

---

## CARTIPATCH®. Une nouvelle perspective pour les greffes de cartilage. Résultats de l'étude clinique de phase II

---

Ph. NEYRET, T.AIT SI SELMI, L. BARNOUIN

---

### Résumé

L'utilisation d'un support solide semble devoir s'imposer face aux suspensions liquides quant à l'implantation de chondrocytes. Cette nouvelle option facilite la technique chirurgicale et autorise une répartition cellulaire plus homogène ainsi qu'une meilleure différenciation cellulaire. L'origine végétale de cette matrice lui confère les qualités attendues en termes de sécurité infectieuse. Après une étude expérimentale concluante chez le mouton un essai clinique de phase 2 a été autorisé et réalisé. Matériel et méthode : Une lésion ostéochondrale fémorale isolée de grade III ou IV (classification ICRS) chez 20 patients présentant un score subjectif très altéré (IKDC < 55) et âgé de 18 à 40 a constitué le critère de sélection essentiel. Un prélèvement cartilagineux (200 à 300mg) était prélevé sur le genou pathologique au cours d'une arthroscopie. Une culture monocouche des chondrocytes était réalisée dans un sérum autologue. Trois à quatre semaines plus tard, les cellules étaient introduites et cultivées dans un gel d'agarose et d'alginate jusqu'à l'obtention de 10 à 20 millions de cellules par ml. Une isolation supplémentaire de 15 jours permettait la différenciation cellulaire avant la greffe. Un ou plusieurs de ces implants (de 10, 14 ou 18mm de diamètre) ainsi préparés étaient placés dans la zone lésionnelle soigneusement calibrée. Une évaluation clinique utilisant le score IKDC subjectif était réalisée au 3ème, 6ème, 12ème, 24ème mois. L'hypothèse formulée était que 75% des patients au moins étaient améliorés sur le plan subjectif (de plus de 10 points IKDC) au recul de 24 mois. Une biopsie de 2mm de diamètre était réalisée à ce même recul. Une étude histologique utilisant une coloration à l'hématoxyline - éosine, au bleu de méthylène et à la Safranine-O était obtenue d'un laboratoire indépendant, de même qu'une étude immuno-histo-chimique détectant le collagène de type II et les agrégannes. L'évaluation a été faite selon les critères de l'ICRS. Résultats : Ceux-ci seront exposés de façon exhaustive, analytique et synthétique. Notre hypothèse clinique a été vérifiée et validée. Conclusion : Les résultats cliniques confirment l'intérêt de la greffe de chondrocytes utilisant pour support une matrice alginate - agarose Cette technique a montré son efficacité. Elle paraît particulièrement adaptée pour le traitement des lésions ostéochondrales de grand diamètre ( $4 > 2\text{cm}^2$ ).

### Mots clés

cellules cartilagineuses, chondrocytes, greffes

---

### Introduction

L'intérêt des greffes de chondrocytes autologues repose sur la reconstitution d'un cartilage hyalin, la bonne intégration du tissu néoformé avec le cartilage sain environnant et la faible quantité de cartilage autologue prélevé. La technique originale de Brittberg [5], aux résultats inté-

### Abstract

The use of a solid support seems to be prevailing over liquid suspensions to implant chondrocytes. This new option facilitates surgical technique, allows more homogeneous spreading and improves cell differentiation. After positive experimentation on sheep, a phase 2 clinical test was authorised and set up. The core selection criteria were isolated femoral osteochondral lesions, grade III or IV (ICRS classification), on 20 patients aged 18 to 40 presenting highly altered subjective scores (IKDC < 55). 200 to 300mg of cartilage was arthroscopically removed from the morbid knee. Chondrocyte cells were developed in autologous serum. After 3 or 4 weeks, the cells were introduced and reproduced in agarose and alginate gel until 10 to 20 million cells per ml were obtained. 15 days additional isolation allowed cell differentiation prior to implantation. One or multiple implants (from 10, 14 to 18mm diameter) thus prepared were implanted in the thoroughly calibrated diseased area. Clinical evaluation using the IKDC subjective score was performed on the 3rd, 6th, 12th, 24th month. The working hypothesis was that, after 24 months, at least 75% of patients would have improved their subjective score (by more than 10 IKDC points). A 2mm diameter biopsy was performed at that time. Results: Comprehensive, analytical and synthetic presentation will follow. Our clinical hypothesis was verified and validated. Conclusion: Clinical results confirm the interest of chondrocyte cells using alginate - agarose media. This technique has proved its efficacy. It is particularly adapted to the treatment of large diameter ( $4 > 2\text{cm}^2$ ) osteochondral lesions.

