

PRE-ORIENTATION CHONDROGENIQUE DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES HUMAINES : VALIDATION PAR ANALYSE QUANTITATIVE ET TRAITEMENTS D'IMAGERIE DE PHASE EN LUMIERE TRANSMISE

*Hupont S.^{1,2}, *Henrionnet C.³, Dumas D.^{2,3}, Mainard D.^{1,3}, Gillet P.³, Pinzano A.³

*Contribution égale en tant que premier auteur

¹ *Bio-ingénierie Moléculaire Cellulaire et Thérapeutique FR3209 CNRS, Biopôle, Campus Biologie Santé, 9 av. de la Forêt de Haye 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy.*

² *PlaTeforme d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire PTIBC-IBISA, Campus Biologie-Santé, Biopôle 9 av. de la Forêt de Haye 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy.*

³ *Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaires, IMoPA UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Biopôle, 9 av. de la Forêt de Haye, CS 50184, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy France.*

Adresse pour la correspondance : sebastien.hupont@univ-lorraine.fr
christel.henrionnet@univ-lorraine.fr

RÉSUMÉ

Le cartilage articulaire est un tissu très spécialisé et différencié. De ce fait, ses capacités de réparation sont limitées. L'ingénierie tissulaire du cartilage est un domaine en plein développement dont le

but est de réparer ou de remplacer le cartilage lésé en associant des cellules à des biomatériaux.

Cela suppose notamment de choisir le biomatériau idéal, de maîtriser le cycle de

vie des cellules choisies (prolifération et différenciation chondrogénique), d'y adjoindre les molécules capables de favoriser leur croissance et d'intégrer les contraintes mécaniques auxquelles doit se plier le nouveau tissu, de façon à obtenir des biomatériaux fonctionnalisés qui vont posséder des propriétés similaires au tissu natif et donc qui pourront être réimplantés en site lésionnel.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) se sont révélées être d'excellents candidates pour l'ingénierie articulaire. Comme toutes les cellules souches, les CSMs ont des propriétés d'auto-renouvellement, et de différenciation en plusieurs types cellulaires, notamment en chondrocytes.

Ce travail est le fruit d'une étude de faisabilité dans le cadre d'un prêt de matériel et repose sur une étude morphométrique de différenciation cellulaire par analyse quantitative et traitements d'images à contraste de phase. Cette technologie innovante et non-invasive permet d'observer des échantillons biologiques en conditions stériles, rapides et sans agent de contraste. Elle fournit des informations quantitatives sur le changement de phase de la lumière transmise selon la différence des trajets optiques induits par les constituants de la cellule et de la matrice extracellulaire (MEC).

L'analyse finale est basée sur l'étude morphologique des CSMs en monocouche sur plusieurs passages successifs et plusieurs jours en fonction du milieu de culture (additif proline acide ascorbique

dexaméthasone) en imagerie de phase de façon à établir une similarité entre les aspects morphologiques des cellules et leur potentiel de différenciation en système 3D.

Mots clés : Cellules souches mésenchymateuses (CSMs), différenciation, chondrocyte, imagerie de phase quantitative, microscopie, analyse d'images, morphologie

ABSTRACT

Articular cartilage is a highly specialized and differentiated tissue. Therefore, its capacities of repair are limited. The tissue engineering of the cartilage is an approach in full development, the purpose of which is to repair or to replace the damaged cartilage by associating cells with biomaterials. It requires in particular to choose the ideal biomaterial, to master the life cycle of chosen cells (proliferation and chondrogenic differentiation), to add growth factors and to integrate the mechanical constraints with which the new tissue has to comply, so as to obtain functionalized biomaterials which will exert similar properties in the native tissue and thus which can be re-implanted in the lesional site. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) seem to be promising. As with all stem cells, bone MSC have properties of auto-renewal and differentiation into several different cellular types, in particular chondrocytes.

