



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THÈSE

2006

Présentée et soutenue publiquement pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L’I.N.P.L.

Spécialité : Bioingénierie

Par

Shalaw FAWZI-GRANCHER

Le 03 Octobre 2006

Titre :

**Influence des facteurs biochimiques et mécaniques *in vitro*
sur la prolifération cellulaire et la synthèse matricielle de
fibroblastes. Applications en Ingénierie tissulaire**

Directeur de thèse : Madame le Docteur Sylvaine MULLER

JURY

Rapporteurs :

M. D. ISABEY	DR CNRS	UMR 651, INSERM, Créteil
M. P. SCHAAF	Professeur	UPR 022 CNRS, ICS, Strasbourg

Examineurs :

M. J.F. STOLTZ	Professeur	UMR 7563 CNRS-UHP-INPL, Nancy
Mme M.L. VIRIOT	DR CNRS	UMR 7630 CNRS-INPL, ENSIC, Nancy
Mme S. MULLER	CR INSERM	UMR 7563 CNRS-UHP-INPL, Nancy

Avant Propos et Remerciements

À Soline-Dia

À Nicolas

À mes parents, à qui je pense malgré la distance

À mes sœurs, pour leur soutien

À mes frères, pour leurs encouragements

À toute ma famille et ma belle-famille

À tous mes amis

Avant Propos et Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à adresser mes remerciements les plus chaleureux à tous ceux qui m'ont aidée durant mes années passées au laboratoire.

*Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur **Jean-François STOLTZ**, Directeur du groupe «Ingénierie Cellulaire et Tissulaire du LEMTA», qui m'a accueillie avec bienveillance dans son laboratoire, d'abord en tant que stagiaire en DEA, puis comme Doctorante.*

*J'exprime ma sincère reconnaissance à Madame **Sylvaine MULLER**, Chargée de Recherche à l'INSERM, ma Directrice de thèse, pour son implication dans mon travail au cours de ma thèse et pour son aide et ses conseils précieux. Elle a suivi le déroulement de ce travail avec beaucoup d'attention, et elle a su me faire partager son enthousiasme dans les moments difficiles. Je ne saurai jamais assez la remercier pour ses conseils éclairés et pour la confiance qu'elle m'a accordée pendant ces années de thèse.*

*Je remercie très vivement Messieurs les Professeurs **D. ISABEY** et **P. SCHAAF**, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.*

*J'exprime toute ma gratitude et mon profond respect à Madame le Docteur **Marie-Laure VIRIOT**, Directeur de Recherche au CNRS, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de juger mon travail ainsi que pour sa bienveillance.*

*Je tiens à remercier Monsieur **Dominique DUMAS**, Ingénieur de Recherche, pour ses conseils et son aide notamment concernant la microscopie de fluorescence.*

*Je remercie très vivement, Monsieur **Michel MARCHAND**, Ingénieur d'Etudes, pour son assistance dans la réalisation de l'appareil d'étirement.*

*Je remercie Mesdames **Monique GENTILS**, **Ghislaine CAUCHOIS**, Techniciennes, pour leur gentillesse, leur sympathie, leur disponibilité et leur soutien continu. Je leur exprime ma profonde reconnaissance pour tout le temps qu'elles ont consacré à la correction de ce manuscrit.*

*Je remercie spécialement Monsieur **Cédric BOURA**, Maître de Conférences, pour sa disponibilité et tout ce qu'il m'a appris durant mes années de présence au laboratoire.*

Avant Propos et Remerciements

*Je tiens à remercier également **Mariama TRAORE et Yun WANG**, Doctorantes, pour leur gentillesse, et pour tout le temps qu'elles m'ont consacré à la correction de mon article.*

Mes remerciements vont également vers mes chers collègues et amis du laboratoire pour m'avoir encouragée et supportée durant ces années :

Natalia, Assia, Rania, Marine, Cédryck, Jingwei, Said, Vanessa, Luc, Lei, Caroline, Halima, Brigitte, Karine, Céline, Claude, Xiong, Véronique et anciens collègues, Hong, Sun.

À tous mes amis irakiens (nes) pour leur amitié et leur soutien moral, en particulier : Avan, Narmine, Safa, Baram.

À l'Institut kurde de Paris pour m'avoir donné la chance de réaliser mon rêve.

À la Fondation de la Recherche Médicale pour avoir financé les derniers mois de ma thèse.

AVANT PROPOS ET REMERCIEMENTS.....	2
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	8
INTRODUCTION GENERAL	25
CHAPITRE I : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES.....	24
<u>A. LE LIGAMENT</u>	25
<u>B. LE TENDON</u>.....	28
B-1: DESCRIPTION.....	28
B-2 : LES CONSTITUANTS	30
B-2-1 : Les fibroblastes	30
<u>B-2-1-1 : Morphologie</u>	30
<u>B-2-1-2 : Métabolisme de fibroblastes</u>	30
B-2-2 : La matrice extracellulaire.....	31
<u>B-2-2-1 : Les fibres</u>	32
<u>B-2-2-2 : Les glycoprotéines</u>	38
<u>B-2-2-3 : Les protéoglycanes (PG)</u>	42
B-2-3 : Propriétés mécaniques du ligament et du tendon.....	42
C. PATHOLOGIE DU LIGAMENT ET DU TENDON	44
C-1 : LIGAMENT CROISE ANTERIEUR (LCA)	45
C-1-1 : Anatomie	45
C-1-2 : Rôle	46
C-1-3 : Structure.....	47
D. PATHOLOGIE DU LIGAMENT CROISE ANTERIEUR (LCA) - TRAITEMENT	48
D-1 : AUTOGREFFE.....	50
D-2 : ALLOGREFFE	52
D-3 : MATERIAUX SYNTHETIQUES.....	52
E. INGENIERIE TISSULAIRE DU LIGAMENT.....	56
E-1 : LES SOURCE DE CELLULES	59
E-2 : LES BIOMATERIAUX (MATRICE).....	60
E-2-1 : Caractéristiques de la matrice.....	60
<u>E-2-1-1 : Biocompatibilité</u>	60
<u>E-2-1-2 : Porosité</u>	60
<u>E-2-1-3 : Propriétés mécaniques</u>	60
<u>E-2-1-4 : Durée de dégradation</u>	61
E-2-2 : Les polyesters	61
<u>E-2-2-1 : Propriétés physiques</u>	62
<u>E-2-2-2 : Dégradation</u>	63
E-3 : FACTEURS REGULATEURS	67
E-3-1 : Facteurs biochimiques et physicochimiques	67
<u>E-3-1-1 : Ingénierie tissulaire et facteurs de croissance</u>	73
<u>E-3-1-2 : Principaux facteurs de croissance en ingénierie tissulaire</u>	74
<u>E-3-1-3 : Combinaison des facteurs de croissance</u>	80
E-3-2 : Facteurs mécaniques	81
<u>E-3-2-1 : Effet des contraintes mécaniques en ingénierie tissulaire</u>	81
<u>E-3-2-2 : Réponse du ligament aux contraintes mécaniques</u>	84
<u>E-3-2-3 : Mécano-transduction</u>	86

Table de Matières

E-4 : MODELES D'ETUDE EN MECANOBIOLOGIE : CULTURE ET APPAREILLAGE	87
E-4-1 : Flexercell®	87
<i>E-4-1-1 : FX-4000T.....</i>	<i>87</i>
<i>E-4-1-2: BioFlex Loading Station™ (LS-3000B)</i>	<i>88</i>
E-4-2 : Bioréacteur	89
E-5 : TECHNOLOGIE DE TRANSFERT DE GENE	90
E-6 : THERAPIE CELLULAIRE	91
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES.....	92
METHODOLOGIE GENERALE	93
<u>A. CULTURE CELLULAIRE.....</u>	93
A-1 : REACTIFS ET MATERIELS	93
A-1-1 : Lignée cellulaire F-CRL.2703	93
A-1-2 : Culture primaire de fibroblastes de ligament croisé antérieur (LCA).....	94
A-2 : MISE EN CULTURE ET PASSAGES	96
A-2-1 : Matériels et supports.....	96
A-2-2 : Passage en subculture	96
A-2-3 : Numération et viabilité cellulaire.....	97
A-2-4 : Préparation des échantillons	97
B. STIMULATION ET TRAITEMENT DES CELLULES.....	98
B-1 : STIMULATION BIOCHIMIQUE.....	98
B-1-1 : Facteurs de croissance.....	98
B-2 : STIMULATION MECANIQUE : ETIREMENT	99
<u>C. METHODOLOGIE SPECIFIQUE.....</u>	102
C-1 : ACTIVITE METABOLIQUE (TEST MTT)	102
C-1-1 : Principe.....	102
C-1-2 : Réactifs et matériels	103
C-1-3 : Protocole.....	103
C-2 : ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE.....	103
C-2-1 : Principe.....	103
C-2-2 : Réactifs et matériels	104
C-2-3 : Marquage de l'ADN	105
C-2-4 : Protocole.....	105
C-2-5 : Analyse des échantillons	105
C-3 : DETECTION DES ARNm PAR RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTASE – POLYMERISATION CHAIN REACTION).....	107
C-3-1 : ARNm et RT-PCR	107
C-3-2 : Protocoles expérimentaux	111
C-4 : FLUORESCENCE - IMMUNOFLUORESCENCE	115
C-4-1 : Principe de l'immunomarquage indirect	115
C-4-2 : Marquage du cytosquelette.....	117
C-4-3 : Préparation des échantillons cellulaires pour AFM – acquisition des images...	118
C-5 : MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE.....	118
<u>D. ANALYSES STATISTIQUES</u>	118
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	119
A. INFLUENCE DES FACTEURS DE CROISSANCE	120
A-1 : RESULTATS PRELIMINAIRES – ACTION DES FACTEURS DE CROISSANCE SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE.....	122

Table de Matières

A-1-1 : Action du TGF-β sur la prolifération et l'activité métabolique des cellules.....	122
A-1-2 : Effet du PDGF-AB sur la prolifération cellulaire. Comparaison avec le TGF-β1	124
.....	
A-2 : OPTIMISATION DES CONDITIONS BIOCHIMIQUES ET INFLUENCE DU SUBSTRAT IN VITRO EN INGENIERIE TISSULAIRE	126
Article 1 : Optimisation od biochemical condition and substrates in vitro for tissue engineering of ligament	
A-3 : INFLUENCE DE LA COMBINAISON DU TGF- β 1 ET DU PDGF-AB SUR LES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES DES FIBROBLASTES	130
A-3-1 : Prolifération cellulaire – mesure du cycle cellulaire	130
A-3-2 : Synthèses de la matrice extracellulaire - mesure par RT-PCR.....	132
A-3-3 : Discussion	134
B. ETUDE DES CONTRAINTES MECANQUES (ETIREMENT).....	136
B-1 : INFLUENCE DE LA PRESENCE DE CONTRAINTE MECANIQUE ET DE SERUM SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE ET LA SYNTHESE MATRICIELLE DES FIBROBLASTES.....	137
Article 2 : Effect of cyclic stretching and foetal bovine serum (FBS) on proligeration and extracellular matrix synthesis of fibroblast	
B-2 : INFLUENCE DES CARACTERISTIQUES DE LA CONTRAINTE MECANIQUE ET DU TYPE CELLULAIRE	139
B-2-1 : Prolifération cellulaire – étude des phases du cycle cellulaire.....	139
B-2-2 : Synthèse de la matrice extracellulaire	140
<i>B-2-2-1 : Etude semi-quantitative de l'expression des ARNm du collagène I, III et de la ténascine-C - étude par RT-PCR.....</i>	<i>140</i>
<i>B-2-2-2 : Etude qualitative des composants matriciels – étude en microscopie confocale</i>	<i>142</i>
B-2-3 : Discussion	146
CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	148
CHAPITRE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	152

Publications dans des revues internationales

- 1) **FAWZI-GRANCHER S.**, DE ISLA N., FAURE GC., STOLTZ J.F., MULLER S. Optimisation of biochemical condition and substrates *in vitro* for Tissue engineering of ligament. *Annals of biomedical engineering*. 2006. (acceptée).
- 2) **FAWZI-GRANCHER S.**, SLIMANI S., KOLOPP-SARDA M.N, MARCHAND M, FAURE G, STOLTZ J.F and MULLER S. Effect of cyclic stretching and foetal bovine serum (FBS) on proliferation and extra cellular matrix synthesis of fibroblast. *Bio-Medical Material and Engineering*. 2006, 16 : S137-44.
- 3) VAQUETTE C., **FAWZI-GRANCHER S.**, LAVALLE P., MULLER S., WANG X. *In vitro* long term biocompatibility of different polyesters membranes. *Bio-Medical Material and Engineering*. 2006, 16 : S131-6.
- 4) **FAWZI-GRANCHER S.**, SUN RJ, TRAORÉ M, STOLTZ J-F, MULLER S. Role of Ca^{2+} in the effects of shear stress and TNF-alpha on caveolin-1 expression. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2005, 33 : 253-61.
- 5) TRAORÉ M., SUN RJ., **FAWZI-GRANCHER S.**, DUMAS D., QING X., SANTUS R., STOLTZ J-F., MULLER S. Kinetics of the endocytotic pathway of Low Density Lipoprotein (LDL) in human endothelial cells line under shear stress: an *in vitro* confocal microscopy study. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2005, 33 : 243-51.
- 6) MULLER S, LABRADOR V, DA ISLA N, DUMAS D, SUN R, WANG X, WEI L, **FAWZI-GRANCHER S**, YANG W, TRAORE M, BOURA C, BENSOUSSAN D, ELJAAFARI A, STOLTZ JF. From hemorheology to vascular mechanobiology: An overview. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2004, 30 : 185-200.
- 7) GIGANT C, LATGER-CANNARD V, BENSOUSSAN D, **FAWZI S**, FEUGIER P, BORDIGONI P, STOLTZ JF. CD34+ cells homing: quantitative expression of adhesion molecules and adhesion of CD34+ cells to endothelial cells exposed to shear stress. *Biorheology*. 2003, 40 : 189-95.

Ouvrage scientifique

FAWZI-GRANCHER S., SLIMANI S., VAQUETTE C., WANG X., MULLER S.
Ingénierie tissulaire du ligament. Optimisation des conditions de culture du néo-tissu in vitro.
Mécano-transduction 2004, Paris, France, (GAMAC), 8-10 septembre, pages 47-54.

Congrès au national et à l'international

- 1) KADI A, **FAWZI-GRANCHER S.**, LAKISIC G. L, DE ISLA N, HUSELSTEIN C, STOLTZ JF, MULLER S. Effect of cyclic stretching and TGF- β pathway on the extra cellular matrix synthesis in tissue engineering. 5th world congress of Biomechanics. Munich, Germany, 29 July- 4 August 2006, Supplement 39 page S579.
- 2) TRAORE M, KADI A, **FAWZI-GRANCHER S**, DUMAS D, MARCHAL L, R. SUN, STOLTZ J-F., MULLER S. Endocytosis and degradation of LDL-Cholesterol in human endothelial cells under shear stress: a Forster- type resonance energy transfer (FRET) study. 5th world congress of Biomechanics. Munich, Germany, 29 July-4 August 2006, Supplement 39 page S623.
- 3) MULLER S, R. SUN, L WEI, **FAWZI-GRANCHER S**, TRAORE M, BOURA C, J-F STOLTZ. Effect of Shear stress on related cytoskeleton molecules in endothelial cells. International symposium on cardiovascular biology. Praha (Czech Republic), 30 June and 1st July 2006, page 28.
- 4) TRAORE M, KADI A, **FAWZI-GRANCHER S**, DUMAS D, MARCHAL L, R. SUN, MULLER S, STOLTZ J-F. Endocytosis and degradation of LDL-Cholesterol in human endothelial cells under shear stress: a Forster- type resonance energy transfer (FRET) study. International symposium on cardiovascular biology. Praha (Czech Republic), 30 June and 1st July 2006, page 29.
- 5) KADI A, **FAWZI-GRANCHER S.**, LAKISIC G. L, DE ISLA N, HUSELSTEIN C, STOLTZ JF, MULLER S. Effect of cyclic stretching and TGF- β on the SMAD pathway. 3^{ème} colloque international de l'école doctorale BIOSE, «Ingénierie Médicale et Thérapie» Nancy, 15-16 Mai 2006, page 46.