### Keywords

cartilage cells, chondrocyte cells, implants

---

ressants soulève plusieurs interrogations. L'homogénéité de répartition des cellules autologues implantées est incertaine [6]. La quantité de chondrocytes greffés dans le site d'implantation n'est pas maîtrisée non plus du fait de fuites de cellules sous la membrane collée ou suturée [6]. Par ailleurs des complications mécaniques liées à l'hypertrophie ou à la délamination du patch de périoste ont été rapportées.

Le Développement de CARTIPATCH® a reposé sur différentes exigences : l'amélioration de la facilité et de la rapidité du geste chirurgical, l'assurance d'une répartition homogène des cellules dans la lésion, l'absence de risque de fuite des cellules greffées dans la lésion.

La présentation de la culture de chondrocytes sous forme solide, incluse dans une matrice, permet de répondre à ces

critères tout en assurant une maîtrise du phénotype chondrocytaire et de la fonctionnalité des cellules

Le cahier des charges de la matrice a porté sur la biocompatibilité, la biosécurité avec l'absence de produit d'origine animale et les possibilités de redifférenciation des chondrocytes par apport d'un environnement tridimensionnel adéquat.

Cette exigence de sécurité s'est aussi traduite par l'utilisation de sérum autologue à la place du sérum bovin comme facteur de croissance des cellules du patient.

## Choix de la matrice

Le choix de la matrice s'est porté sur un hydrogel associant l'agarose et l'alginate. Ces produits d'origine végétale ont une bonne biocompatibilité lorsqu'ils ont un niveau de purification suffisant. Par ailleurs, l'hydrogel est stérilisable par simple autoclavage. L'hydrogel mélangé à une suspension cellulaire permet le moulage à 37°C de formes complexes qui se solidifient à environ 25°C dans des conditions non-stressantes pour les cellules. Les cellules n'ont pas le temps de sédimenter avant la prise du gel, ce qui permet d'assurer une répartition homogène. De plus, l'hydrogel permet une diffusion des milieux de culture nécessaire à la nutrition des cellules et assure ainsi une bonne viabilité.

L'alginate apporte une élasticité à la matrice permettant d'améliorer la manipulation lors de la production mais aussi lors du geste opératoire.

L'utilisation d'un alginate pur a permis de se prémunir des réactions inflammatoires observées avec d'autres produits de qualité inférieure. L'alginate est d'ailleurs implanté avec succès dans différentes indications avec une tolérance satisfaisante.

## Les études précliniques

Après une première série d'essais chez le lapin, le produit a été testé chez le mouton. Le prélèvement était autologue, les greffons étaient préparés selon le procédé mis au point tel qu'il devait être réalisé chez l'homme. La lésion (6 mm de diamètre/ 4 mm de profondeur) était créée sur le condyle fémoral en zone portante avec une fraise telle qu'elle devait être développée pour l'implantation chez l'homme. Les moutons étaient implantés avec le produit complet ou avec un témoin sans cellules et sacrifiés à 3, 6 mois. Après six mois, on notait une absence de reconstruction ostéochondrale dans le défaut créé dans le mouton contrôle et une réparation du cartilage associée à une reconstruction sous-chondrale pour les autres. La surface du cartilage était irrégulière mais non-fibreuse et son aspect était de type hyalin avec une répartition des chondrocytes en colonne. Il n'était pas retrouvé de résidus d'hydrogel après 6 mois d'implantation.

## Technique d'implantation chirurgicale

La technique d'implantation comporte trois étapes successives

## Prélèvement

Une quantité minimale de 200 mg de cartilage sain était prélevée sous arthroscopie en zone non portante dans l'échancrure ou sur les berges de la trochlée. L'arthroscopie permettait également l'évaluation morphologique précise de la lésion dont les caractéristiques étaient reportées sur une fiche de cartographie lésionnelle.