This work is the result of a feasibility study as a part of an equipment loan. It is based on a morphological study of cellular differentiation by analysis and treatment of a series of images acquired by interfero-

metry in a multilateral gap. This innovative and non-invasive technology allows the observation of biological samples in sterile, fast conditions and without contrast agents. It integrates the transmitted light passing through the cellular matrix and measures the difference of the refractive index of the various constituents of the cell and the extracellular matrix (ECM). This index is represented as a gap of phase with regard to the transmitted light.

The final analysis is based on the morphological observation of MSCs in a monolayer in imaging of phase due to medium (added dexamethasone, proline and ascorbic acid) so as to establish a direct correlation between the morphological aspects of cells and their differentiation potentialities in 3D systems.

Key Words : Mesenchymal Stem Cell, differentiation, chondrocyte, quantitative phase imaging, image processing, morphometry, phase imaging microscopy

INTRODUCTION

Le cartilage articulaire est un tissu très spécialisé et différencié. De ce fait, ses capacités de réparation sont limitées. L'ingénierie tissulaire du cartilage est un domaine en plein développement dont le but est de réparer ou de remplacer le cartilage lésé en associant des cellules, choisies en fonction de leurs capacités de différenciation, à des biomatériaux.

Cela suppose notamment de choisir le biomatériau idéal, de maîtriser le cycle de vie des cellules (prolifération, différen-

ciation et fonctionnalisation de chondrocytes), d'y adjoindre les molécules et les conditions capables de favoriser leur croissance et leur différenciation. Il est également important d'intégrer les contraintes mécaniques auxquelles doit se plier le nouveau tissu, de façon à obtenir des biomatériaux fonctionnalisés qui vont posséder des propriétés similaires au tissu natif et donc qui pourront être réimplantés en site lésionnel.

Les chondrocytes, cellules du cartilage, peuvent sembler *a priori* les plus adaptés pour coloniser le biomatériau utilisé. Mais ces cellules présentent plusieurs inconvénients. D'une part, leur obtention par prélèvement dans le cartilage nasal, auriculaire ou articulaire est un acte invasif, ne produisant qu'une quantité réduite de chondrocytes. D'autre part, la culture des chondrocytes *in vitro* induit une perte de leur spécificité cellulaire et tend à produire un fibroblaste peu différencié.

Aussi de nouvelles sources de cellules se sont révélées être d'excellentes candidates : les cellules souches mésenchymateuses (CSMs). Comme toutes les cellules souches, les CSMs ont des propriétés d'auto-renouvellement, de différenciation et la capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires différents, et notamment en chondrocytes.

Les conditions de cultures en monocouche restent une étape primordiale pour favoriser une différenciation de bonne qualité. En effet, un milieu de base (DMEM), Sérum de veau Foetal ± Facteurs de crois-

sance (FGF-1 ou 2), augmente la prolifération et le potentiel de différenciation ostéogénique et chondrogénique. De même, la densité d'ensemencement, le nombre de passage ainsi que le temps de doublement de la population sont des limites de la culture cellulaire dans le temps et sont donc responsables de la variabilité du potentiel de différenciation des cellules (1).

Nous proposons dans ce travail d'étudier la différenciation cellulaire par analyse de séries d'images acquises par interférométrie à décalage multilatéral (2). Cette technologie, que l'on peut également appeler «imagerie à contraste de phase» offre la possibilité d'obtenir une information quantitative (cf figure 1) à l'instar de

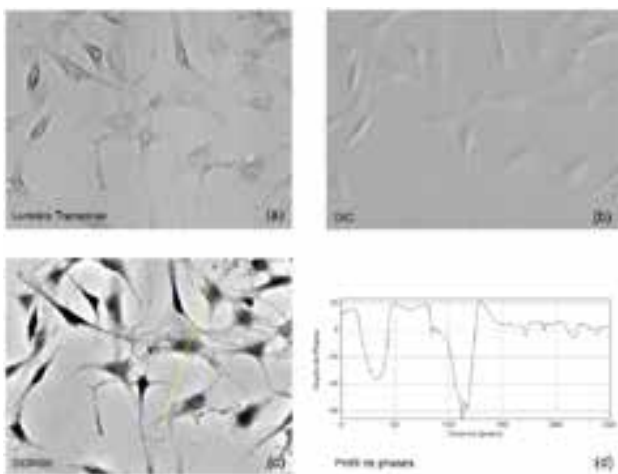


Figure 1 : Comparatifs d'observation de CSM en Lumière Transmise (a) simple, DIC (b), imagerie de phase quantitative (c) et profil d'épaisseurs optiques lié aux angles de déphasage mesuré (d).