- 6) MULLER S., **FAWZI-GRANCHER S.**, WANG B., WANG X. Tissue Engineering of Ligament/Tendon. Part II – Importance of Biochemical and Mechanical Factors on the Neogenesis of Ligament. China-France Medicine Symposium 2005, Cell and Tissue Therapy: From Engineering to Patients, Wuhan, China June 6-8, 2005. Journal of biomedical engineering. Volume 22 (3) 2005, page 27-28.
- 7) WANG X., VAQUETTE C., SLIMANI S., **FAWZI-GRANCHER S.**, MULLER S. Tissue Engineering of Ligaments/Tendons. Part I. Biomaterial and Mechanical Aspects. China-France Medicine Symposium 2005, Cell and Tissue Therapy: From Engineering to Patients, Wuhan, China June 6-8, 2005. Journal of biomedical engineering. Volume 22 (3) 2005, page 27-28.
- 8) **FAWZI-GRANCHER S.**, SLIMANI S., WANG X., MULLER S. Cyclic stretching effect on proliferation and extra cellular matrix synthesis of fibroblast in different concentrations of serum. 2^{ème} symposium de l'école doctorale BIOSE, «Ingénierie et Thérapie Cellulaire et Tissulaire » Nancy, 10-11 Mai 2005, page 30.
- 9) VAQUETTE C., **FAWZI-GRANCHER S.**, LAVALLE P., MULLER S., WANG X. In vitro long term biocompatibility of different polyester membranes. 2^{ème} symposium de l'école doctorale BIOSE, « Ingénierie et Thérapie Cellulaire et Tissulaire » Nancy, 10-11 Mai 2005, page 31.
- 10) SLIMANI S., **FAWZI-GRANCHER S.**, MULLER S., WANG X., COUDANE H., STOLTZ J-F. Approche biomécanique du supraspinatus et du TLB dans la rupture de la coiffe des rotateurs. 2^{ème} symposium de l'école doctorale BIOSE, « Ingénierie et Thérapie Cellulaire et Tissulaire » Nancy, 10-11 Mai 2005, page 32.
- 11) **FAWZI-GRANCHER S.**, SLIMANI S., VAQUETTE C., WANG X., MULLER S. Ingénierie tissulaire du ligament. Optimisation des conditions de culture du néo-tissu in vitro. XXIX^{ème} Congrès de la société de Biomécanique. Créteil, 8-10 septembre 2004- Archives of physiology and biochemistry, 112 supplement Septembre 2004 : page 12.
- 12) **FAWZI-GRANCHER S.**, SLIMANI S., VAQUETTE C., WANG X., MULLER S. Effect of biochemical factors on the neogenesis of ligament tissue. Abstracts of the

Liste de publications et communications

Annual Meeting of the Swiss Society of Biomaterials (SSB) Congress Centre, Davos, Switzerland. (2004) Volume No 7-Supplement 2. July 1st 2004 page 8.

- 13) **FAWZI-GRANCHER S.**, SUN RJ, MULLER S, WANG X., STOLTZ J.F.
Translocation and expression of Caveolin-1 in EC. Effect of Ca²⁺ and shear stress.
XXVIII^{ème} Congrès de la société de Biomécanique. Poitiers, France, 11-12 Septembre
2003. Archives of physiology and biochemistry, 111 supplement September 2003: page
12.
- 14) **FAWZI S.**, MULLER S., SUN RJ., WANG X., STOLTZ JF. Ca²⁺ and shear stress effect
on the expression and location of caveolin in endothelial cells. 12th European Conference
on Clinical Hemrheology, June 22-26, 2003, Sofia, Bulgaria, pages 79-80.

Liste des abréviations et notations

2D : bidimensionnel

3D : tridimensionnel

ADN: acide désoxyribonucléique

AFM : microscopie à force atomique

cAMP : adénosine monophosphate cyclique

ALPase : Alkaline phosphatase

ARNm: acide ribonucléique messenger

bFGF: *basic fibroblast growth factor*

BSA: sérum albumine bovine

COX2 : cyclooxygénase 2

CSE: cellule souche embryonnaire

CSM: cellule souche mésenchymateuse

DMEM : dulbecco's modified eagle medium

EDTA : acide éthylènedinitrilotétraacétique

EGF : *Epidermal growth factor*

em : Emission

ex : Excitation

FAK : *focal adhesion kinase*

FGF: *fibroblast growth factor*

FL1: canal de fluorescence 1er

FN: fibronectine

FSC: diffusion aux petits angles

GAG: glycosaminoglycannes

Hz: Hertz

IGF: *Insulin growth factor*

IL: interleukines

Liste d'abréviations et notation

JNK : *Jun kinase*

LCA: ligament croisé antérieur

LCP: ligament croisé postérieur

LLE : ligament latéral externe

LLI: ligament latéral interne

LM: laminine

LTB₄ : leukotriène B₄

m : membrane

MEC: matrice extracellulaire

MMP: métalloprotéase

MTT: bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2yl)-2,5 diphénytétrazolium

n : noyau

NO: oxyde nitrique

PAF: paraformaldéhyde

PBS: tampon phosphate

PCR : *polymerase chain reaction*

PDGF: *platelet derived growth factor*

PG: protéoglycanes

PGA: acide polyglycolique

PGE₂: prostaglandine E₂

PKB : protéine kinase B

PKC : protéine kinase C

PLA₂: phospholipase-A₂

PLGA: copolymères (acide poly L-lactique-acide polyglycolique)

PLLA: acide poly L-lactique

PTFE: polytétrafluoroéthylène

Liste d'abréviations et notation

SAPK : *stress-activated protein kinase*

SPARC : *secreted protein acidic and rich in cystein*

SSC: diffusion grands angles

SSRE: *shear stress responsive element*

TA: tendon d'Achille

TGF- β : *transforming growth factor β*

TIMP: inhibiteur des métalloprotéases

TNF: *Tumor necrosis factor*

TR: tendon rotulien

tsp : thrombospondine

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

Notations

λ = longueur d'onde

σ = contrainte

ε = déformation

L= longueur

MPa= méga pascal

Figures

Chapitre I

Figure I-1 : Représentation schématique d'un genou.

Figure I-2 : Coupe histologique d'un ligament.

Figure I-3 : Coupe histologique de tendon.

Figure I-4 : Structure hiérarchique d'un tendon.

Figure I-5 : Activités de synthèse de fibroblastes.

Figure I-6 : Fonctions et régulation des métalloprotéinases.

Figure I-7 : Structure de collagène en triple hélice.

Figure I-8 : Organisation des faisceaux de collagènes.

Figure I-9 : Formation des fibres d'élastine.

Figure I-10 : Les fibres d'élastine- Etats fonctionnels

Figure I-11 : Structure de la fibronectine humaine.

Figure I-12 : La Ténascine-C.

Figure I-13 : Courbe de tension de contrainte-déformation du tendon

Figure I-14 : Ligament du genou.

Figure I-15 : Rotation du genou.

Figure I-16 : Schéma représentatif du principe de l'autogreffe.

Figure I-17 : Ingénierie tissulaire-procédé général.

Figure I-18 : Formule développée des trois principaux polyesters.

Liste d'illustrations

Figure I-19 : Cordes de soie.

Figure I-20 : Matrice de poly lactide-co-glycolide (PLGA) tricoté.

Figure I-21 : Schéma 3D de matrice de PLLA tressé.

Figure I-22 : Classification des facteurs de croissance—en fonction de leur synthèse et leur d'activité.

Figure I-23 : Voie générale de transduction du signal de TGF.

Figure I-24 : Voie générale de transduction du signal de PDGF.

Figure I-25 : Schéma de trois types d'élongation.

Figure I-26 : Forces agissant sur le substrat : axiale, transversale et cisaillement.

Figure I-27 : Système de Flexercell.

Figure I-28 : Puits de culture.

Figure I-29 : System de BioFlex Loading Station™.

Chapitre II

Figure II-1 : Aspect des fibroblastes.

Figure II-2 : Chambre d'étirement.

Figure II-3 : Schéma de la chambre d'étirement.

Figure II-4 : Schéma de la membrane de silicone.

Figure II-5: Principe de la réaction de réduction du MTT.

Figure II-6 : Représentation schématique du cycle cellulaire.

Figure II-7 : A : Cytogramme FSC en fonction de SSC qui reflète la taille et la granulosité des cellules. B : Histogramme montrant les populations cellulaires. C : histogramme représentant les phases du cycle cellulaire.

Liste d'illustrations

Figure II-8 : Histogramme de répartition des phases du cycle cellulaire.

Figure II-9 : Séquence cible.

Figure II-10 : Etape de dénaturation des brins d'ADN

Figure II-11 : Etape d'hybridation des amorces d'ADN.

Figure II-12 : Etape d'extension des amorces.

Figure II-13 : Migration d'acide nucléique dans des gels.

Figure II-14 : Représentation schématique de l'extraction de l'ARN.

Figure II-15 : Schéma de principe de l'immunofluorescence indirecte.

Chapitre III

Figure III-1 : Influence de différents concentrations de TGF- β 1 (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ng/mL) sur la prolifération cellulaire de fibroblastes.

Figure III-2 : Mesure de l'activité métabolique cellulaire (test MTT) après 24, 48, 72 heures de culture.

Figure III-3 : Influence de différentes concentrations de : A) PDGF-AB (10 et 50 ng/mL), B) TGF- β 1 (1, 5, 10 ng/mL) sur la prolifération cellulaire.

Figure III-4 : Images AFM des fibroblastes cultivés sur une lamelle de verre pendant 10 jours.

Figure III-5 : Influence de la combinaison des facteurs de croissance (TGF- β 1 + PDGF-AB) sur la prolifération de fibroblastes en fonction de temps (J3 et J10).

Figure III-6 : Effet de la combinaison des facteurs de croissance (TGF- β 1 + PDGF-AB) sur la synthèse de collagènes de fibroblastes en fonction du temps (J3 et J10).

Figure III-7 : Effet de l'étirement sur les phases du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire.

Figure III-8 : Effet de l'étirement sur l'ARNm de collagène de type I, III et de ténascine-C.

Liste d'illustrations

Figure III-9 : Détection des collagènes de type I et III et de la ténascine-C sur la lignée de Fibroblaste F-CRL.2703.

Figure III-10 : Détection des collagènes de type I et III et de la ténascine-C sur des cellules de fibroblaste de LCA.

Chapitre IV

Figure IV-1 : Voies de signalisation de TGF- β .

Tableaux

Chapitre I

Tableau I-I: Caractéristiques anatomiques et morphologiques des ligament et tendons

Tableau I-II: Différents types de collagène et répartition en fonction du tissu

Tableau I-III: Traitements du LCA - avantages et inconvénients

Tableau I-IV: Propriétés mécaniques des matériaux synthétiques utilisés pour le remplacement de ligament-comparaison avec le LCA

Tableau I-V: Information sur les prothèses utilisés pour le remplacement du ligament.

Tableau I-VI: Propriétés mécaniques des principaux polyesters

Tableau I-VII : Temps de dégradation des matériaux

Tableau I-VIII: Propriétés caractéristiques - Facteurs de croissances (liste non exhaustive)

Tableau I-IX: Utilisation des facteurs de croissance pour la réparation et la régénération de tendon et de ligament

Tableau I-X: TGF- β et ingénierie tissulaire du tendon et du ligament

Tableau I-XI: PDGF et ingénierie tissulaire du tendon et du ligament

Tableau I-XII : Réponse des fibroblastes de différents types cellulaires à des contraintes mécaniques Uniaxiales

Tableau I-XIII : Réponse des fibroblastes de différents types cellulaires à des contraintes mécaniques biaxiales

Chapitre II

Tableau II-I : séquences des amorces

Tableau II-II : Caractéristiques des anticorps utilisés pour les marquages en immunofluorescence indirecte

	INTRODUCTION GÉNÉRALE	
--	------------------------------	--

L'ingénierie tissulaire est reconnue aujourd'hui comme une technique émergente qui consiste en manipulations biologiques et physiques sur des cellules pour la régénération et la reconstruction de tissus et d'organes. Son objectif est de régénérer, à partir de cellules vivantes, des tissus naturels afin de remplacer des tissus ou des organes défectueux ou perdus (Tabata Y, 2004). Le développement des connaissances sur les cellules et l'évolution de la biomécanique et de la bioingénierie (effets des contraintes mécaniques sur les cellules et les tissus) permettent d'envisager la reconstruction de tissus *in vitro* au laboratoire. En effet, des travaux récents montrent que l'activité de synthèse des cellules et leur degré de différenciation sont dépendants non seulement des caractéristiques biochimiques du milieu, mais également de l'application de contraintes mécaniques (Butler DL et col., 2000). Le contrôle des conditions mécaniques dans la culture de tissus biologiques constitue donc l'un des points clés de l'ingénierie tissulaire. Ainsi la culture *in vitro*, dans une matrice tridimensionnelle, de cellules prélevées chez le patient ou de cellules souches mésenchymateuses (CSM) pourrait conduire à la formation d'un nouveau tissu capable de suppléer aux tissus lésés (os, cartilage, ligament et tendon), d'un point de vue biologique et mécanique (Gage FH, 2000).

La culture de tissus ligamentaires présente un intérêt scientifique et médical important, car il est connu, en chirurgie orthopédique, que la réparation de certains ligaments, en particulier, le ligament croisé antérieur (LCA) du genou, ne peut être réalisée de manière satisfaisante. La réparation du LCA après rupture chez le patient jeune (18-40 ans) tout comme ceux des tendons à l'épaule (tendons de la coiffe des rotateurs) chez les personnes plus âgées (40-70 ans) représente un atout socio-économique certain. Il s'agit de véritables problèmes de santé publique.

La mise au point par le biais de l'ingénierie tissulaire d'un nouveau tendon permettrait la réparation du LCA sans le recours à une autogreffe tendineuse. Cela diminuerait la morbidité post-opératoire avec une réhabilitation à l'effort et une reprise du travail plus précoce. De plus, la réparation de ces tissus offrirait une chance inespérée chez les personnes âgées qui présentent des ruptures étendues des tendons avec une reprise d'autonomie et une diminution des prises de médicaments analgésiques.

Néanmoins, dans le cadre d'une reconstruction d'un ligament par ingénierie tissulaire, certains facteurs doivent être pris en compte, qu'ils soient intrinsèques ou extrinsèques, biochimiques ou mécaniques, tels que les facteurs de croissance apportés au milieu ou synthétisés par les cellules elles-mêmes, ou les contraintes mécaniques d'étirements appliqués au tissu. De nombreuses études ont montré le rôle des facteurs de croissance dans la cicatrisation du ligament et du tendon et ont tenté de déterminer des stratégies appropriées

Introduction générale

pour l'usage des facteurs de croissance dans l'ingénierie tissulaire du tendon et du ligament. Parmi les facteurs de croissance, le *Transforming Growth Factor* (TGF), le *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), et l'*Insulin Like Growth Factor* (IGF) sont connus pour avoir la capacité d'améliorer la prolifération des cellules du tendon et du ligament ainsi que la formation de matrice *in vitro* ou *in vivo*. De même, il semble que les contraintes mécaniques soient nécessaires pour que le tissu reconstruit présente une structure et une fonctionnalité semblable à celle du tissu natif.

L'objectif de notre étude a été d'optimiser, *in vitro*, les conditions biologiques et mécaniques pour la reconstruction d'un nouveau tissu. En effet, pour mener à bien un programme d'ingénierie tissulaire, il est nécessaire de prendre en compte un certain nombre de points essentiels, en particulier le choix des cellules colonisatrices, le réseau de support extracellulaire (matrice 3D ou encore *scaffold*), les conditions biochimiques et mécaniques de la culture, etc.

Notre étude a porté sur deux types cellulaires : une lignée cellulaire de fibroblastes humains de peau (F-CRL.2703, ATCCTM N°.2584882) ainsi que sur des cultures primaires de fibroblastes de ligament croisé antérieur (LCA).

La lignée fibroblastique a été utilisée comme modèle cellulaire pour mettre au point les différentes conditions biochimiques. En revanche, nos travaux sur l'effet des contraintes mécaniques ont été réalisés sur les deux types cellulaires.

Dans un premier temps, nous avons étudié les effets des facteurs biochimiques des facteurs de croissance TGF- β 1 et PDGF-AB, sur la lignée fibroblastique humaine (F-CRL.2703, ATCCTM N°.2584882) et sur différents substrats (membrane de silicone recouverte ou non avec 1% de gélatine, le verre servant de contrôle). Les paramètres suivis étaient la prolifération cellulaire et la synthèse de la matrice extracellulaire, en particulier les collagènes de types I et III qui sont considérés comme marqueurs spécifiques des tissus ligamentaires. Plus précisément, nous avons étudié les effets du TGF- β (*transforming growth factor- β*) sur la synthèse des éléments de la matrice extracellulaire (collagène de type I, et de type III) et du PDGF-AB (*platelet derived growth factor*) sur la prolifération des fibroblastes en fonction non seulement de leur concentration et de la durée du traitement mais également leur action combinée.

Introduction générale

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence des contraintes mécaniques (étirement) sur les types cellulaires sus-cités cultivés sur des membranes de silicone recouvertes avec de la gélatine à 1% et soumises à différentes fréquences (0,5 et 1 Hz) et à une élancement de 5% pendant 24 h.

La première étape de ce travail a été une validation d'un prototype d'étirement, pour contrôler :

- ☞ **les paramètres mécaniques** (homogénéité de la déformation, problèmes liés aux différents éléments...).
- ☞ **les paramètres physico-chimiques** (température, pH, CO₂).
- ☞ **les conditions biomécaniques de culture** (choix de la fréquence, de l'élancement).

Après cette validation, nous avons étudié la réponse cellulaire sous différentes conditions :

➤ d'une part, nous avons testé l'influence du sérum de veau fœtal (SVF) sur la lignée F-F-CRL.2703, pour des cellules exposées à une élancement de 5% et une fréquence de 0,5 Hz (30 cycles/min) pendant 24 h sur les paramètres de base : la prolifération cellulaire et la synthèse de la matrice extracellulaire (collagène de types I, III et ténascine-C, glycoprotéine spécifique des tissus ligamentaires et tendineux).

➤ d'autre part, nous avons étudié l'effet des conditions de contraintes mécaniques (0,5–1 Hz) sur deux types cellulaires pour une élancement de 5% pendant 24 h.

Ainsi que nous l'avons dit, les principaux paramètres étudiés dans nos travaux sont :

- ❖ la viabilité et la prolifération cellulaire, étudiés par :
 - test MTT pour mesurer l'activité métabolique.
 - analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.
- ❖ la synthèse et l'expression de MEC :
 - de manière semi-quantitative par une méthode de RT-PCR pour étudier l'expression d'ARNm de collagène de types I, III et de ténascine-C.
 - de manière qualitative par un marquage en immunofluorescence pour montrer l'expression de ces protéines.

