Vv, Sv (Castello's) and Sv (Griffith's), along with a post-hoc Fisher least squares difference (LSD) test to analyze univariate differences. The Shapiro-Wilk test showed all data sets followed a normal distribution, except IIa-implant Lv, drill-only Vv, and implant-only Vv data were slightly skewed. Each of the 48 drill holes analyzed was considered as independent, with half of the holes constituting within-animal observations (Ranstam, 2012). The GLM with treatment condition as the only categorical predictor, was used to evaluate treatment-specific differences in the mean % tissue stain (col-I, col-II, SafO), drill hole soft tissue cross-sectional area and residual hole depth, and mean Lv, Vv, Sv (analyzed by taking the average of all 4 depth measures in each hole), with Fisher LSD post-hoc analysis to observe univariate differences. The study design assumes that the observed outcomes are independent of animal, knee (left-right), age, and sex (male-female). Statistical significance was set at p<0.05.

3.6 Results

3.6.1 Blood vessel stereology an effect of clotting factors on angiogenesis

Marrow stimulation surgery, with or without implant, elicited sterile inflammation as shown by soft tissue parapatellar swelling at 1 week post-operative in roughly half the operated knees, that persisted in 30% of drill-only, and 50% of implant-treated knees (\pm coagulation

factors) at 21 days post-operative, without signs of infection. At necropsy, almost all control drill holes were filled with a white repair tissue while most treated drill holes were filled with either a red or dull white-grey repair tissue. The macroscopic “reddish” appearance coincided with the presence of large blood vessels at the base of the hole in the histology sections, while white repair tissues had abundant extracellular matrix at the top of the hole (**Figure 3-3**).

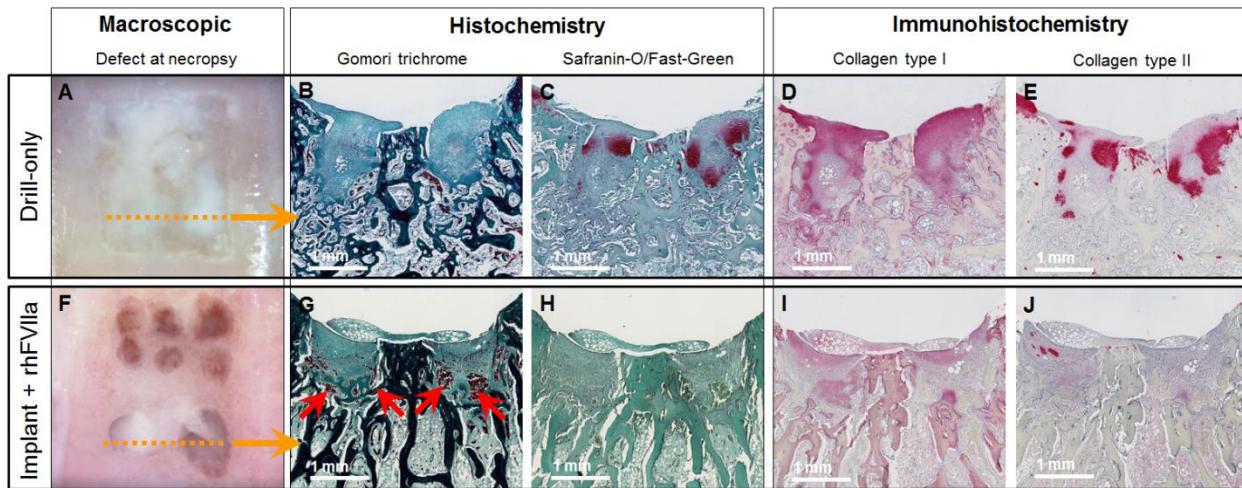


Figure 3-3 : Macroscopic defect appearance and corresponding microscopic features. Image at necropsy of the cartilage defect in a representative control sample (drill only, A-E) and a treated sample (chitosan implant with factor rhFVIIa, F-J) and the corresponding histology of the two distal holes (Gomori trichrome stain, SafraninO/Fast Green stain; or pink collagen immunostain as indicated). Big blood vessels (red arrows) and low collagen seen on the histologic sections give the reddish color to the repair tissue at necropsy.

Top-down stereology measures revealed a depth-dependent increase in angiogenic vessels to 1 mm deep in the microdrill holes, for Lv, Sv and Vv ($p<0.00001$, **Figures 3-4A-C**). *Top-down* Lv profiles ranged from 0 to $120/\text{mm}^2$ (drill-only) and ~20 to $120/\text{mm}^2$ (implant-treated) (**Figure 3-4A**). IIa-implant treated defects had the highest blood vessel Vv (23%) at 1 mm deep in the hole and the highest Sv (12 mm^{-1}) at 0.5mm deep in the hole ($p=0.035$ vs drill-only, $p=0.010$ vs implant-only, **Figures 3-4B,C**). Analysis of Griffith’s Sv (blood vessel volume as the reference) showed an over-all diminishing surface-to-volume ratio with depth ($p<0.000002$, **Figure 3-4D**). These data illustrate clearly the anisotropic blood vessel growth in the microdrilled hole from the base of the hole towards the surface and indicate the location of larger vessels

deeper in the holes. Griffith's Sv also revealed a significant difference due to treatment condition ($p=0.04$), related to the unique and complete absence of blood vessels in drill-only defects at the top of the hole (†, **Figure 3-4D**).

The *Bottom-up* method produced more variation in the data for each condition, compared to the *Top-down* method, but generally showed the same trends (**Figures 3-4E-H**). Significant depth-dependent increases in angiogenic vessels were seen between the base and 1.1mm higher in the drill hole for Vv and Sv ($p=0.01$ to $p=0.002$, **Figures 3-4F-H**), but not for Lv ($p=0.47$, **Figure 3-4D**).

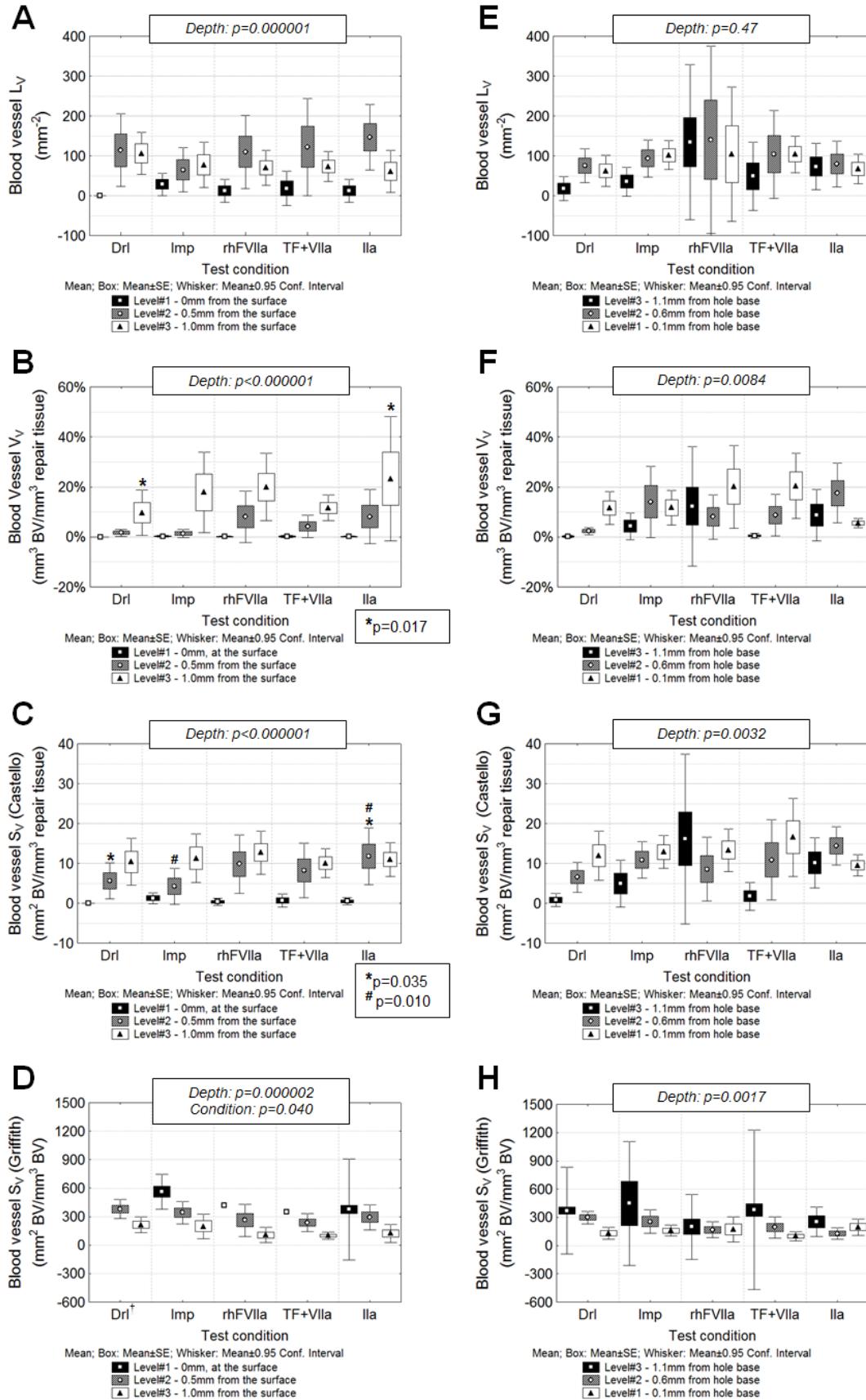


Figure 3-4 : Depth-dependent variation in blood vessel density in repairing drill holes. Data are presented from the *Top-down* method (A-D) at 0mm, 0.5mm and 1.0mm from the granulation tissue surface and from the *Bottom-up* method (E-H) at 1.1mm, 0.6mm, and 0.1 mm from the drill hole base. (A& E) Lv (B & F) Vv; (C & G) Sv (Costello's), and (D & H) Sv (Griffith's) are shown for drill only (Drl), chitosan implant only (Imp), and implant solidified with rhFVIIa (rhFVIIa), tissue factor and factor rhFVIIa (TF+VIIa) or thrombin (IIa). P-values presented were obtained through univariate analysis of the whole model fit of the dependent stereological variables to the designed GLM model, with the treatment condition and the depth-level set as categorical predictors. Data are shown as the mean (point) with the uncertainty estimated by standard error (box) and $\pm 95\%$, confidence intervals (whiskers). Symbols: † (panel D) indicates that Sv=0 (Griffith's method) at the top of the drill hole (0mm) in drill-only control defects. Only fields containing blood vessels were used to calculate Griffith's Sv and no value was attributed to fields without any blood vessels.

When *Top-down* measures were analyzed using an average value up to 1.5 mm deep in the hole, a similar average Lv was obtained for all treatment conditions (~ 65 to $80/\text{mm}^2$, **Figure 3-5A**). Vv was increased 4-fold in rhFVIIa-implant and IIa-implant repair tissues compared to drill-only ($p=0.031$ and $p=0.038$, respectively, **Figure 3-5B**). A trend for higher Castello's Sv for these two conditions was also seen ($p=0.053$ and $p=0.094$ for rhFVIIa and IIa, respectively, **Figure 3-5C**). In this case, higher Sv indicates that a larger surface is available for the exchange of oxygen and nutrients between the blood stream and the granulation tissue. Griffith's Sv values were lower for rhFVIIa-implant and TF+VIIa-implant treated defects, compared to drill only and compared to implant-only (**Figure 3-5D**). Because here lower Sv indicates more voluminous blood vessels, and because Lv was similar between conditions, these data showed that the treatment of microdrilled subchondral bone defects with rhFVIIa-implant and IIa-implant elicited the formation of larger blood vessels (Vv and Sv) rather than promoting a higher number of vessels (Lv). Larger vessels allow a higher blood inflow in the granulation tissue in comparison to microdrilling-alone. The data also showed that the chitosan implant had a specific effect on facilitating blood vessel growth to the top of the microdrill holes, with and without coagulation factor.

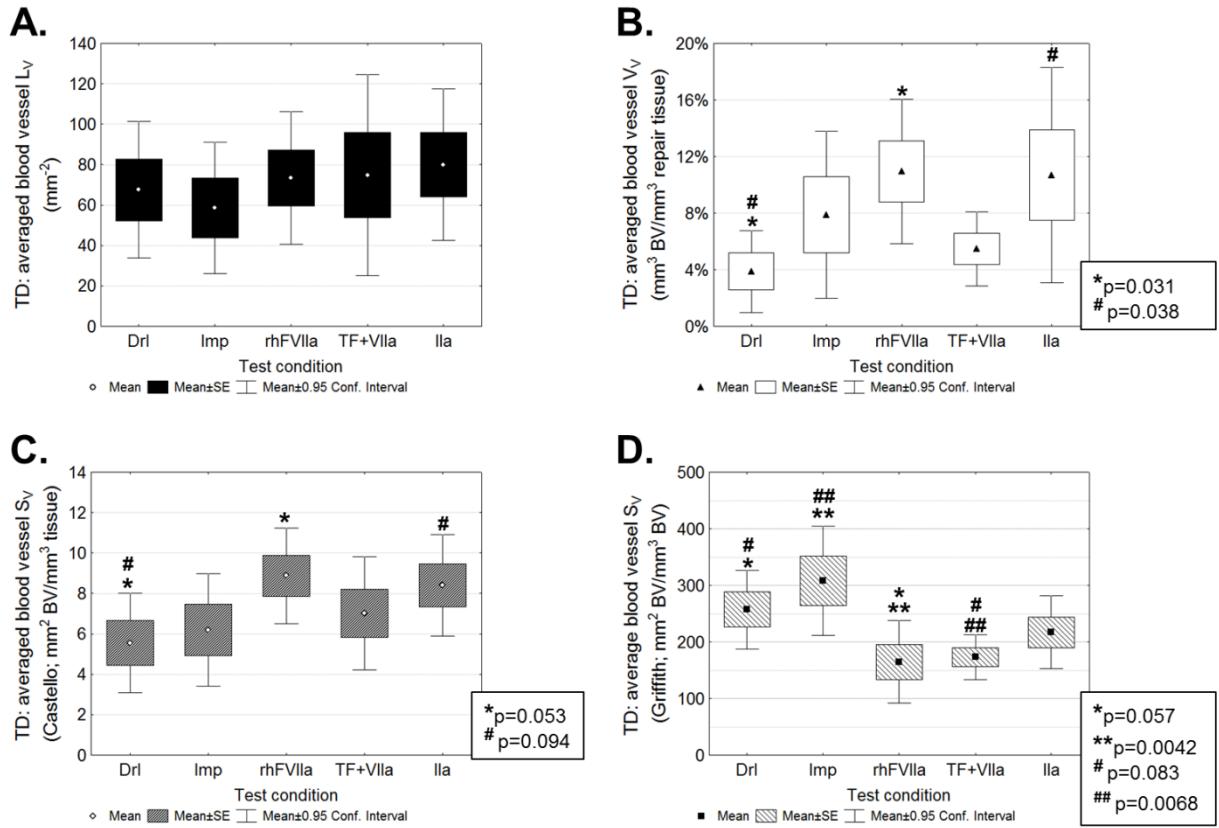


Figure 3-5 : Average blood vessel densities of all depths and conditions for *Top-down* measures of L_v (A), V_v (B) and S_v (Castello's method, C and Griffith's method, D) for drill only (Drl), chitosan implant only (Imp), and implant solidified with rhFVIIa (rhFVIIa), tissue factor and rhFVIIa (TF+VIIa) or thrombin (IIa). V_v : p=0.031 for rhFVIIa vs drill-only, p=0.038 for IIa vs drill-only. For S_v with Castello's method, p=0.053 rhFVIIa vs drill-only, and p=0.094 for IIa vs drill-only. For S_v with Griffith's method, p=0.057 rhFVIIa vs drill-only, p=0.0042 rhFVIIa vs chitosan implant-only, p=0.083 for IIa vs drill-only, and p=0.0068 rhFVIIa vs chitosan implant-only (Fisher post-hoc, N=8 to N=12 drill holes analyzed per condition). Data are shown as the mean (point) with the uncertainty estimated by standard error (box) and $\pm 95\%$ confidence intervals (whiskers).

3.6.2 Chitosan implant and thrombin delayed drill hole bone repair and chitosan implant delayed collagen deposition

All bone defects were, on average, smaller than the initial defect area ($\sim 3.6 \text{ mm}^2$) and shallower than the initial depth ($\sim 3-4 \text{ mm}$) (Figure 3-6A). Implant-treated drill holes were

consistently wider than drill-only controls, especially for IIa-implant-treated defects ($p=0.013$ vs drill-only, **Figure 3-6A**). By comparison, the average hole depth was variable, ranging from ~1.5-1.7mm (rFVIIa-implant, TF+rhFVIIa-implant, drill-only), 2.0 mm (implant), and 2.1 mm (IIa-implant, $p=0.034$ vs drill-only, **Figure 3-6A**). These data suggested that chitosan implant induced bone remodelling at the edges of the drill hole, and that thrombin promoted this effect.

In all defects treated with chitosan implant, only traces of GAG and collagen type II (Col-II) were found (**Figures 3-3 & 3-6C,D**) whereas defects that were only microdrilled had about 20% of the tissue area on the histological sections stained positively for both GAG and Col-II. They are both components of chondrogenic foci, thus the appearance of chondrogenic foci is delayed by the use of chitosan implant irrespective of the addition of coagulation factor. For collagen type I (Col-I) deposition, the mean percent Col-I for the drill-only group was about twice higher than the other treatment conditions (**Figure 3-6B**).

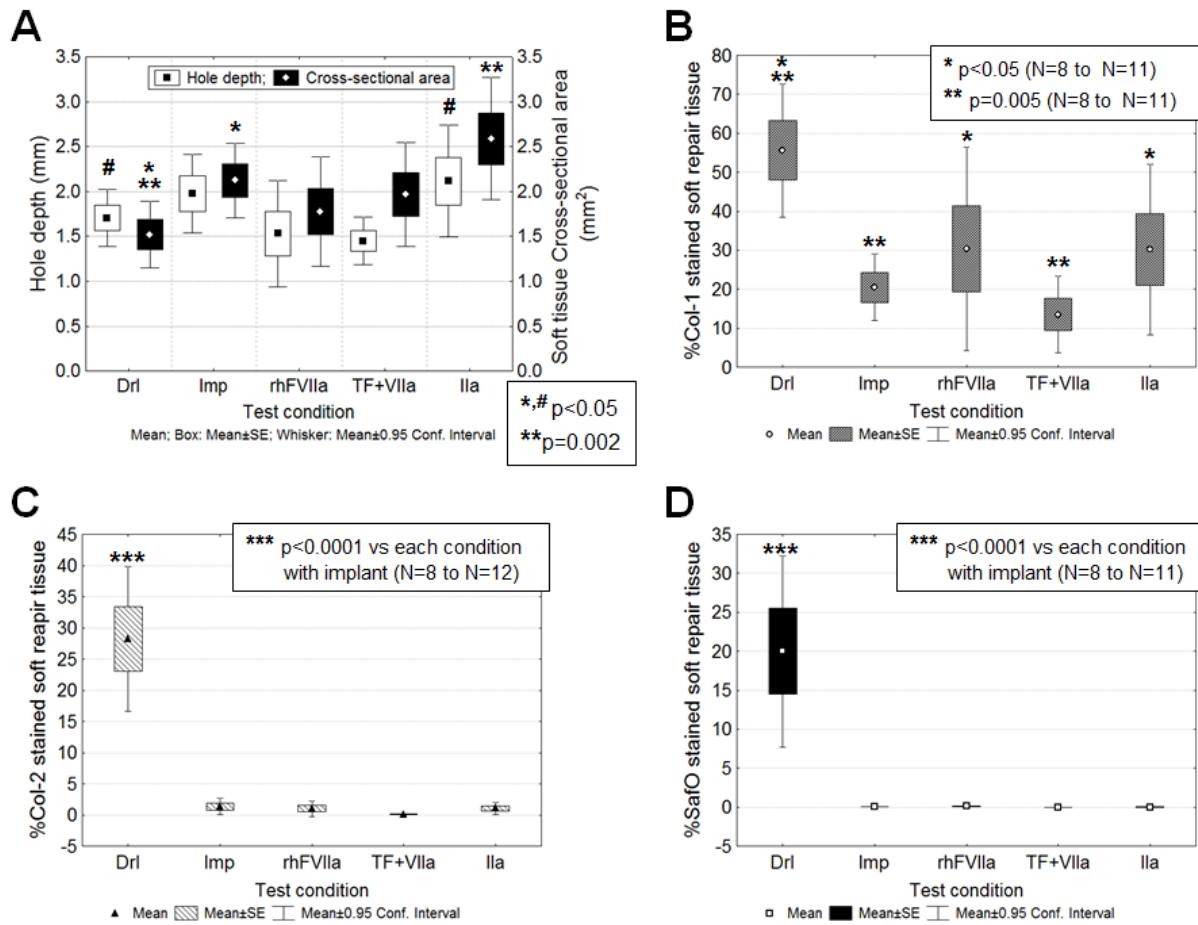


Figure 3-6 : Histomorphometry of GAG, Col-I and Col-II in the drill hole granulation tissue at 21 days post-operative. (A) mean cross-sectional area of the residual microdrilled hole (mm^2) and % stained soft repair tissue for Safranin O (B) collagen type I (C) and collagen type II (D). Data is shown as the mean (point) with the uncertainty estimated by standard error (box) and $\pm 95\%$, confidence intervals (whiskers) for the 5 groups: drill only (Drl), chitosan implant only (Imp), and implant solidified with rhFVIIa (rhFVIIa), tissue factor and factor rhFVIIa (TF+VIIa) and thrombin (IIa). Statistics presented were obtained with a Post-hoc Fisher test (N=8 to N=12 per condition, Gomori and Col-II; or N=8 to N=11 per condition, SafO and Col-I).