la microscopie Nomarski/contraste de différentes interférences (DIC). Elle fournit des informations liées aux changements de phase de la lumière transmise selon la différence des trajets optiques induits par les constituants de la cellule et de la matrice

extracellulaire (MEC). En conséquence, elle révèle les caractéristiques morphométriques de l'échantillon biologique concerné, et permet d'extraire d'importants paramètres biophysiques tels que la masse sèche (3), le volume optique, l'indice de réfraction moyen intracellulaire...

Dans notre étude, les critères morphométrique (élongation, circularité, opacité...) seront utilisés comme facteurs discriminants. En effet, cette technologie non-invasive permet d'observer des échantillons biologiques en condition stérile, rapide et sans agent de contraste exogène, en mesurant la différence de l'indice de réfraction des différents constituants et ainsi les représenter en nuances de gris. Nous pouvons ainsi mesurer l'épaisseur optique réelle de chaque constituant. L'unité de mesure s'exprime en degré, qui correspond à l'écart de phase induit entre la MEC et un fond référant. L'analyse finale est basée sur l'observation morphologique des cellules en monocouche en imagerie à contraste de phase de façon à établir une similarité entre les aspects morphologiques des cellules et leur potentiel de différenciation en système 3D. Cette approche nous a ainsi permis de comparer l'effet de différents additifs dans le milieu de culture de façon à pré-orienter les CSMs vers une différenciation chondrocytaire avant l'ensemencement en biomatériaux, en sachant que les cellules mésenchymateuses non différenciées sont de petite taille et allongées. Leur noyau ovoïde est central et leur cytoplasme peu abondant (4).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Isolation et expansion des cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse humaine

Les CSMs sont obtenues à partir de moelle osseuse prélevée lors de remplacement total de hanche en collaboration avec le Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (Pr D. Mainard et Pr. L. Galois) et l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus de Centre Hospitalo-Universitaire de Nancy (UTCT, CHU Nancy). Les échantillons sont placés dans des tubes de 50 mL contenant 1 mL de tampon phosphate salin (PBS) supplémenté avec 625 UI/mL d'héparine. Les cellules nucléées sont comptées etensemencées à une densité de 50000 cellules/cm² dans une flasque de culture T75 à 37 °C en atmosphère humidifiée contenant 5 % (v/v) de dioxyde de carbone. Le milieu est changé deux fois par semaine jusqu'à ce que les cellules arrivent à confluence. Le milieu utilisé pour le passage 0 au passage 2 est une base de milieu Dulbecco Eagle modifié avec un faible taux de glucose (DMEM-LG 1g/mL, 31885, Gibco) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (FBS, Sigma), 1 ng/mL de bFGF/(RD), de la glutamine et de la pénicilline-streptomycine (Gibco). Lorsque les cellules adhérentes ont atteint environ 80 % de confluence, les cellules souches mésenchymateuses sont trypsinisées et réensemencées à une densité de 0,5 x 10⁷ cellules/flasque. Au cours du dernier passage, avant l'ensemencement dans des biomatériaux (passage 3), les cellules sont cultivées avec du milieu de différenciation composé de DMEM 4,5 g/mL de glucose, additionné de pyruvate de

sodium (110 µg/mL), de bFGF (1 ng/mL), de pénicilline-streptomycine, de proline (P), d'acide L-ascorbique-2-phosphate (A) et de dexaméthasone (D).