La définition de ces facteurs biochimiques et mécaniques est primordiale en ingénierie tissulaire du ligament, et ils devront être pris en compte lors de la construction de bioréacteurs.

	CHAPITRE I ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES	
--	---	--

A. Le ligament

Le ligament est un tissu conjonctif dense, peu vascularisé, présent dans les articulations, et qui s'insère sur les os en les maintenant en contact (par exemple : fémur et tibia). Si l'on prend l'exemple de l'articulation du genou, on y trouve les ligaments latéraux : le ligament latéral interne et le ligament latéral externe. Au centre du genou sont situés les ligaments croisés : ligament croisé postérieur, et ligament croisé antérieur (figure I-1).

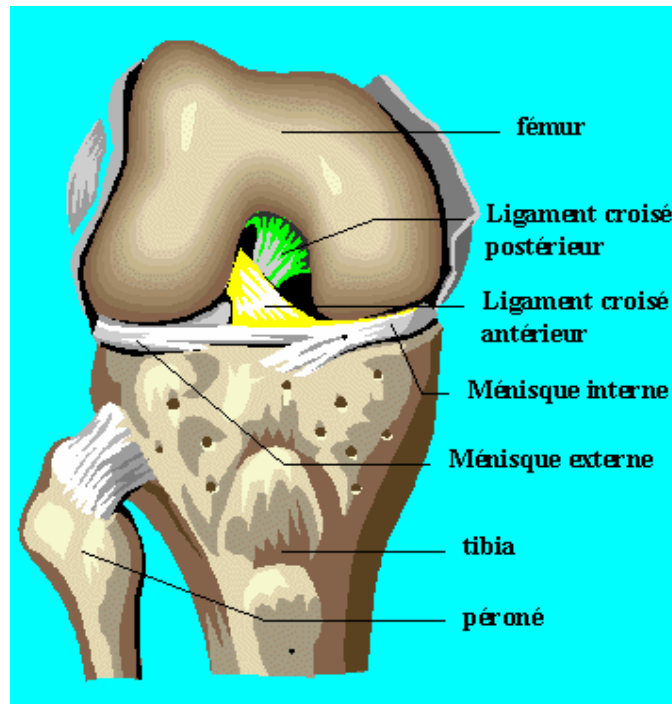


Figure I-1 : Représentation schématique d'un genou

<http://www.genou.com/Anatomiegenou.htm>

Comme tous les tissus conjonctifs du corps, les ligaments comprennent des cellules, les fibroblastes (environ 20% du volume total) et une abondante matrice extracellulaire (environ 80% de ce même volume). Cette matrice contient environ 60% d'eau et 40% de constituants solides synthétisés et sécrétés par les fibroblastes :

- a.** des collagènes (75%)
- b.** de l'élastine < 1%
- c.** des protéoglycanes
- d.** des glycoprotéines

Les faisceaux des fibres collagènes sont disposés parallèlement. Les fibroblastes sont disposés en rangées entre les faisceaux. Dans les ligaments qui subissent des contraintes mécaniques

multidirectionnelles, les fibres sont positionnées dans plusieurs directions : en parallèle, en oblique ou en spirale (figure I-2).

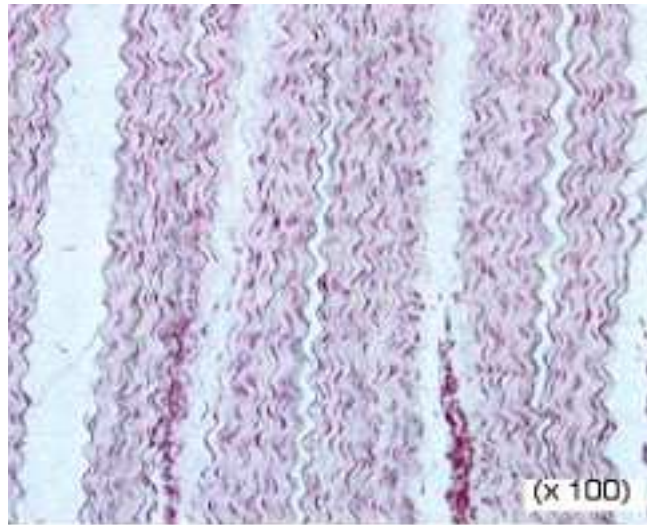


Figure I-2 : Coupe histologique d'un ligament

Au microscope, la morphologie du ligament est semblable à celle des tendons, qui permettent l'ancrage musculaire sur un os. Néanmoins, des différences biochimiques existent entre les deux. En comparaison avec le tendon, l'activité métabolique des ligaments est plus importante. Les fibroblastes ligamentaires ont un contenu plus élevé d'ADN et des quantités plus élevées de réticulation réductible entre les fibres de collagène (**Goh JC et col., 2003**). Il y a une distribution bimodale des diamètres de fibrille de collagène dans les ligaments. Le 1^{er} groupe de fibrilles présente un diamètre de 40 à 70 nm, le second, un diamètre entre 100 et 150 nm. Le ligament est entouré par une enveloppe périé-ligamentaire vascularisée. L'ensemble des caractéristiques anatomiques et morphologiques des ligaments est rassemblé dans le tableau I-I.

Les propriétés mécaniques des ligaments sont dépendantes non seulement de l'architecture et des propriétés des fibres de collagène, mais aussi de la proportion d'élastine que ces structures contiennent. L'élastine n'est guère présente dans les tendons contrairement aux ligaments, ce qui leur confère une élasticité légèrement supérieure à celle des tendons. Il a été récemment suggéré que la molécule de collagène du type III est plus flexible que la molécule de collagène du type I, suggérant également que le mélange de types de collagène change le module élastique des fibrilles de collagène (**Silver FH et col., 2002**).

Tableau I-I : Caractéristiques anatomiques et morphologiques des ligament et tendons

	Ligament (a), (b)	Tendon (c), (d)
Rôle	✓ liaison os-os ✓ stabilité mécanique des articulations ✓ guide pour le mouvement articulaire ✓ prévention de mouvement extrême	✓ liaison os-muscles ✓ transmission des forces de tension des muscles aux os ✓ permettent une distance « ventre musculaires articulation » optimale
Structure	✓ structure hiérarchique ✓ force de tension multidirectionnelle ✓ fibrille de collagène (1-20 µm)	✓ structure hiérarchique ✓ force de tension unidirectionnelle ✓ fibrille de collagène (1-300 µm)
Composition	Tissu conjonctif dense (a) A. Volume du tissu a) 20% fibroblastes b) 80% MEC B. Volume de MEC a) 70% eau b) 30% solide ✓ 75% collagènes ❖ collagène de type I (70-80%) ❖ collagène de type III, V (8-12%) ✓ élastine < 1% ✓ protéoglycanes + glycoprotéines	Tissu conjonctif dense (c) A. Volume du tissu a) 20% fibroblastes b) 75% MEC B. Volume de MEC a) 60-80% eau b) 30% solide ✓ 75% collagènes ❖ 95% collagène de type I ❖ 5% collagène de types III, V ✓ 2% élastine ✓ 1-5% protéoglycanes (décorine) < 1% glycoprotéines
Propriétés	A. alignement des fibres collagènes + - B. activité métabolique importante C. contenu plus élevé d'ADN D. réticulation réductible entre les fibres de collagène + + E. distribution bimodale des diamètres de fibrille de collagène F. cicatrisation ⇒ importance du collagène de type III	A. alignement des fibres collagènes + + B. activité métabolique faible C. contenu moins élevé d'ADN D. réticulation réductible entre les fibres de collagène + - E. Pareil F. Cicatrisation ⇒ importance du collagène de type I

(a) Goh JC et col., 2003

(b) Vunjak-Novakovic G et col., 2004

(c) Nordin M et col., 2001

(d) Silver FH et col., 2003 ; Lin TW et col., 2004

Le ligament présente une combinaison moléculaire unique de molécules, une unité de structure, des propriétés mécaniques spécifiques, mais il n'existe pas de marqueur spécifique pour distinguer le ligament des autres tissus. Le phénotype ligamentaire peut être décrit par un pourcentage différentiel de ses différents composants. De plus, les propriétés du ligament varient avec la situation anatomique, l'âge, et d'autres facteurs associés (pathologies), donc la connaissance de la structure de ligament et de ses composants est extrêmement importante dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du ligament pour la définition d'une matrice.

B. Le tendon

B-1: Description

De même que le ligament, le tendon est un tissu dense, régulièrement organisé. Sa structure se compose de longues fibres disposées de collagène. Les fibres de collagène permettent le raccordement entre les muscles et les os.

La fonction et le comportement des tendons dépendent de leurs propriétés mécaniques. Ils sont rigides lors de la tension d'un muscle et pourtant assez flexibles pour se conformer à leur environnement anatomique. Dans les tendons, qui sont essentiellement soumis à des forces de traction, les fibres de collagène sont disposées en parallèle, dans la continuité des structures conjonctives présentes dans le muscle (figure I-3). Les tendons doivent supporter de grandes forces. Chez l'homme, on a estimé que la force maximale transmise par le tendon d'Achille pendant le jogging était de 9 kN, ce qui est équivalent à 12,5 fois le poids corporel. Il s'avère que la force du tendon fléchisseur humain s'étend entre 1 et 6 N (**Wang JH, 2006**).

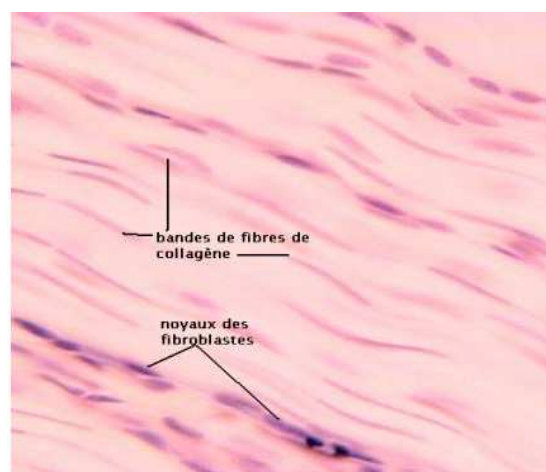


Figure I-3 : Coupe histologique de tendon

Les propriétés mécaniques du tissu tendineux peuvent être attribuées aux fibrilles parallèles du collagène qui composent approximativement 75% du poids sec du tendon

d'adulte. Les tendons humains d'adulte présentent une distribution bio-modale des diamètres de fibrille de collagène. Les diamètres moyens varient entre 60 et 175 nm. La composition structurale et biochimique du tendon diffère quelque peu de celle du ligament (tableau I-I). L'eau représente 60-80% du poids humide du tendon. Le tendon contient peu de cellules, qui sont également des fibroblastes. Le protéoglycane prédominant dans le tendon est la décorine. Bien que le collagène de type I représente environ 95% des collagènes du tendon, la présence de faibles pourcentages des collagènes des types III et V a été montré en mélange avec du collagène de type I dans une simple fibrille, suggérant ainsi que les différences spécifiques de ce tissu au niveau mécanique tiennent à ces arrangements (**Silver FH et col., 2003**).

Comme pour le ligament, l'orientation spatiale distincte des fibroblastes de tendon est associée à l'organisation des fibres de collagène dans la structure hiérarchique du tendon (figure I-4). Un tendon se compose de fascicules multiples entourés par une membrane fasciculaire. L'enveloppe des tendons se compose de deux couches, entre lesquelles se trouve le fluide synovial qui améliore la lubrification. Des tendons sont dépourvus de cette enveloppe de deux couches sont entourés par un tissu connectif lâche appelé le paratendon qui permet une liberté de mouvement plus importante (**Lin TW et col., 2004**). À l'intérieur d'un fascicule, nous trouvons un mélange des fibroblastes en position centrale et des fibrilles. Les fibrilles se composent de microfibrilles de tropocollagène (**Calve S et col., 2004 ; Pioletti DP et col., 2004**).

En raison de sa nature non vascularisée, le tendon est également un bon candidat en ingénierie tissulaire.

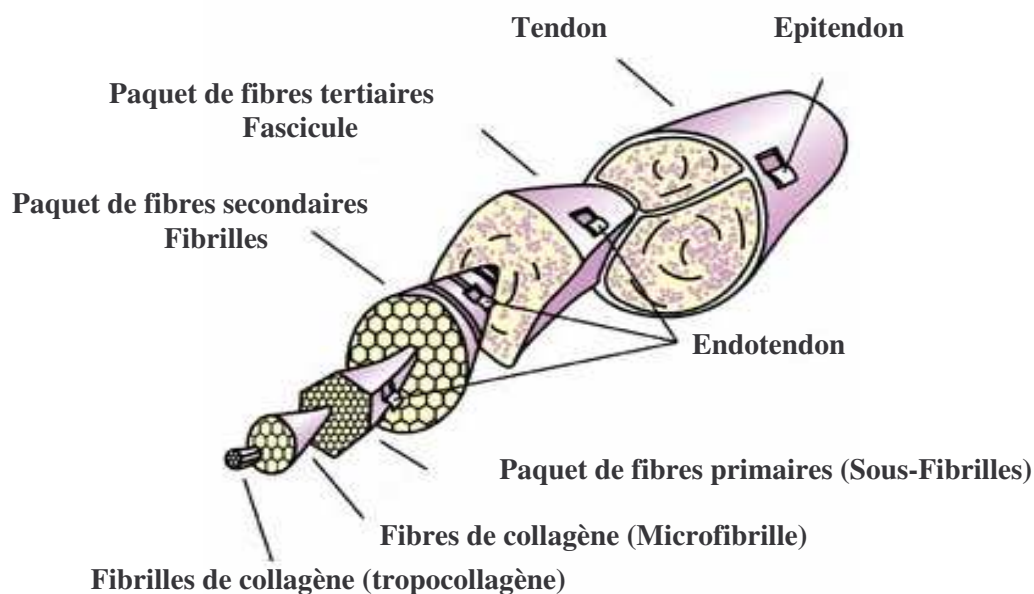


Figure I-4 : Structure hiérarchique d'un tendon

B-2 : Les constituants

B-2-1 : Les fibroblastes

Les fibroblastes sont les cellules les plus nombreuses du tissu conjonctif ordinaire. Ils proviennent d'une cellule souche mésenchymateuse multipotente qui est également à l'origine des adipoblastes, des chondroblastes, des ostéoblastes et des myoblastes. Les fibroblastes ont la capacité de se transformer en tendocytes, chondrocytes ou ostéocytes.

B-2-1-1 : Morphologie

Les fibroblastes sont des cellules fusiformes ou étoilées possédant de longs prolongements cytoplasmiques. En microscopie optique, leur cytoplasme est peu visible et seul leur noyau, ovoïde, allongé, avec un ou deux nucléoles, est bien visible. En microscopie électronique, on y décèle tous les organites cellulaires habituels et surtout, dans les fibroblastes en pleine activité, les organites impliqués dans la synthèse des protéines (collagènes...). Les fibrocytes sont des fibroblastes arrivés à maturité, ayant perdu leur capacité de synthèse. Le terme de fibrocyte désigne des fibroblastes en fin de vie qui ne sont plus capables de division cellulaire et synthétisent peu de matrice.

B-2-1-2 : Métabolisme de fibroblastes

Les fibroblastes synthétisent les macromolécules protéiques et polysaccharidiques (Protéoglycanes, Glycoprotéines...) de la matrice extracellulaire des tendons et des ligaments. Les fibroblastes sont aussi capables de sécréter des molécules (cytokines, facteurs de croissance, enzymes), impliquées dans les processus de réparation tissulaire et/ou dans l'entretien des réactions inflammatoires. Le phénotype des fibroblastes est modulable en fonction de leur degré d'activation et ils peuvent se différencier ainsi sans néanmoins présenter la plasticité des CSM (par exemple, transformation en myofibroblaste).

Ils sont le plus souvent entourés de protéines fibreuses dont ils sécrètent la molécule précurseur. Le procollagène, précurseur du collagène, la proélastine, précurseur de l'élastine, et des glycosaminoglycanes et protéoglycanes tel que la ténascine (figure I-5). En plus de la production de la matrice extracellulaire, les fibroblastes régulent également la réponse du tendon et du ligament à une contrainte mécanique (**Hsieh AH et col., 2000**).

Le rôle le plus important des fibroblastes est de réparer les lésions dues à un traumatisme. En cas d'inflammation ou autre processus dégénératif, le fibroblaste joue un rôle réparateur. Devenant mobile, il présente alors des capacités de contraction favorisant le processus de cicatrisation des plaies, en particulier via la synthèse de collagène de type III. Ce sont essentiellement les myofibroblastes qui possèdent cette capacité.