Thus, these results show that chitosan also suppresses fibrosis (Col-I) at 3 week post-surgery and that the addition of coagulation factors to the implant does not alter these results. Moreover, Col-I and Col-II deposition in the matrix of control holes was mutually exclusive of

blood vessel growth in an area around 0.5 mm from the surface in the hole (**Figure 3-7**), where stereology showed a significant effect of both chitosan and coagulation factors. The lack of bone plate remodelling in control defects seems to prevent ingrowth of vessels from trabeculae at the bone plate level.

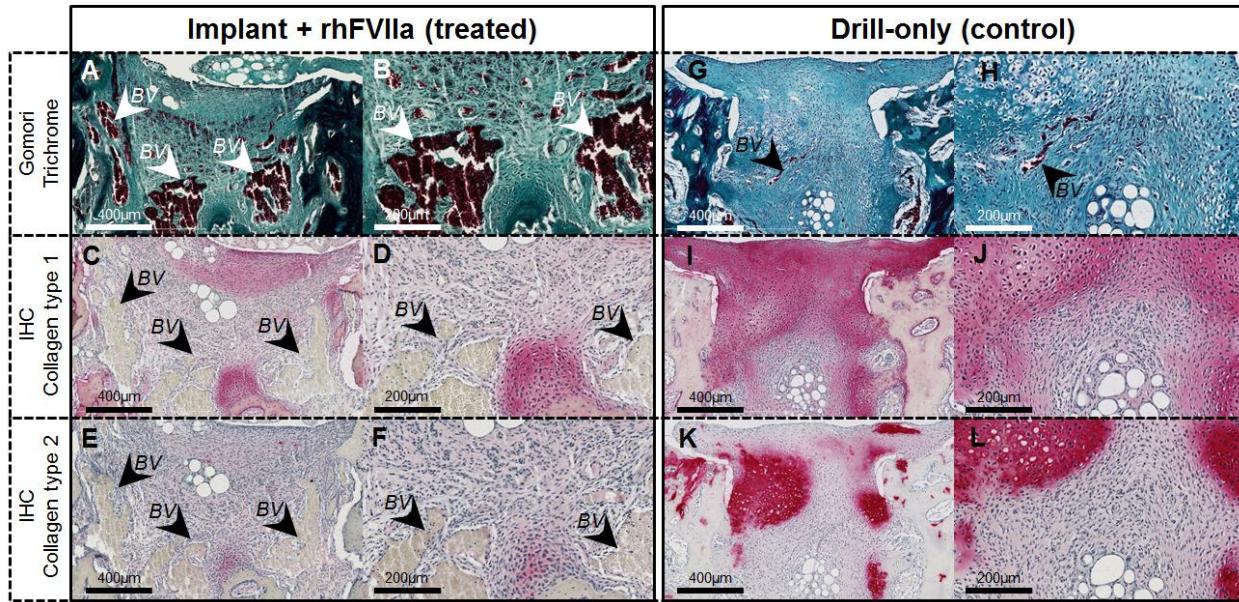


Figure 3-7 : Blood vessel localisation and collagen type I and type II deposition. Histological images at the surface of the soft repair tissue (10x, A,C,E,G,I,K) and at 0.4mm from the surface (20x, B,D,F,H,J,L) in a representative control sample (drill only) and a treated sample (chitosan implant with factor rhFVIIa) with histochemistry (Gomori trichrome) and immunohistochemistry (Collagen type I and type II) stains. Blood vessels are seen in regions with little collagen deposition, whether it is type I or type II, and occurred either above the chondrogenic foci (A-F, treated) or below the foci (G-L, control).

3.7 Discussion

This study reports the novel finding of spatial guidance of blood vessels toward the surface of repairing microdrill holes in a model of bone marrow stimulation-based articular cartilage repair. Prior analyses of angiogenesis have been limited to mainly bone fracture repair, and confined to qualitative observations or cross-sections of blood vessels in a selected area (Henno et al., 2003; Mapp et al., 2008; Wang, L. et al., 2010), which fall short of demonstrating spatial or volume-dependent changes in angiogenesis. In this study, stereological parameters, L_v ,

S_v and V_v revealed that adding rhFVIIa and thrombin to the chitosan-GP/blood implant promotes the formation of larger blood vessels from the base of the microdrilled hole. The *Top-down* method is both quantitative and reproducible, since the average length density results obtained are in the same range as those obtained in a similar model at 21 days post-surgery (Chevrier et al., 2007). Blood vessel stereology thus standardizes the data, which permits direct comparison of the data to other studies.

Blood vessel V_v can vary from 3% to 7% (brain tissues, nasal mucosa) to 29% (placenta) throughout the various tissues of the body (Abrams et al., 1997; Dockery & Fraher, 2007; Mayhew, Wijesekara, Baker, & Ong, 2004). The relatively high 20% V_v at the base of many chitosan implant-treated drill holes was due to the formation of large blood vessels as opposed to the very dense capillary bed found in placenta, for example. Thrombin peptide TP508 and thrombin were previously shown to stimulate angiogenesis in subcutaneous sites, and TP508 stimulated the formation of large vessels in repairing bone fracture callus, but the actual vessel dimensions were not reported (Carney et al., 1992; Wang, H. L. et al., 2005). Our data now confirm that thrombin stimulates a 4-fold increase in acute angiogenesis in subchondral bone defects, and extend the data to show that rhFVIIa also stimulates angiogenesis *in vivo*.

Stereology theoretically assumes an isotropic structure, and uses random sampling techniques to reduce bias (Baddeley, 2004; Dockery & Fraher, 2007; Garcia et al., 2007; Griffiths et al., 1993), but in the case of cartilage repair, the biological processes of interest occur in an anisotropic granulation tissue therefore traditional sampling techniques cannot be applied. Point counting with a randomly imposed grid generates unbiased volume density (V_v) measures, however L_v and S_v parameters were partially biased by the anisotropic orientation of blood vessel growth from the vascular bone perimeter to the middle of the microdrilled hole. Applying cycloid lines (Garcia et al., 2007) can further reduce bias in S_v measures. For L_v , sampling in the middle of the holes minimized bias due to slight variations in drill hole angle and sectioning plane. Other limitations in the methodology were inherent to the wide variation in blood vessel size. Small capillaries were not visible at lower magnifications, which obliged us to use 40x magnification images, and very large vessels crossed the forbidden lines in some 40x magnification images, generating $L_v=0$ and high V_v for 8 out of 166 measures, which nonetheless had a very low impact on the final data. Castello's and Griffith's S_v methods provided distinct information on angiogenic vessels: higher Castello's S_v values suggest

branching, while lower Griffith's S_v values show a low surface-volume ratio indicating bigger blood vessels and more tissue oxygenation in the chosen reference volume. Analysis of tortuosity and connectivity between bone trabeculae would require additional 3D analyses of intact vessels.

In fracture repair, angiogenesis occurs spontaneously during 2 phases: in the granulation tissue, and later on by vascular invasion during endochondral ossification (Hoemann et al., 2012; Street et al., 2002). In rabbit 3 mm osteochondral defects, granulation tissue angiogenesis at 1 week post-operative is spontaneously followed by abundant collagen deposition at 3 weeks (~30% per dry weight collagen, and around twice as much Col-I as Col-II) (Furukawa, Eyre, Koide, & Glimcher, 1980; Hoemann, Sun, et al., 2005; Shapiro et al., 1993). The delay of collagen deposition by chitosan implant is highly reproducible (Chen, G. et al., 2011; Chevrier et al., 2007, 2011; Hoemann et al., 2010) (**Figure 3-6**), and delayed fibrosis accompanied by large blood vessels is made more probable as an outcome by *in situ* solidification with coagulation factors (**Figure 3-4**). The effect could be due to PAR1 and PAR2 activation by IIa and rhFVIIa, respectively (Mackie et al., 2008), as well as a more rapid hemostasis that favours chitosan particle residency (Marchand, Chen, Buschmann, & Hoemann, 2011; Marchand et al., 2009). PAR activation is a complex system, but both PAR-1 and PAR-2 are expressed by bone lineage precursor cells and mesenchymal stromal cells (reviewed in (Mackie et al., 2008; Ossovskaya & Bunnett, 2004)), supporting the hypothesis that these cell types might mediate the angiogenic effect of IIa and rhFVIIa. Bone remodelling, which is enhanced by chitosan (Chen, G. et al., 2011), especially at the bone plate level (Bell et al., 2012; Hoemann et al., 2012) (**Figure 3-7**) favors blood vessel invasion at the top of the defect (Marchand et al., 2011). Diffusion of angiogenic factors from the synovial cavity could also partly explain the anisotropic, depth-dependent blood vessel Lv, Vv and Sv.

Because thrombin-chitosan-GP/blood implant elicits a more hyaline repair tissue in microdrilled defects compared to surgical controls at later repair periods (Chen, G. et al., 2011; Marchand et al., 2012), higher subchondral angiogenesis at 3 weeks post-operative due to IIa or rhFVIIa could be an indicator of better cartilage repair. But in a cortical fracture-repair model, higher thrombin dosages stimulated too much angiogenesis and remodelling (Mackie et al., 2008). In this study, only a few coagulation factors, currently used in clinical applications (Marchand et al., 2009; Morrissey, Macik, Neuenschwander, & Comp, 1993; Philippart, Daubie, & Pochet, 2005; Wilbourn, Harrison, Mackie, Liesner, & Machin, 2003), have been tested and at

only one or two concentrations. It seems obvious that angiogenesis is necessary in cartilage and bone repair (Hankenson et al., 2011), if only to provide nutrients and gas exchange in the repairing tissue; but many factors influence angiogenesis (Mackie et al., 2008), through mechanisms that are not yet completely understood. Thus, it is necessary to improve our knowledge of angiogenesis to be able to determine when it works in favour of cartilage repair or when it can be harmful. It is difficult to anticipate the appropriate biological factor and dosage that could be applied to an acute, bleeding defect, to stimulate an adequate cartilage repair, without the full understanding of the cross-talk between the various cellular and molecular players of tissue repair and angiogenesis (Eming et al., 2007). This study shows that recombinant hFVIIa and purified thrombin promote angiogenesis at dosages sufficient to promote rapid *in situ* clotting of the hybrid clot (Marchand et al., 2009). For future studies it will be important to determine when blood vessels should optimally regress, to restore the subchondral bone, articular cartilage, and the tidemark.

3.8 Acknowledgements

Support : Canadian Institutes of Health Research (Grant No. BME-185810), Natural Science and Engineering Council of Canada (Discovery Grant No. 262874), the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB), and salary support from the FRSQ (Bourse de Carrière Chercheur National, CDH). We gratefully acknowledge Hugo Boulanger and Gaoping Chen for valuable technical contributions, and Julie Tremblay for Quality Assurance.

3.9 Role of the authors

The authors made substantial contributions in designing the study (CDH, GER), gathering and analyzing the data (CM, AC, VL, CDH) and drafting and revising the article (CM, AC, GER, CDH). Data in this paper were collected towards the M.Sc. thesis of CM.

3.10 Role of the funding source

Operating grants from CIHR and NSERC paid for all experimental procedures, graduate student stipends, salary support for research staff, and towards presentation of the findings at the

Canadian Connective Tissue Conference (May 2011, Montreal, QC, Canada) and the Cell Science Stem Cell Conference (Sept 2011, Philadelphia, PA, USA). FRSQ-GRSTB funds provided partial salary support for research staff.

3.11 Conflict of Interest Statement

The authors have no competing interests to declare

3.12 References

- Abarrategi, A., Lopiz-Morales, Y., Ramos, V., Civantos, A., Lopez-Duran, L., Marco, F., & Lopez-Lacomba, J.L. (2010). Chitosan scaffolds for ostéochondral tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95A(4), 1132-1141. doi: 10.1002/Jbm.A.32912
- Abrams, D.C., Toynton, S.C., Dore, C., Emson, M.A., Taylor, P., Springall, D.R., . . . Polak, J.M. (1997). Stereological estimation of blood vessel surface and volume densities in human normal and rhinitic nasal mucosa. *Rhinology*, 35(1), 22-27.
- Baddeley, A.J. (2004). *Monographs on Statistics and Applied Probability : Stereology for Statisticians*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Bell, A., Lascau-Coman, V., Sun, J., Chen, G., Lowerison, M., Hurtig, M., & Hoemann, C.D. (2012). Bone-induced chondroinduction in sheep Jamshidi biopsy defects with and without treatment by subchondral chitosan-blood implant: 1 day, 3 week, and 3 month repair. *Cartilage, E-put ahead of print: October 23, 2012 as doi:10.1177/1947603512463227*
- Carney, D.H., Mann, R., Redin, W.R., Pernia, S.D., Berry, D., Heggers, J.P., . . . Glenn, K.C. (1992). Enhancement of Incisional Wound-Healing and Neovascularization in Normal Rats by Thrombin and Synthetic Thrombin Receptor-Activating Peptides. *Journal of Clinical Investigation*, 89(5), 1469-1477.
- Chen, G., Sun, J., Lascau-Coman, V., Chevrier, A., Marchand, C., & Hoemann, C.D. (2011). Acute Osteoclast Activity following Subchondral Drilling Is Promoted by Chitosan and Associated with Improved Cartilage Repair Tissue Integration. *Cartilage*, 2(2), 173-185. doi: 10.1177/1947603510381096
- Chevrier, A., Hoemann, C.D., Sun, J., & Buschmann, M.D. (2007). Chitosan-glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(3), 316-327. doi: 10.1016/j.joca.2006.08.007
- Chevrier, A., Hoemann, C.D., Sun, J., & Buschmann, M.D. (2011). Temporal and spatial modulation of chondrogenic foci in subchondral microdrill holes by chitosan-glycerol

- phosphate/blood implants. *Osteoarthritis and Cartilage*, 19(1), 136-144. doi: 10.1016/j.joca.2010.10.026
- Chevrier, A., Rossomacha, E., Buschmann, M.D., & Hoemann, C.D. (2005). Optimization of histoprocessing methods to detect glycosaminoglycan, collagen type II, and collagen type I in decalcified rabbit ostéochondral sections. *Journal of Histotechnology*, 28(3), 165-175.
- Dockery, P., & Fraher, J. (2007). The quantification of vascular beds: A stereological approach. *Experimental and Molecular Pathology*, 82(2), 110-120. doi: 10.1016/j.yexmp.2006.12.011
- Eming, S.A., Krieg, T., & Davidson, J.M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*, 127(3), 514-525. doi: 10.1038/sj.jid.5700701
- Fan, L., Yotov, W.V., Zhu, T., Esmaeilzadeh, L., Joyal, J.S., Sennlaub, F., . . . Rivard, G.E. (2005). Tissue factor enhances protease-activated receptor-2-mediated factor VIIa cell proliferative properties. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(5), 1056-1063. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01250.x
- Furukawa, T., Eyre, D.R., Koide, S., & Glimcher, M.J. (1980). Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am*, 62(1), 79-89.
- Garcia, Y., Breen, A., Burugapalli, K., Dockery, P., & Pandit, A. (2007). Stereological methods to assess tissue response for tissue-engineered scaffolds. *Biomaterials*, 28(2), 175-186. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.037
- Griffiths, G., Burke, B., & Lucocq, J. (1993). *Fine structure immunocytochemistry*. Berlin ; New York: Springer-Verlag.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314-321. doi: 10.1038/nature07039
- Hankenson, K.D., Dishowitz, M., Gray, C., & Schenker, M. (2011). Angiogenesis in bone regeneration. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*, 42(6), 556-561. doi: 10.1016/j.injury.2011.03.035
- Hasanova, G.I., Noriega, S.E., Mamedov, T.G., Thakurta, S.G., Turner, J.A., & Subramanian, A. (2011). The effect of ultrasound stimulation on the gene and protein expression of chondrocytes seeded in chitosan scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5(10), 815-822. doi: 10.1002/Term.384
- Henno, S., Lambotte, J.C., Glez, D., Guigand, M., Lancien, G., & Cathelineau, G. (2003). Characterisation and quantification of angiogenesis in beta-tricalcium phosphate implants by immunohistochemistry and transmission electron microscopy. *Biomaterials*, 24(19), 3173-3181. doi: S0142961203001492 [pii]
- Hoemann, C.D., Chen, G., Marchand, C., Tran-Khanh, N., Thibault, M., Chevrier, A., . . . El-Gabalawy, H. (2010). Scaffold-guided subchondral bone repair: implication of neutrophils and alternatively activated arginase-1+ macrophages. *Am J Sports Med*, 38(9), 1845-1856. doi: 10.1177/0363546510369547
- Hoemann, C.D., Hurtig, M., Rossomacha, E., Sun, J., Chevrier, A., Shive, M.S., & Buschmann, M.D. (2005). Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage

- repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am*, 87(12), 2671-2686. doi: 10.2106/JBJS.D.02536
- Hoemann, C.D., Kandel, R., Roberts, S., Saris, D.B.F., Creemers, L., Mainil-Varlet, P., . . . Buschmann, M.D. (2011). International Cartilage Repair Society (ICRS) Recommended Guidelines for Histological Endpoints for Cartilage Repair Studies in Animal Models and Clinical Trials. *Cartilage*, 2(2), 153-172. doi: 10.1177/1947603510397535
- Hoemann, C.D., Lafantaisie-Favreau, C.H., Lascau-Coman, V., Chen, G., & Guzman-Morales, J. (2012). The cartilage-bone interface. *J Knee Surg*, 25(2), 85-97.
- Hoemann, C.D., Sun, J., Legare, A., McKee, M.D., & Buschmann, M.D. (2005). Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(4), 318-329. doi: 10.1016/j.joca.2004.12.001
- Hoemann, C.D., Sun, J., McKee, M.D., Chevrier, A., Rossomacha, E., Rivard, G.E., . . . Buschmann, M.D. (2007). Chitosan-glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(1), 78-89. doi: 10.1016/j.joca.2006.06.015
- Insall, J.N. (1967). Intra-articular surgery for degenerative arthritis of the knee. A report of the work of the late K. H. Pridie. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume*, 49(2), 211-228.
- Jain, R.K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine*, 9(6), 685-693. doi: 10.1038/nm0603-685
- Kirilak, Y., Pavlos, N.J., Willers, C.R., Han, R., Feng, H., Xu, J., . . . Zheng, M.H. (2006). Fibrin sealant promotes migration and proliferation of human articular chondrocytes: possible involvement of thrombin and protease-activated receptors. *International Journal of Molecular Medicine*, 17(4), 551-558.
- Li, J.J., Zhao, Q., Wang, E.B., Zhang, C.H., Wang, G.B., & Yuan, Q. (2012). Dynamic compression of rabbit adipose-derived stem cells transfected with insulin-like growth factor 1 in chitosan/gelatin scaffolds induces chondrogenesis and matrix biosynthesis. *Journal of Cellular Physiology*, 227(5), 2003-2012. doi: 10.1002/Jcp.22927
- Lolmede, K., Campana, L., Vezzoli, M., Bosurgi, L., Tonlorenzi, R., Clementi, E., . . . Rovere-Querini, P. (2009). Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways. *J Leukoc Biol*, 85(5), 779-787. doi: 10.1189/jlb.0908579
- Mackie, E.J., Loh, L.H., Sivagurunathan, S., Uaesoontrachoon, K., Yoo, H.J., Wong, D., . . . Pagel, C.N. (2008). Protease-activated receptors in the musculoskeletal system. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(6-7), 1169-1184. doi: 10.1016/j.biocel.2007.12.003
- Mandarim-de-Lacerda, C.A. (2003). Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*, 75(4), 469-486. doi: S0001-37652003000400006 [pii]
- Mapp, P.I., Avery, P.S., McWilliams, D.F., Bowyer, J., Day, C., Moores, S., . . . Walsh, D.A. (2008). Angiogenesis in two animal models of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(1), 61-69. doi: 10.1016/j.joca.2007.05.017

- Maragoudakis, M.E., Tsopanoglou, N.E., & Andriopoulou, P. (2002). Mechanism of thrombin-induced angiogenesis. *Biochem Soc Trans*, 30(2), 173-177. doi: 10.1042/BST.20020033
- Marchand, C., Chen, G.P., Tran-Khanh, N., Sun, J., Chen, H.M., Buschmann, M.D., & Hoemann, C.D. (2012). Microdrilled Cartilage Defects Treated with Thrombin-Solidified Chitosan/Blood Implant Regenerate a More Hyaline, Stable, and Structurally Integrated Osteochondral Unit Compared to Drilled Controls. *Tissue Engineering Part A*, 18(5-6), 508-519. doi: DOI 10.1089/ten.tea.2011.0178
- Marchand, C., Chen, H.M., Buschmann, M.D., & Hoemann, C.D. (2011). Standardized Three-Dimensional Volumes of Interest with Adapted Surfaces for More Precise Subchondral Bone Analyses by Micro-Computed Tomography. *Tissue Engineering Part C-Methods*, 17(4), 475-484. doi: 10.1089/ten.tec.2010.0417
- Marchand, C., Rivard, G.E., Sun, J., & Hoemann, C.D. (2009). Solidification mechanisms of chitosan-glycerol phosphate/blood implant for articular cartilage repair. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(7), 953-960. doi: 10.1016/j.joca.2008.12.002
- Mathieu-Castello, O. (1987). Stereology. Dans R. Skalak & S. Chien (Édit.), *Handbook of bioengineering* (p. 35.31-35.31). New York: McGraw-Hill.
- Mayhew, T.M., Wijesekara, J., Baker, P.N., & Ong, S.S. (2004). Morphometric evidence that villous development and fetoplacental angiogenesis are compromised by intrauterine growth restriction but not by pre-eclampsia. *Placenta*, 25(10), 829-833. doi: 10.1016/j.placenta.2004.04.011
- Meachim, G., & Roberts, C. (1971). Repair of the joint surface from subarticular tissue in the rabbit knee. *J Anat*, 109(Pt 2), 317-327.
- Morrissey, J.H., Macik, B.G., Neuenschwander, P.F., & Comp, P.C. (1993). Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood*, 81(3), 734-744.
- Ossovskaya, V.S., & Bunnett, N.W. (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev*, 84(2), 579-621. doi: 10.1152/physrev.00028.2003
- Ozaki, Y., Nishimura, M., Sekiya, K., Suehiro, F., Kanawa, M., Nikawa, H., . . . Kato, Y. (2007). Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 16(1), 119-129. doi: 10.1089/scd.2006.0032
- Philippart, P., Daubie, V., & Pochet, R. (2005). Sinus grafting using recombinant human tissue factor, platelet-rich plasma gel, autologous bone, and anorganic bovine bone mineral xenograft: histologic analysis and case reports. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 20(2), 274-281.
- Ranstrom, J. (2012). Repeated measurements, bilateral observations and pseudoreplicates, why does it matter? *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(6), 473-475. doi: 10.1016/j.joca.2012.02.011
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001
- Shapiro, F., Koide, S., & Glimcher, M.J. (1993). Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 75(4), 532-553.