Imagerie à Contraste de Phase

Pour ces travaux nous avons utilisé un système d'acquisition composé d'un microscope optique inversé Olympus IX70 muni d'un objectif 20x (0.4 NA) autorisant une imagerie en lumière transmise et muni d'un port caméra de type montage C sur lequel nous avons installé une caméra SID4bio de la société Phasics S.A. Cette caméra dispose d'une matrice de 1600 x 1200 pixels de 7,4 mm². Elle couvre une gamme de longueur d'onde du proche UV à l'infrarouge (350 à 1100 nm) et est utilisée comme un capteur de front d'onde basé sur l'interférométrie à décalage multilatéral (5) dont l'image résultante sera de 396 x 296 pixels. Cette technique mesure la différence de chemin optique introduite par le matériel biologique en référence à une image acquise au préalable, appelée interférogramme de référence. Cette référence est en quelques sortes la fonction de transfert optique du système. Par déconvolution de l'image de l'objet avec cette référence, le logiciel d'acquisition SID4 recalcule une image d'intensité en lumière transmise, une imagerie DIC dont on peut faire varier l'angle d'interférence, et une image à contraste de phase qui est en quelques sortes un projeté de tous les angles d'interférence/déphasage mesurés en fonction de l'indice de réfraction (ou épaisseur optique) des matériels biologiques traversés. La dynamique de l'image est de 32 bits en raison des valeurs décimales positives, négatives

tives ou nulles des déphasages mesurés (cf figure 1c et 1d représentant en nuances de gris le profil de déphasages successifs induits par une cellule en lumière transmise).

ANALYSE D'IMAGE QUANTITATIVE

Nous avons fait le choix de ne pas utiliser les informations d'épaisseur optique ou de calcul de matière sèche, les indices de réfraction de chacun des constituants de la cellule et de la matrice extracellulaire n'étant à ce jour pas connus. Nous avons utilisé les informations quantitatives des nuances de gris ainsi que les paramètres morphométriques pour montrer l'orientation de cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes.

Nous avons choisi Image J (6), un logiciel libre de droits, comme outil pour l'analyse et le traitement des images. Cependant, tous les logiciels permettant un travail sur l'image possèdent les algorithmes utilisés et décrits dans ce travail.

Dans un premier temps, nous avons appliqué à chaque image une série d'algorithmes qui ont eu pour effet d'améliorer le contraste, la netteté et d'optimiser la répartition des niveaux de gris pour que chaque image puisse être comparée l'une à l'autre (cf figure 2).

Une valeur de déphasage (cf figure 1d) nulle indique que le fond de l'image est similaire à l'interférogramme de référence. Une pente de déphasage négatif est liée à la présence d'un indice de réfraction supplémentaire donc que l'épaisseur optique augmente tandis qu'une pente positive indique une diminution de cet indice. A l'interface,

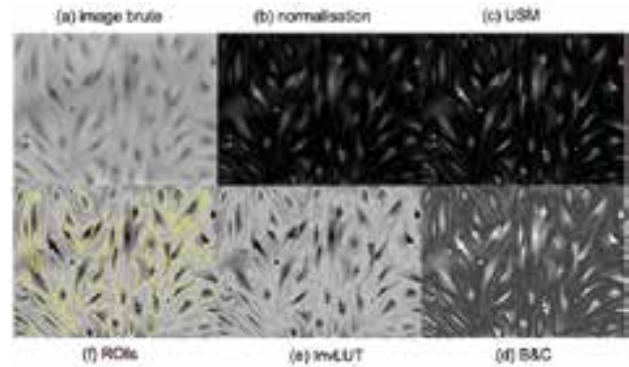


Figure 2 : Clichés représentant les différentes étapes de traitement de l'image pour rehausser le contraste et améliorer la détection de contour en vue d'obtenir une région d'intérêt la plus fidèle possible à l'occupation de la cellule et de sa matrice extracellulaire. (a) image brute ; (b) après normalisation des valeurs quantitatives de déphasage ; (c) déflouage de l'image ; (d) rehausse de contraste ; (e) inversion de lut pour une meilleure appréciation de la dynamique ; (f) régions d'intérêts avec un rendu plus fidèle aux contours des cellules