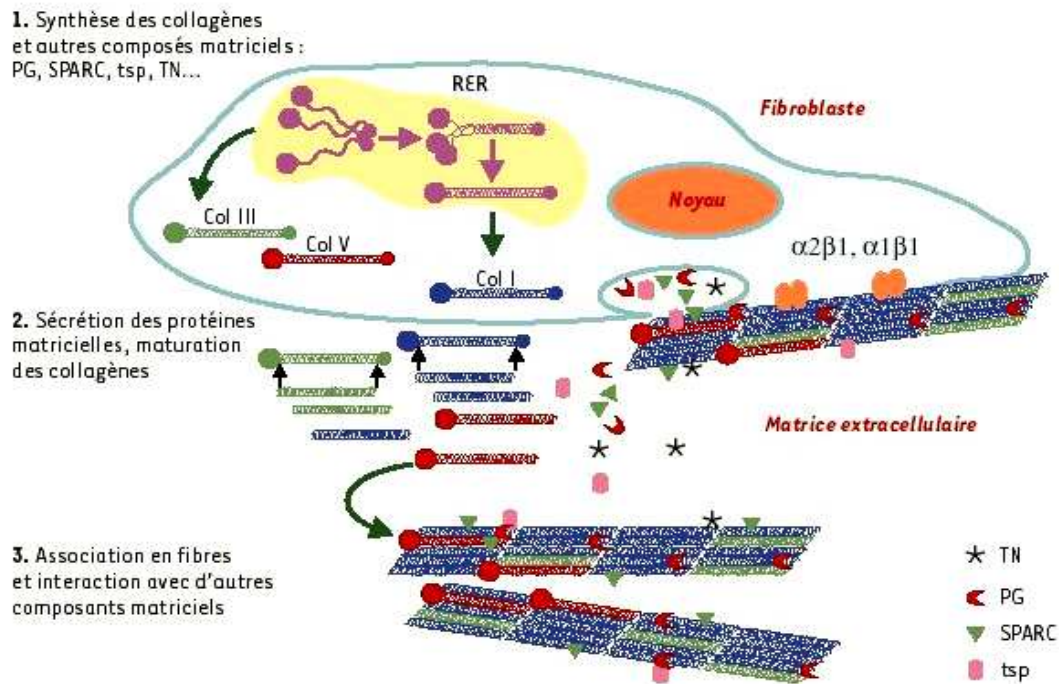


Figure I-5 : Activités de synthèse de fibroblastes. Organisation supramoléculaire des protéines matricielles dans le compartiment extracellulaire (Fichard A et col., 2003).

PG : protéoglycanes, TN : ténascine, tsp : thrombospondine, SPARC : secreted protein acidic and rich in cysteine (i.e. glycoprotéine).

B-2-2 : La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un terme collectif pour tous les composants matriciels dans l'espace extracellulaire. Il s'agit de macromolécules, produites par les cellules et sécrétées dans l'espace extracellulaire, où elles forment des interactions avec d'autres molécules. Sa fonction est importante notamment d'un point de vue mécanique.

La matrice extracellulaire du tissu conjonctif contient les fibres et la substance fondamentale amorphe :

- Fibres :
 - a. collagènes
 - b. protéines élastiques
- Substance fondamentale amorphe : protéoglycanes

Ces composés peuvent, pour la plupart, s'auto-assembler mais également interagir entre eux ou par l'intermédiaire de récepteurs, avec les cellules dans lesquelles les intégrines jouent un rôle très important. C'est grâce à cette trame de connexions que se réalise la vie cellulaire

(adhérence, morphogénèse, apoptose...) et que se forgent les caractéristiques mécaniques du tissu (solidité, souplesse...). La matrice extracellulaire n'est pas statique, elle se remodèle constamment et son homéostasie est régulée par des protéases (par exemple : les métalloprotéases MMP) (figure I-6). Il s'agit d'une vaste famille d'endopeptidases dirigées contre les différents constituants de la matrice extracellulaire. La majorité des MMPs se trouve sous forme libre dans le tissu interstitiel. Il existe cependant des MMPs qui sont des enzymes membranaires. Leur expression est stimulée par des facteurs de croissance, des cytokines, des promoteurs tumoraux et les interactions intercellulaires ou cellule-MEC. Leur activité est modulée par des inhibiteurs tissulaires spécifiques (TIMPs) (**Chiquet M et col., 2003**).

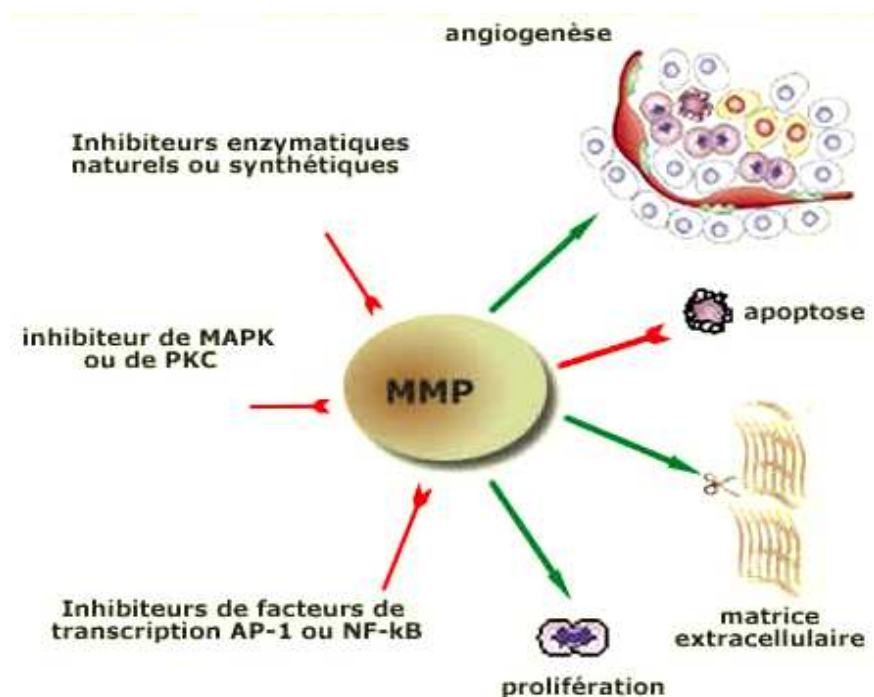


Figure I-6 : Fonctions et régulation des métalloprotéinases (Chiquet M et col., 2003)

B-2-2-1 : Les fibres

A. Les collagènes

Le collagène est le constituant majeur des structures qui servent au maintien des tissus : os, tendons, peau, ligaments, cartilage, vaisseaux sanguins et tissu conjonctif. Il fournit la solidité et il confère la forme tout en permettant la flexibilité et le mouvement ; c'est le principal élément structural des tissus, portant la tension dans les tissus mous et fournissant une plateforme pour la minéralisation dans les tissus durs qui sont soumis à la compression (**Cowin SC, 2000**).

Il existe une douzaine de types de collagène, très proches les uns des autres. Les types de collagène ont été marqués par des chiffres romains dans l'ordre de leur découverte. Ils peuvent être groupés selon leurs différences structurales.

🌈 Collagènes fibrillaires : ce sont des protéines extracellulaires constituées de trois chaînes polypeptidiques comportant au moins un domaine replié en triple hélice (300 nm de longueur, 1,5 nm de diamètre). Cette conformation caractéristique due à la présence dans la séquence primaire de chacune des chaînes d'une succession de triplets Gly-X-Y, pour lesquels X est le plus souvent représenté par une proline et Y par une hydroxyproline ou hydroxylysine (figure I-7). La glycine augmente la stabilité de la molécule en formant des liaisons hydrogène parmi les trois chaînes de la superhélice. Les collagènes fibrillaires sont synthétisés sous forme de pro-collagènes, présentant une triple hélice ininterrompue d'environ 1000 acides aminés, flanquée de deux extrémités amino- et carboxy- propeptidiques (**Silver FH et col., 2003 ; Cowin SC, 2000**). Une fois sécrétée dans la matrice, la molécule de collagène subit une excision de ces extrémités amino- et carboxy-terminales effectuée par des enzymes spécifiques, les amino et carboxy protéinases. Le collagène est toujours formé de trois chaînes entrelacées avec un pas à droite.

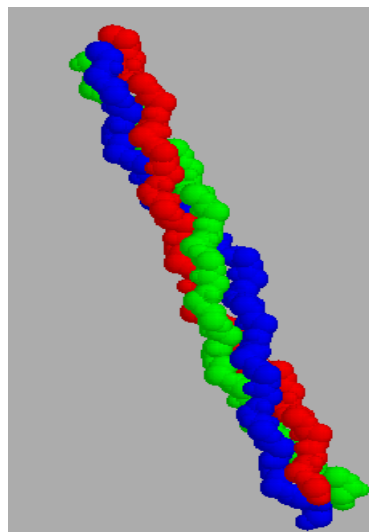


Figure I-7 : Structure de collagène en triple hélice

[www.biochimie.univ-montp2.fr/.../ str_2re.htm](http://www.biochimie.univ-montp2.fr/.../str_2re.htm)

Les collagènes de types I et III sont les principaux types de collagènes trouvés dans les matrices de tissu conjonctif. Les collagènes de type I peuvent se trouver dans les tendons, les ligaments, les os, la peau, le cartilage fibreux. Le collagène de type II est surtout présent dans le cartilage hyalin et élastique et il est utilisé comme un marqueur phénotypique du chondrocyte.

Les collagènes de type III apparaissent dans des tissus comme les artères, le foie, la rate, le ligament, dans différentes proportions. Le collagène de type III est un collagène qui apparaît précocément dans le processus de cicatrisation, en raison de ces liaisons de types «ponts disulfures» qui se forment rapidement. C'est cette structure chimique qui donne à la nouvelle matrice ses propriétés mécaniques, notamment sa résistance (**Ge Z et col., 2006 ; Eckes Bet col., 2000 ; Woo SL et col., 1999 ; Cheung DT et col., 1983**).

🧩 Collagènes non fibrillaires : ces sont des collagènes qui ne forment pas eux-mêmes de structures supramoléculaires, mais sont souvent intégrés avec des collagènes fibrillaires d'autres types. Ils contiennent également un domaine court sans triple hélice. Pour cette raison, ils sont considérés comme associés aux fibrilles de collagènes. Ce sont les collagènes de type VI, X, XII, XIX.

🧩 Autres types de collagènes : ils forment des assemblages non fibrillaires comme des feuilles ou réseaux (collagènes types IV, VIII, X) ou des billes de microfilaments (collagènes type VI), ainsi que des fibrilles d'ancrage qui peuvent contribuer à l'adhésion à la membrane basale (collagène type VII) (tableau I-II).

Les contraintes mécaniques peuvent influencer l'expression du type de collagène dans différentes situations physiologiques (**Liu SH et col., 1995**). Les modifications histologiques sont corrélées avec une modification des propriétés mécaniques (**Amiel D et col., 1982 ; Woo SL et col., 1982**). L'exercice physique ou l'immobilisation peuvent avoir un impact sur la structure anatomique des ligaments et des tendons (**Michna H et col., 1989**).

Tableau I-II : Différents types de collagène et répartition en fonction du tissu.

	Type	Forme polymérisée	Représentation
Fibrilles	I	Fibrilles	Os, peau, tendon, ligament, cornée, organes internes, cartilage fibreux, disque intervertébral
	II	Fibrilles	Cartilage (élastique et hyalin), corps vitré de l'œil
	III	Fibrilles	Hypoderme, vaisseaux, cheveux, ligament
	V	Fibrilles (avec type I)	Voir type I
	XI	Fibrilles (avec type II)	Voir type II
Associé aux fibrilles	IX	Connection latérale aux fibrilles de type I	Cartilage
	XII	Connection latérale aux fibrilles de type II	Interagit avec les types I et III.
Réseau	IV	Réseau	Lamina basale
	VII	Fibrilles d'ancrage de la membrane basale	Sous épiderme pluristratifié

<http://www.unifr.ch/histologie/elearningfree/francais/bindegewebe/sfa/f-sfa.php>

Les fibres de collagènes sont très résistantes à la traction : dans le tendon elles peuvent supporter une traction de 500-1000 kg/cm². Elles sont légèrement extensibles, mais pas élastiques. Leur disposition ondulée et croisée dans le tissu conjonctif permet toutefois une certaine élasticité et mobilité.

Dans une fibre de collagène, il y a de nombreuses fibrilles constituées par des microfibrilles (figure I-8).

En microscopie électronique, elles montrent une striation caractéristique (= 67 nm), qui est la conséquence de l'arrangement périodique des molécules de tropocollagène et assure la limite d'élasticité.

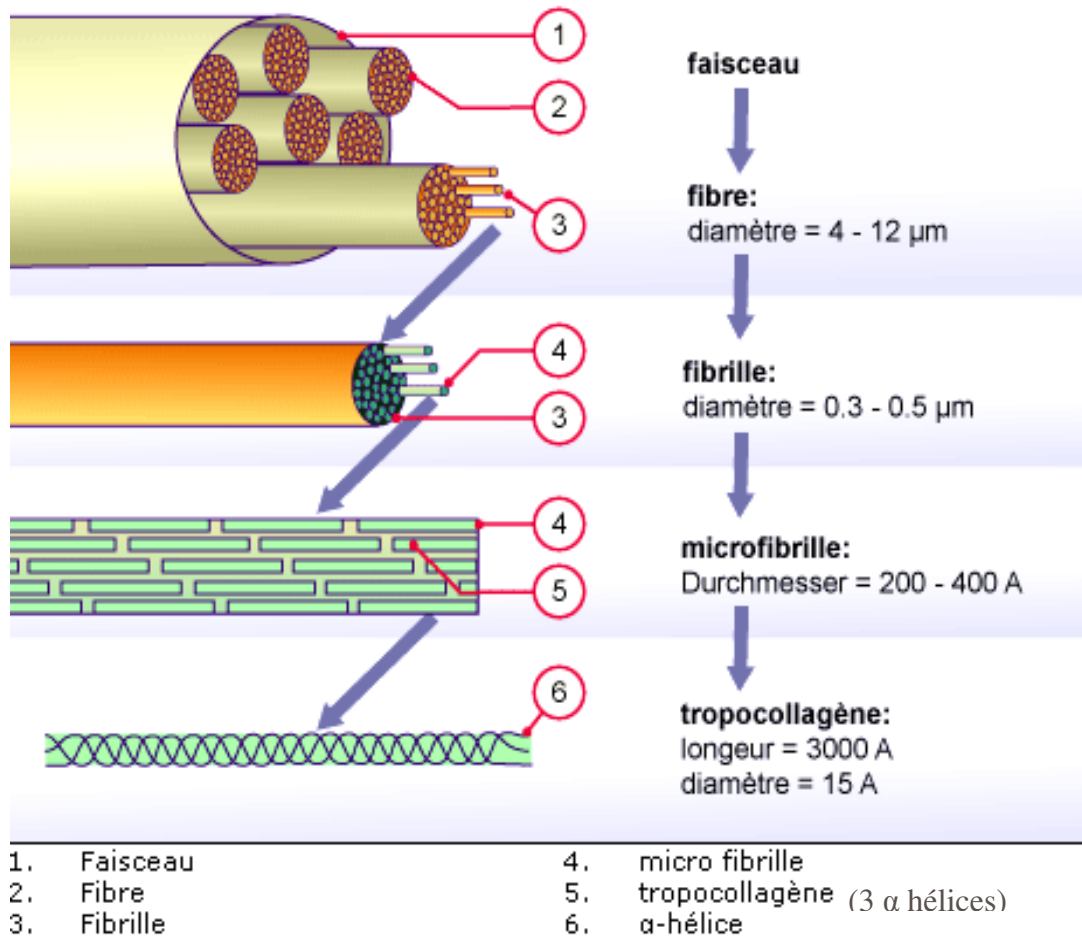


Figure I-8 : Organisation des faisceaux de collagènes

<http://www.unifr.ch/histologie/elearningfree/francais/bindegewebe/sfa/f-sfa.php>

B. Les fibres élastiques

Les fibroblastes synthétisent de l'élastine et différents types de fibrillines. Les élastines sont des protéines organisées en fibres, qui confèrent l'élasticité et la solidité aux tissus. L'assemblage de ces différents constituants s'effectue à l'extérieur du fibroblaste, mais à proximité immédiate de la membrane plasmique, souvent dans une véritable gouttière ménagée par celle-ci. La synthèse de ces différents éléments est complexe et fortement contrôlée par le fibroblaste. La sécrétion vers le site d'assemblage est contrôlée par des protéines chaperonnes.

L'élastine est synthétisée sous forme de monomères de tropoélastine, entre lesquels il y a des ponts stabilisants de desmosine et d'isodesmosine. La tropoélastine, primitivement soluble, est rendue insoluble au cours de l'assemblage des fibres élastiques par des réactions

d'oxydation effectuées par la lysyl-oxydase. Cette enzyme fait apparaître des pontages entre les molécules d'élastine adjacentes (figure I-9).