## Préparation en laboratoire

Après extraction par digestion enzymatique, les cellules étaient cultivées en monocouche avec du milieu de culture supplémenté de sérum autologue à une concentration de 10%. Le sérum était prélevé et préparé par l'Établissement Français du Sang environ trois semaines avant le prélèvement du cartilage. La multiplication cellulaire était menée jusqu'à obtenir 10 millions de cellules par ml. Les cellules étaient ensuite isolées et mises en suspension dans un gel d'Agarose et Alginate. Le mélange était moulé pour obtenir des implants cylindriques de différents diamètres : 10 mm, 14 mm et 18 mm, d'une épaisseur de 4 mm et dont la base était tronconique pour faciliter l'implantation. Les tailles et quantité de plot étaient définies par la surface et la forme de la lésion précisées lors du prélèvement arthroscopique et par l'IRM pré-opératoire. Les implants étaient incubés au minimum 14 jours avant d'être délivrés, libérés après les contrôles de viabilité et du phénotype.

## Implantation

L'implantation était réalisée à ciel ouvert par courte arthrotomie centrée sur la lésion condylienne, sous garrot pneumatique. La surface et la forme de la lésion étaient réévaluées. Un ancillaire spécifique présentant une mèche et un guide mèche correspondant aux diamètres des différents plots permettait d'ajuster les sites d'implantation à la forme des greffons (figure 4). Après forage de la lésion, des fantômes d'implants de tailles adéquates étaient positionnés pour tester les mensurations de l'avivement et la stabilité des greffons (figure 6). Le schéma de recouvrement pouvait être de un à six implants selon un modèle en mosaïque. La mise en place des implants s'effectuait au moyen d'une aiguille permettant de centrer et de guider la descente au centre du site receveur avec précision. La levée du garrot constituait un test d'expulsion, et des mouvements de flexion extension permettaient d'attester de la bonne tenue et de la congruence des greffes.

La fermeture était commune à toute arthrotomie avec mise en place d'un drain aspiratif temporaire, disposé dans le cul de sac sous quadricipital pour ne pas menacer le site de la greffe.

## Rééducation

La protection du genou était assurée par l'utilisation d'une attelle amovible et de cannes avec un appui différé durant 4 semaines. Un traitement anticoagulant préventif, institué 48 heures après l'intervention pour limiter le risque d'expulsion lié au saignement osseux, était poursuivi jusqu'à la reprise de l'appui. La mobilisation du genou débutait immédiatement dans un secteur d'amplitude de 0° à 90° de flexion. La remise en appui était progressive pour être effective à 2 mois et demi et la mobilisation du

genou était élargie de 0 à 140°. Des activités non traumatisantes pouvaient être envisagées progressivement à partir de cette période. La marche, le vélo (sur le plat uniquement), la natation (sauf la brasse) étaient conseillés. Entre 6 et 12 mois le jogging pouvait être repris de façon modérée. Après un an tous les sports étaient autorisés de façon progressive.

## **Essai clinique de phase II**

### **Méthodologie**

Un essai clinique de phase II multicentrique (4 centres) a été autorisé par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) et approuvé par le comité d'éthique en août 2002.

Les critères d'inclusion comportaient l'existence de lésions chondrales ou ostéochondrales symptomatiques (score subjectif IKDC inférieur à 55), de taille inférieure à 5 cm<sup>2</sup> et de profondeur inférieure à 10 mm, localisées à un condyle fémoral, d'étiologie traumatique de grade 3 et 4 ou séquellaires d'une ostéochondrite disséquante de type III et IV selon la classification de l'ICRS, chez des patients âgés de 16 à 50 ans. Chaque lésion était systématiquement évaluée par IRM.

Les critères d'exclusion étaient : une lésion cartilagineuse en miroir sur le tibia, l'existence d'une instabilité d'origine ligamentaire ou patellaire, une arthrite du genou, une déformation frontale supérieure à 10°, une obésité, une pathologie nécessitant une prescription de médicaments ayant une influence dans le métabolisme osseux, ou encore un antécédent de ménissectomie ou de pathologie musculaire ou osseuse.