- Shaw, T.J., & Martin, P. (2009). Wound repair at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 18), 3209-3213. doi: 10.1242/jcs.031187
- Siu, R.K., Zara, J.N., Hou, Y.P., James, A.W., Kwak, J., Zhang, X.L., . . . Lee, M. (2012). NELL-1 Promotes Cartilage Regeneration in an In Vivo Rabbit Model. *Tissue Engineering Part A*, 18(3-4), 252-261. doi: 10.1089/ten.tea.2011.0142
- Steadman, J.R., Rodkey, W.G., & Briggs, K.K. (2010). Microfracture. *Cartilage*, 1(2), 78-86. doi: 10.1177/1947603510365533
- Steadman, J.R., Rodkey, W.G., Singleton, S.B., & Briggs, K.K. (1997). Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 7(4), 300-304.
- Stojadinovic, A., Carlson, J.W., Schultz, G.S., Davis, T.A., & Elster, E.A. (2008). Topical advances in wound care. *Gynecologic Oncology*, 111(2), S70-S80. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.07.042
- Street, J., Bao, M., deGuzman, L., Bunting, S., Peale, F.V., Jr., Ferrara, N., . . . Filvaroff, E.H. (2002). Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(15), 9656-9661. doi: 10.1073/pnas.152324099
- Wang, H.L., Li, X.M., Tomin, E., Doty, S.B., Lane, J.M., Carney, D.H., & Ryaby, J.T. (2005). Thrombin peptide (TP508) promotes fracture repair by up-regulating inflammatory mediators, early growth factors, and increasing angiogenesis. *Journal of Orthopaedic Research*, 23(3), 671-679. doi: 10.1016/j.orthres.2004.10.002
- Wang, L., Fan, H., Zhang, Z.Y., Lou, A.J., Pei, G.X., Jiang, S., . . . Jin, D. (2010). Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized betacalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 31(36), 9452-9461. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.036
- Wilbourn, B., Harrison, P., Mackie, I.J., Liesner, R., & Machin, S.J. (2003). Activation of platelets in whole blood by recombinant factor VIIa by a thrombin-dependent mechanism. *Br J Haematol*, 122(4), 651-661. doi: 4461 [pii]
- Yang, Z., Wu, Y.N., Li, C., Zhang, T.T., Zou, Y., Hui, J.H.P., . . . Lee, E.H. (2012). Improved Mesenchymal Stem Cells Attachment and In Vitro Cartilage Tissue Formation on Chitosan-Modified Poly(L-Lactide-co-Epsilon-Caprolactone) Scaffold. *Tissue Engineering Part A*, 18(3-4), 242-251. doi: 10.1089/ten.tea.2011.0315

CHAPITRE 4 DÉTECTION DES CELLULES STROMALES ET DES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSE PAR IMMUNOHISTOCHIMIE

Cette partie présente l'étude du développement et de l'optimisation de la détection des cellules souches mésenchymateuse par immunohistochimie.

4.1 Introduction

La réparation d'un tissu chez les mammifères peut être divisée en trois évènements principaux, qui comptent chacun différentes étapes : l'hémostase, l'inflammation, la prolifération et la restauration (Eming et al., 2007; Shaw & Martin, 2009). Dans le cas de l'endommagement du cartilage articulaire, l'hémostase ne peut pas avoir lieu, puisque le cartilage est un tissu dépourvu de vaisseaux sanguins. Pour remédier à ce problème, diverses techniques ont été développées pour amorcer la réparation, par exemple par la stimulation de la moelle osseuse pour entraîner un saignement et l'hémostase (microfracture, microperforation) ou encore en greffant des cellules souches pour initier la prolifération.

Suite à l'application de la technique de stimulation de la moelle osseuse, il a été observé que la création d'un passage entre le cartilage et la moelle de l'os sous-chondral permet à la fois la réparation de l'os et la génération d'un tissu cartilagineux suffisamment durable et efficace pour soulager les douleurs des patients et rétablir une certaine mobilité de l'articulation (Insall, 1967; Meachim & Roberts, 1971; Steadman, J. Richard et al., 2010). De plus, la combinaison de la microperforation avec un implant chitosan-GP/sang a permis d'augmenter le recrutement de neutrophiles et de macrophages, ainsi que d'augmenter l'angiogenèse et retarder la chondrogenèse 21 jours après l'opération, l'ensemble de tous ces facteurs aidant à avoir une réparation plus hyaline (Chevrier et al., 2007, 2011; Hoemann et al., 2010).

Ces études montrent également que cette technique chirurgicale permet le recrutement des cellules stromales et de cellules souches mésenchymateuses (MSC) pour la réparation de l'os sous-chondral et la régénération du cartilage (Chevrier et al., 2007). Cependant, la distribution et la localisation des cellules stromales et des MSC dans le tissu de granulation ne sont pas connues. Ainsi, nous avons effectué l'optimisation de tests IHC, avec l'aide d'anticorps reconnaissant les marqueurs des MSC humaines *in vitro* et *in vivo*, dans le but d'identifier et de localiser les

cellules stromales et les MSC dans les défauts ostéochondraux chez le lapin NZW. Un anticorps en particulier, l'anticorps anti- α SMA clone 1A-4, a été détecté dans les tissus de lapin NZW au cours d'études passées (Cai et al., 2001; Funakoshi et al., 2010). Afin d'optimiser les tests IHC, il sera déterminé dans un premier temps si l'anticorps est en mesure de cibler l'antigène dans les tissus de lapin NZW. En cas de succès, la procédure de coloration IHC sera optimisée, car elle comprend de nombreuses étapes, telles que la révélation de l'antigène ou la contre-coloration, qui doivent être ajustées pour obtenir un signal positif clair et éviter les signaux faux-positifs et faux-négatifs.

Pour s'assurer de la spécificité du signal obtenu, il est important d'avoir des tissus de contrôle dans lesquels l'antigène est exprimé ou dans lesquels les MSC sont présentes. Parce que la localisation des MSC chez l'adulte n'est pas connue, des tissus fœtaux de lapin, collectés après 22 jours de gestation, ont été étudiés. À ce stade du développement fœtal, l'ossification primaire a débuté, la plaque de croissance doit être formée et le développement du fœtus est suffisamment avancé pour permettre l'étude des tissus par coupes histologiques.

Enfin, avec la procédure IHC optimisée et les tissus de contrôle collectés, la distribution des cellules exprimant les marqueurs MSC, tels que α SMA, sera étudiée dans des tissus ostéochondraux d'un modèle *in vivo* de réparation du cartilage par stimulation de la moelle osseuse, 3 semaines après l'opération.

Nous présentons donc dans ce chapitre le matériel et la méthode d'immunohistochimie utilisée pour la détection des cellules stromales et des MSC, ainsi que les résultats obtenus dans les tissus de lapin NZW fœtaux et adultes.

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Études *in vivo* de réparation du cartilage chez le lapin et *in vivo* des tissus des fœtus lapin

L'ensemble des études *in vivo* a été effectué avec l'accord du comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux de l'Université de Montréal et en respect de leurs politiques et leurs normes. Les biopsies humaines ont toutes été obtenues, avec l'accord du Registre

International sur la Biosécurité (IRB), des déchets opératoires d'arthroplastie dans des genoux arthritiques.

Les tissus testés lors de cette étude sont énumérés et décrits dans le **Tableau 4.1**. À l'exception des tissus fœtaux, les différents tissus ont été sélectionnés d'études précédentes, ainsi la procédure chirurgicale et la nécropsie ne seront pas décrites.

Tableau 4.1 : Description des tissus analysés par immunohistochimie pour la présence de MSC

Tissu	Espèce	Description/origine	Anticorps testés
Fœtus, 22 jours	Lapin NZW	Étude IHC de détection des MSC	Nestin (10C2), αSMA (1A-4)
Foie	Lapin NZW	Modèle in vivo de réparation du cartilage	β-catenin PY489, β-catenin PY654 (IgM & IgG), nestin (rat-401), αSMA (1A-4)
Peau	Lapin NZW	Modèle in vivo d'implants sous-cutanés	β-catenin PY489, β-catenin PY654 (IgM & IgG), nestin (rat-401), αSMA (1-A4)
Placenta	Lapine NZW gestante	Étude IHC de détection des MSC	Nestin (10C2), αSMA (1-A4)
Poumon	Lapin NZW ou Lapine NZW gestante	Modèle in vivo de réparation du cartilage ou Étude IHC de détection des MSC	Nestin (10C2), αSMA (1-A4)
Trochlée, 3 semaines de réparation	Lapin NZW	Modèle in vivo de réparation du cartilage	αSMA (1A-4)
Trochlée intacte	Lapine NZW gestante	Étude IHC de détection des MSC	αSMA (1A-4)
Biopsie ostéochondral	Humain	Déchets opératoires d'arthroplastie de genou	Nestin (10C2), αSMA (1A-4)
Biopsie de la membrane synoviale	Humain	Déchets opératoires d'arthroplastie de genou	Nestin (10C2), αSMA (1A-4)
Cellules primaires MSC	Humain	Cellules cultivées 3 semaines dans un milieu standard, formant des nodules	β-catenin PY489, β-catenin PY654 (IgM & IgG), nestin (Rat-401)

Chez le lapin NZW, la période de gestation est typiquement de 29 à 35 jours, avec une moyenne de 31-32 jours (Harkness, Turner, Vande Woude, & Wheler, 2010; Hartman, 1974) et la portée est d'environ 7-9 lapereaux en moyenne. Pour cette étude, la femelle obtenue avait une portée de cinq lapereaux et était à 22 jours de gestation. Dans le développement du lapin NZW,

c'est à cet instant que la première ossification survient dans les os longs, dont le fémur, ainsi les os de genou devraient encore être sous forme de tissu cartilagineux et avec des MSC encore présentes. Avant l'extraction des fœtus, la femelle fut anesthésiée avec du xylène-kétamine-buprenorphine. Les cinq fœtus extraits ont été directement fixés dans une solution de 4 % paraformaldéhyde/0.1% glutaraldéhyde/100 mM cacodylate (Annexe 2). Une fois les fœtus extraits, la femelle fut euthanasiée avec une injection de pentobarbital, suite à laquelle des biopsies de plusieurs organes et les têtes distales de fémur ont été prélevées.

4.2.2 Matériaux

Parmi les tissus étudiés du lapin, des biopsies de peau contenaient le chitosan. Des lésions ostéochondrales de la trochlée du genou ont été traitées avec des implants au chitosan. Ces échantillons ont été générés dans d'autres études (Lafantaisie-Favreau et al., in revision; Marchand et al., 2009).

Dans le cas des biopsies de peau, l'échantillon provient d'un lapin NZW ayant reçu une injection sous-cutanée de chitosan avec un degré d'acétylation de 80 %.

Pour les sections ostéochondrales, la trochlée fut perforée dans N=4 lapins, soit trois fois dans le plan sagittal pour créer les lésions ostéochondrales qui ont été traitées avec des implants Chitosan-GP/sang présolidifiés dans le genou gauche, et pas traité ou traité avec TF dans le genou droit (Lafantaisie-Favreau et al., in revision), avec trois poids moléculaires de 150, 40 et 10 kilodaltons pour le chitosan (degré d'acétylation moyen de 81.8%DDA) procuré par BioSyntech (Laval, Qc, Canada; aujourd'hui racheté par Piramal). Dans d'autres lapins (voir **Tableau 4.1.** Page 67), une lésion chondrale a été créée et ensuite microporéforée avec deux trous distaux de 0.9 mm de diamètre et six trous proximaux de 0.5 mm traités avec des implants chitosan-GP/sang avec ou sans facteur de coagulation (Marchand et al., 2009). Pour ce deuxième cas, la procédure chirurgicale et le matériel utilisé sont décrits dans la section 3.5 de ce document.

Pour les tests IHC, les marqueurs MSC étudiés sont la β -catenin, la nestin, filament intermédiaire exprimée lors de la prolifération, et l' α SMA, microfilament exprimé par les muscles lisses, par les cellules stromales et par les chondrocytes du cartilage articulaire (**Tableau 4.2.**). Les anticorps sélectionnés reconnaissent les épitopes humains, car il a été démontré que les

déterminants antigéniques de lapin sont plus semblables aux déterminants antigéniques humains que ceux des rongeurs (Hoemann et al., 2010).

Tableau 4. 2 : Listes des anticorps sélectionnés pour la détection des MSC par IHC et témoins

Nom	clone	Isotype	Espèce origine/cible	Fournisseur	#produit	Concentration à la réception
Marqueurs de MSC						
β-catenin	PY489	IgM monoclonal	Souris anti-souris, anti-poule	DSHB	PY489	48 µg/mL
β-catenin	PY654	IgM monoclonal	Souris anti-souris, anti-poule	DSHB	PY654	52 µg/mL
β-catenin	PY654	IgG monoclonal	Souris anti-souris, anti-poule	DSHB	PY654	34 µg/mL
Nestin	Rat-401	IgG1 monoclonal	Souris anti-souris, anti-rat	DSHB	Rat-401	10 µg/mL
Nestin	10C2	IgG1 monoclonal	Souris anti-humain, anti-rat	Santa-cruz	SC-23927	200 µg/mL
αSMA	1A4	IgG2a monoclonal	Souris anti-humain, anti-lapin, anti-souris, anti-rat	Sigma-Aldrich	A-5228	2.0-2.1mg/mL
Témoins						
Arginase-1	PY489	Polyclonal	Chèvre	Santa Cruz	SC-18351	200 µg/mL
Col-I	I-8H5	IgG2a monoclonal	Souris anti-humain	Calbiochem Cederlane	CP17	1mg/mL
Col-II	II-II6B3	IgG1κ monoclonal	Souris anti-humain	DHSB	II-II6B3	10-43 µg/mL

4.2.3 Histologie et procédure d'immunohistochimie

Pour cette étude, les fœtus, les tissus ostéochondraux, les autres tissus de lapin NZW et les biopsies de tissus humains ont été fixés dans une solution de 4 % paraformaldéhyde/0.1% glutaraldéhyde/100 mM cacodylate à pH 7.2. Les tissus ostéochondraux étudiés ont également été décalcifiés dans une solution d'EDTA/0.1% paraformaldehyde durant environ 1 mois et postfixés de nouveau dans la même solution de fixation. Par la suite, les échantillons ostéochondraux ont été soit coupés en lamelles de 1 mm à 2mm d'épaisseur ou rogné à une taille adéquate. Tous les tissus ont été « defatted » dans l'éthanol 70%, équilibrés dans du sucre et immersés dans un composé Tissue-Tek OCT (Cedrlane, Hornby, ON, Canada) afin de les préserver

dans des blocs cryogènes à -80°C. Après la génération de coupes histologiques cryogènes (cryosections) utilisant le système CryoJane tape transfer (Leica Biosystems, Richmond IL), les tissus ont suivi un traitement par histochimie (pour un échantillon de fœtus de lapin) et par immunohistochimie. Pour l'histochimie, une coloration Safrinin-O/Fast Green (SafO) a été effectuée, (Chevrier et al., 2005).

Pour l'immunohistochimie des MSC, les cryosections ont premièrement été décongelées à l'air ambiant, température pièce, durant 5 minutes. Pour la révélation de l'antigène, les lames ont été lavées dans une solution d'acétone, une solution tampon Tris saline pH7.6 (TBS, à RT) et une solution Tris pH10 réchauffée (60°C). Il existe des traitements supplémentaires pour cette étape, tel que le traitement enzymatique avec de la pronase ou de l'hyaluronidase, qui sont notamment appliqués dans les IHC pour Col-1 et Col-2 tel que décrit précédemment (cf. **section 3.5.3**, (Chevrier et al., 2005)). Ensuite, une étape de blocage est faite à l'aide d'une solution de sérum de chèvre dilué à 20% v/v dans tampon phosphate salin (PBS) et 0.1% Triton X100, afin de diminuer la possibilité de signaux faux-positifs.

Plusieurs anticorps primaires ont été testés (**Tableau 4.2**), notamment des anticorps anti- β -catenin, anti-Nestin et anti- α -actine de muscle lisse (α SMA), qui ont tous été dilué dans une solution de 0.3%BSA/PBS/0.1%TX-100 ou 1%BSA/PBS/0.1%TX-100. Les sections ont été incubées dans les solutions d'anticorps primaires à 4°C pendant une nuit, puis elles ont été rincées 3 fois dans du PBS pendant 5 minutes chaque et incubées dans une solution d'anticorps secondaire chèvre anti-souris (IgG) diluée dans la même solution de 0.3%BSA/PBS/0.1%TX-100 ou 1%BSA/PBS/0.1%TX-100 durant 60 min (RT). Après trois rinçages de 5 minutes chaque dans du PBS, la technique d'immunohistochimie pour l'amplification et la révélation de la détection de l'antigène est la méthode indirecte du complexe Avidin-biotine (ABC). Elle se base sur la forte affinité de l'avidin pour la vitamine biotine (Key, 2009), molécule facilement attachée aux anticorps, qui dans ce cas est conjuguées avec l'anticorps secondaire. Il se forme alors un complexe entre la cellule, l'anticorps primaire, l'anticorps secondaire et l'avidin-biotine-peroxydase, et par ce biais une coloration rouge est obtenue par la réaction entre le complexe ABC et l'AP-red Substrat. Ce signal révèle ainsi la présence de l'antigène visé, dans le cas présent soit la β -catenin, la nestin ou encore l' α SMA.

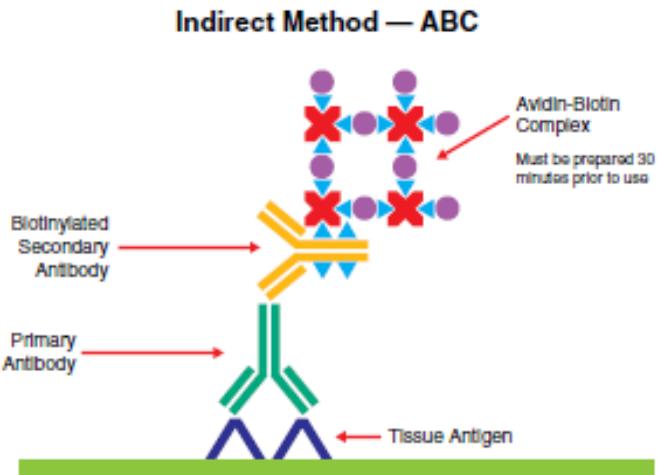


Figure 4-1 : Schéma des interactions entre les éléments de la méthode Avidin-Biotine (Key, 2009).

Afin de faciliter la visualisation des cellules et d'augmenter le contraste entre les cellules détectées, les sections sont contre-colorées avec une solution de Weigert's Iron hématoxyline. Ce colorant histochimique donne une couleur bleue au noyau des cellules.

Une fois le signal révélé, les sections subissent un cycle de déshydratation dans de l'éthanol et du toluène, pour finalement être montées sur une lamelle de verre avec de la solution Permount.

Pour chaque test IHC, des contrôles négatifs et positifs doivent être définis. Comme défini précédemment, le contrôle positif constitue la coloration d'un tissu qui présente l'antigène. Plusieurs variantes de contrôles négatifs peuvent être utilisées pour s'assurer de la spécificité du signal. Dans le cas de cette étude, le contrôle négatif est l'omission de l'anticorps dans la solution d'incubation de l'anticorps primaire ou l'utilisation d'un anticorps isotopique, du même isotope que l'anticorps primaire testé.

4.3 Résultats

4.3.1 β -catenin et nestin (Rat-401) ne sont pas détectés dans les tissus ostéochondraux de Lapin NZW ou les cultures de cellules primaires MSC humaines

Pour débuter les tests IHC, trois dilutions de l'anticorps primaire ont été testées pour les anticorps anti- β -catenin (PY489 et PY654) et anti-nestin (Rat-401) dans des tissus de peau avec un implant au chitosan, sur des tissus de foie et sur des cryosections de nodules de MSC humaines primaires cultivées *in vitro*, dans un milieu de stimulation de la différentiation (**Tableau 4.3**). Il a été supposé que des cellules souches mésenchymateuses seraient localisées dans les follicules des poils du tissu de peau et seraient identifiables au milieu des nodules de MSC humains. Le tissu contrôle pour ces tests en un tissu de foie de Lapin NZW, coloré avec l'anticorps anti-arginase-1 pour le contrôle positif et l'omission de l'anticorps primaire pour le contrôle négatif.

Tableau 4. 3 : Liste des tests IHC effectués pour la détection de β -catenin et nestin (Rat-401) dans les tissus de lapin NZW et les cellules primaires MSC humaines.