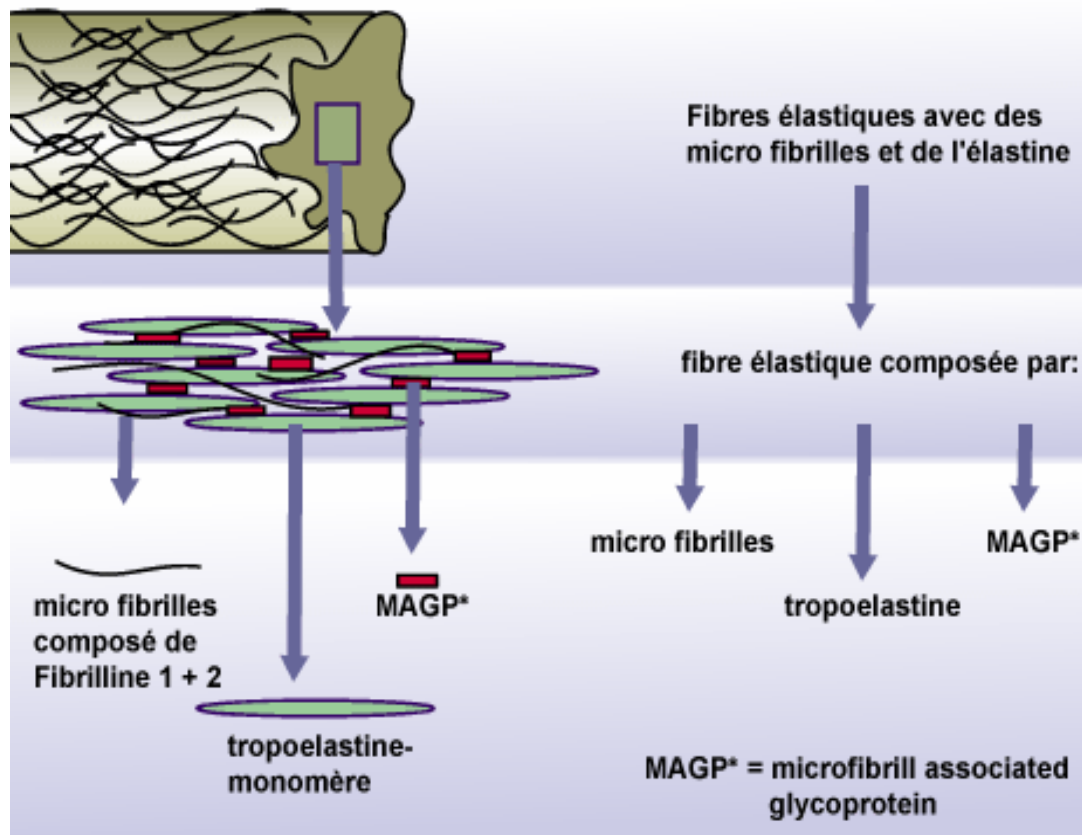


Figure I-9 : Formation des fibres d'élastine

<http://www.unifr.ch/histologie/elearningfree/francais/bindegewebe/sfa/f-sfa.php>

En résumé, les fibres de collagène assurent la résistance à l'étirement et aux tractions, tandis que les fibres élastiques assurent le retour à la configuration de base après un étirement mécanique, en se ramifiant et se rejoignant. En fait, les fibres sont enroulées de façon aléatoire à l'état relâché et se modifient après chaque étirement. Elles confèrent une résistance au tissu et peuvent être étirées jusqu'à 120 à 150% de leur longueur initiale par des forces relativement faibles (20-30 Kg/cm²) et reprennent passivement leur longueur initiale dès que la traction s'arrête sans se déchirer, permettant la dilatation et l'expansion du tissu en se rétractant (figure I-10).

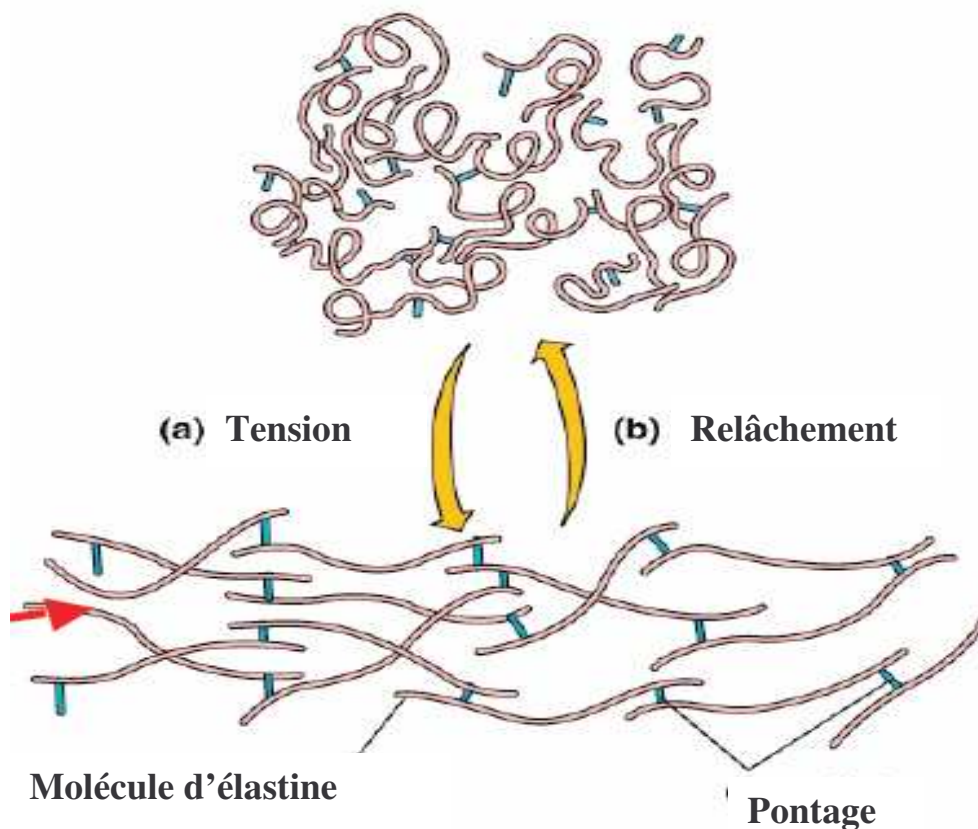


Figure I-10 : Les fibres d'élastine-Etats fonctionnels
a) sous étirement, b) état relâché. (Alberts B, 2002)

B-2-2-2 : Les glycoprotéines

Les glycoprotéines sont des hétéroprotéines dont une partie est constituée d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés, mais sur laquelle ou lesquelles viennent se greffer par des liaisons covalentes des chaînons constitués de plusieurs oses ou dérivés d'oses (oligosaccharides ou glycanes). Les glycoprotéines ont des rôles divers, elles se lient non seulement aux autres constituants de la matrice cellulaire mais aussi à la surface des cellules.

1. Les **fibronectines (FN)** : la fibronectine (du latin *fibra* = fibre ; *nectere* = relier) est une glycoprotéine de grande taille dont il existe plusieurs iso-formes. Ce sont des dimères, chaque chaîne est constituée en 2500 acides aminés. Ce sont des protéines solubles multiadhésives dans la matrice extracellulaire, qui se joignent aux intégrines (protéines de liaison membranaire à 2 sous-unités α et β et des composants de la matrice extracellulaire

(collagène I, protéoglycanes...) et servent à l'attachement des cellules aux fibrilles de collagènes (types I, II, III et V), ainsi qu'à la **fibrine** (par exemple : formation de thrombus).

Le domaine aminoterminal est capable de lier plusieurs catégories de macromolécules (fibrine, héparine) ainsi que les staphylocoques. Le domaine suivant assure la liaison du collagène (gélatine), puis un autre domaine contribue à l'attachement cellulaire par son motif RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser), qui est reconnu par les intégrines des cellules eucaryotes. Les deux domaines carboxy-terminaux reconnaissent l'un l'héparine et l'autre la fibrine (figure I-11).

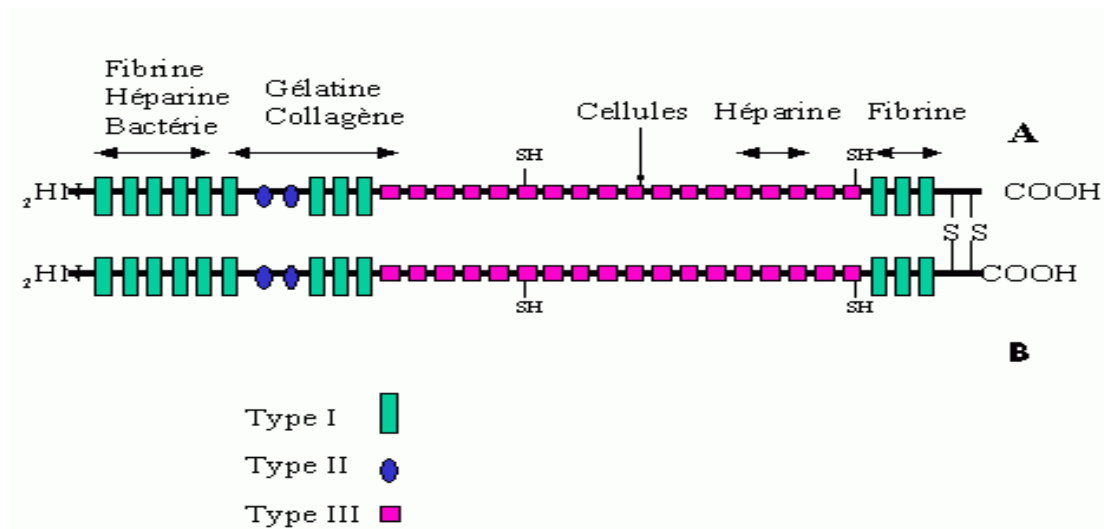


Figure I-11 : Structure de la fibronectine humaine

www.unige.ch/.../BisognanoC/these_body.html

La fibronectine est présente sous forme soluble (sécritée par les hépatocytes et les cellules endothéliales) dans les liquides de l'organisme et sous forme insoluble dans la MEC, où elle est sécrétée par les cellules mésenchymateuses, les fibroblastes et par certaines cellules épithéliales. En association avec des intégrines, elle assure des liaisons indispensables pour contrôler l'adhésion, l'agrégation, l'étalement et la motilité cellulaire dans un environnement matriciel.

La fibronectine, en plus de son rôle de molécule majeure de l'adhérence cellulaire avec le tissu conjonctif, intervient dans la communication cellulaire. La liaison fibronectine-intégrine membranaire peut activer des voies de transduction du signal (via des protéines kinases et le cytosquelette) modifiant le comportement cellulaire (par exemple : prolifération, différenciation, motilité). Ainsi, la fibronectine joue un rôle fondamental au cours de

l'embryogenèse et dans de multiples processus physiologiques (cicatrisation, hémostase, angiogenèse) ou pathologiques (inflammation, cancérogenèse) (**Chiquet M et col., 2003**).

2. **Les ténascines** : sont des protéines anti-adhésives qui interfèrent avec l'attachement des cellules à la fibronectine et à d'autres substrats de la matrice en changeant la structure des points d'adhésions focaux du cytosquelette (**Orend G col., 2000**). La ténascine-C (ténascine-cytotactine, TN-C) appartient à une famille de glycoprotéines oligomères qui contiennent cinq membres connus, les ténascines C, R, X, Y, W (**Chiquet ER et col., 1994 a**). Ces dernières ont été découvertes au début des années 1980. Le nom de ténascine a été proposé, car il désigne le rôle d'une protéine anti-adhésive. La TN-C forme un hexamère résultant de la liaison de six monomères par des ponts disulfures (**Mackie EJ, 1997**).

Chaque monomère de TN-C est constitué de différents domaines à structures répétées (figure I-12) :

- i. un domaine N-terminal (AT) riche en cystéines permettant l'assemblage en hexamère.
- ii. une série répétitive (14,5) de type EGF (*epidermal growth factors*).
- iii. une série répétitive analogue aux modules de la fibronectine de type III (FNIII) dont certains peuvent être alternativement épissés (chez l'homme et chez la souris).
- iv. un globe C-terminal (GF) similaire aux chaînes β et γ du fibrinogène.

Divers types cellulaires ont la capacité de synthétiser la ténascine-C, mais les modes d'expression changent. Ainsi, elle est fortement exprimée pendant l'embryogenèse et transitoirement exprimée pendant l'organogenèse. Elle est absente ou faiblement exprimée dans les organes développés, mais réapparaît dans des conditions pathologiques causées par des infections, des inflammations ou pendant la tumorigenèse (**Chiquet ER, 2004 ; Chiquet ER et col., 2003**).

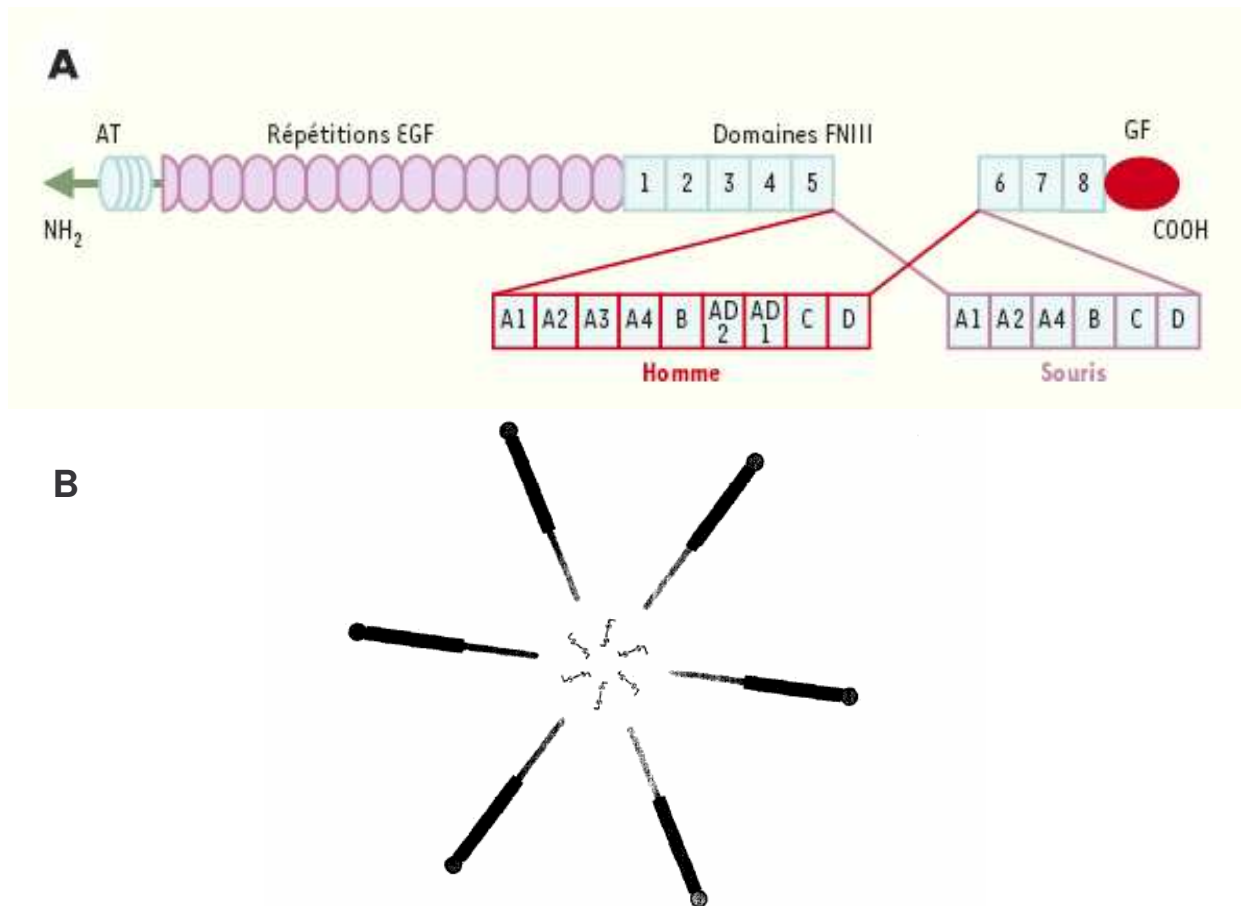


Figure I-12 : La Ténascine-C

(A) Représentation schématique d'un monomère de ténascine-C

(B) Structure d'un hexamère de ténascine-C

La ténascine-C est exprimée constitutivement dans quelques tissus connectifs, tels que **les os, les tendons, les ligaments** (Mackie EJ, 1994). L'induction de l'expression de la ténascine-C est également sensible aux contraintes mécaniques (Chiquet M et col., 2003 ; Fluck M et col., 2000 ; Chiquet ER et col., 1994b). C'est une des raisons pour laquelle l'expression de la ténascine-C est continue dans le tendon et les jonctions myotendineuses. *In vitro*, les cellules peuvent exprimer la ténascine-C après exposition aux facteurs de croissance et aux hormones, par exemple : les fibroblastes expriment la TN-C en réponse à des facteurs associés à l'inflammation et à la cicatrisation, comme le *transforming growth factor-β* (TGF-β), le *basic fibroblast growth factor* (bFGF) et l'*Interleukin-1* (IL-1) (Chiquet ER et col., 1995). Dans notre travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la ténascine-C car elle est considérée comme un marqueur phénotypique spécifique de fibroblastes ligamentaires.

B-2-2-3 : Les protéoglycanes (PG)

Les protéoglycanes sont formés par l'association covalente entre des chaînes de glycosaminoglycannes (GAG) et une protéine porteuse. La partie prédominante glucidique, liée à une partie protéique moins importante, est constituée de glycosaminoglycannes.

Les PG ont des propriétés modulatrices multiples :

- ☞ ils modulent l'espace hydrique extracellulaire et sa viscosité
- ☞ ils interagissent avec les facteurs de croissance
- ☞ ils se lient à de nombreuses protéases ou à des inhibiteurs de protéases pour les inactiver
- ☞ ils interagissent avec les protéines fibreuses de la matrice
- ☞ ils régulent la biodisponibilité de protéines extracellulaires

Le tendon contient une variété de PG comprenant la décorine (un petit PG riche en leucine) qui se lie spécifiquement aux composants matriciels comme le collagène de type I (**Scott JE, 1993**), ainsi que des autres petits PG riches en leucine comme le biglycane, la fibromoduline (**Silver FH et col., 2003**). Leur charge négative élevée leur permet de retenir de grandes quantités d'eau.