Le Critère principal de l'étude était l'amélioration de 10 points du score d'évaluation subjective de l'ICRS à 24 mois pour 80% des patients (HA :  $r > 75\%$  et H0 :  $r < 50\%$  ;  $\beta = 10\%$ ,  $\alpha = 10\%$ ).

Le score ICRS devait être enregistré en préopératoire puis à 3, 6, 12 et 24 mois. L'évaluation IRM était réalisée avant l'intervention puis à 24 mois. Une arthroscopie de contrôle associée à une biopsie à 24 mois permettrait d'évaluer l'aspect macroscopique et histologique du tissu de réparation. La tolérance était suivie à chaque visite.

### **Résultats**

Un total de vingt patients (15 hommes et 5 femmes, d'âge moyen 29,8 ans) a été inclus de novembre 2002 à janvier 2004. Dix-sept patients ont été implantés. Parmi les trois cas non implantés, un patient avait présenté un échec de culture avec un sérum autologue non fertile, un patient souffrait de chondrocalcinose et un patient présentait un comblement de la lésion au moment de l'implantation faisant renoncer à la greffe (un débridement au moment du prélèvement avait été effectué).

Parmi les vingt patients 13 patients avaient déjà eu un traitement chirurgical.

Les lésions étaient réparties en 7 lésions traumatiques (dont deux reprises de mosaïcplastie) et 13 ostéochondrites disséquant. La taille de la lésion était de 1 à 5,1 cm<sup>2</sup> avec une moyenne de 2,9 cm<sup>2</sup>.

Le prélèvement de cartilage avait été effectué au niveau de l'espace intercondylien chez 19 patients, ainsi que sur les bords de la trochlée médiale pour la moitié d'entre eux. La quantité de cartilage recueilli, 339 mg en moyenne (125 à 681), a toujours permis d'obtenir un nombre suffisant de cellules sauf dans le cas du sérum autologue non fertile.

Le temps de préparation des greffons était en moyenne de 48 jours (38 à 62 jours). Le nombre moyen de passage a été de 3 (P3 à P4 maximum). Le temps d'incubation d'un minimum de 14 jours a été ajusté en fonction de la disponibilité du bloc opératoire et du patient. En moyenne, 2,8 greffons par patient ont été préparés (de 1 à 5).

Le sérum a été utilisé conformément au protocole de culture sauf pour 2 patients ou il a été utilisé à 20% pour pallier un manque de fertilité. Un des deux sérums n'a pas permis la multiplication cellulaire dans ces conditions avec un blocage en P0. Le redémarrage de la culture sous sérum de veau a été imparfait et l'étiologie de l'échec de culture reste inconnue.

La viabilité des cellules cultivées a toujours été supérieure à 75%. Le phénotype chondrocytaire a été systématiquement confirmé avant l'implantation.

Au total, 17 patients ont eu une implantation. Le nombre de greffons implantés par patients a été de 1 à 3 avec une moyenne de 1,9. Les appositions de greffons en mosaïque ont permis un comblement satisfaisant des lésions sauf dans un cas qui a nécessité l'utilisation de fibrine pour stabiliser les greffons au nombre de 3. Aucune expulsion n'a été observée lors de la levée du garrot ni migration primaire des greffons qui ont pu s'emboîter très exactement dans leurs logements respectifs. Le temps opératoire a été de 30 minutes à 1 heure.

Deux phlébites liées à une mise en route tardive des anti-coagulants ont été constatées (H72 au lieu de H24). Une volumineuse hémarthrose a été observée chez un patient pour lequel aucun drainage n'avait été mis en place.

Le score d'évaluation subjectif IKDC initial était de 18 à 64 pour les 20 patients inclus, avec un score moyen de 36,6 à l'inclusion. Le score moyen était de 53,1 (22 à 85) à trois mois (11 patients), de 74,4 (52 à 90) à 6 mois (7 patients) et de 77,8 à 24 mois ( $p < 0,001$ ) avec 16 patients sur 17 améliorés.