Étape	Solution ciblée	Conditions testées	Tissus utilisés	Résultats
Incubation dans l'anticorps primaire	β -catenin PY489; β -catenin PY654. (IgM)	Dilutions: - 1:5; - 1:25; - 1:100.	Lapin NZW : Trochlée; Peau; Foie Humain : Cellules primaires MSC;	Aucun signal positif détecté.
Incubation dans l'anticorps primaire	β -catenin PY654 (IgG); Nestin (rat-401),	Dilutions: - 1:5; - 1:25; - 1:100.	Lapin NZW : Trochlée; Peau; Foie Humain : Cellules primaires MSC;	Aucun signal positif détecté. (cf. Figure 4-2)

La présence d'un signal positif pour l'arginase-1 dans le tissu de foie indique que les étapes du test IHC ont été réalisées avec succès, et l'absence de signal dans le contrôle négatif a

également été observée dans ce tissu. Ce dernier résultat montre que l'anticorps secondaire ne se lie pas à des sites du tissu de manière non-spécifique. Aucune coloration dans le noyau des cellules n'a été observée dans les autres tissus colorés avec l'anticorps anti- β -caténin (PY654) (**Figure 4-2**). Cependant, l'utilisation d'une contre-coloration Weigert's Iron hématoxyline au cours de ce test présente une limitation, puisqu'elle est spécifique au noyau des cellules et en mesure de masquer un faible signal positif. Pour l'anticorps anti-nestin (clone Rat-401), seuls de très faibles signaux dans le cytoplasme ont été observés (**Figure 4-2**) dans les tissus colorés. Ces résultats indiquent donc que les anticorps anti- β -caténin (PY654) et anti-nestin (clone Rat-401) testés ne sont pas efficaces dans des tissus ostéochondraux de lapin NZW analysés ou les coupes de cellules primaires MSC cultivées in vitro.

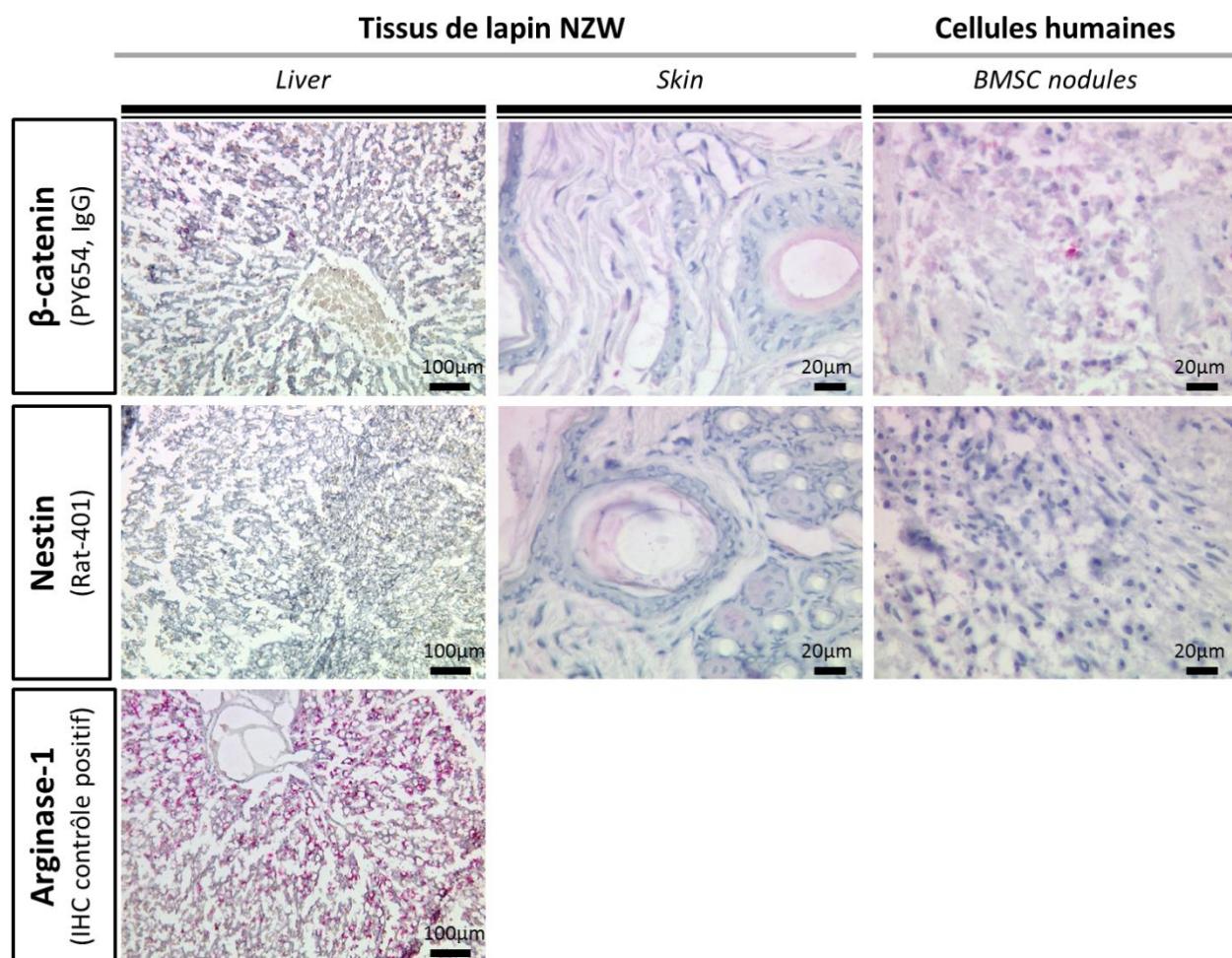


Figure 4-2 : Photo au microscope optique, des résultats obtenus avec l'IHC usant les anticorps β -caténin (PY654, DSHB) et Nestin (Rat-401, DSHB). Aucun signal spécifique aux antigènes ciblés n'a pu être observé.

Ces premiers résultats sont toutefois limités par l'absence d'un contrôle positif approprié, qui devrait contenir des cellules humaines β -caténin-positives. Les tissus de foie de lapin NZW utilisés pour les contrôles positifs et négatifs n'ont servi que pour la vérification du bon déroulement de l'immunohistochimie, mais ne permettent pas de contrôler la spécificité et l'efficacité de l'anticorps pour l'antigène. Afin d'obtenir de meilleurs contrôles positifs, des tissus fœtaux de lapin NZW ont été collectés.

4.3.2 Immunohistochimie avec la nestin (10C2) donne un signal positif dans le placenta de lapin NZW et un signal négatif dans les tissus fœtaux 22J et adulte de lapin NZW.

La nestin est un filament intermédiaire, exprimé dans les cellules souches mésenchymateuses lors de la prolifération. Les tests d'immunohistochimie accomplis précédemment avec l'anticorps anti-nestin du clone Rat-401 n'ont pas permis de détecter l'antigène dans les tissus de lapin NZW ou les cellules primaires humaines. Cependant, les travaux de Dr. A. Calderone ont montré que la nestin était exprimée dans le tissu cictré du myocarde, par des cellules semblables aux cellules neuronales (Beguin et al., 2012; Calderone, 2012). Les tests d'IHC effectués dans des tissus humains et de rat ont également montré la localisation de la nestin dans les poumons, suite à un traumatisme ou un choc (comme par exemple une opération chirurgicale), ainsi que dans des biopsies de tissu neuronal.

L'anticorps utilisé par l'équipe de Dr. A. Calderone est un anticorps anti-nestin du clone 10C2. Nous avons donc effectué un nouveau test IHC avec cet anticorps dans des tissus de membrane synoviale et des biopsies humaines de trochlée, ainsi que sur des tissus de poumon et de placenta de lapin NZW adulte (**Tableau 4.4**). Ces tests sont effectués dans le but de déterminer si l'utilisation d'anticorps de clones différents peut révéler la présence de nestin dans les tissus de lapin NZW.

Tableau 4.4 : Détails du test IHC effectué avec l'anticorps anti-nestin (10C2).

Étape	Solution ciblée	Conditions testées	Tissu utilisé	Résultats
Incubation dans l'anticorps primaire	Nestin (10C2),	Dilutions: - 1:25; - 1:100; - 1:250.	Lapin NZW : Fœtus (22jours) Placenta Poumon	Signal positif détecté dans le tissu de placenta (cf. Figure 4-3 & Figure 4-4)

			Humain : Biopsie ostéochondrale;	
--	--	--	-----------------------------------------------	--

Suite aux expériences effectuées, la nestin n'est pas détecté ni dans la membrane synoviale humaine, ni dans la biopsie de trochlée humaine ou le tissu de poumon de lapin NZW adulte. Mais un signal est détecté dans le placenta de lapine NZW gestante, indiquant a priori que l'anticorps fonctionne dans les tissus de lapin NZW (**Figure 4-3**).

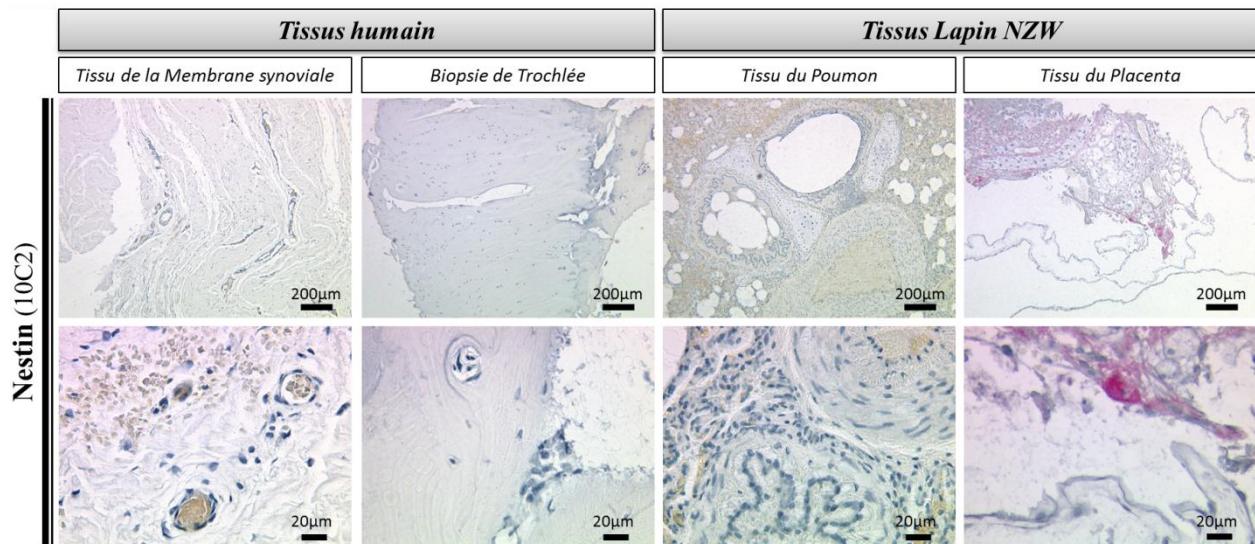


Figure 4-3 : Image au microscope optique de l'IHC avec l'anticorps anti-nestin (10C2) dans des biopsies de tissu humain et de lapin NZW adulte, utilisé comme tissus de contrôle dans de nombreuses études.

De plus, l'anticorps anti-nestin (10C2) a été testé sur le tissu fœtal 22J de lapin NZW, tissu servant de contrôle. Les résultats montrent toutefois que la nestin n'est pas localisée dans le tissu distal du fémur (**Figure 4-4**). Comme aucun signal n'est visible pour la nestin à travers l'ensemble du tissu, la nestin n'est probablement plus exprimée dans les cellules stromales des tissus fœtaux de la partie inférieure après 22 jours de gestation.

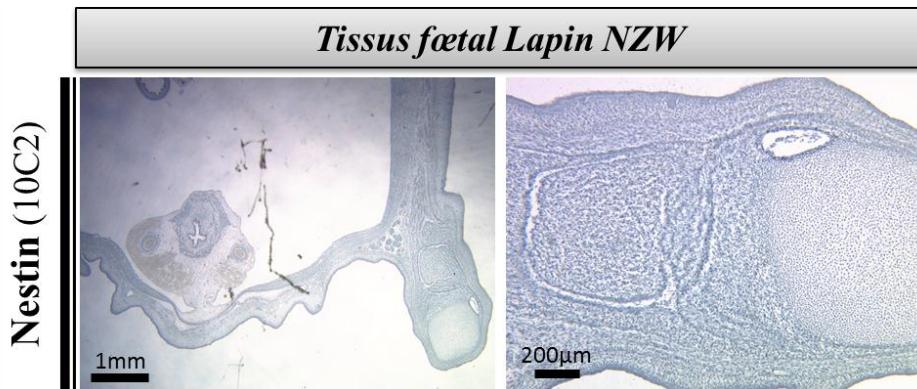


Figure 4-4 : Image au microscope optique de l’IHC avec les anticorps anti-nestin (10C2) dans le tissu distal du fémur d’un fœtus 22J de lapin NZW.

4.3.3 α SMA est détectée dans une variété de tissus fœtaux et adultes de lapin NZW.

Il a été rapporté dans la littérature, que les cellules stromales dérivées de la moelle osseuse et les MSC expriment l’isoforme de l’actine α SMA, lors de la différentiation. Il a également été montré que l’ α SMA pouvait être détectée dans des tissus cartilagineux de lapin NZW (Cai et al., 2001; Funakoshi et al., 2010).

Nous avons donc mené plusieurs expériences dans le but de vérifier et d’optimiser la procédure de coloration IHC avec l’anticorps anti- α SMA (1A4). L’essai de différentes conditions pour certaines étapes du protocole (**Tableau 4.5**), telles que la révélation de l’antigène, l’incubation dans l’anticorps primaire ou encore la contre-coloration, a abouti au protocole optimisé décrit dans la **section 4.2.3**.

Tableau 4. 5 : Liste des tests IHC effectués et des conditions ajustées dans les tissus fœtaux et adulte de lapin NZW et des biopsies de tissus humains.

Phase	Étape	Conditions testées	Tissu utilisé	Résultat
Révélation de l’antigène	Traitement enzymatique	Avec et sans hyaluronidase	Lapin NZW : Trochlée, Fœtus, Peau, Placenta, Poumon. Humain : Membrane synoviale.	Diminution du signal avec le traitement enzymatique

Phase	Étape	Conditions testées	Tissu utilisé	Résultat
Révélation de l'antigène	Retrait de la colle du « tape »	Avec ou sans lavage à l'acétone et au TBS.	Lapin NZW : Trochlée, Fœtus, Placenta, Poumon. Humain : Membrane synoviale.	Diminution du « bruit de fond » avec le lavage à l'acétone et au TBS Signal positif révélé dans les chondrocytes du cartilage
Incubation dans l'anticorps primaire	Dilution de l'anticorps primaire	Dilutions: - 1:150; - 1:400; - 1:2000.	Lapin NZW : Fœtus, Foie, Peau, Placenta, Poumon, Trochlée. Humain : Biopsie ostéochondrale, Membrane synoviale.	La dilution optimale est 1 :2000 (concentration de 1 µg/mL) (cf. Figure 4-5)
Incubation dans l'anticorps primaire et secondaire	Dilution de l'anticorps	Solution de dilution composée de 0.3% BSA ou de 1% BSA	Lapin NZW : Trochlée, Fœtus, Placenta, Poumon. Humain : Membrane synoviale;	Diminution du « bruit de fond » avec la solution composée de 1% BSA
Contre-coloration	Préparation de la solution Weigert's Iron Hematoxyline	Dilutions Weigert dans H ₂ Odd : - 1:2 - 1:5 - 1:10	Lapin NZW : Trochlée, Placenta.	La dilution 1:2 dans H ₂ Odd est optimale (cf. Figure 4-6)

Les résultats de ces tests IHC ont montré que αSMA est exprimé dans une grande variété de tissus de lapin NZW, avec une concentration de 1 µg/mL. Un signal positif a été observé dans les tissus constitués de cellules musculaires lisses, tel que les parois des vaisseaux sanguins et des bronches (**Figure 4-5**). Des cellules, exprimant αSMA, ont également été localisées à proximité des follicules pileux et dans le placenta et plus précisément dans la membrane du sac amniotique (**Figure 4-5**), emplacements dans lesquels se trouvent des MSC.

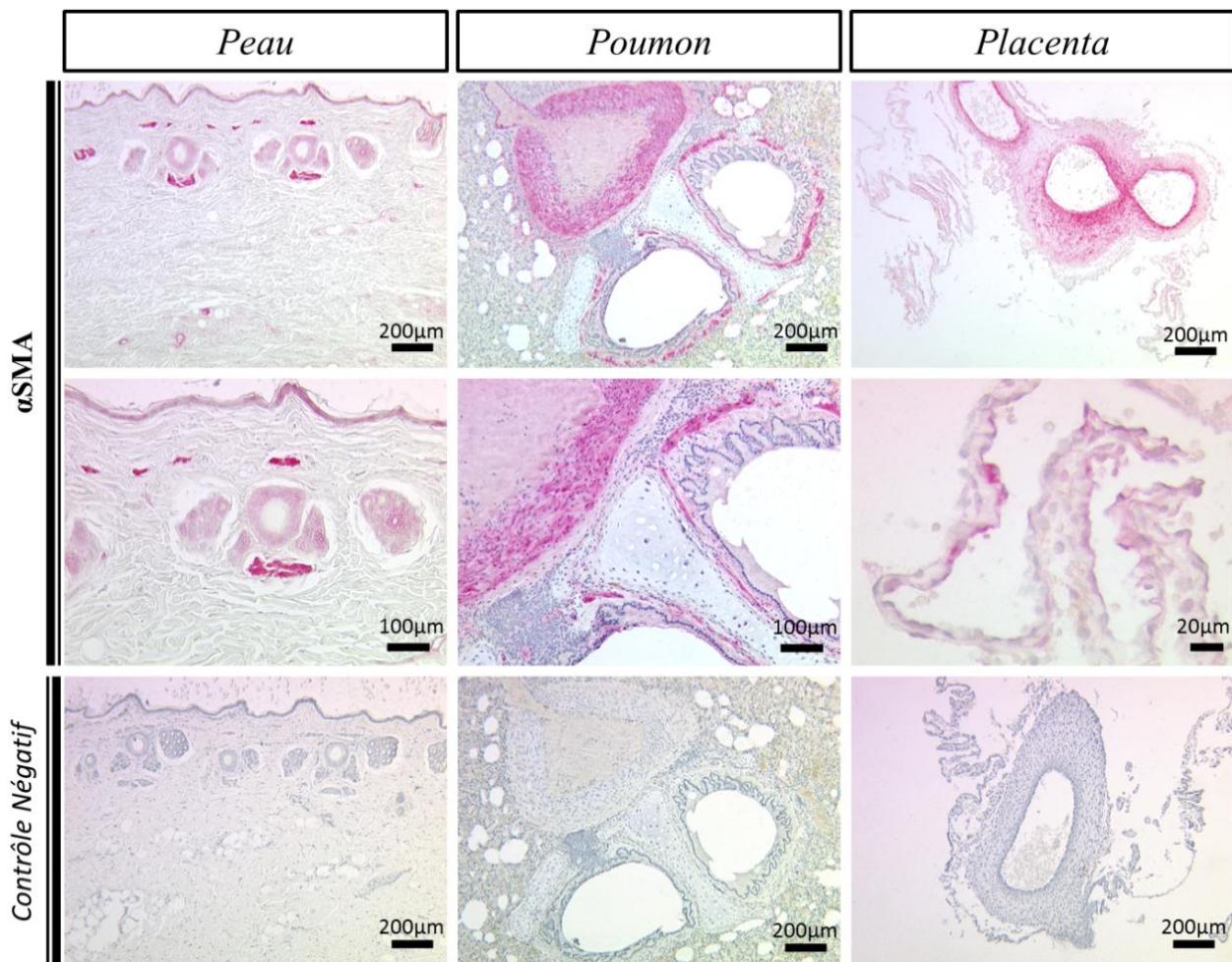


Figure 4-5 : Image au microscope optique de l’IHC avec l’anticorps anti- α SMA dans des biopsies de tissu de lapin NZW adulte, utilisé comme tissus de contrôle dans de nombreuses études.

Parce que l’analyse des résultats d’IHC nécessite un bon contraste de couleurs entre le signal de l’antigène détecté et la contre-coloration permettant de distinguer les différentes structures cellulaires, une optimisation de la concentration de la solution Weigert’s Iron hématoxyline a été effectuée (**Tableau 4.5**). Les résultats obtenus montrent qu’une dilution plus grande que 1:2 entraîne une diminution trop importante de la couleur dans le noyau des cellules (**Figure 4-6**). Les structures cellulaires ne peuvent alors plus être distinguées, au point où les images microscopiques à une dilution de 1:10 et sans contre-coloration paraissent vides. Nous en avons donc déterminé que la dilution 1:2 de la solution Weigert’s Iron hématoxyline donne un contraste optimal suite à la contre-coloration du tissu.