B-2-3 : Propriétés mécaniques du ligament et du tendon

En raison de leur position anatomique et de leur structure, les ligaments transmettent la charge avec un minimum de perte d'énergie et de déformation. Le tendon ou le ligament présentent un comportement particulièrement élastique tant que la contrainte n'excède pas 4% (**Woo SL et col., 1982**). Ceci peut être illustré par la courbe de contrainte-déformation du tendon (**Best TM et col., 1994**) .

Sur la figure I-13, on distingue quatre domaines de déformation qui rendent compte de la structure complexe du matériau. La partie initiale de la courbe, la partie concave, est nommée zone **I**, ou zone de réarrangement tissulaire. Cette partie de la courbe est le résultat du caractère ondulé du faisceau de fibres de tendon : les fibres de collagène commencent à s'organiser dans les sens de mise sous tension entre 1,5 à 4%. Après la zone **I**, le tendon montre une réponse relativement linéaire à l'effort (zone **II**). Les fibres du tendon deviennent parallèles. Elles perdent leur aspect ondulé. La pente de la courbe dans cette zone permet de calculer le module élastique, ou module d'élasticité de Young

$$E = \sigma / \epsilon$$

où σ est la contrainte (N/m²), ϵ la déformation ($\Delta L/L_0$)/%

La micro rupture des fibres se produit à la fin de cette zone linéaire de charge. Au-delà de la limite d'élasticité, le ligament entre dans le domaine plastique (zone **III**), où les déformations sont irréversibles. Cette zone correspond aux contraintes de 4 à 8%.

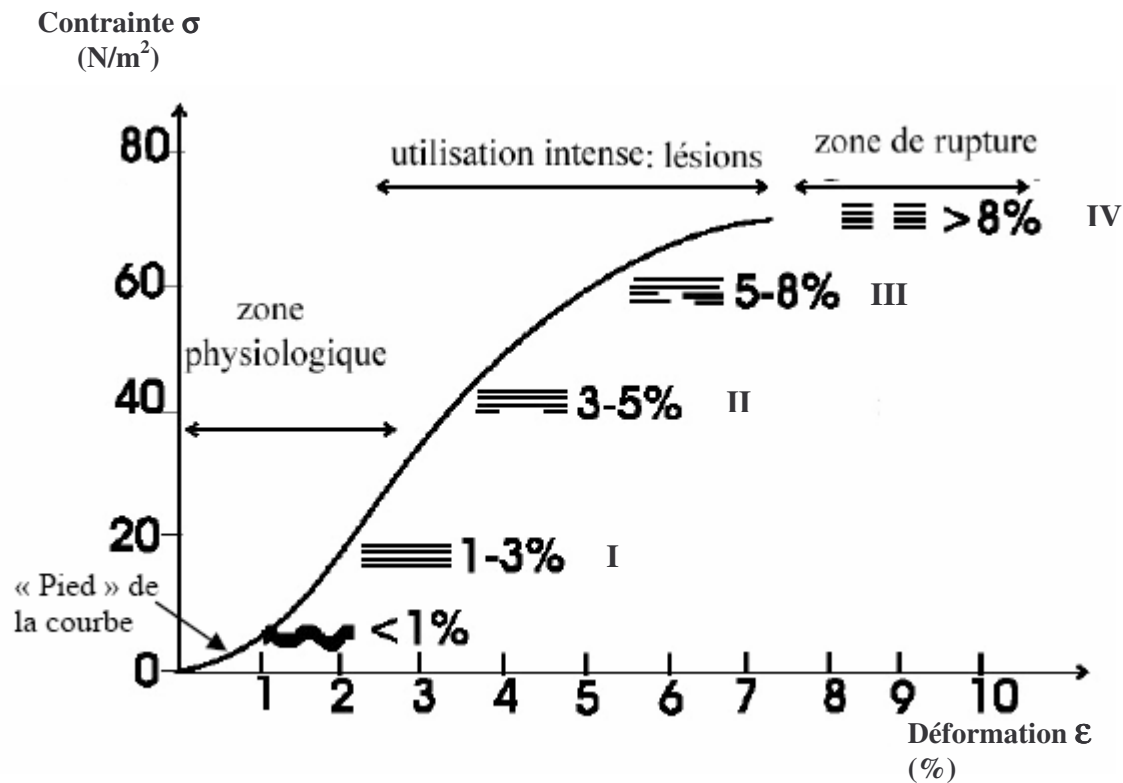


Figure I-13 : Courbe de tension de contrainte-déformation du tendon

Dans la zone **IV**, le ligament pénètre dans la zone de surcharge qui amène une déchirure complète et la perte totale de sa capacité à résister à une force appliquée. La rupture se produit en raison du défaut de déformation de fibres et de cisaillement entre les fibres.

Les propriétés mécaniques de ces tissus ont été modulées en fonction de la morphologie et de la structure hiérarchique des fibres de collagène. En outre, plusieurs études ont montré le rapport entre morphologie et restauration des propriétés mécaniques dans la cicatrisation du tendon (**Franck CB et col., 1996, 1992**).

Les expériences sur des animaux prouvent que la résistance à la traction, la rigidité élastique, et le poids total du tendon peuvent augmenter après des séances progressives d'exercice physique (Woo SL et col., 1980 ; Archambault JM et col., 1995). Ces considérations soulignent la nécessité d'une approche en mécanobiologie et l'apport des contraintes mécaniques en ingénierie tissulaire pour améliorer la composition moléculaire et la structure hiérarchique des fibres de collagène pour aboutir à un biomatériau fonctionnel.

C. Pathologie du ligament et du tendon

Les pathologies du ligament et du tendon sont multiples. Bien que la plupart du temps le traitement puisse être simple, certaines restent problématiques. Parmi les lésions non irréversibles, nous pouvons citer :

❖ **lésion tendineuse :**

De nombreux facteurs peuvent être plus ou moins directement impliqués dans la survenue des tendinites : mouvement répétitif sur utilisation.

- le tendon d'Achille est le plus gros et le plus solide tendon de l'organisme. Il relie le mollet à la partie osseuse arrière du pied. Le traitement passe par **un repos** d'un mois et demi qui va permettre aux fibres lésées de cicatriser ⇒ **cicatrisation possible**.

- le tendon rotulien et le tendon du quadriceps : ils assurent la relation entre la partie charnue située sur l'avant de la cuisse (le quadriceps) et la jambe. Ces tendons s'insèrent sur le haut du tibia par-dessus la rotule. Leur inflammation est favorisée par les exercices provoquant des tensions importantes du quadriceps. Les soins ne nécessitent pas forcément un repos complet. Une activité physique peut continuer si elle n'engendre pas de douleurs. Sinon, les étirements et les soins de **kinesthésie permettent de supprimer la pathologie**.

- Tendon de la coiffe des rotateurs : (ensemble de tendons jointifs qui recouvrent la tête de l'humérus). Leur action est essentielle pour la fonction de l'épaule. **Une rééducation préalable au geste chirurgical est impérative** et donne des résultats meilleurs chez des sujets jeunes.

❖ **lésion ligamentaire :**

➤ lésions des structures latérales :

- ligament latéral interne (LLI) et ligament latéral externe (LLE) : ils sont tendus longitudinalement du fémur au tibia au niveau de la face interne ou externe du genou. Ils assurent la stabilité latérale du genou. Le diagnostic est essentiellement clinique et nécessite rarement la réalisation d'exploration complémentaire, **ces ligaments cicatrisent facilement**.

➤ lésion de pivot central :

- ligament croisé postérieur (LCP) : situé au centre du genou, c'est un ligament puissant qui s'oppose au déplacement vers l'arrière du tibia par rapport au fémur. La rupture de ligament croisé postérieur (LCP) **est rare**, car le LCP est un ligament plus épais et plus résistant. Une fois déchiré, ce ligament ne cicatrise pas. Cependant, **la réparation chirurgicale n'est pas toujours nécessaire**, car il est souvent possible de reprendre des activités normales, y compris sportives, grâce à une bonne rééducation.

En revanche, il existe aussi des lésions irréversibles :

- ligament croisé antérieur (LCA) : il joue un rôle fondamental dans l'articulation du genou. Dans la grande majorité des cas, **ce ligament a peu de capacité à cicatriser spontanément**, c'est la raison pour laquelle, contrairement à d'autres ligaments, **une reconstruction ligamentaire est nécessaire**.

Nous nous sommes attaché donc plus particulièrement à cette pathologie grave survenant chez les jeunes sportifs et nous détaillerons donc ci-dessous ses caractéristiques et ses pathologies afférentes. (<http://www.genou.com/sommaire2.htm>)

C-1 : Ligament croisé antérieur (LCA)

C-1-1 : Anatomie

Le ligament croisé antérieur (LCA) est situé au centre du genou (il fait partie du "pivot central"). Placé dans l'échancrure du fémur, véritable cavité au milieu du genou, il est oblique vers le haut, vers l'arrière et en dehors (figure I-14). Le ligament croisé postérieur est situé juste en arrière du LCA. Ces deux ligaments sont "croisés" l'un par rapport à l'autre : lorsque le tibia effectue un mouvement de rotation en dedans, ils ont tendance à s'enrouler ensemble.

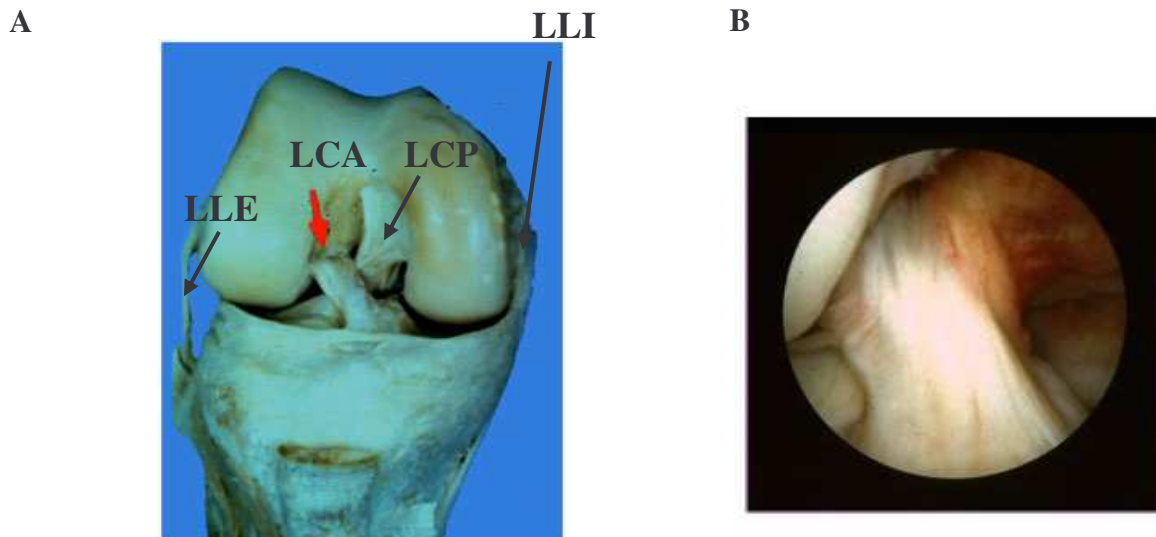


Figure I-14 : (A) : Ligament du genou (vue schématique en arthroscopie)

(B) : Aspect en arthroscopie du ligament croisé antérieur normal

LCA = Ligament croisé antérieur, **LCP** = Ligament croisé postérieur, **LLE** = Ligament latéral externe, **LLI** = Ligament latéral interne

Les dimensions d'un ligament croisé antérieur humain sont d'environ 30 à 38 mm de long et de 10 à 13 mm de large (Vunjak-Novakovic G et col., 2004). La charge maximale

d'un LCA humain (de 16 à 26 ans) est à peu près de 1,7 kN. Le LCA résiste à une charge cyclique de 0,3 kN et il est régulièrement exposé aux charges de 67 N (descente d'escalier) à 0,63 kN (jogging). Les fibres ondulées de LCA permettent l'extension de 7 à 16% avant une déformation permanente ou une altération. La géométrie complexe et la fonction de LCA sont en partie responsables de la difficulté rencontrée pour développer un remplacement chirurgical approprié.

C-1-2 : Rôle

Le LCA commande le mouvement en reliant le fémur au tibia et en stabilisant l'articulation. Ses fonctions principales sont de soutenir et de renforcer le genou.

Comme tout ligament, le LCA stabilise l'articulation. Au niveau du genou, il y a plusieurs ligaments, et chacun a une action bien spécifique. Mais le rôle du LCA est double :

⇒ d'avant en arrière, il s'oppose à la translation antérieure du tibia par rapport au fémur : il empêche ainsi un mouvement de " tiroir antérieur " du tibia par rapport au fémur.

⇒ dans le sens des rotations, le LCA s'oppose à la rotation interne du tibia par rapport au fémur, du fait de sa direction, et de son enroulement autour du ligament croisé postérieur (figure I-15).



Figure I-15 : Rotation du genou. La rotation interne excessive du tibia par rapport au fémur peut entraîner une rupture du LCA

La rupture du LCA n'a pas de conséquence sur les mouvements du genou dans l'axe flexion-extension. En revanche, le genou n'est pas protégé dans les mouvements de rotation, de torsion : c'est le cas des rotations du corps, pieds bloqués au sol.

Au niveau de la stabilité fonctionnelle du ligament, l'organisation hélicoïdale des fibres de collagène est essentielle. Pendant la flexion du genou (~ 140° en extension/flexion), le mode d'attachement est le résultat d'une torsion de 90° du LCA et des faisceaux de fibres périphériques. Pendant la flexion, les fibres du LCA restent isométriques et permettent une distribution égale de charge dans tous les faisceaux de fibres. Cette caractéristique particulière permet au LCA de supporter une charge importante au cours de tous les mouvements du genou (**Vunjak-Novakovic G et col., 2004**).

C-1-3 : Structure

Il n'y a pas de marqueur unique pour le fibroblaste de LCA. L'intégrité du ligament natif ou pathologique est évaluée en fonction de combinaison de facteurs :

- ❖ les composants de la matrice extracellulaire (collagènes de types I et III, élastine, fibronectine, décorine, et biglycane) (**Lo YY et col., 1998 ; Arnoczky SP, 1996**).
- ❖ les ratios relatifs de collagène de type I et de type III (~88% type I : 12% type III) (**Lo YY et col., 1998**). Le pourcentage de collagène de type III est plus important dans ce ligament que dans d'autres tissus similaires. Le LCA contient légèrement moins de collagène de type I et 1/3 de plus de collagène de type III, une plus grande concentration de GAG, et une proportion plus élevée sur les réticulations réductibles de collagène que le LLI.
- ❖ la morphologie cellulaire avec une zone distinctive du ligament (**Murray MM et col., 2004**).
- ❖ l'ultra-structure du réseau de collagène (par exemple, modèle de *crimp* (les fibrilles de collagène dans les ligaments montrent un changement périodique de la direction), les diamètres des fibres de collagène dont le diamètre varie entre 20 et 175 nm) (**Arnoczky SP, 1996**).

Les études sur la stimulation mécanique de fibroblastes de LCA suggèrent que les collagènes de type I et type III, la ténascine-C et la vimentine répondent à la stimulation mécanique (**Eckes B et col., 1998 ; Toyoda T et col., 1998**).

Le ligament latéral interne (LLI) est extra-articulaire, mince, plat, et soutenu par les tissus mous qui l'entourent et vascularisé. En revanche, le ligament croisé antérieur (LCA) a une structure intra-articulaire composée de paquets contournés, et entourés par la membrane synoviale et le liquide synovial, peu vascularisé et présente donc une capacité de régénération moindre (**Amiel D et col., 1995 ; Lee J et col., 1995**).

D. Pathologie du ligament croisé antérieur (LCA) - Traitement

La rupture du ligament croisé antérieur (LCA) du genou est liée à l'activité sportive dans 85% des cas (football, ski, rugby, handball, etc.) : il s'agit d'une lésion fréquente, invalidante, évolutive. La rupture ligamentaire peut également survenir lors de classiques entorses du genou, lors d'un contact appuyé (plaquage au rugby, choc au foot ...) en valgus et rotation externe, en varus et rotation interne.

La rupture du ligament croisé antérieur s'observe très souvent dans un contexte sportif alors que le quadriceps est fortement contracté (réception d'un saut, shoot dans le vide...). Le traitement chirurgical (devenu fiable depuis plus de 15 ans) et la kinésithérapie ont une place essentielle. La rupture ou lésion totale du ligament croisé antérieur chez le jeune sportif nécessite, la plupart du temps, un traitement chirurgical. Le traitement peut être conservateur (non chirurgical) chez des patients sans ambition sportive, plus âgés. La rupture du ligament peut se compliquer de lésions méniscales. Dans la mesure du possible, il faut chercher à reconstruire le ligament croisé antérieur avant d'avoir des lésions méniscales ou du cartilage. Cependant, en cas de lésion méniscale associée, le traitement chirurgical consiste en une suture de la lésion méniscale associée à la reconstruction du ligament (tableau I-III). L'évolution d'une lésion non traitée chez le jeune sportif peut amener à une *arthrose* (usure du cartilage), 20-30 ans après la rupture initiale. Plus de 200 000 ruptures de LCA se produisent aux Etats-Unis tous les ans (Weitzel PP et col., 2002).