on peut observer un artéfact (changement de pente) directement lié à la diffusion de la lumière non cohérente en transmission et qui crée un halo. Cela a pour incidence de fausser la délimitation de la cellule et donc de sa taille. Comme nous pouvons l'observer sur la figure 2, différentes étapes successives ont été nécessaires pour discriminer le contour des cellules de façon exhaustive. Nous avons appliqué un changement d'origine de l'amplitude de ces niveaux de gris (figure 2b) pour s'affranchir de ce phénomène de diffusion pour chaque pixel de l'image selon la formule suivante :

$$V_{\text{final } x,y} = \text{Abs}(V_{\text{initial } x,y} - V_{\text{max}})$$

Avec $V_{x,y}$ la valeur d'un pixel, $\text{Abs}()$ le calcul de la valeur absolue et V_{max} la valeur maximum atteinte pour un pixel sur l'image et correspondant à cette brillance artéfactuelle.

Une seconde étape a consisté à appliquer un filtre de type passe-haut qui a pour conséquence d'accentuer le contraste et améliorer les bords en soustrayant une version floue de l'image à son originale. Il s'agit d'un algorithme mathématique appelé «Unsharp Mask ou USM» qui s'utilise en calcul matriciel en définissant le rayon de flou gaussien (augmente le contraste de façon proportionnel) et le poids du masque ou force du filtrage dont l'augmentation rehausse les bords. Nous avons utilisé les paramètres (figure 2c) : Radius 2.0 Mask Weight 0.70.

Grâce à ce traitement de l'image, le détournage cellulaire est rendu aussi plus simple tandis que les zones semi-transparentes contenues dans la matrice extracellulaire rendent le seuillage impossible. Les contours exacts des cellules (figure 2f) définissent des régions d'intérêt dont nous pouvons extraire des critères morpho-géométriques comme l'aire, la circularité (*rondeur de la cellule*), la mesure de l'élongation cellulaire (*aussi appelé A.R. pour aspect ratio qui est le rapport entre l'axe majeur elliptique et l'axe mineur elliptique*). Pour une région d'intérêt (ROI) donnée, nous calculons la somme de tous les niveaux de gris de la façon suivante :

$$\int V_{ROI} = \int \text{Abs}(V_{\text{initial}_{x,y}} - V_{\text{max}}) - (V_{\text{min}} * \text{Aire}_{ROI})$$

Avec $V_{x,y}$ la valeur d'un pixel, Abs() le calcul de la valeur absolue, V_{max} la valeur maximum atteinte pour un pixel sur l'image et correspondant à cette brillance artéfactuelle, V_{min} la valeur seuil rehaussée due à la normalisation et Aire_{ROI} l'aire de

la région d'intérêt (ROI) donnée (une cellule détournée). Cette valeur vraie obtenue, nous utilisons d'autres critères morphométriques basés sur l'analyse des niveaux de gris vrais tels que le niveau de gris moyen, l'écart-type des niveaux de gris, la variance.

RÉSULTATS

Après avoir appliqué différents filtres successifs pour améliorer le contraste puis la netteté de l'image, l'analyse s'est déroulée selon plusieurs méthodes en vue d'automatiser le résultat du traitement. La figure 3 est une illustration des étapes successives

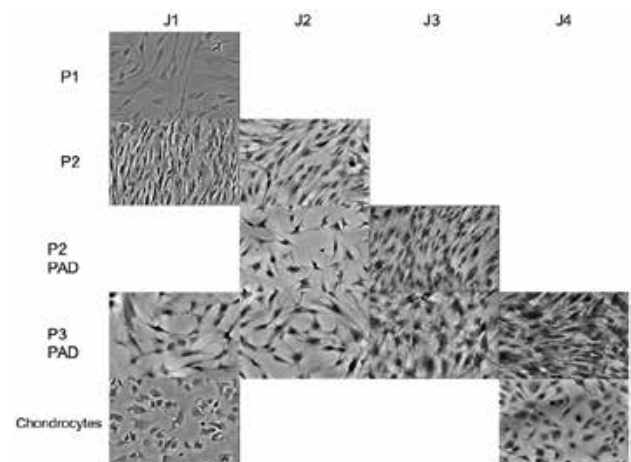


Figure 3 : Images représentatives des différents passages successifs (P1, P2, P3), et de l'influence du PAD (proline, acide ascorbique et dexaméthasone) en « imagerie de phase quantitative » en comparaison avec des chondrocytes en passage 0, pour montrer un changement morphologique des CSMs (pré-différenciation chondrocytaire) en fonction du temps de culture (J1, J2, J3, J4)