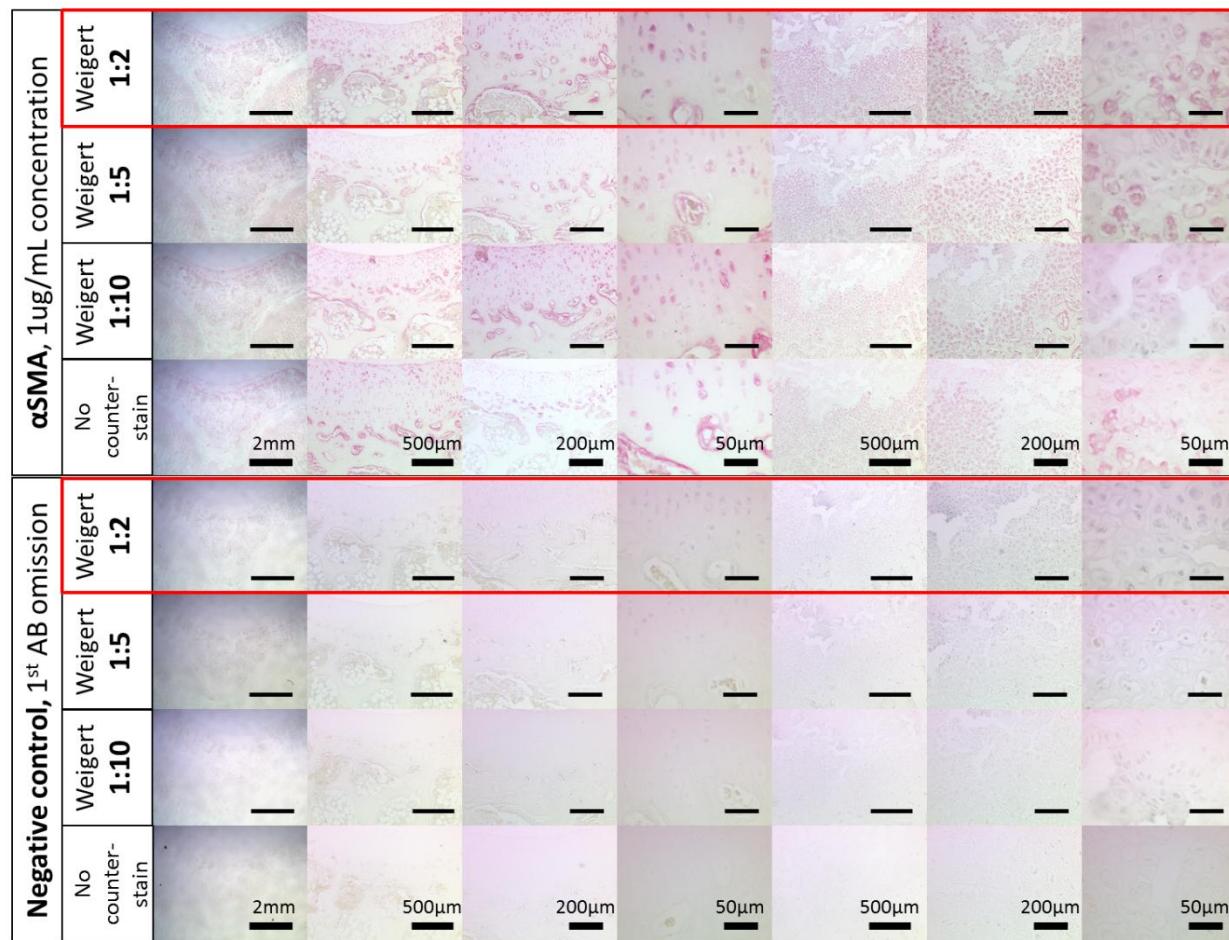


Figure 4-6 : Images microscopiques du test IHC d'optimisation de la contre-coloration dans un tissu de trochlée de lapin NZW.

Après 22 jours de gestation, les paupières des yeux, le museau et les narines, ainsi que les divisions entre les doigts des pattes, sont visibles chez les fœtus de lapin NZW (**Annexe-2**), indiquant donc que la phase de développement d'organes majeurs est terminée (Beaudoin, Barbet, & Bargy, 2003; Rivas & Shapiro, 2002). Les coupes utilisées pour l'étude de la détection des cellules stromales et des MSC sont des coupes transversales de la partie postérieure du corps fœtal, qui comprend les membres inférieurs, une partie de la colonne vertébrale et les hanches. De plus, la position de la jambe pliée permet d'observer dans les premières coupes l'extrémité distale du fémur, soit l'articulation du genou.

Dans les sections des trois échantillons fœtaux, on peut observer le tissu de la partie distale du fémur dans le genou (**Figure 4-7**). Ce dernier se compose d'un condensat de cellules semblable à du cartilage, d'un tissu cellulaire constitué de cellules fusiformes et d'une membrane qui enveloppe le tout. Les colorations IHC de Col-I et Col-II permettent de confirmer que l'enveloppe est le périoste, constituée essentiellement de Col-I, et que l'agrégat cellulaire est du tissu cartilagineux, issu de la différenciation du mésenchyme (**Figure 4-3**). Pour α SMA, les résultats montrent qu'elle est exprimée entre le périoste (Col-I) et l'agrégat de cartilage (Col-II), dans le tissu aux cellules fusiformes, semblables aux cellules stromales.

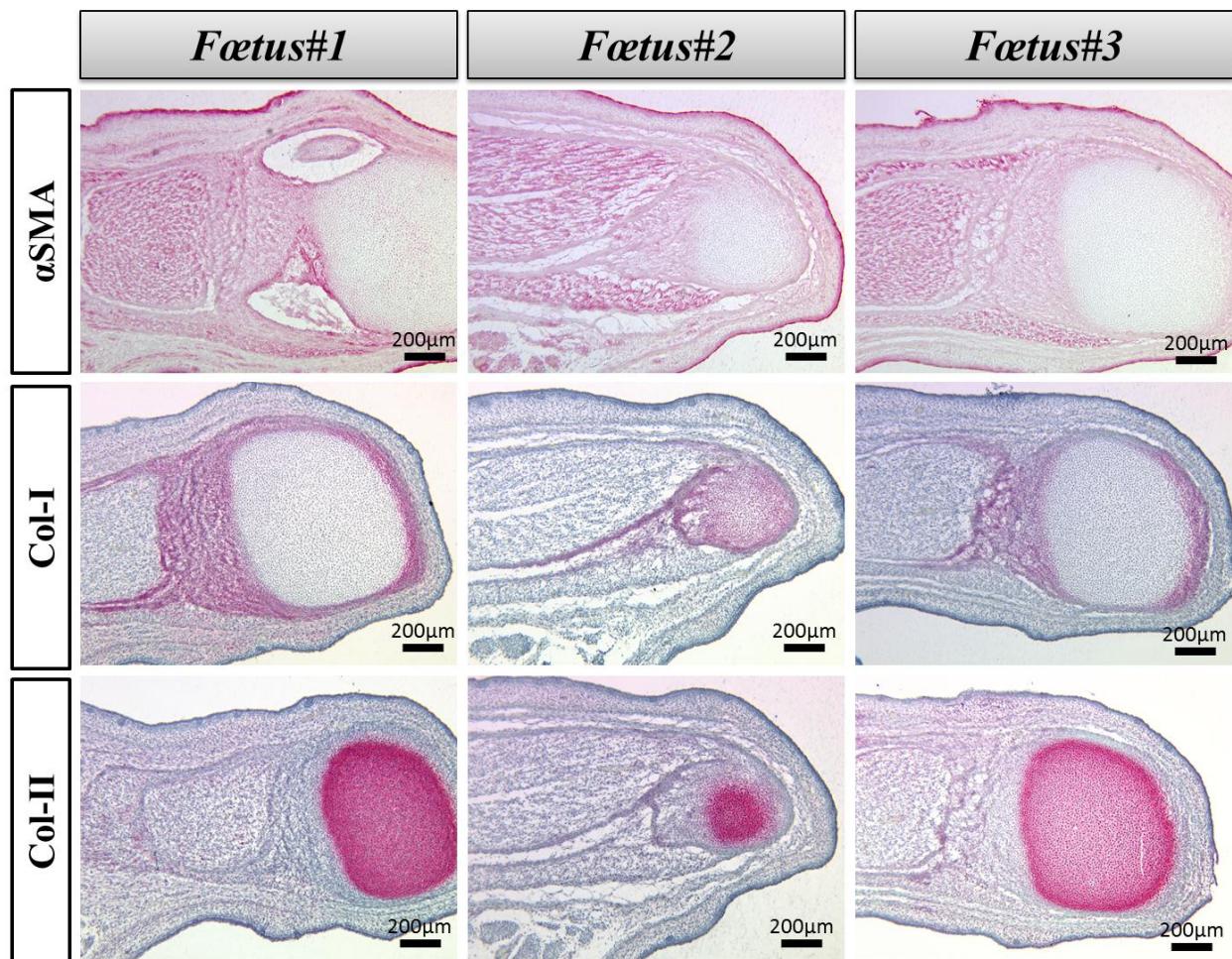


Figure 4-7 : Résultats des IHC pour la détection d' α SMA et la déposition de Col-I et Col-II dans le membre postérieur gauche des trois fœtus de lapin NZW étudié.

Malgré le fait que les coupes histologiques n'ont pas été collectées à la même profondeur dans le genou, principalement causé par l'orientation variable des pattes des fœtus, il est possible

de distinguer un motif de coloration dans les tissus de l'extrémité distale du fémur (**Figure 4-8**). Le tissu exprimant α SMA est certainement le tissu stromal, entreprenant à cet instant du développement fœtal la différentiation de cartilage en os.

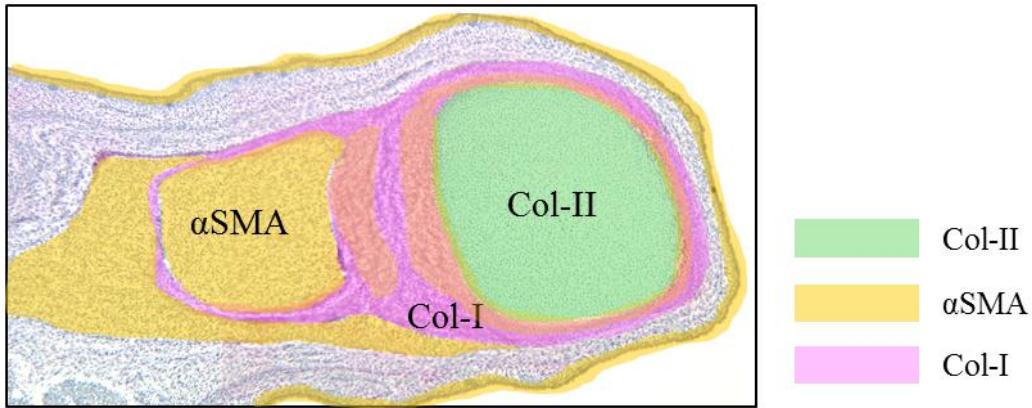


Figure 4-8 : Schéma du motif général de coloration pour la détection d' α SMA et de déposition de Col-I et Col-II à l'extrémité distale du fémur chez un fœtus après 22 jours de gestation.

Suite aux différents tests IHC effectués, il est possible d'affirmer que α SMA est exprimé et détecté dans une variété de tissus de lapin NZW. Les tissus fœtaux de l'extrémité du fémur et le tissu de placenta de la femelle gestante sont recommandés comme tissus de contrôle pour l'optimisation de techniques IHC de détections de cellules stromales et cellules souches mésenchymateuses.

4.3.4 α SMA est détecté dans les précurseurs des « chondrogenic Foci » attachés aux parois du défaut ostéochondraux en réparation dans un modèle *in vivo* de lapin NZW

La procédure d'IHC développée et optimisée a été appliquée à des échantillons ostéochondraux provenant de modèles *in vivo* de réparation du cartilage chez le lapin NZW traité par microperforation et avec un implant chitosan-GP/sang.

Les tests effectués ont révélé que les cellules exprimant α SMA étaient localisées au niveau de la plaque sous-chondrale, ainsi qu'au niveau de la plaque de croissance dans des échantillons ostéochondraux de Lapin NZW squelettiquement immature (**Figure 4-9**). Les cellules détectées sont des chondrocytes et des « bone lining cells ».

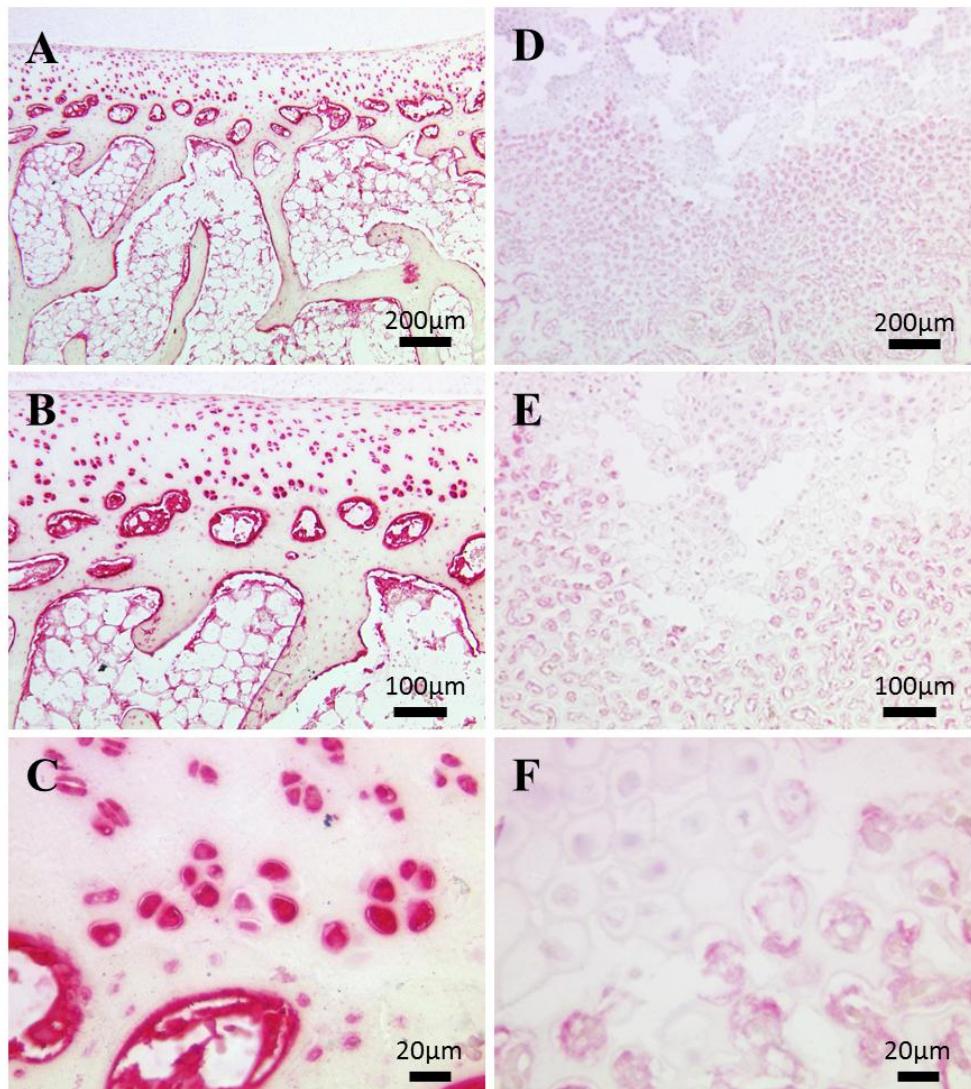


Figure 4-9 : Images microscopique des résultats d'IHC avec α SMA dans des coupes ostéochondrales de jeunes lapins NZW, avec la plaque de croissance. (A-C) à la surface du cartilage articulaire, (D-F) au niveau de la plaque de croissance.

L'étude de l'expression d' α SMA dans le tissu de trochlée intacte d'un lapin NZW squelettiquement mature, montre que les cellules de la plaque sous-chondrale cessent de l'exprimer. Cependant α SMA est encore exprimée par les chondrocytes à la surface du cartilage (**Figure 4-10**).

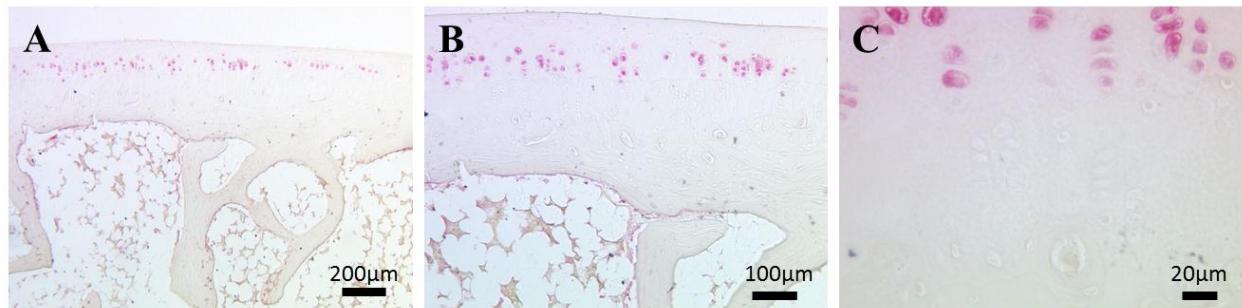


Figure 4-10 : Coloration par IHC avec α SMA dans une coupe sagittale de trochlée intacte (control) d'un lapin squelettiquement mature.

Lors de la réparation de l'os et du cartilage suite à la stimulation de la moelle osseuse par microperforation, un condensat de chondrocytes se forme spontanément après 2-3 semaines post-opératoires. Des études précédentes ont montré que les condensats de chondrocytes, ou « chondrogenic foci », émergent des bords du trou microperforé et évolue vers la surface du tissu de granulation. α SMA est également exprimée en bordure des « chondrogenic foci » (**Figure 4-11**). Il est possible d'observer une apposition linéaire des cellules le long des fibres de la matrice vers le condensat de chondrocytes (voir **Figure 4-11**, cellules indiquées par des flèches). Cette organisation des cellules est très semblable à celle observée au niveau de la plaque de croissance. Ainsi, en plus d'être associée au remodelage du tissu osseux, les cellules exprimant α SMA semblent également être impliquées dans la formation des « chondrogenic Foci », et donc également la formation de tissu cartilagineux qui s'en suit.

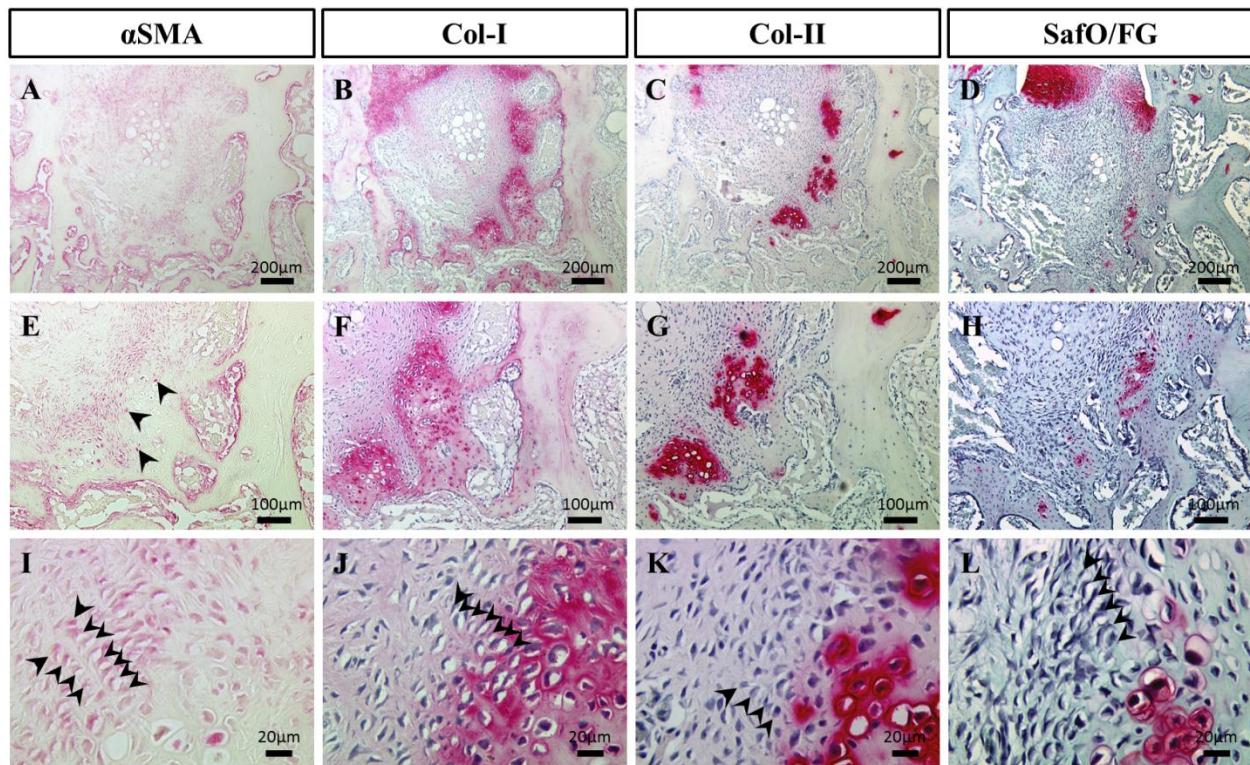


Figure 4-11 : Images au microscope optique des cellules exprimant α SMA (A, E & I, coupe#5-26) comparativement aux colorations IHC de Col-1 (B, F & J, coupe#5-27) et de Col-2 (C, G & K, coupe#5-29), ainsi que la coloration SafO/Fast Green (D, H & L, coupe#6-3) au niveau d'un « chondrogenic Foci » émergent du tissu osseux à la base de la lésion cartilage microperforée, traitée avec l'implant chitosan-GP/sang, à 3 semaines post-chirurgicale.

Lorsqu'un implant chitosan-GP/sang avec du facteur rhVIIa est combiné à la microperforation, des cellules expriment α SMA sur les bords du trou microperforé à 3 semaines postchirurgie, et celles alignées le long de la matrice osseuse nouvellement formée (**Figure 4-12**). Ce sont donc les cellules activées au site de transition entre le tissu de granulation et le tissu osseux qui expriment ce marqueur. Les données obtenues montrent donc que ces cellules sont des « bone lining cells » et qu'elles pourraient être associées aux précurseurs des cellules de l'os et du cartilage, aux cellules stromales ou encore aux MSC. Certaines vaisseaux sanguins ont été marqués également (muscle lisse) (**Figure 4-12**).