Tableau I-III : Traitements du LCA-avantages et inconvénients

Traitement	Avantages	Inconvénients
Traitement Fonctionnel	Évite l'intervention chirurgicale Pas de complication En cas d'échec, possibilités de chirurgie secondaire	Pas de réparation du LCA Ne permet pas la reprise de tous les sports Entretien musculaire à effectuer
Traitement Chirurgical	Réparation du LCA Permet la reprise de tous les sports Traitement définitif	Geste chirurgical avec risques opératoires Complications possibles En cas d'échec, chirurgie complexe

La cicatrisation du tendon et du ligament peut être divisée en trois phases (**Laurencin CT et col., 2005 ; Woo SL et col., 1999**) :

- **Inflammation**

L'inflammation se produit dans les 72 h après la lésion. Pendant cette étape, le fluide séreux s'est accumulé dans le ligament et les tissus environnants ainsi que le secteur endommagé deviennent fragiles, les macrophages, les monocytes, les leucocytes migrent à l'emplacement de la blessure. Le macrophage est responsable de la phagocytose des tissus nécrotiques. Les macrophages sécrètent également de multiples types de facteurs de croissance qui induisent une néo-vascularisation. Trois jours après la lésion, l'emplacement de la blessure contient des plaquettes, des macrophages, des leucocytes polynucléaires, des lymphocytes, et des cellules mésenchymateuses multipotentes. Les plaquettes libèrent du PDGF, du TGF- β , et du EGF. Les macrophages produisent du bFGF, du TGF- α , du TGF- β et du PDGF. Ces facteurs de croissance ont non seulement une action chimiotactique vis-à-vis du fibroblaste et d'autres cellules, mais stimulent également la prolifération de fibroblastes et la synthèse du collagène de types I, III, V et de protéines non collagéniques.

- **Prolifération cellulaire et réparation de la matrice**

Durant l'étape de la prolifération cellulaire et de la réparation de la matrice, les fibroblastes sont présents et le tissu vasculaire est formé. Le contenu total de collagène est plus important que dans le ligament normal avec un rapport collagène III-collagène I élevé, mais la concentration en collagène est inférieure et la matrice reste désorganisée. Cette étape dure typiquement six semaines.

- **Remodelage**

Cette étape dure plusieurs mois, pendant lesquels la nouvelle matrice extracellulaire se forme dans le tissu hyper-cellularisé et légèrement désorganisé. La matrice devient plus dense et est orientée longitudinalement. Le contenu en eau, le rapport du collagène de type I à type III commencent à s'approcher de la valeur normale. Le tissu guéri continue à évoluer pendant plusieurs mois, mais n'atteindra jamais des caractéristiques morphologiques et des propriétés mécaniques normales. La guérison du ligament est limitée par le manque de vascularisation. La cicatrisation optimale est réalisée quand la continuité des fibres de collagène est maintenue. En raison du manque d'organisation du tissu et de différences dans le modèle «*crimp*» entre la nouvelle et l'ancienne matrice extracellulaire, le nouveau tissu cicatriciel a des propriétés mécaniques différentes et entraîne une réduction des propriétés mécaniques du LCA (**Laurencin CT et col., 2005 ; Segawa H et col., 2001**).

Depuis les années 80, la communauté orthopédique de la médecine du sport considère les dommages du LCA comme une cause importante d'incapacité sportive.

La cicatrisation des ligaments et des tendons est donc aléatoire et est affectée par des facteurs spécifiques et environnementaux (Yoshida M et col., 1999 ; Amiel D et col., 1995) :

- les facteurs spécifiques du ligament incluent :
 - les propriétés cellulaires
 - les réponses cellulaires aux facteurs de croissance
 - la densité cellulaire
- les facteurs environnementaux de ligament incluent :
 - la vascularisation
 - la nutrition
 - les forces mécaniques
 - le fluide synovial
 - l'approvisionnement en facteurs de croissance

D-1 : Autogreffe

En raison des difficultés pour trouver un donneur compatible en vue d'une allogreffe, on a développé l'autogreffe où le malade est à la fois donneur et receveur (figure I-16).

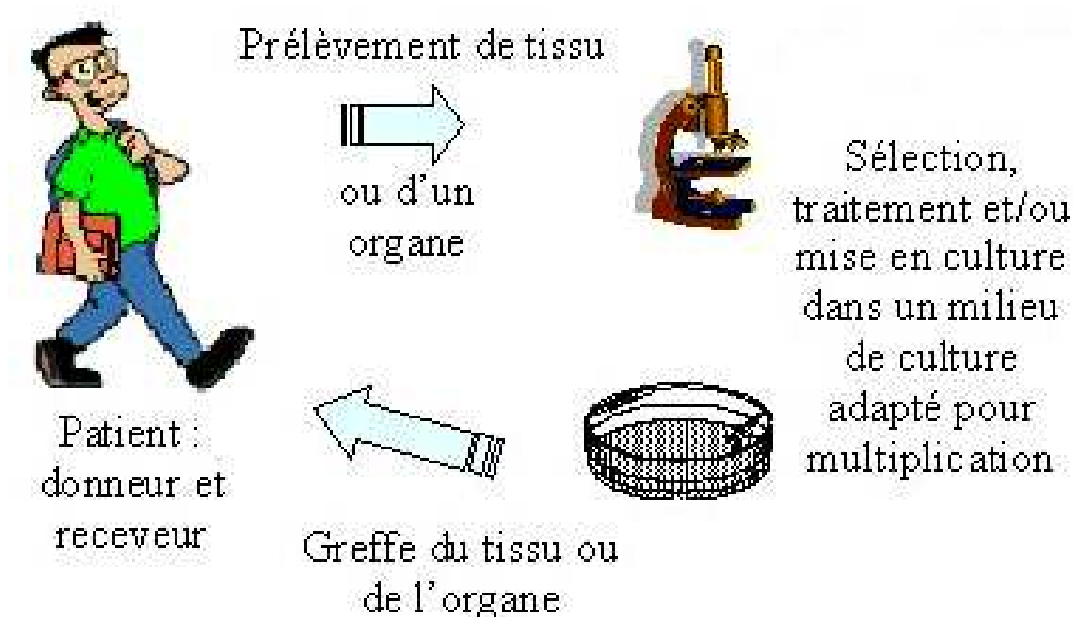


Figure I-16 : Schéma représentatif du principe de l'autogreffe

Ceci implique de prélever un tissu d'un endroit chez le patient et de le transplanter dans une autre partie du même patient. En utilisant les greffes autologues, on obtient de meilleurs résultats cliniques puisqu'on évite le rejet. Cependant, l'autogreffe a plusieurs inconvénients tels que les coûts chirurgicaux augmentés par le prélèvement, les infections, les douleurs et la perte de sang exigeant une transfusion sanguine qui s'accompagne de risques à la transfusion, ainsi que la morbidité de la zone donneuse.

Au début du XXI^{ème} siècle, les chirurgiens orthopédiques peuvent utiliser un tissu auto-génique pour reconstituer l'articulation du genou chez un pourcentage élevé de patients qui retrouvent pour la majorité leur niveau initial d'activité sportive. Les techniques chirurgicales utilisées pour reconstruire le ligament croisé antérieur du genou sont pratiquées sous arthroscopie. Dans la plupart des cas, il est possible d'utiliser une greffe autologue (c'est-à-dire un tendon du même patient) : les greffes les plus utilisées sont le tiers moyen du tendon rotulien, les tendons de la patte d'oie (droit interne et demi-tendineux). Ce tendon est positionné en lieu et place du ligament croisé antérieur rompu (position anatomique). Le transplant ainsi choisi est fixé au niveau du fémur et du tibia à l'aide des vis d'interférences ou autres systèmes de fixation. Parfois, dans des laxités évoluées ou chez des "sportifs à risque", une plastie d'addition extra-articulaire complémentaire s'avère nécessaire pour protéger la greffe.

(http://www.orthopedie.com/ligament_croise_anterieur/index.htm)

L'autogreffe d'os-tendon rotulien-os fournit une excellente stabilité. Cependant, d'un point de vue mécanique, le tendon de os-tendon rotulien-os est plus fort (2,9 kN) et plus raide (685 N) que le LCA natif (**Newton PO et col., 1990 ; Noyes FR et col., 1984**). Elle offre l'avantage de la cicatrisation os-os, qui peut se produire plus rapidement que la cicatrisation du tendon à l'os.

Cependant, les inconvénients des greffes de tendon rotulien sont :

- ☞ une augmentation de la morbidité d'emplacement de greffes
- ☞ une diminution de force mécanique de quadriceps
- ☞ une plus grande prédominance de douleur antérieure de genou
- ☞ une douleur du rotulien persistante et une éducation prolongée (**Dunn MG et col., 1995**).

D-2 : Allogreffe

Le tissu ou les organes d'un donneur sont transplantés à un patient. Tandis que la technologie de transplantation a spectaculairement progressé au cours du temps avec l'arrivée des médicaments anti-rejet, le problème immédiat est le manque de donneurs. Par exemple, en 1998, il y avait 22170 greffes d'organe aux Etats-Unis, mais 4855 patients morts tout en attendant les organes de donneurs compatibles. Des allogreffes du tendon d'Achille peuvent être réalisées pour remplacer les LCA et sont insérés et fixés avec les mêmes techniques que celles employées pour des autogreffes.

Les allogreffes de tendon rotulien portent le risque de transmission de maladies, hépatite et HIV. Les infections bactériennes sont également un risque et peuvent avoir comme conséquence, la perte de la greffe et entraîner la survenue d'arthrite (**Barbour SA et col., 2003**).

Les allogreffes représentent un travail intensif et un coût financier important. Elles sont un bon choix quand il y a une limitation dans la disponibilité du tissu d'un patient. Les reconstructions multiples compliquées de ligament ayant besoin de plusieurs greffes (par exemple : des reconstructions simultanées de LCA et de LCP après un genou disloqué) exigent l'utilisation du tissu d'allogreffe en plus d'une autogreffe.

L'autogreffe de tendon de quadriceps est moins fréquente, mais elle a montré d'excellents résultats cliniques avec une basse morbidité (**West RV et col., 2005**). Cependant, aucune technique reconstructive n'a prouvé sa supériorité dans la stabilité fonctionnelle, la prévention d'ostéoarthrite, ou le taux de complication. Aucune greffe n'a été prouvée supérieure aux autres options (**Woo SL et col., 2000**).

D-3 : Matériaux synthétiques

Vers la fin des années 70 et le début des années 80 la communauté orthopédique a essayé des produits de remplacement de LCA dans le but de retrouver une haute résistance, une mobilisation immédiate, et un retour plus rapide à l'entraînement pour un sportif. Les ligaments synthétiques sont habituellement répartis en trois catégories. Nous ne ferons que citer, dans chaque catégorie, les ligaments les plus couramment utilisés :

- **prothèses ligamentaires :**
 - Dacron[®] (polyester)
 - Goretex[®] (polytétrafluoroéthylène PTFE)
- **prothèses de substitution réhabitables :**
 - Fibre de carbone

➤ **ligaments de renfort :**

- Ligament Augmentation Device (polypropylène) (LAD)

Parmi les propriétés mécaniques des prothèses ligamentaires (tableau I-IV), seules la résistance à la rupture est avantageuse. Elle est toujours supérieure à celle du ligament croisé antérieur. Par contre, les ligaments synthétiques pèchent par une déformation élastique insuffisante et inférieure à celle du LCA ainsi que par une rigidité supérieure à celle du LCA (résistance des objets à la déformation/variation de la charge).

Tableau I-IV : Propriétés mécaniques des matériaux synthétiques utilisés pour le remplacement de ligament-comparaison avec le LCA

Matériaux synthétiques	Résistance à la rupture (N)	Raideur (N/mm)	Déformation élastique %	Marque
Gore-Tex®	5300	322	9	W.L. Gore & Assoc., Inc., Flag Staff, AZ
Dacron®	3631	420	18,7	Meadox Medicals, Oakland, NJ
Fibre de carbone	660	230×10^9 (2,1-2,3 Pa)	1	Osteonic Biomaterials (formerly Hexcel Medical), Livermore, CA
LAD	1730	56	22	3M Orthopedic Prod., St. Paul, MN
LCA	740 à 1700	129 à 182	20 à 25	

LAD = Ligament Augmentation Device

LCA = Ligament croisé antérieur

Sur 855 ligaments prothétiques relevés pendant 15 années (40 à 78%), un fort taux d'échecs dus aux débris d'usure, aux réactions tissulaires et à la limitation mécanique a été observé (**Frank CB et col., 1996**). La pose d'un ligament synthétique est particulièrement instructive dans la perspective des travaux en ingénierie tissulaire. Ces prothèses permanentes ont été conçues pour avoir une haute résistance à la rupture afin de résister à des contraintes mécaniques cycliques continues.

De même, les matrices utilisées en ingénierie tissulaire de ligaments doivent avoir une résistance initiale, mais sont conçues pour que les contraintes soient transférées graduellement sur le tissu réformé.

✓ **Le ligament croisé antérieur en Gore-Tex®** est une prothèse faite d'un fil simple de polytétrafluoréthylène (PTFE) enroulé dans des boucles multiples. Le fil est tissé dans un multifilament formé de trois paquets avec des oeillets de fixation à chaque extrémité du ligament. Ce type de prothèse a été implanté dans le monde entier à plus de 18000 patients (McCarthy DM et col., 1993). Ces prothèses sont prévues pour fonctionner efficacement et accélérer la mobilisation et le retour à l'activité.

✓ **Le ligament en Dacron®** a été conçu comme prothèse hybride pour faire face aux problèmes de rigidité rencontrés aux taux de rupture élevés dans les dispositifs précédents. La prothèse de Dacron se compose d'un noyau de quatre bandes étroitement tissées qui sont emballées par une douille du velours lâchement tissée de Dacron, qui favorise l'incarnation abondante de tissu. La résistance de ce dispositif est supposée être suffisante pour résister à l'effort et à la fatigue (Richmond JC et col., 1992).

✓ **Le dispositif de fibres de carbone** a été conçu comme une matrice qui favorisait l'incarnation rapide du nouveau collagène du tissu fibroblastique et produirait le nouveau collagène (McCarthy DM et col., 1993). Les prothèses en fibre de carbone sont formées de 40000 fibres de carbone en deux ou trois paquets tordus en parallèle, recouverts avec de la gélatine médicale biodégradable.

✓ **Le dispositif de Kennedy Ligament-Augmentation Device®**, il s'agit d'une tresse de polypropylène de 8 mm de large et de 1mm d'épaisseur. Cette tresse est thermocollée aux 2 bouts et existe en plusieurs longueurs. Le LAD est constitué de 9 torons de 180 fibres de polypropylène et résiste à une force de traction de 1,75 kN. Il a été conçu pour fournir une protection à la partie faible de quadriceps de tendon rotulien autogreffé en utilisant une reconstruction supérieure aussi bien qu'à la réparation primaire du LCA. Cependant, ce dispositif a présenté un taux élevé de complication dans les reconstructions primaires de LCA (jusqu'à 63%).

Les echecs des prothèses ligamentaires souvant liées à deux grandes causes : mécaniques et biologiques.

➤ **Les causes mécaniques :**

Elles se traduisent par la réapparition d'une laxité ; en l'absence d'une exploration complémentaire (imagerie, arthroscopie ou chirurgie), il n'est pas toujours facile de différencier la rupture et la distension (**Fu FH et col., 1996**), sauf en considérant l'aspect radiographique des inserts métalliques inclus dans la prothèse.

La rupture des ligaments synthétiques est le plus souvent consécutive à leur abrasion contre les reliefs osseux. La résistance à l'abrasion ne peut être estimée comme une propriété mécanique. Pourtant, elle est le principal point faible de ces ligaments artificiels, comparativement à un ligament sain ou à un transplant biologique. L'abrasion responsable des ruptures secondaires peut se produire au contact de la berge antéro-externe de l'échancrure inter-condylienne (**Fu FH et col., 1996**) ou au contact de l'émergence intra-articulaire des tunnels osseux, principalement du tunnel fémoral (**Howell SM et col., 1992**). Elle confère une sensibilité toute particulière des ligaments synthétiques au positionnement des tunnels avec un risque accru d'échec en cas d'erreur (**Howell SM et col., 1993 ; Kdolsky R et col., 1993**). Les autres causes mécaniques d'échec sont dues à la fatigabilité des structures, qui apparaît lors des tests de fatigue prolongés (**Gillquist J et col., 1993**), et par la perte de l'intégrité textile due aux infiltrats tissulaires et collagéniques (**Richmond JC et col., 1992**).

➤ **Les causes biologiques :**

La première cause biologique d'échec des prothèses ligamentaires, habituellement associées à leur faillite mécanique, ou aggravée par elle, est la synovite réactionnelle (**Christel P., 1994 ; Makisalo S et col., 1988**).

Le taux de synovite varie. Dans la littérature, selon la prothèse considérée : de 0 à 14% pour le LAD, de 5 à 12% pour le Goretex, de 2 à 26% pour le Dacron, de 20 à 40% pour le carbone. **Olson** a par ailleurs insisté, dès 1988, sur l'effet délétère sur le cartilage des particules d'usure des ligaments synthétiques. Synovites et lésions cartilagineuses font toute la gravité des échecs des ligaments synthétiques (**Olson EJ et col., 1989**).

Les avantages et les inconvénients de ces prothèses ont été présentés dans le tableau I-V.