Les résultats IKDC en fonction des patients étaient significativement supérieurs en cas de lésion  $> 3$  cm<sup>2</sup>, et on notait une tendance à la significativité en cas d'ostéochondrite disséquante et de lésion de grade 4.

Treize évaluations arthroscopiques ont été effectuées à 2 ans de l'implantation avec un score moyen de l'ICRS de 10 sur 12.

Treize biopsies ont été réalisées. L'analyse histologique retrouvait un score moyen de O'Driscoll de 16 sur 21 et un score de l'ICRS moyen de 14 sur 18. 8 patients présentaient un cartilage en majorité hyalin, 3 un cartilage mixte hyalin et un 2 fibrocartilage. La cicatrisation de l'os sous-chondrale était complète ou marquée pour 11 patients sur 13.

La taille des lésions visualisées à l'IRM des 20 patients

inclus avant l'intervention était de 0,7 à 4,5 cm<sup>2</sup> soit une moyenne de 2,56 cm<sup>2</sup> (Tableau 2). A 1 an, la forme conique de l'implant était toujours observée. L'aspect était homogène et comparable au signal du cartilage environnant. Le tissu nouvellement formé s'intégrait avec la structure cartilagineuse adjacente.

L'évaluation IRM à 2 ans montrait 10 patients sur 15 présentant un signal identique au cartilage normal. Pour 11 de ces 15 patients on ne retrouvait pas de transition visible entre le cartilage reconstitué et le cartilage sain adjacent.

## Discussion

Les caractéristiques de cet implant par ses qualités de répartition, de viabilité et d'expression phénotypiques des cellules incorporées, ainsi que le succès observé à moyen terme, plaident pour l'utilisation d'une matrice tridimensionnelle pour la culture de chondrocytes par rapport aux thérapeutiques chirurgicales plus conventionnelles. L'utilisation de membrane de périoste [5, 7] ou de collagène suturé ou collé (avec une colle de fibrine, produits d'origine humaine ou animal) [8] est inutile grâce à cette technique d'ajustement en press-fit et au caractère solide des implants. Les fuites de cellules ou des répartitions cellulaires non homogènes de la suspension cellulaire [9] sont ainsi prévenues. Par ailleurs, le mode de préparation garantissant une quantité de cellules proportionnelle à la dimension de l'implant, donc à la lésion, et non pas une dose fixe de cellule comme on l'observe dans les ACI.

Pour ce qui est de la technique chirurgicale, l'implantation paraît fiable et reproductible avec une courbe d'apprentissage courte par comparaison à l'ACI pour laquelle la difficulté technique et une courbe d'apprentissage longue ont été rapportées [10]. Le temps opératoire court compris entre 30 mn et 1 h marque également une réelle amélioration par rapport à l'ACI. Les greffons ont pu s'ajuster avec précision dans leur logement, leur positionnement a été central et il n'a pas été observé d'expulsion. Enfin, l'ancillaire et les implants d'essai, de même que le caractère bombé de la surface des Cartipatch®, permettent d'obtenir une bonne adéquation du contour de la zone greffée avec le cartilage adjacent. Néanmoins, compte tenu des dimensions fixes des moulages, il est nécessaire de planifier 15 jours avant la greffe la quantité et les dimensions des greffons. Lorsque la lésion est circulaire et circonscrite de 15 à 18 mm de diamètre, l'utilisation d'un seul greffon de 18mm de diamètre permet un recouvrement complet et une intervention simple. Lorsqu'il s'agit d'une lésion longitudinale, il est préférable de réaliser une implantation linéaire de greffons adjacents. Lorsque la lésion affleure ou empiète sur l'échancrure inter-condylienne, des difficultés de fixation peuvent se rencontrer. Il est préférable dans ces conditions de décaler le site de forage sur la zone portante afin d'obtenir un logement dont le contour circulaire est continu. De même, il faut éviter que les greffons ne se chevauchent, car leur fragilité relative interdit de les manipuler pour les recouper, ou de forer en empiétant sur un greffon déjà en place. Il sera possible également d'étendre la gamme de tailles disponibles dans l'avenir, voir de programmer des greffons sur mesure.