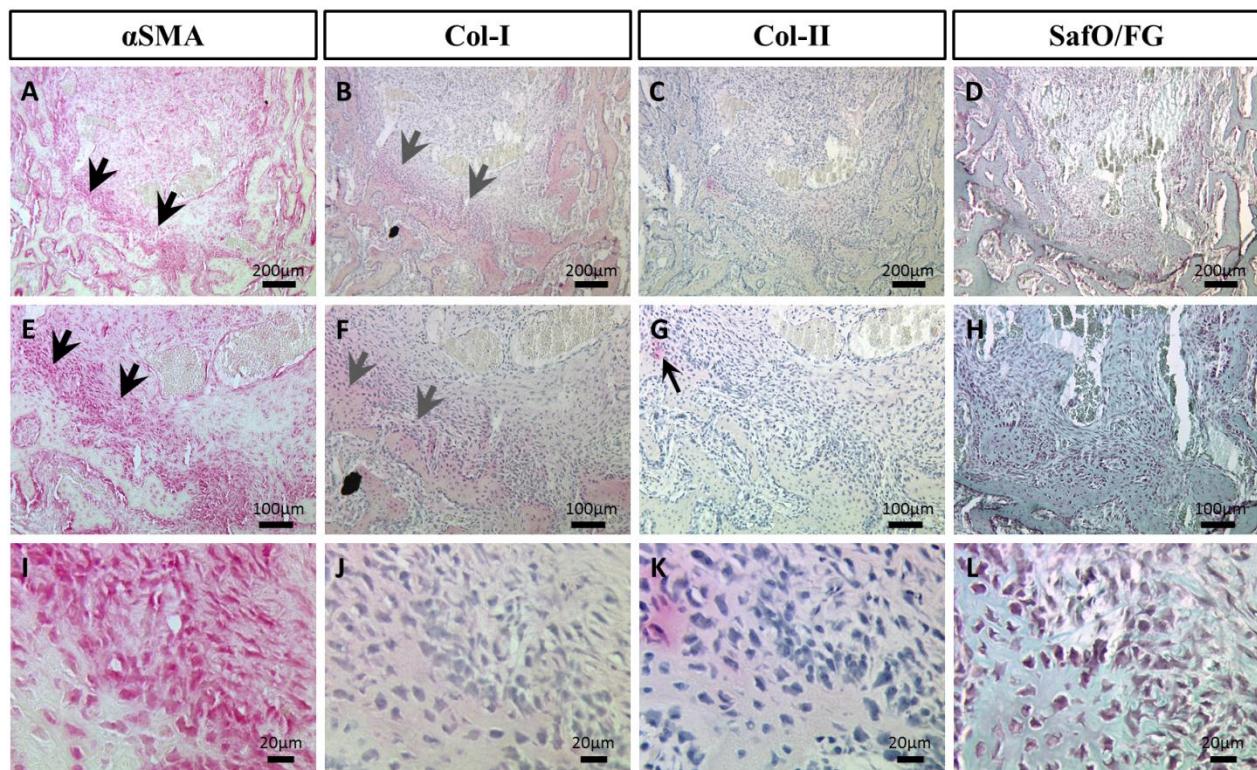


Figure 4-12 : Images au microscope optique des cellules exprimant α SMA (A, E & I, coupe#10) comparativement aux colorations IHC de Col-1 (B, F & J, coupe#9) et de Col-2 (C, G & K, coupe#8), ainsi que la coloration SafO/Fast Green (D, H & L, coupe#1) à l'interface entre le tissu de granulation et la matrice osseuse nouvellement formée, à 3 semaines post-chirurgicale dans une lésion cartilage microperforée et traité avec rhFVIIa ajouté à l'implant chitosan-GP/sang.

Pour les tests suivants, les échantillons ostéochondraux ont été traités avec des implants chitosan-GP/sang avec des poids moléculaires du chitosan différents. Dans chacune des coupes des échantillons microperforées, des cellules, exprimant α SMA, ont été détectées à la surface du tissu de granulation, ainsi qu'à l'intersection entre le tissu de granulation et le nouveau tissu osseux (**Figure 4-13**). À la surface, les cellules positives pour l'antigène α SMA ont des formes variables, rondes ou fusiformes, et bien qu'aucune quantification n'ait été performée, l'augmentation de la masse moléculaire du chitosan semble augmenter le recrutement de ces cellules dans cette zone. À l'intersection du tissu de granulation et du tissu osseux, les cellules détectées sont localisées dans les zones de remodelage du tissu osseux, posées à la surface de la matrice osseuse.

Ces données permettent également de poser l'hypothèse que les cellules exprimant α SMA sont des cellules « bone lining cells » et des cellules stromales participant au remodelage du tissu osseux. Toutefois, la forte densité cellulaire α SMA-positive laisse également supposer que des cellules stromales ou des MSC sont potentiellement recrutées de l'os sous-chondral et du fluide synovial, ou même la membrane synoviale à côté de la rotule qui frotte la trochlée lors l'articulation.

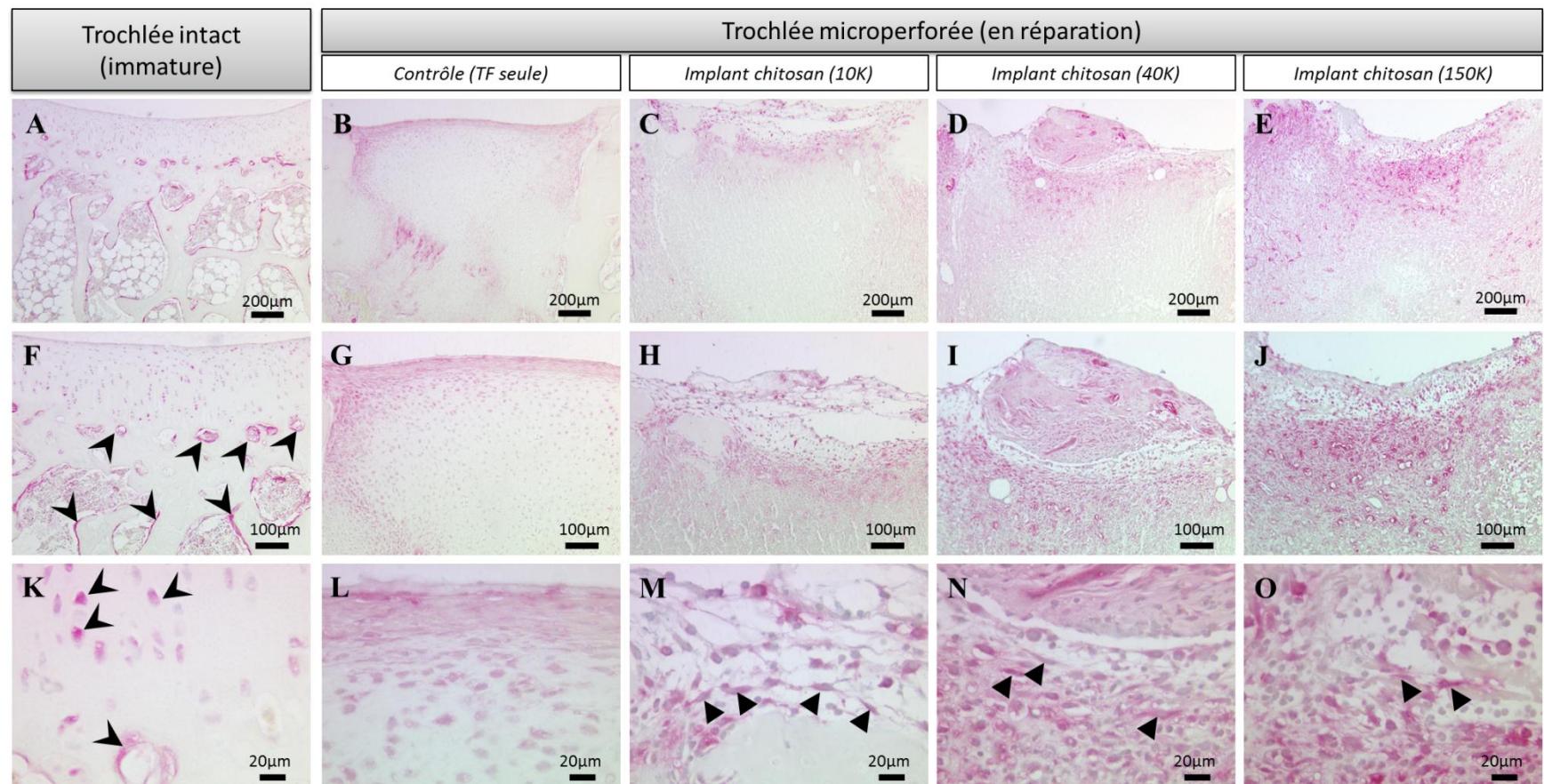


Figure 4-13 : Immunhistochimie avec l'anticorps anti- α SMA dans des échantillons ostéochondraux de trochlée de lapin NZW traité ou non avec un implant chitosan-GP/sang présolidifié, 3 semaines après l'opération de microperforation. Les flèches bleues indiquent le signal positif à la surface du tissu de granulation. Les flèches noires indiquent un signal positif dans les chondrocytes et les « bone lining cells » (K) ainsi que dans les cellules fusiformes (M, N & O) du tissu de granulation.

Suite à la formation du condensat de chondrocytes, il se produit une ossification endochondrale. Alors que les « chondrogenic foci » émergent des bords du trou microperforé et évoluent vers la surface du tissu de granulation, une seconde invasion de vasculaire a lieu en coordination avec le processus d'ossification du tissu. Dans le tissu ostéochondral de contrôle microperforé et traité avec IIa, l'apposition linéaire des cellules α SMA-positives en dessous du condensat de chondrocytes, semble correspondre aux cellules endothéliales participant à la formation de capillaires et le dépôt de Col-1 autour des cellules endothéliales semble associé à l'ossification endochondrale (**Figure 4-14**).

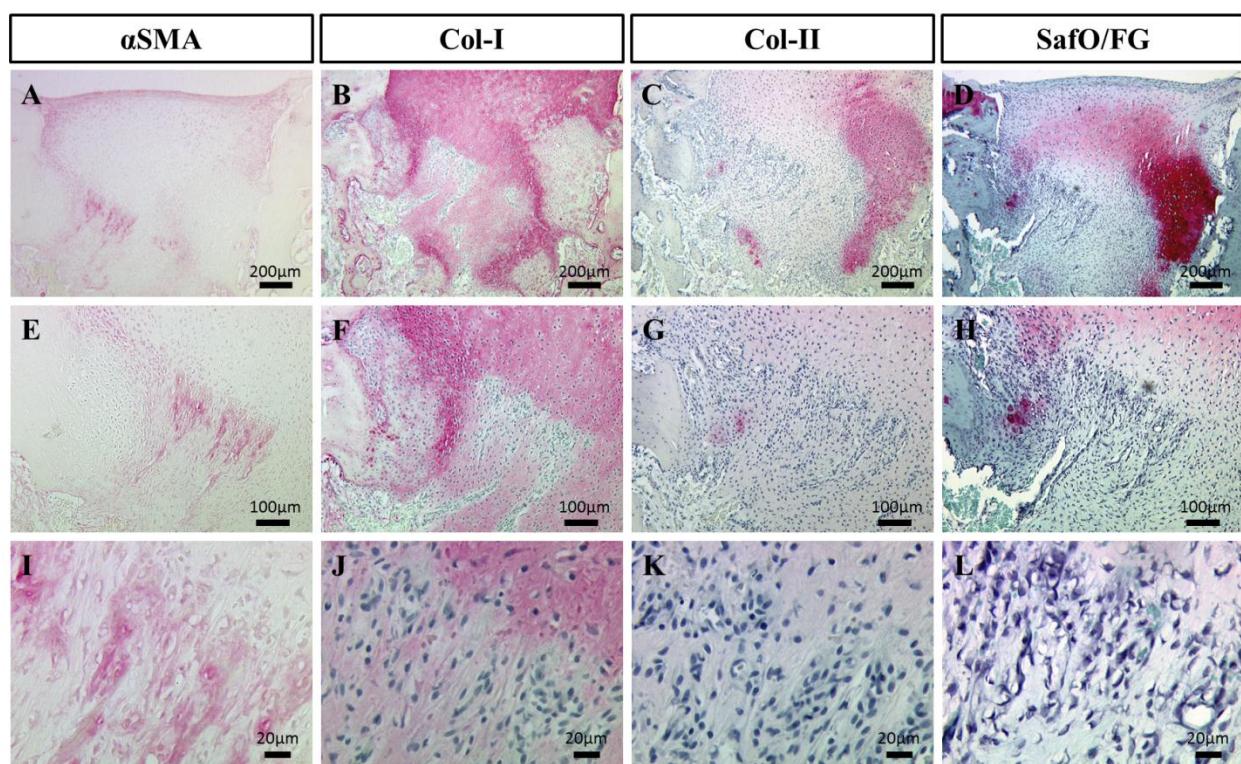


Figure 4-14 : Expression de l'actine α SMA à différents grossissements (A, E & I, coupe#3-6) dans un tissu de cartilage stimulé par microperforation seulement, comparé au dépôt des macromolécules de la matrice extracellulaire, Col-I (B, F & J, coupe#3-8), Col-II (C, G & K, coupe#3-11) (E) et GAG (D, H & L, coupe#3-9) au cours de l'ossification endochondrale.

Pour finir, les résultats obtenus indiquent également que l'expression de α SMA dans les cellules du cartilage et du tissu osseux semble se perdre avec la maturation du squelette. En effet, α SMA est présent dans le tissu fœtal du fémur, dans les chondrocytes et au niveau de la plaque

sous-chondrale d'un individu squelettiquement immature, mais n'est plus exprimée dans la plaque sous-chondrale après la disparition de la plaque de croissance (**Figure 4-15**). Avec l'expression d'αSMA au niveau de la plaque de croissance, le signal plus important dans les tissus de jeunes lapins NZW pourrait expliquer la plus grande capacité de réparation des animaux squelettiquement immature en comparaison aux animaux plus âgés.

On peut également observer que la procédure de débridement du cartilage extrait des cellules αSMA-positives du cartilage et de la plaque sous-chondrale (**Figure 4-15**). Si ces cellules sont effectivement des progénitrices ou des MSC, un débridement excessif pourrait nuire à la réparation en retirant ces cellules.

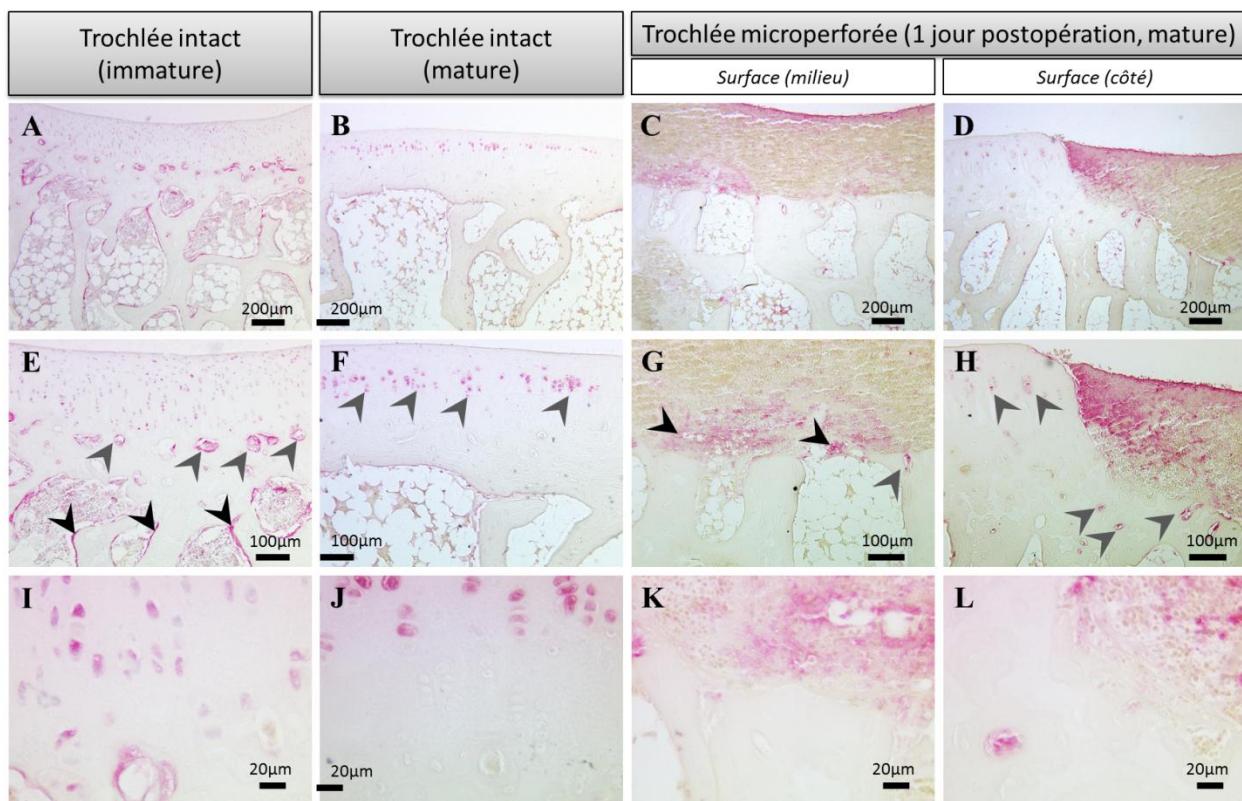


Figure 4-15 : Immunohistochimie avec l'anticorps anti-αSMA dans des échantillons ostéochondraux de trochlée intacte d'un lapin NZW squelettiquement immature (A, E & I), ainsi que deux échantillons ostéochondraux de lapin NZW mature, le premier d'une trochlée intacte (B, F & J) et le second d'une trochlée traitée avec un implant chitosan-GP/sang, 1 jour après l'opération de microperforation (C-D, G-H & K-L).

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

Cette étude fait part de nouvelles observations au niveau des mécanismes de l'angiogenèse et au niveau de la détection de cellules mésenchymateuses dans les lésions produite pour la stimulation de la moelle osseuse.

Dans le but d'améliorer la réparation du cartilage, de nombreuses études se concentrent sur la provenance, la migration et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (Grogan et al., 2009; Pittenger et al., 1999; Shapiro et al., 1993; Tuan et al., 2003). La capacité pluripotente des MSC est très documentée *in vitro*, cependant la localisation et le comportement de ces cellules dans les tissus *in vivo* ne sont pas encore bien compris (Richter, 2009). Les marqueurs recensés jusqu'à présent pour caractériser les MSC, ne sont pas exclusifs à cette population cellulaire. Plusieurs études s'intéressent ainsi des récepteurs ou des marqueurs de la prolifération, de la différenciation et de la migration, tel que la β -catenin, la nestin ou l'actine α SMA (Calderone, 2012; Chen, Y. et al., 2007; Funakoshi et al., 2010; MacDonald, Tamai, & He, 2009). Dans cette étude, de nombreux résultats ont été obtenus pour les cellules exprimant l'actine α SMA. Il a été démontré que cette molécule d'actine était exprimée par les cellules stromales mésenchymateuses extraites de la moelle osseuse (Cai et al., 2001; Funakoshi et al., 2010). Bien que des tests quantitatifs doivent être effectués pour valider ces résultats, il a été montré dans cette étude que les cellules stromales mésenchymateuses, ou les cellules préceptrices des lignées cellulaires de l'os exprimant α SMA, sont localisées le long de la matrice minéralisée dans les zones de remodelage du cartilage.

Deux sources probables des cellules stromales mésenchymateuses qui participent à la réparation des lésions ostéochondrales sont mises en avant dans la littérature : l'os sous-chondral ou la membrane synoviale (Meachim & Roberts, 1971). Le cartilage endommagé ne peut pas être se réparer sans un stimulus extérieur. De nombreuses études dans la littérature présentent les résultats de la réparation du cartilage grâce à la technique de stimulation de la moelle osseuse par microperforation (Bell et al., 2012; Mithoefer et al., 2006; Steadman, J. Richard et al., 2010). Bien que cette procédure soit l'une des plus utilisées en médecine orthopédique, les résultats dépendent de nombreux facteurs, comme l'âge du patient (Richter, 2009), et n'aboutissent pas toujours à la restitution du cartilage (Kaul et al., 2012).

Cette technique se base sur la notion de recrutement des cellules de l'os sous-chondral, qui initient le processus de réparation du cartilage, sans toutefois toujours prendre en considération l'influence des tissus environnants, tels que la membrane synoviale ou la plaque sous-chondrale (Dowthwaite et al., 2004; Gomoll et al., 2010). Des études récentes ont démontré que la restitution ou la préservation de l'intégrité de la « tidemark » et de la plaque sous-chondrale sont importantes pour la réparation de l'os et du cartilage (Gomoll et al., 2010; Hoemann et al., 2012; Madry, van Dijk, & Mueller-Gerbl, 2010). Les résultats de cette étude montrent l'influence de la structure particulière de la plaque sous-chondrale sur la réparation. Premièrement, l'étude de l'angiogenèse a révélé des différences importantes entre les différentes conditions essentiellement à 0.5mm en dessous de la surface du tissu de granulation. Au niveau de la surface, aucun ou très peu de vaisseaux sanguins ont été quantifié. Il semble donc que la structure à l'interface entre l'os et le cartilage et de la plaque sous-chondrale est soit en lien avec cet effet. Des expériences à différent moment de la réparation seraient nécessaires.

Ensuite, les tests IHC avec l'anticorps anti- α SMA ont révélés un signal positif dans les tissus de trochlée d'un lapin NZW squelettiquement immature, et notamment dans la plaque sous-chondrale. Ceci indique la présence de cellules stromales mésenchymateuses et que des MSC se trouvent potentiellement dans la plaque sous-chondrale. Il est donc possible qu'un retrait trop agressif du cartilage endommagé, lors de l'opération avec une curette (« debridement »), engendre l'extraction des cellules multipotentes logées dans la plaque sous-chondrale et nuise à la réparation (Madry et al., 2010; Steadman, J. Richard et al., 2010; Steadman, J. R. et al., 1997). Il serait alors recommandé aux chirurgiens, lors de la stimulation de la moelle osseuse par micropéforation, de se limiter au retrait total ou partiel des couches du cartilage en s'assurant de préserver la couche de cartilage calcifié et la plaque sous-chondrale intacte (Hoemann et al., 2012).