de culture cellulaire nécessaires selon les jours (J1 ; J2 ; J3 ; J4 en abscisses) et selon les passages (P1 ; P2 ; P3PAD en ordonnées) pour orienter les CSMs vers la différenciation chondrogénique. Près de 24 paramètres résultants de combinai-

sons de critères morphométriques ont été évalués sur plus de 100 images représentatives de cellules souches mésenchymateuses issues de quatre patients différents. Quatre de ces paramètres se sont révélés discriminants dans l'analyse de ces images pour chaque étape correspondant à chaque image de la figure 3. La synthèse graphique de ces résultats sont reproduits sur la figure 4 en deux parties : (4a) les critères

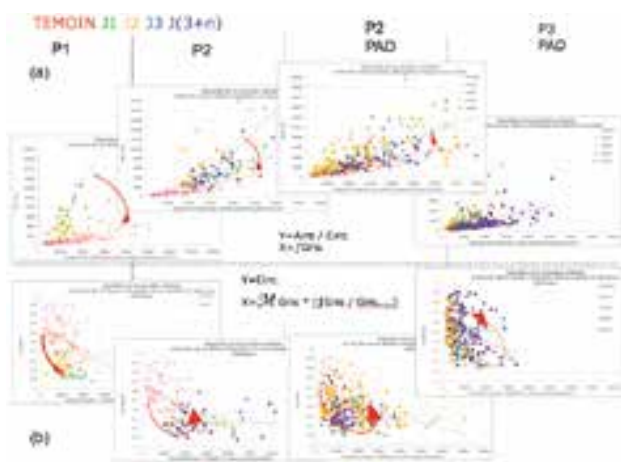


Figure 4 : Orientation des cellules souches mésenchymateuses (1point = 1 cellule) selon les jours successifs de cultures cellulaires (gradient de couleur vert J1 ; jaune J2 ; Bleu J3 et violet J4 et plus) et selon les passages successifs (P1 ; P2 ; P2PAD ; P3PAD) vers la différenciation chondrocytaire (référence en rouge) – (a) critères morphométriques mettant en relation des variables caractérisant la forme, le rapport aire-circularité de chaque cellule, en fonction de variables représentant l'intensité globale (b) critères morphométriques mettant en relation des variables caractérisant la forme, la circularité, en fonction de variables représentant la variance relative de l'intensité de chaque cellule.

morphométriques mettant en relation des variables caractérisant la forme, le rapport aire-circularité de chaque cellule, en fonction de variables représentant leur intensité globale ; (4b) les critères morphométriques mettant en relation des variables caracté-

sant la forme, la circularité, en fonction de variables représentant la variance relative de l'intensité de chaque cellule. Chaque point représente une cellule ; chaque couleur représente un jour de culture cellulaire (vert J1 ; jaune J2 ; Bleu J3 et violet J4 et plus). Les points rouges sont identiques quelque soit le graphique respectivement pour les figures 4a et 4b, puisqu'ils représentent les chondrocytes comme cellules "de référence". Pour chaque nuage de points, nous avons calculé une courbe de tendance linéaire pour mieux apprécier la répartition de population selon les critères retenus. Chaque graphique correspond aux passages successifs (P1 ; P2 ; P2PAD ; P3PAD) de la gauche vers la droite pour montrer la progression du processus. Ainsi on peut constater que chaque population tend un peu plus chaque jour et selon les passages successifs vers une morphologie chondrocytaire (flèches rouges). Ce phénomène est accentué par l'adjonction de PAD après quoi on ne peut pratiquement plus distinguer les populations selon ces mêmes critères morphométriques. Nous avons donc réussi à montrer quantitativement et qualitativement une orientation cellulaire des CSMs vers la différenciation chondrocytaire corroborée par deux méthodes de discrimination utilisant des combinaisons de paramètres différents. La figure 5 est un montage d'images illustrant ces résultats, selon les jours successifs de culture cellulaire (*en abscisse* : J1 ; J2 ; J3 ; J4 et plus) et selon les passages successifs (*en ordonnées* : P1 ; P2 ; P3PAD).