L'implantation est réalisée à ciel ouvert du fait des limitations de la mise en place des greffes sous arthroscopie. En effet, la vision déformée en grand angle, le caractère oblique des optiques donc de la vision et la perte de la vision tridimensionnelle, rendent très difficiles les ajustements parfaits. Cependant, un ancillaire adapté à la mise en place d'un nombre limité d'implants de petites tailles est envisageable.

Les réparations cartilagineuses concernent les lésions localisées, isolées et circonscrites de 1 à 6 cm<sup>2</sup> environ, le plus souvent condyliennes. L'indication idéal du Cartipatch® s'adresse aux lésions ostéochondrales limitées (ostéochondrite, fracture ostéochondrale, voire ostéonécrose) dans la mesure où la préparation nécessite d'empiéter légèrement sur l'os sous chondral, en sachant que les greffons mesurent 4 mm de hauteur en périphérie. Il n'y a pas de place actuelle pour cette technique dans le traitement de l'arthrose où il faudrait envisager des greffes en miroir. Ainsi, la pratique systématique d'un cliché en schuss (Rosenberg view) permet d'éliminer les pincements articulaires même débutants.

Les lésions localisées, purement chondrales, n'affectant pas l'os sous chondral sont plus rares et souvent peu symptomatiques. Néanmoins, elles constituent également une indication, la reconstitution de l'os sous chondral au niveau initial ayant été démontrée en pratique clinique. L'existence d'un défaut d'axe excédant 5° doit faire discuter théoriquement une ostéotomie correctrice associée, de même que la présence d'une lésion ligamentaire, voire méniscale, nécessite la réalisation d'une greffe ou d'une réparation associées. Dans le cadre actuel d'une étude clinique, ces gestes bien que logiques, rendraient l'interprétation des résultats aléatoires. Si pour cette raison ces lésions concomitantes ont constitué des facteurs d'exclusion, leur traitement reste logique et devrait être proposé en cas d'élargissement des indications de Cartipatch® dans le futur.

## Conclusion

L'étude clinique de phase II est à présent cloturée.

La greffe de cartilage dans un hydrogel CARTIPATCH confirme une amélioration significative clinique en particulier pour les lésions larges et profondes. Il s'agit d'un geste chirurgical simple demandant moins d'une heure d'intervention et qui permet d'obtenir dans la plupart des cas une bonne intégration os/cartilage.

L'utilisation d'une matrice permettant une répartition homogène et une absence de fuite cellulaire peut expliquer les bons résultats histologiques avec plus de 60% de cartilage réparé majoritairement hyalin à 24 mois.

Une étude de phase III versus mosaïcoplastie est en cours.

## Références

1. Messner, K. and J. Gillquist, Cartilage repair. A critical review. *Acta Orthop Scand*, 1996. 67(5): p. 523-9.
2. Minas, T., The role of cartilage repair techniques, including chondrocyte transplantation, in focal chondral knee damage. *Instr Course Lect*, 1999. 48: p. 629-43.
3. Martinek, V., P. Ueblacker, and A.B. Imhoff, Current concepts of gene therapy and cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br*, 2003. 85

- (6): p. 782-8.
4. Bentley, G. and T. Minas, Treating joint damage in young people. *Bmj*, 2000. 320(7249): p. 1585-8.
  5. Brittberg, M., et al., Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 1994. 331(14): p. 889-95.
  6. Ochi, M., et al., Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artif Organs*, 2001. 25(3): p. 172-9.
  7. Ochi, M., et al., Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br*, 2002. 84(4): p. 571-8.
  8. Ronga, M., F.A. Grassi, and P. Bulgheroni, Arthroscopic autologous chondrocyte implantation for the treatment of a chondral defect in the tibial plateau of the knee. *Arthroscopy*, 2004. 20(1): p. 79-84.
  9. Sohn, D.H., et al., Effect of gravity on localization of chondrocytes implanted in cartilage defects. *Clin Orthop*, 2002(394): p. 254-62.
  10. Knutsen, G., et al., Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am*, 2004. 86-A(3): p. 455-64.