Parce que les tests IHC avec les marqueurs β -catenin et nestin n'ont révélé aucun signal positif dans les coupes ostéochondrales du lapin (fœtus ou adulte), ce fait doit être vérifié à l'aide d'autres marqueurs MSC. La détection de ces cellules reste un défi surtout avec l'absence de marqueurs exclusifs aux MSC et le petit nombre d'anticorps produits contre les antigènes du lapin NZW. Et cela malgré le fait que ce modèle animal est un des modèles animaux les plus fréquemment utilisés dans les études précliniques orthopédiques (Hurtig et al., 2011).

Ces travaux mettent en avant que beaucoup de mécanismes de la réparation du cartilage et de l'os sous-chondral sont encore méconnus. Pour améliorer les techniques chirurgicales et les traitements disponibles, les connaissances sur l'angiogenèse et la localisation des cellules stromales et cellules souches mésenchymateuses dans les tissus devront être approfondies.

CONCLUSION

Le but du génie tissulaire est de développer des substituts biologiques ou artificielles des tissus ayant perdu leur fonctionnalité. Parmi les nombreux défis qui entourent ce domaine de la recherche et de l'industrie, les mécanismes de l'angiogenèse et des cellules souches ont besoin d'être élucidés.

Dans cette étude, nous avons montré que l'utilisation d'un implant chitosan-GP/sang avait une influence sur la déposition de macromolécules de l'ECM et sur l'angiogenèse. Les données stéréographiques ont permis de distinguer que l'ajout de facteurs de coagulations, notamment la thrombine et le facteur rhFVIIa recombinant humain, promeut une augmentation des densités de surface et de volume. L'implant chitosan-GP/sang avec ces facteurs de coagulation entraîne par conséquent l'augmentation du débit sanguin vers la lésion du cartilage et permet un plus flux d'échange de nutriments et de gaz entre le sang et le tissu de granulation. Les valeurs de densité de longueur n'ont pas dévoilé de différence entre les contions de traitements, mais elles ont pu être comparées à des études précédentes et montrées que les données de l'angiogenèse étaient reproductibles. Les données histomorphométriques ont confirmé que l'implant chitosan-GP/sang retardait le dépôt des macromolécules Col-1, Col-2 et GAG. Elles ont également démontré que l'ajout de facteurs de coagulation dans la préparation de l'implant n'a pas d'incidence sur ce phénomène.

Le développement de techniques d'immunohistochimie pour la détection des cellules souches mésenchymateuses a dévoilé les contraintes de cette technique pour les tissus de lapin NZW. Les principales sont premièrement la difficulté de trouver un marqueur des MSC qui leur aient exclusifs, et deuxièmement la disponibilité d'anticorps fonctionnant contre les antigènes de lapin NZW. Parmi les anticorps sélectionnés et testés, seul l'anticorps anti- α SMA a permis la détection des MSC dans les tissus ostéochondraux de lapin NZW, ainsi que dans d'autres tissus variés. L'expression de α SMA a permis d'observer que les cellules stromales mésenchymateuses et les MSC étaient potentiellement associées au « bone lining cells » et qu'elles étaient également localisées dans la plaque sous-chondrale. La détection de cellules α SMA-positives indique également que la réparation pourrait se produire à la fois à travers la membrane synoviale et l'os sous-chondral. L'une des observations les plus intéressantes est cependant la ressemblance entre le motif de coloration des cellules de la plaque sous-chondrale et la plaque de croissance dans un

échantillon de trochlée immature, et celui des cellules sous-jacentes aux « chondrogenic foci » dans les échantillons ostéochondraux de réparation du cartilage. La réparation de cartilage semble donc se produire selon des mécanismes semblables à l'ossification endochondrale.

Dans cette étude, l'angiogenèse a été quantifiée par la stéréographie des vaisseaux sanguins du tissu de granulation à partir d'une coloration histochimique, Gomori Trichrome, mais aucune distinction n'a été faite entre l'angiogenèse et la vasculogenèse. Ces phénomènes se produisant différemment dans le tissu de granulation, la compréhension des mécanismes de la vasculogenèse pourrait contribuer à l'optimisation de la composition et structure de l'implant chitosan-GP/sang.

Ensuite, les résultats obtenus à l'aide de la procédure IHC avec l'actine α SMA ne sont que descriptifs et qualitatifs, il serait pertinent de poursuivre les études sur les cellules souches mésenchymateuses dans les tissus de cartilage en réparation. L'élucidation de la localisation, de la migration et du comportement de ces cellules dans les tissus ostéochondraux pourrait mener au développement d'un implant acellulaire à base de chitosan stimulant la régénération de cartilage « purement » hyalin.

RÉFÉRENCES

- Abarrategi, A., Lopiz-Morales, Y., Ramos, V., Civantos, A., Lopez-Duran, L., Marco, F., & Lopez-Lacomba, J.L. (2010). Chitosan scaffolds for ostéochondral tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95A(4), 1132-1141. doi: 10.1002/Jbm.A.32912
- Abrams, D.C., Toynton, S.C., Dore, C., Emson, M.A., Taylor, P., Springall, D.R., . . . Polak, J.M. (1997). Stereological estimation of blood vessel surface and volume densities in human normal and rhinitic nasal mucosa. *Rhinology*, 35(1), 22-27.
- Adams, R.L.C., & Bird, R.J. (2009). Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology*, 14(5), 462-470. doi: DOI 10.1111/j.1440-1797.2009.01128.x
- Ahern, B.J., Parvizi, J., Boston, R., & Schaer, T.P. (2009). Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(6), 705-713. doi: DOI 10.1016/j.joca.2008.11.008
- Baddeley, A.J. (2004). *Monographs on Statistics and Applied Probability : Stereology for Statisticians*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Baldini, N., Cenni, E., Ciapetti, G., Granchi, D., & Savarino, L. (2009). Bone repair and regeneration Dans J. A. Planell (Édit.), *Bone repair biomaterials*. Boca Raton, FL: CRC Press LLC.
- Batty, P., & Smith, J.G. (2010). Haemostasis. *Surgery (Oxford)*, 28(11), 530-535. doi: 10.1016/j.mpsur.2010.08.008
- Beaudoin, S., Barbet, P., & Bargy, F. (2003). Developmental stages in the rabbit embryo: guidelines to choose an appropriate experimental model. *Fetal Diagn Ther*, 18(6), 422-427. doi: 10.1159/000073136
- Beguin, P.C., Gosselin, H., Mamarbachi, M., & Calderone, A. (2012). Nestin expression is lost in ventricular fibroblasts during postnatal development of the rat heart and re-expressed in scar myofibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 227(2), 813-820. doi: Doi 10.1002/Jcp.22794
- Bell, A., Lascau-Coman, V., Sun, J., Chen, G., Lowerison, M., Hurtig, M., & Hoemann, C.D. (2012). Bone-induced chondroinduction in sheep Jamshidi biopsy defects with and without treatment by subchondral chitosan-blood implant: 1 day, 3 week, and 3 month repair. *Cartilage, E-put ahead of print: October 23, 2012 as doi:10.1177/1947603512463227*
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., & Robey, P.G. (2001). Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19(3), 180-192. doi: DOI 10.1634/stemcells.19-3-180
- Boyce, B.F., Zuscik, M.J., & Xing, L. (2013). Biology of Bone and Cartilage. Dans R. V. Thakker, M. P. Whyte, J. A. Eisman & T. Igarashi (Édit.), *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease* (p. 3-24). San Diego: Academic Press.

- Buckwalter, J.A., & Mankin, H.J. (1997). Articular cartilage .2. Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 79A(4), 612-632.
- Buckwalter, J.A., & Mankin, H.J. (1998). Articular cartilage: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional Course Lectures, Vol 47 - 1998*, 47, 477-486.
- Cai, D., Marty-Roix, R., Hsu, H.P., & Spector, M. (2001). Lapine and canine bone marrow stromal cells contain smooth muscle actin and contract a collagen-glycosaminoglycan matrix. *Tissue Eng*, 7(6), 829-841. doi: 10.1089/107632701753337762
- Calderone, A. (2012). Nestin(+) cells and healing the infarcted heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 302(1), H1-H9. doi: DOI 10.1152/ajpheart.00716.2011
- Carney, D.H., Mann, R., Redin, W.R., Pernia, S.D., Berry, D., Heggers, J.P., . . . Glenn, K.C. (1992). Enhancement of Incisional Wound-Healing and Neovascularization in Normal Rats by Thrombin and Synthetic Thrombin Receptor-Activating Peptides. *Journal of Clinical Investigation*, 89(5), 1469-1477.
- Chen, G., Sun, J., Lascau-Coman, V., Chevrier, A., Marchand, C., & Hoemann, C.D. (2011). Acute Osteoclast Activity following Subchondral Drilling Is Promoted by Chitosan and Associated with Improved Cartilage Repair Tissue Integration. *Cartilage*, 2(2), 173-185. doi: 10.1177/1947603510381096
- Chen, Y., Whetstone, H.C., Youn, A., Nadesan, P., Chow, E.C., Lin, A.C., & Alman, B.A. (2007). Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 526-533. doi: M602700200 [pii]
- 10.1074/jbc.M602700200
- Cheng, S.L., Yang, J.W., Rifas, L., Zhang, S.F., & Avioli, L.V. (1994). Differentiation of Human Bone-Marrow Osteogenic Stromal Cells in Vitro - Induction of the Osteoblast Phenotype by Dexamethasone. *Endocrinology*, 134(1), 277-286.
- Chevrier, A., Hoemann, C.D., Sun, J., & Buschmann, M.D. (2007). Chitosan-glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(3), 316-327. doi: 10.1016/j.joca.2006.08.007
- Chevrier, A., Hoemann, C.D., Sun, J., & Buschmann, M.D. (2011). Temporal and spatial modulation of chondrogenic foci in subchondral microdrill holes by chitosan-glycerol phosphate/blood implants. *Osteoarthritis and Cartilage*, 19(1), 136-144. doi: 10.1016/j.joca.2010.10.026
- Chevrier, A., Rossomacha, E., Buschmann, M.D., & Hoemann, C.D. (2005). Optimization of histoprocessing methods to detect glycosaminoglycan, collagen type II, and collagen type I in decalcified rabbit ostéochondral sections. *Journal of Histotechnology*, 28(3), 165-175.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469-480. doi: DOI 10.1016/j.cell.2006.10.018

- Dahlback, B. (2000). Blood coagulation. *Lancet*, 355(9215), 1627-1632. doi: Doi 10.1016/S0140-6736(00)02225-X
- Daintith, J., & Martin, E. (Édit.). (2010). (6^e éd.). Oxford University Press.
- Daugherty, R.L., & Gottardi, C.J. (2007). Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)*, 22, 303-309. doi: 22/5/303 [pii] 10.1152/physiol.00020.2007
- Davie, E.W. (2003). A Brief Historical Review of the Waterfall/Cascade of Blood Coagulation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 50819-50832. doi: 10.1074/jbc.X300009200
- Davie, E.W., Fujikawa, K., & Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, 30(43), 10363-10370. doi: 10.1021/bi00107a001
- Dockery, P., & Fraher, J. (2007). The quantification of vascular beds: A stereological approach. *Experimental and Molecular Pathology*, 82(2), 110-120. doi: 10.1016/j.yexmp.2006.12.011
- Dowthwaite, G.P., Bishop, J.C., Redman, S.N., Khan, I.M., Rooney, P., Evans, D.J.R., . . . Archer, C.W. (2004). The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *Journal of Cell Science*, 117(6), 889-897. doi: Doi 10.1242/Jcs.00912
- Dutta, P.K., Rinki, K., & Dutta, J. (2011). Chitosan: A Promising Biomaterial for Tissue Engineering Scaffolds. *Chitosan for Biomaterials II*, 244, 45-79. doi: Doi 10.1007/12_2011_112
- Eberhart, C.G., & Argani, P. (2001). Wnt signaling in human development: Beta-catenin nuclear translocation in fetal lung, kidney, placenta, capillaries, adrenal, and cartilage. *Pediatric and Developmental Pathology*, 4(4), 351-357.
- Eming, S.A., Krieg, T., & Davidson, J.M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*, 127(3), 514-525. doi: 10.1038/sj.jid.5700701
- Eyre, D. (2002). Collagen of articular cartilage. *Arthritis Research*, 4(1), 30-35. doi: Doi 10.1186/Ar380
- Eyre, L., & Gamlin, F. (2010). Haemostasis, blood platelets and coagulation. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 11(6), 244-246. doi: 10.1016/j.mpaic.2010.02.015
- Fan, L., Yotov, W.V., Zhu, T., Esmailzadeh, L., Joyal, J.S., Sennlaub, F., . . . Rivard, G.E. (2005). Tissue factor enhances protease-activated receptor-2-mediated factor VIIa cell proliferative properties. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(5), 1056-1063. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01250.x
- Fuchs, R.K., Warden, S.J., & Turner, C.H. (2009). Bone anatomy, physiology and adaptation to mechanical loading. Dans J. A. Planell (Édit.), *Bone repair biomaterials*. Boca Raton, FL: CRC Press LLC.
- Funakoshi, T., Martin, S.D., Wolf, B.T., Schmid, T.M., Thornhill, T.S., & Spector, M. (2010). alpha-Smooth muscle actin-expressing cells and lubricin in periprosthetic tissue. *J Biomed Mater Res A*, 93(2), 515-527. doi: 10.1002/jbm.a.32522

- Furukawa, T., Eyre, D.R., Koide, S., & Glimcher, M.J. (1980). Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am*, 62(1), 79-89.
- Garcia, Y., Breen, A., Burugapalli, K., Dockery, P., & Pandit, A. (2007). Stereological methods to assess tissue response for tissue-engineered scaffolds. *Biomaterials*, 28(2), 175-186. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.037
- Gomoll, A.H., Madry, H., Knutson, G., van Dijk, N., Seil, R., Brittberg, M., & Kon, E. (2010). The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy*, 18(4), 434-447. doi: DOI 10.1007/s00167-010-1072-x
- Gray, H., Standring, S., Ellis, H., & Berkovitz, B.K.B. (2005). *Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice* (39th^e éd.). Edinburgh ; New York: Elsevier Churchill Livingstone.
- Griffiths, G., Burke, B., & Lucocq, J. (1993). *Fine structure immunocytochemistry*. Berlin ; New York: Springer-Verlag.
- Grogan, S.P., Miyaki, S., Asahara, H., D'Lima, D.D., & Lotz, M.K. (2009). Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 11(3), -. doi: 10.1186/Ar2719
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314-321. doi: 10.1038/nature07039
- Hall, B.K. (2005). *Bones and cartilage : developmental and evolutionary skeletal biology*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press.
- Hankenson, K.D., Dishowitz, M., Gray, C., & Schenker, M. (2011). Angiogenesis in bone regeneration. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*, 42(6), 556-561. doi: 10.1016/j.injury.2011.03.035
- Harkness, J.E., Turner, P.V., Vande Woude, S., & Wheler, C.L. (2010). *Harkness and Wagner's biology and medicine of rabbits and rodents* (5^e éd.). Ames, Iowa American College of Laboratory Animal Medicine
- Hartman, H.A. (1974). The Fetus in Experimental Teratology. Dans S. H. Weisbroth, R. E. Flatt & A. J. Kraus (Édit.), *The biology of the Laboratory Rabbit* (p. 92-153). New York and London: Academic Press.
- Hasanova, G.I., Noriega, S.E., Mamedov, T.G., Thakurta, S.G., Turner, J.A., & Subramanian, A. (2011). The effect of ultrasound stimulation on the gene and protein expression of chondrocytes seeded in chitosan scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5(10), 815-822. doi: 10.1002/Term.384
- Henno, S., Lambotte, J.C., Glez, D., Guigand, M., Lancien, G., & Cathelineau, G. (2003). Characterisation and quantification of angiogenesis in beta-tricalcium phosphate implants by immunohistochemistry and transmission electron microscopy. *Biomaterials*, 24(19), 3173-3181. doi: S0142961203001492 [pii]
- Hoemann, C.D., Chen, G., Marchand, C., Tran-Khanh, N., Thibault, M., Chevrier, A., . . . El-Gabalawy, H. (2010). Scaffold-guided subchondral bone repair: implication of

- neutrophils and alternatively activated arginase-1+ macrophages. *Am J Sports Med*, 38(9), 1845-1856. doi: 10.1177/0363546510369547
- Hoemann, C.D., Hurtig, M., Rossomacha, E., Sun, J., Chevrier, A., Shive, M.S., & Buschmann, M.D. (2005). Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am*, 87(12), 2671-2686. doi: 10.2106/JBJS.D.02536
- Hoemann, C.D., Kandel, R., Roberts, S., Saris, D.B.F., Creemers, L., Mainil-Varlet, P., . . . Buschmann, M.D. (2011). International Cartilage Repair Society (ICRS) Recommended Guidelines for Histological Endpoints for Cartilage Repair Studies in Animal Models and Clinical Trials. *Cartilage*, 2(2), 153-172. doi: 10.1177/1947603510397535
- Hoemann, C.D., Lafantaisie-Favreau, C.H., Lascau-Coman, V., Chen, G., & Guzman-Morales, J. (2012). The cartilage-bone interface. *J Knee Surg*, 25(2), 85-97.
- Hoemann, C.D., Sun, J., Legare, A., McKee, M.D., & Buschmann, M.D. (2005). Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(4), 318-329. doi: 10.1016/j.joca.2004.12.001
- Hoemann, C.D., Sun, J., McKee, M.D., Chevrier, A., Rossomacha, E., Rivard, G.E., . . . Buschmann, M.D. (2007). Chitosan-glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(1), 78-89. doi: 10.1016/j.joca.2006.06.015
- Hurtig, M.B., Buschmann, M.D., Fortier, L.A., Hoemann, C.D., Hunziker, E.B., Jurvelin, J.S., . . . Whiteside, R.A. (2011). Preclinical Studies for Cartilage Repair: Recommendations from the International Cartilage Repair Society. *Cartilage*, 2(2), 137-152. doi: 10.1177/1947603511401905
- Insall, J.N. (1967). Intra-articular surgery for degenerative arthritis of the knee. A report of the work of the late K. H. Pridie. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume*, 49(2), 211-228.
- Jain, R.K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine*, 9(6), 685-693. doi: 10.1038/nm0603-685
- Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., & Bruder, S.P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 64(2), 295-312.
- Jeffrey, D.R., & Watt, I. (2003). Imaging hyaline cartilage. *British Journal of Radiology*, 76(911), 777-787. doi: 10.1259/Bjr/51504520
- Jones, E.A., English, A., Emery, P., & McGonagle, D. (2002). Isolation and characterization of unique human bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis and Rheumatism*, 46(9), S568-S568.
- Junqueira, L.C.U., & Mescher, A.L. (2010). *Junqueira's basic histology : text and atlas* (12th^e éd.). New York: McGraw-Hill Medical.
- Kaul, G., Cucchiari, M., Remberger, K., Kohn, D., & Madry, H. (2012). Failed cartilage repair for early osteoarthritis defects: a biochemical, histological and immunohistochemical

- analysis of the repair tissue after treatment with marrow-stimulation techniques. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 20(11), 2315-2324. doi: 10.1007/s00167-011-1853-x
- Key, M. (2009). Immunohistochemistry Staining Methods Dans G. L. Kumar & L. Rudbeck (Édit.), *Immunohistochemical Staining Methods* (5^e éd., p. 57-60). Carpinteria, California: Dako North America.
- Kirilak, Y., Pavlos, N.J., Willers, C.R., Han, R., Feng, H., Xu, J., . . . Zheng, M.H. (2006). Fibrin sealant promotes migration and proliferation of human articular chondrocytes: possible involvement of thrombin and protease-activated receptors. *International Journal of Molecular Medicine*, 17(4), 551-558.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C., & Robbins, S.L. (Édit.). (2013). *Robbins basic pathology* (9^e éd.). Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders.
- Lafontaisie-Favreau, C.-H., Guzman-Morales, J., Sun, J., Chen, G., Harris, A., Smith, T., . . . Hoemann, C.D. (in revision). Subchondral pre-solidified chitosan/blood implants elicit reproducible early osteochondral wound-repair responses including neutrophil and stromal cell chemotaxis, bone remodeling and enhanced repair tissue integration. *Bmc Musculoskeletal Disorders*.
- Lee, R.H., Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, H.S., Suh, K., . . . Jung, J.S. (2004). Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 14(4-6), 311-324. doi: 10.1159/000080341
- Li, J.J., Zhao, Q., Wang, E.B., Zhang, C.H., Wang, G.B., & Yuan, Q. (2012). Dynamic compression of rabbit adipose-derived stem cells transfected with insulin-like growth factor 1 in chitosan/gelatin scaffolds induces chondrogenesis and matrix biosynthesis. *Journal of Cellular Physiology*, 227(5), 2003-2012. doi: 10.1002/Jcp.22927
- Liu, X., Ma, L., Mao, Z.W., & Gao, C.Y. (2011). Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Repair and Regeneration. *Chitosan for Biomaterials II*, 244, 81-127. doi: Doi 10.1007/12_2011_118
- Lolmede, K., Campana, L., Vezzoli, M., Bosurgi, L., Tonlorenzi, R., Clementi, E., . . . Rovere-Querini, P. (2009). Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways. *J Leukoc Biol*, 85(5), 779-787. doi: 10.1189/jlb.0908579
- Lories, R.J., & Luyten, F.P. (2013). Overview of Joint and Cartilage Biology. Dans R. V. Thakker, M. P. Whyte, J. A. Eisman & T. Igarashi (Édit.), *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease* (p. 35-51). San Diego: Academic Press.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/beta-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell*, 17(1), 9-26. doi: DOI 10.1016/j.devcel.2009.06.016
- Mackie, E.J., Loh, L.H., Sivagurunathan, S., Uaesoontrachoon, K., Yoo, H.J., Wong, D., . . . Pagel, C.N. (2008). Protease-activated receptors in the musculoskeletal system. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(6-7), 1169-1184. doi: 10.1016/j.biocel.2007.12.003