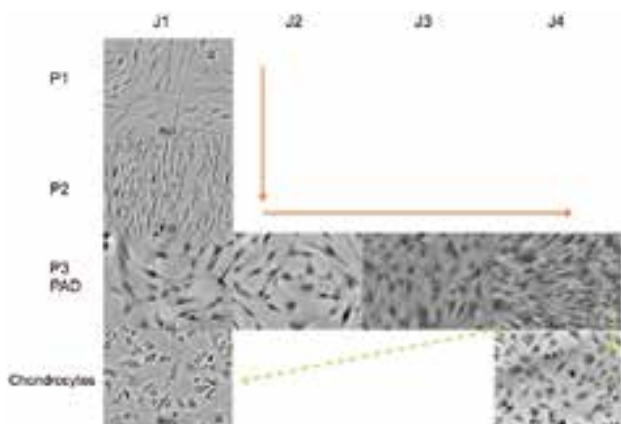


Figure 5 : Effet du PAD lors du passage P3 en fonction du nombre de jours de culture des CSMs (J1, J2, J3 et J4), en comparaison avec des chondrocytes en passage 0 : Images représentatives des différents passages successifs (P1, P2 et P3), et de l'influence du PAD (proline, acide ascorbique et dexaméthasone) en «imagerie de phase quantitative» pour montrer un changement morphologique des CSMs (pré-différenciation chondrocytaire).

DISCUSSION

Plusieurs techniques chirurgicales, notamment des greffes de chondrocytes, sont capables de restaurer le cartilage. Elles se heurtent toutefois à de nombreuses limites : difficulté de mise en œuvre, réparation parfois médiocre du tissu lésé, variabilité de la réponse des patients. Ainsi, de nouvelles techniques d'ingénierie sont en développement. Le principe de l'ingénierie tissulaire du cartilage consiste à utiliser un biomatériau en tant que matrice, à l'ensemencer avec des cellules appropriées et à y ajouter des molécules biologiquement actives (*facteurs de croissance*) permettant aux cellules de se différencier et se multiplier vers le tissu à régénérer.

Un certain nombre de paramètres reste incontournable, comme le choix des cellules ainsi que le choix des biomatériaux. A l'heure actuelle, l'utilisation des CSMs

présente une bonne alternative à l'utilisation des chondrocytes de par leur obtention facile ainsi que leur grand potentiel de différenciation (7).

Il est cependant très important d'évaluer le potentiel de différenciation des CSMs de chaque patient de façon à standardiser et à optimiser la chondrogenèse en biomatériaux et l'implantation par la suite d'un implant de bonne qualité en site articulaire lésionnel. Banfi et col. ont d'ailleurs mis en évidence des variabilités importantes du potentiel de différenciation des CSMs en fonction de la densité d'ensemencement (1), du nombre de passage ainsi que du temps de doublement de la population. La différenciation chondrogénique des CSMs est également dépendante de l'âge du patient, ainsi que de la quantité de cellules prélevées (8).

Des études antérieures réalisées au laboratoire ont également démontré qu'une pré-orientation chondrogénique avec un cocktail de facteurs (dexaméthasone, proline, acide ascorbique) lors du troisième et dernier passage en monocouche était essentiel à une différenciation des CSMs de bonne qualité par la suite (9, 10). Ces résultats sont en accord avec ceux de Jürgen (11) qui utilisent également l'acide ascorbique et la dexaméthasone tout au long de la culture en monocouche pour obtenir une différenciation chondrocytaire.

Ce travail a donc pour but de développer une technique basée sur l'étude morphologique de différenciation cellulaire par analyse d'images à contraste de phase.