- Madry, H., van Dijk, C.N., & Mueller-Gerbl, M. (2010). The basic science of the subchondral bone. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy*, 18(4), 419-433. doi: DOI 10.1007/s00167-010-1054-z
- Mandarim-de-Lacerda, C.A. (2003). Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*, 75(4), 469-486. doi: S0001-37652003000400006 [pii]
- Mandelbaum, B.R., Browne, J.E., Fu, F., Micheli, L., Mosely, J.B., Erggelet, C., . . . Peterson, L. (1998). Articular cartilage lesions of the knee. *American Journal of Sports Medicine*, 26(6), 853-861.
- Mapp, P.I., Avery, P.S., McWilliams, D.F., Bowyer, J., Day, C., Moores, S., . . . Walsh, D.A. (2008). Angiogenesis in two animal models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 16(1), 61-69. doi: 10.1016/j.joca.2007.05.017
- Maragoudakis, M.E., Tsopanoglou, N.E., & Andriopoulou, P. (2002). Mechanism of thrombin-induced angiogenesis. *Biochem Soc Trans*, 30(2), 173-177. doi: 10.1042/
- Marchand, C., Chen, G.P., Tran-Khanh, N., Sun, J., Chen, H.M., Buschmann, M.D., & Hoemann, C.D. (2012). Microdrilled Cartilage Defects Treated with Thrombin-Solidified Chitosan/Blood Implant Regenerate a More Hyaline, Stable, and Structurally Integrated Osteochondral Unit Compared to Drilled Controls. *Tissue Engineering Part A*, 18(5-6), 508-519. doi: DOI 10.1089/ten.tea.2011.0178
- Marchand, C., Chen, H.M., Buschmann, M.D., & Hoemann, C.D. (2011). Standardized Three-Dimensional Volumes of Interest with Adapted Surfaces for More Precise Subchondral Bone Analyses by Micro-Computed Tomography. *Tissue Engineering Part C-Methods*, 17(4), 475-484. doi: 10.1089/ten.tec.2010.0417
- Marchand, C., Rivard, G.E., Sun, J., & Hoemann, C.D. (2009). Solidification mechanisms of chitosan-glycerol phosphate/blood implant for articular cartilage repair. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(7), 953-960. doi: 10.1016/j.joca.2008.12.002
- Mareddy, S., Crawford, R., Brooke, G., & Xiao, Y. (2007). Clonal isolation and characterization of bone marrow stromal cells from patients with osteoarthritis. *Tissue Engineering*, 13(4), 819-829.
- Marieb, E.N., & Hoehn, K. (2010). *Anatomie et physiologie humaines* (4^e éd.). Saint-Laurent, Qc : Éditions du Renouveau pédagogique.
- Martin, P. (1997). Wound healing - Aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276(5309), 75-81. doi: DOI 10.1126/science.276.5309.75
- Mathieu-Castello, O. (1987). Stereology. Dans R. Skalak & S. Chien (Édit.), *Handbook of bioengineering* (p. 35.31-35.31). New York: McGraw-Hill.
- Mayhew, T.M., Wijesekara, J., Baker, P.N., & Ong, S.S. (2004). Morphometric evidence that villous development and fetoplacental angiogenesis are compromised by intrauterine growth restriction but not by pre-eclampsia. *Placenta*, 25(10), 829-833. doi: 10.1016/j.placenta.2004.04.011
- Meachim, G., & Roberts, C. (1971). Repair of the joint surface from subarticular tissue in the rabbit knee. *J Anat*, 109(Pt 2), 317-327.

- Michalczyk, K., & Ziman, M. (2005). Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol*, 20(2), 665-671.
- Miller, M.D., & Hart, J.A. (2008). *Review of orthopaedics* (5^e éd.). Philadelphia: Saunders/Elsevier.
- Minister of Health. (2011). Medical Devices Regulations. tiré de <http://laws-lois.justice.gc.ca>
- Mithoefer, K., McAdams, T., Williams, R.J., Kreuz, P.C., & Mandelbaum, B.R. (2009). Clinical Efficacy of the Microfracture Technique for Articular Cartilage Repair in the Knee An Evidence-Based Systematic Analysis. *American Journal of Sports Medicine*, 37(10), 2053-2063. doi: 10.1177/0363546508328414
- Mithoefer, K., Williams, R.J., 3rd, Warren, R.F., Potter, H.G., Spock, C.R., Jones, E.C., . . . Marx, R.G. (2006). Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am*, 88 Suppl 1 Pt 2, 294-304. doi: 10.2106/JBJS.F.00292
- Montjovent, M.O., Bocelli-Tyndall, C., Scaletta, C., Scherberich, A., Mark, S., Martin, I., . . . Pioletti, D.P. (2009). In Vitro Characterization of Immune-Related Properties of Human Fetal Bone Cells for Potential Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering Part A*, 15(7), 1523-1532. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0222
- Morrissey, J.H., Macik, B.G., Neuenschwander, P.F., & Comp, P.C. (1993). Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood*, 81(3), 734-744.
- Noden, D.M., & de Lahunta, A. (1985). *The Embryology of Domestic Animals: Developmental Mechanisms and Malformations*. Baltimore/London.
- Ossovskaya, V.S., & Bunnett, N.W. (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev*, 84(2), 579-621. doi: 10.1152/physrev.00028.2003
- Ozaki, Y., Nishimura, M., Sekiya, K., Suehiro, F., Kanawa, M., Nikawa, H., . . . Kato, Y. (2007). Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 16(1), 119-129. doi: 10.1089/scd.2006.0032
- Pearle, A.D., Warren, R.F., & Rodeo, S.A. (2005). Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clinics in Sports Medicine*, 24(1), 1-+. doi: 10.1016/j.csm.2004.08.007
- Philippart, P., Daubie, V., & Pochet, R. (2005). Sinus grafting using recombinant human tissue factor, platelet-rich plasma gel, autologous bone, and anorganic bovine bone mineral xenograft: histologic analysis and case reports. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 20(2), 274-281.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., . . . Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147.
- Raggatt, L.J., & Partridge, N.C. (2010). Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103-25108. doi: 10.1074/jbc.R109.041087

- Rallapalli, S., Bishi, D.K., Verma, R.S., Cherian, K.M., & Guhathakurta, S. (2009). A multiplex PCR technique to characterize human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett*, 31(12), 1843-1850. doi: 10.1007/s10529-009-0106-2
- Ranstrom, J. (2012). Repeated measurements, bilateral observations and pseudoreplicates, why does it matter? *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(6), 473-475. doi: 10.1016/j.joca.2012.02.011
- Revell, P.A. (1983). Histomorphometry of bone. *J Clin Pathol*, 36(12), 1323-1331.
- Richter, W. (2009). Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *Journal of Internal Medicine*, 266(4), 390-405. doi: DOI 10.1111/j.1365-2796.2009.02153.x
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001
- Rivas, R., & Shapiro, F. (2002). Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: a study in the New Zealand white rabbit. *J Bone Joint Surg Am*, 84-A(1), 85-100.
- Roach, H.I., & Tilley, S. (2008). The Pathogenesis of Osteoarthritis. Dans F. Bronner & M. C. Farach-Carson (Édit.), *Bone and Osteoarthritis*. London: Springer.
- Sarwark, J.F. (2010). *Essentials of musculoskeletal care* (4^e éd.).
- Schöni-Affolter, F., Dubuis-Grieder, C., & Strauch, E. (2008). Human Embryology. *Cours d'embryologie en ligne à l'usage des étudiants et étudiantes en médecine*. Tiré de <http://www.embryology.ch/index.html>
- Shapiro, F., Koide, S., & Glimcher, M.J. (1993). Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 75(4), 532-553.
- Shaw, T.J., & Martin, P. (2009). Wound repair at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 18), 3209-3213. doi: 10.1242/jcs.031187
- Simard, P., Galarneau, H., Marois, S., Rusu, D., Hoemann, C.D., Poubelle, P.E., . . . Fernandes, M.J.G. (2009). Neutrophils exhibit distinct phenotypes toward chitosans with different degrees of deacetylation: implications for cartilage repair. *Arthritis Research & Therapy*, 11(3). doi: Artn R74
- Doi 10.1186/Ar2703
- Siu, R.K., Zara, J.N., Hou, Y.P., James, A.W., Kwak, J., Zhang, X.L., . . . Lee, M. (2012). NELL-1 Promotes Cartilage Regeneration in an In Vivo Rabbit Model. *Tissue Engineering Part A*, 18(3-4), 252-261. doi: 10.1089/ten.tea.2011.0142
- Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzonana, G., Gillessen, D., & Gabbiani, G. (1986). A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol*, 103(6 Pt 2), 2787-2796.
- Sophia Fox, A.J., Bedi, A., & Rodeo, S.A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*, 1(6), 461-468. doi: 10.1177/1941738109350438
- Statistics Canada. (2012). Tableau 105-0501 - Profil d'indicateurs de la santé, estimations annuelles, selon le groupe d'âge et le sexe, Canada, provinces, territoires, régions

sociosanitaires (limites de 2011) et groupes de régions homologues. Accessible par CANSIM. Consulté le 09-11-2012

- Steadman, J.R., Rodkey, W.G., & Briggs, K.K. (2010). Microfracture. *Cartilage*, 1(2), 78-86. doi: 10.1177/1947603510365533
- Steadman, J.R., Rodkey, W.G., Singleton, S.B., & Briggs, K.K. (1997). Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 7(4), 300-304.
- Stojadinovic, A., Carlson, J.W., Schultz, G.S., Davis, T.A., & Elster, E.A. (2008). Topical advances in wound care. *Gynecologic Oncology*, 111(2), S70-S80. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.07.042
- Street, J., Bao, M., deGuzman, L., Bunting, S., Peale, F.V., Jr., Ferrara, N., . . . Filvaroff, E.H. (2002). Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(15), 9656-9661. doi: 10.1073/pnas.152324099
- Suh, J.K.F., & Matthew, H.W.T. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, 21(24), 2589-2598.
- Teranishi, N., Naito, Z., Ishiwata, T., Tanaka, N., Furukawa, K., Seya, T., . . . Tajiri, T. (2007). Identification of neovasculature using nestin in colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, 30(3), 593-603.
- Tuan, R.S., Boland, G., & Tuli, R. (2003). Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research & Therapy*, 5(1), 32-45. doi: 10.1186/Ar614
- Wang, H.L., Li, X.M., Tomin, E., Doty, S.B., Lane, J.M., Carney, D.H., & Ryaby, J.T. (2005). Thrombin peptide (TP508) promotes fracture repair by up-regulating inflammatory mediators, early growth factors, and increasing angiogenesis. *Journal of Orthopaedic Research*, 23(3), 671-679. doi: 10.1016/j.orthres.2004.10.002
- Wang, L., Fan, H., Zhang, Z.Y., Lou, A.J., Pei, G.X., Jiang, S., . . . Jin, D. (2010). Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized betricalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 31(36), 9452-9461. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.036
- Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, 83(3), 835-870. doi: 10.1152/physrev.00031.2002
- 83/3/835 [pii]
- Widmaier, E.P., Raff, H., & Strang, K.T. (2004). *Physiologie humaine : les mécanismes du fonctionnement de l'organisme : Vander, Sherman, Luciano* (J.-L. Pradel & M. Pradel, Trad., 4^e éd.). Paris: Maloine.
- Wilbourn, B., Harrison, P., Mackie, I.J., Liesner, R., & Machin, S.J. (2003). Activation of platelets in whole blood by recombinant factor VIIa by a thrombin-dependent mechanism. *Br J Haematol*, 122(4), 651-661. doi: 4461 [pii]
- Yang, Z., Wu, Y.N., Li, C., Zhang, T.T., Zou, Y., Hui, J.H.P., . . . Lee, E.H. (2012). Improved Mesenchymal Stem Cells Attachment and In Vitro Cartilage Tissue Formation on

Chitosan-Modified Poly(L-Lactide-co-Epsilon-Caprolactone) Scaffold. *Tissue Engineering Part A*, 18(3-4), 242-251. doi: 10.1089/ten.tea.2011.0315

Yoo, J.U., Barthel, T.S., Nishimura, K., Solchaga, L., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., & Johnstone, B. (1998). The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 80A(12), 1745-1757.

ANNEXES

ANNEXE 1– Descriptive time-point table of embryogenesis events in NZW rabbit

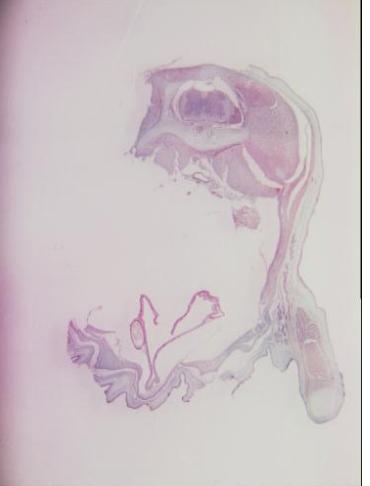
Time (days)	Description	Size (mm)
0-2	Cleavage – 2-Cell Embryo (Noden & de Lahunta, 1985)	-
2.5	Cleavage – 8-Cell Embryo (Noden & de Lahunta, 1985)	-
3	Blastocyst – rupture of the zona pellucida and anchoring on the epithelium of the uterine muscosa (Noden & de Lahunta, 1985; Schöni-Affolter, Dubuis-Grieder, & Strauch, 2008)	-
5	Gastrula (Noden & de Lahunta, 1985)	-
7.75	Gastrula – 1-4 pairs of somites, the neural tube is open throughout the embryonic disk (Hartman, 1974)	-
8.25	Neurulation – Heart forms, neural tube closes to form the hindbrain (Hartman, 1974)	-
8.5	Neurulation – formation of the anterior neuropore (Hartman, 1974)	-
9	Neurulation – closure of the anterior neuropore (Beaudoin et al., 2003; Hartman, 1974)	-
9.5	Appearance of the 1 st and 2 nd pharyngeal arches (mandibular arch and hyoid arch); Closure of the caudal neuropore; one cerebral vesicle and optic vesicles formed (Beaudoin et al., 2003; Hartman, 1974)	3.2 to 4.4
10	Appearance of the 3 rd and 4 th pharyngeal arches (Hartman, 1974)	-
10.5	Dorsal C-shaped curvature; Formation of anterior/caudal limb buds; predominant cardiac swelling (Beaudoin et al., 2003; Hartman, 1974)	-

11.5	- Formation of nasal pits (Hartman, 1974) - 3 cerebral vesicles, optic plate and mesonephric ridge formed (Beaudoin et al., 2003)	4.4 to 6.3
12	Limb buds formation – uniform distribution of mesenchymal cells (Rivas & Shapiro, 2002)	-
12.5	Division of the forelimb buds (hand plate); lens vesicle closes; 5 cerebral vesicles, facial bud and vertebrae formed (Beaudoin et al., 2003; Hartman, 1974)	± 8.5
13.5	Formation of foot plate, finger rays, prominent liver, intestinal loops and auricular hillocks (tubercles on mandibular and hyoid arches) (Beaudoin et al., 2003; Hartman, 1974)	-
14	Distal and proximal ends of femur – mesenchymal condensation Middle of femur – cartilage differentiation (Rivas & Shapiro, 2002)	± 10.2
14.5	Cuboidal body, trunk straightens, parallel limbs, toe rays appear, face is modeled and auricle are visible (ear flap) (Beaudoin et al., 2003; Hartman, 1974)	-
15	Distal and proximal ends of femur – Cartilage differentiation, interzone formation and epiphyseal shaping Middle of femur – chondrocyte hypertrophy (Rivas & Shapiro, 2002)	± 12.5
15.5	Fingers elongation and notches between toe rays (Beaudoin et al., 2003)	-
16	Distal and proximal ends of femur – epiphyseal shaping Middle of femur – formation of the primary center of ossification (Rivas & Shapiro, 2002)	± 14.8
16.5	Appearance of membranous eyelids; Separation of hindlimbs and forelimbs digits (Beaudoin et al., 2003; Hartman, 1974)	± 18.0
17.5	- Complete separation of forelimb digits (Hartman, 1974) - Formation of knee, neck and eyelids (Beaudoin et al., 2003)	± 21.3
18	Distal and proximal ends of femur – resorption of joint interzone and formation of smooth articular surface Middle of femur – vascular invasion of hypertrophic chondrocyte area, endochondral bone formation and completion of ossification (Rivas & Shapiro,	25.0

	2002)	
19	Palpebral fissure closes	

Time (days)	Description	Size (mm)	Weight (g)
19.5	Completed fetal appearance and organogenesis achieved	29	< 5
21	Distal and proximal ends of femur – formation of the physis and of peripheral perichondrial groove tissue (Rivas & Shapiro, 2002)		< 7
24-27	Distal and proximal ends of femur – vascularization of epiphyseal cartilage with formation of cartilage canals (Rivas & Shapiro, 2002)		15 < m < 32
32	Birth		~40

ANNEXE 2 – Photodocumentation des fœtus de lapin NZW à la nécropsie et à la cryogénérisation pour l'étude de détection des MSC.

	Fœtus #1	Fœtus #2	Fœtus #3
Morphologie	Après 22 jours de gestation : <i>Masse=7.985g Taille ≈ 5.50cm</i>	Après 22 jours de gestation : <i>Masse=8.710g Taille ≈ 5.00cm</i>	Après 22 jours de gestation : <i>Masse=8.421g Taille ≈ 5.00cm</i>
Échantillon avant la cryogénérisation			
Coupe histologique colorée par IHC pour l'αSMA			

ANNEXE 3 – Acceptation du renouvellement du protocole d'expérimentation animale

N° de la demande : 0 - 130

DEMANDE ABRÉGÉE DE RENOUVELLEMENT D'UN PROJET

11 SEP. 2010

Ce formulaire peut être utilisé lors du renouvellement d'un projet dont l'autorisation est toujours valide, si aucune modification majeure n'est prévue. En cas de modification substantielle, comme un changement d'espèce, l'ajout de nouvelles manipulations, chirurgies ou d'une modification pouvant avoir un impact important sur le bien-être animal, un nouveau formulaire CDEAF1-Demande d'autorisation d'utiliser des animaux devra être rempli. **De plus, seulement deux renouvellements avec le formulaire abrégé sont possibles.** Par la suite, une demande complète doit être soumise avec le formulaire CDEAF1-Demande d'autorisation d'utiliser des animaux. Remplir toutes les sections, y joindre les annexes, imprimer, signer et retourner au CDEA, local R-313, Pavillon Roger-Gaudry.

Nom du chercheur : Caroline Hoemann

Département/Faculté : Département de génie chimique, École Polytechnique

Titre du projet : R2 Étude de la réparation articulaire *in vivo* par encapsulation cellulaire dans une matrice autogélique *in situ*

Numéro de la demande précédente : 09-118

Date d'autorisation : 2009-09-04

1. RENOUVELLEMENT DEMANDÉ **Protocole expérimental inchangé**

Le projet soumis précédemment, cité ci-dessus, se poursuivra sans aucune modification et n'a pas fait l'objet de plus d'une demande de renouvellement abrégée.

 Modifications mineures apportées

Le projet se poursuivra tel que décrit dans la demande précédente citée ci-dessus, avec seules les modifications mineures décrites ci-après ou dans l'ANNEXE à joindre. (ex.: nouveaux groupes, manipulations, chirurgies, effets).

2. FINANCEMENT

ORGANISME SUBVENTIONNAIRE*	ACCORDEE	EN ATTENTE**	COMITÉ DE PAIRS***
1. CRSNG	<input checked="" type="checkbox"/> N° compte : 365025	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
2. IRSC	<input checked="" type="checkbox"/> N° compte : 185810	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
3.	<input type="checkbox"/> N° compte :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non

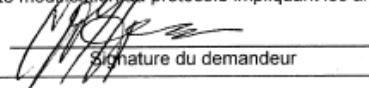
* Si les TITRES des demandes de fonds sont différents du titre de ce protocole, indiquez ces titres dans l'ANNEXE.

** Si les fonds ne sont PAS accordés, vous devez en informer le CDEA et suivre la procédure d'évaluation du MERITE SCIENTIFIQUE établie par le CDEA.

*** Si l'organisme n'a pas de Comité de pairs qui revoit le MERITE SCIENTIFIQUE du projet, suivez la procédure établie à cet effet par le CDEA.

3. DÉCLARATION DU DEMANDEUR

Les informations fournies dans ce formulaire sont exactes et complètes. Je m'engage à utiliser les animaux cités ci-après selon les politiques et les normes de l'Université de Montréal et en conformité avec les principes et recommandations du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) et ce, après autorisation par le Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (CDEA). J'aviserai le CDEA avant d'apporter toute modification au protocole impliquant les animaux.



10 Septembre 2010

Date

4. AUTORISATION DU CDEA (Réserve à l'usage du Comité)

LE CDEA DE L'UNIVERSITE DE MONTREAL AUTORISE CETTE DEMANDE D'UTILISATION D'ANIMAUX

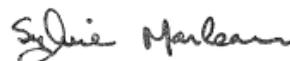
 Questions ci-jointesCATEGORY : A B C D EAIGUÈ/CHRONIQUE : A A/C C

BUT DE L'UTILISATION DES ANIMAUX : 4

ANIMAUX AUTORISES

10 souris et 24 lapins

Dates d'examen :



Signature du président

30 SEP. 2010
Date d'autorisation
(valide pour un an)