Nous avons donc pu suivre quotidiennement, tout au long de la culture en monocouche, l'aspect morphologique des cellules récupérées en fonction des passages. Nous avons ainsi pu suivre les changements morphologiques résultant de l'ajout du PAD lors du passage 3, en comparaison avec des chondrocytes. Les chondrocytes nous ont servi de témoin de morphologie d'une cellule très différenciée (*de forme hexagonale*), en comparaison avec des cellules dites indifférenciées comme les CSMs (*de forme fibroblastique très allongée*).

Nous avons pu obtenir, grâce à cette technologie innovante, non-invasive et stérile des informations quantitatives sur le changement de phase de la lumière transmise selon la différence des trajets optiques induits par les constituants de la cellule et de la matrice extracellulaire (MEC).

Nous avons donc pu quantifier les différences morphologiques entre les CSMs en passage 1 et 2 et les CSMs en passage 3 avec l'ajout du PAD. Clairement, les cellules passent d'un aspect très allongé et orienté à un aspect plus hexagonal, se rapprochant de la morphologie du chondrocyte (*cellule de référence*), avec l'ajout du PAD. Nous avons déjà remarqué dans de précédentes études que ce changement morphologique était essentiel à une différenciation chondrocytaire de bonne qualité en système 3D.

Ce changement morphologique, quantifiable par cette technique, permet donc d'évaluer le potentiel de différenciation

des CSMs avant la mise en biomatériaux et offre donc un outil de contrôle qualité pour l'utilisation des cellules récupérées. Ce paramètre est extrêmement important en ingénierie tissulaire du cartilage puisqu'il permettrait de gagner un temps considérable pour l'implantation d'un biomatériau fonctionnalisé de bonne qualité au sein d'une lésion. Il serait bien évidemment souhaitable d'établir un seuil acceptable de réponse au PAD et donc d'établir un seuil de prédifférenciation chondrocytaire de façon à adapter les conditions de culture, comme par exemple un temps de culture plus long, pour les cellules les moins répondantes au PAD.

Cet outil, basé sur de l'observation simple, rapide, non invasive, offre également de nombreuses possibilités pour d'autres types cellulaires, dans d'autres applications et pour une plus grande robustesse, mériterait d'être couplé à une approche statistique pour réaliser une analyse en composante principale, compte-tenu du nombre de paramètres morphométriques.

BIBLIOGRAPHIE

1. BANFI A, MURAGLIA A, DOZIN B, MASTROGIACOMO M, CANCEDDA R, QUARTO R. : Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol*, 2000 Jun, 28 (6), 707-15.
2. BON P, MAUCOURT G, WATTELIER B, MONNERET S: Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells, *Optics Express*, 2009, 17 (15), 13080-13094.
3. BARER R: Interference microscopy and mass determination, *Nature*, 1952, 169, 366 – 367.
4. PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, 1999 Apr 2, 284 (5411), 143-7.
5. BON P, SAVATIER J, MERLIN M, WATTELIER B and MONNERET S: Optical detection and measurement of living cell morphometric features with single-shot quantitative phase microscopy, *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17 (7), 076004.
6. RASBAND, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2015.
7. PELTTARI K1, STECK E, RICHTER W: The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis, *Injury*, 2008 Apr, 39 (1), 58-65.
8. LI Y, CHARIF N, MAINARD D, BENSOUSSAN D, STOLTZ JF, DE ISLAN N: Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity, *Biomed Mater Eng.*, 2014, 24(1 Suppl), 47-52.
9. HENRIONNET C, ROEDER E, GILLET R, GALOIS L, BENSOUSSAN D, MAINARD D, NETTER P, GILLET P, PINZANO A: Expression of chondrogenic genes by undifferentiated vs. differentiated human mesenchymal stem cells using array technology, *Biomed Mater Eng.*, 2010, 20 (3), 175-81.
10. HENRIONNET C, WANG Y, ROEDER E, GAMBIER N, GALOIS L, MAINARD D, BENSOUSSAN D, GILLET P, PINZANO A: Effect of dynamic loading on MSCs chondrogenic differentiation in 3-D alginate culture, *Biomed Mater Eng.*, 2012, 22 (4), 209-18.
11. JÜRGEN M: Quality control for mesenchymal stromal cells: chondrogenesis as a standard condition ?, *Rheumatology: Current Research*, 2012