Tableau I-V : Information sur les prothèses utilisées pour le remplacement du ligament

	Avantages	Inconvénients
Gore-Tex®	Haute résistance de rupture, débris particuliers limités	Difficulté de se lier au tissu ; effilage au niveau du tunnel osseux ; longévité
Dacron®	Haute résistance de rupture	Rupture de l'insertion fémorale ou tibial ; rupture de l'organisme central ; élongation de ligament
Fibre de carbone	Matériel synthétique	Réponse étrangère de corps dans le synovial ; matière particulière
LAD	Protège la greffe pendant la maturation	Réaction inflammatoire ; taux élevé de complications

Nombreuses sont les études qui défendent les prothèses ligamentaires en se référant à un taux d'échecs mécaniques comparable à celui des transplants biologiques. Il apparaît donc que les greffes ou les prothèses ne représentent pas une réponse satisfaisante aux pathologies ligamentaires. **Une autre alternative est représentée par l'ingénierie tissulaire.**

E. Ingénierie tissulaire du ligament

L'ingénierie tissulaire attire de plus en plus l'attention de chercheurs et d'ingénieurs de formations d'origines différentes et présente des intérêts scientifiques et des retombées économiques très importants (estimation à 50 milliards d'euros à l'horizon 2020). Son objectif est de régénérer, à partir de cellules différenciées ou de cellules souches adultes, des tissus naturels afin de remplacer des tissus ou des organes déficients ou inopérants. Cette technique peut être considérée comme la troisième voie de thérapie en médecine régénératrice après les deux principales thérapies existantes : transplantation d'organes et chirurgie reconstructrice. C'est une voie alternative qui devrait permettre d'éviter certains problèmes rencontrés par les techniques classiques de réparation, en particulier le manque de donneurs, une médication immunosuppressive permanente. Elle ne nécessite pas l'implantation de matériaux artificiels qui peuvent présenter une biocompatibilité médiocre. L'ingénierie tissulaire offre de nouvelles voies thérapeutiques prometteuses en orthopédie, notamment

dans les domaines de la réparation ligamentaire ou cartilagineuse (**Tabata Y, 2004, 2003 ; Weitzel PP et col., 2002**).

Aujourd'hui, l'ingénierie tissulaire basée sur la manipulation des cellules et de leur environnement biochimique et biomécanique, offre un grand potentiel pour la réparation de ligaments. En effet, le développement des connaissances sur les cellules, et de la biomécanique-bioingénierie (effets des contraintes mécaniques sur les cellules et les tissus) laisse envisager de «construire» des tissus *in vitro* au laboratoire. Ainsi la culture *in vitro*, dans une matrice tridimensionnelle, de cellules prélevées chez le patient conduit à la formation d'un nouveau tissu capable de suppléer biologiquement et mécaniquement le ligament ou le tendon.

Les cellules sont importantes pour la production du nouveau tissu par la synthèse de matrice extracellulaire et elles sont responsables à long terme de la stabilité de cette matrice (**Altaman GH et col., 2002a ; Bonassar LJ et col., 1998**).

Les matrices fournissent la stabilité mécanique à court terme de la greffe. Ainsi, l'interaction matrices/cellules, l'adhérence de cellules sur la surface de la matrice, la maturation des cellules, la production de la matrice extracellulaire, et la prolifération cellulaire sont toutes importantes pour le succès de la construction d'un tissu (**Schultz O et col., 2000**).

L'utilisation de matériaux biodégradables permet d'éviter les difficultés associées à l'implantation permanente d'un matériau synthétique *in vivo* (infections, inflammation chronique). Les matrices peuvent influencer ou même réguler le phénotype de cellules. Ainsi, les matrices spécifiquement conçues sont des outils fondamentaux dans l'application de l'ingénierie tissulaire (**Ringe J et col., 2002**).

Dans l'ingénierie tissulaire, les matrices prétraitées par des cellules *in vitro* soit *in vivo*, servent de tuteur : le matériel porteur fournit la stabilité mécanique et assure une matrice tridimensionnelle permettant le développement de cellules (**Bonassar LJ et col., 1998**). Ainsi, l'utilisation des matériaux biodégradables est préférable.

Cependant, il est nécessaire de prendre en compte tous les paramètres qui permettent aux cellules de développer un phénotype propre à chaque tissu, tant du point de vue biochimique que mécanique. En effet, une des propriétés fondamentales des tissus vivants est leur adaptation à l'environnement et aux mouvements (Principe de Roux, 1880). Ces mouvements sont à l'origine de contraintes mécaniques plus ou moins intenses sur l'organisme et constituent a fortiori des stimuli responsables entre autres de la modification du comportement biologique des cellules. Il est maintenant admis que les contraintes mécaniques ont un retentissement sur la fonctionnalité et le métabolisme cellulaire, conduisant ainsi à un

remodelage tissulaire adapté. En effet, cette mécano-activation cellulaire déclenche une cascade de réactions en chaîne, ou processus de mécano-transduction, qui constitue un signal d'adaptation cellulaire et tissulaire.

Les modifications induites par les forces mécaniques (pression, cisaillement, élongation) sont maintenant considérées comme déterminantes dans la compréhension de nombreux mécanismes physiopathologiques (arthrose, inflammation, thrombose, athérosclérose...) mais également dans le déroulement des reconstructions tissulaires.

Cependant, il est nécessaire de prendre en compte certains paramètres incontournables qui permettront la formation d'un nouveau tissu, en favorisant la synthèse matricielle, la prolifération cellulaire tout en conservant, au long de sa formation, des caractéristiques mécaniques fonctionnelles du tissu en formation (figure I-17) :

- ❖ les cellules
- ❖ les matrices 3D
- ❖ les conditions biochimiques
- ❖ les conditions mécaniques

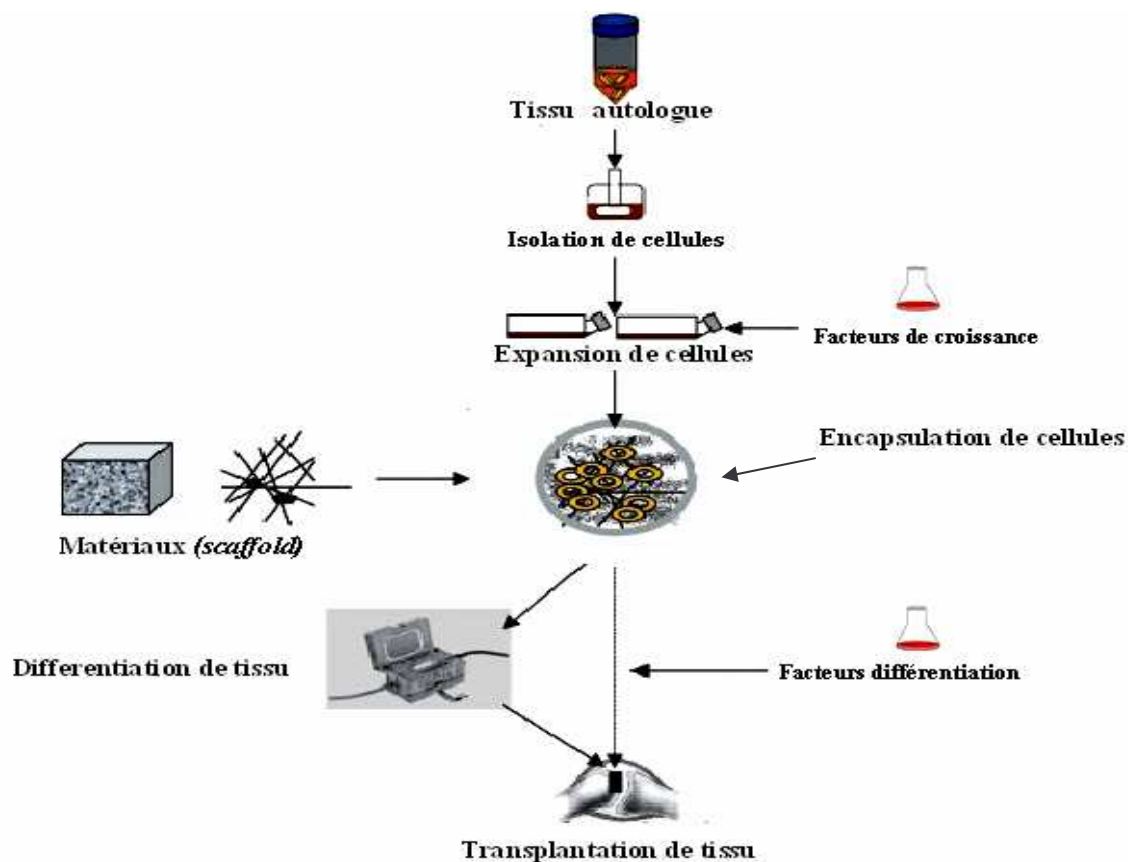


Figure I-17 : Ingénierie tissulaire - procédé général

E-1 : Les source de cellules

L'idéal est que le patient soit traité avec ses propres cellules pour éliminer les risques associés à l'utilisation des allogreffes (problèmes immunitaires, transmissions de maladie). Les fibroblastes de LCA sont connus pour répondre aux facteurs spécifiques de croissance, aux stimulations mécaniques, et aux tensions statiques (**Murray MM et col., 2000 ; Desrosiers EA et col., 1995**).

Les recherches sur des lignées cellulaires de fibroblastes ont été faites avec l'idée que ce sont des cellules différenciées possédant les caractéristiques phénotypiques nécessaires pour la synthèse de collagène (MEC) et donc la formation d'un néo-tissu ligamentaire. La prolifération et la fonction de fibroblastes sont dépendantes des substrats de culture et de l'origine du fibroblaste. Des études ont montré que les fibroblastes de tendon rotulien (TR) prolifèrent plus vite que les fibroblastes de LCA (**Dunn MG et col., 1995**). Il a été également montré que les fibroblastes de LCA et LLI cultivés dans une matrice synthétique biodégradable ont une capacité de proliférer rapidement. Cette prolifération a été augmentée par l'association de contraintes mécaniques et l'addition de TGF- β 1 (**Lin VS et col., 1999**). Des études récentes ont été réalisées sur différents types de fibroblastes (LCA, LLI, TA, TR), et ont montré que les fibroblastes de LCA sont les cellules les plus appropriées pour l'ingénierie tissulaire du ligament (**Cooper JA Jr et col., 2006**).

Cependant, bien que les fibroblastes maintiennent plusieurs qualités phénotypiques nécessaires pour la synthèse de collagène, ils sont relativement quiescents et ils ont un potentiel limité pour favoriser la différenciation (**Van Eijk F et col., 2004**).

Une autre source de cellules peut également être envisagée :

- les cellules souches mésenchymateuses (CSM), présentes dans la moelle osseuse.

Il a été montré que les CSM adulte peuvent se différencier en différents types de cellules comme les ostéoblastes, les chondroblastes, les adipocytes, et les cellules myocardiques, (**Fuchs E et col., 2000 ; Gage FH, 2000**). Des travaux ont montré que les CSM semblent être des cellules utilisables pour l'étude et le développement ultérieur d'ingénierie tissulaire de ligament (**Ge Z et col., 2005 ; Van Eijk F et col., 2004**).

Bien que les cellules souches soient toutes une source prometteuse en thérapie cellulaire, et avant que les CSM puissent être utilisées dans la régénération de tissu, il y a quelques problèmes à résoudre au niveau de leur application en clinique (**Tsutsumi S et col., 2001**) :

- difficulté d'isolation et d'expansion, due au faible pourcentage (< 2%) de ces cellules dans la moelle osseuse ou dans le sang
- contrôle de la différenciation

▪ la cellule souche embryonnaire (CSE) peut être prometteuse parce qu'elle est biologiquement plus jeune que les cellules souches mésenchymateuses. Les CSE possèdent théoriquement des potentiels intacts de se différencier dans tous les types cellulaires présents dans le corps. Cependant, l'utilisation de ces cellules pose des problèmes éthiques. De plus, elles peuvent dériver un processus tumoral (Vats A et col., 2005 ; Evans M, 2005).

E-2 : Les biomatériaux (*Matrice*)

La matrice idéale doit être biocompatible avec la source de cellules, tout en tenant compte de l'adhérence et la prolifération cellulaire. Dans le cas de tissus soumis à des contraintes mécaniques importantes, tels que le ligament, le cartilage..., les propriétés mécaniques des matrices sont à prendre en considération ce matériau servant de «tuteur» durant le temps nécessaire à la reconstruction d'une matrice fonctionnelle. La structure de la matrice (*scaffold*), ainsi que l'ensemble de ses propriétés (mécaniques, porosité) sont déterminantes dans le transport moléculaire et le transfert des signaux mécaniques et biochimiques donc des phénomènes de mécano transduction.

E-2-1 : Caractéristiques de la matrice

Les caractéristiques matricielles sont les suivantes :

E-2-1-1 : Biocompatibilité

La matrice doit être biocompatible étant donné qu'elle seraensemencée par des cellules vivantes telles que des fibroblastes (Yannas IV, 2001). La biocompatibilité est liée à la fois au matériau en lui-même mais aussi à son procédé de fabrication (des traces de solvant pouvant induire une réponse de la part des cellules).

E-2-1-2 : Porosité

La matrice doit posséder une haute porosité et présenter une importante interconnexion entre les pores afin de permettre la diffusion des nutriments et la migration des cellules. De même le rapport aire surfacique/volume doit être le plus élevé possible, présentant une large surface pour les interactions cellules/matrice (Atala A et col., 1997). Une taille de pore de 100 à 200 µm est adéquate pour l'adhésion et la migration cellulaire (Zeltinger J et col., 2001).

E-2-1-3 : Propriétés mécaniques

Etant donné que les stimulations mécaniques peuvent induire la différenciation des cellules, la matrice doit pouvoir supporter des déformations cycliques allant jusqu'à 10% et

posséder une récupération suffisante pour limiter son allongement durant les cycles de fatigue (Altman GH et col., 2002b).

E-2-1-4 :Durée de dégradation

Une matrice idéale devrait totalement se dégrader afin de permettre d'une part l'expansion du tissu et d'autre part, d'obtenir après la culture dans le bioréacteur, un tissu ligamentaire naturel. Ainsi la durée de dégradation requise dépend essentiellement du temps de culture nécessaire à la synthèse du tissu ligamentaire. Le temps de culture d'un tel tissu peut nécessiter plusieurs mois.

Pour résumer, il convient de trouver un matériau biocompatible, de mise en forme aisée, possédant une porosité supérieure à 90%, résistant à la fatigue mécanique, et dont la dégradation est lente.

Aujourd'hui, des polymères de suture biorésorbable sont utilisés comme matrices dans les nouvelles stratégies en ingénierie tissulaire ou la réparation et la régénération du ligament. Les polymères biodégradables synthétiques sont biocompatibles et disponibles dans le commerce. Ils peuvent être mis en forme de manière tridimensionnelle, avec une structure et une porosité variable, et présentent une grande envergure de propriétés mécaniques et leur dégradation peut être contrôlée (Hutmacher DW, 2000). Des matériaux biodégradables tels que le collagène, la chitine, le poly- ϵ -caprolactone, l'acide polylactique (PLA), et l'acide polyglycolique (PGA) ont été utilisés dans la préparation de telles matrices (Awad HA et col., 2000 ; Von den Hoff JW, 2003 ; Ouyang HW et col., 2002c, 2003). Pour choisir un polymère ou un co-polymère approprié pour l'ingénierie tissulaire du ligament, il est nécessaire de comprendre l'influence de la chimie des polymères sur la viabilité, la croissance, et la fonction des cellules (Saltzman WM, 2000). Il est important de noter que les propriétés mécaniques de biomatériaux dépendent du poids moléculaire des polymères.

E-2-2 : Les polyesters

Le premier critère de sélection est bien entendu la biocompatibilité. Ainsi il convient de se diriger vers les matériaux qui sont déjà connus et admis pour être biocompatibles et c'est le cas notamment de la famille des polyesters aliphatiques mais aussi du collagène déjà utilisé par plusieurs laboratoires dans le domaine de l'ingénierie tissulaire (Chen G et col., 2003 ; Lee CR et col., 2002). Cependant le collagène présente des désavantages tels que la nécessité d'être isolé à partir de tissu humain ou animal aboutissant alors à de grandes variations dimensionnelles d'un lot à l'autre. De plus, **le collagène présente une mise en œuvre**

complexe. C'est pour cela qu'on s'oriente vers l'utilisation de polymères synthétiques et biodégradables, qui, en sus d'être moins chers, permettent une bonne reproductibilité du procédé de fabrication. Le large éventail des procédés de fabrication permet l'ajustement des propriétés mécaniques, de la porosité et de la géométrie de la matrice.

Dans la famille des polyesters aliphatiques, plusieurs polymères se distinguent par leur utilisation comme matériel de suture biorésorbable. L'acide polylactique (PLA) et l'acide polyglycolique (PGA) ainsi que leurs copolymères : l'acide lactique-co-glycolique (PLGA) ont été acceptés par la *Food and Drug Administration (FDA)* pour leur application *in vivo* il y a plusieurs dizaines d'années (Cooper JA et col., 2005 ; Zhang R et col., 1999 ; Freed LE et col., 1994). Certains sont commercialisés tels que les fils de suture Vicryl® (90% acide glycolique et 10% acide lactique) polygalactine®, etc.

On s'intéressera en particulier à trois polyesters et leurs copolymères :

- Acide polylactique (PLA)
- Acide polyglycolique (PGA)
- Acide poly lactique-co-glycolique (PLGA)
- Poly- ϵ -caprolactone (PCL)
- Acide (lactique-co-caprolactone) (PLCL)

E-2-2-1 : Propriétés physiques

La figure I-18 présente les formules moléculaires des trois polyesters précités.

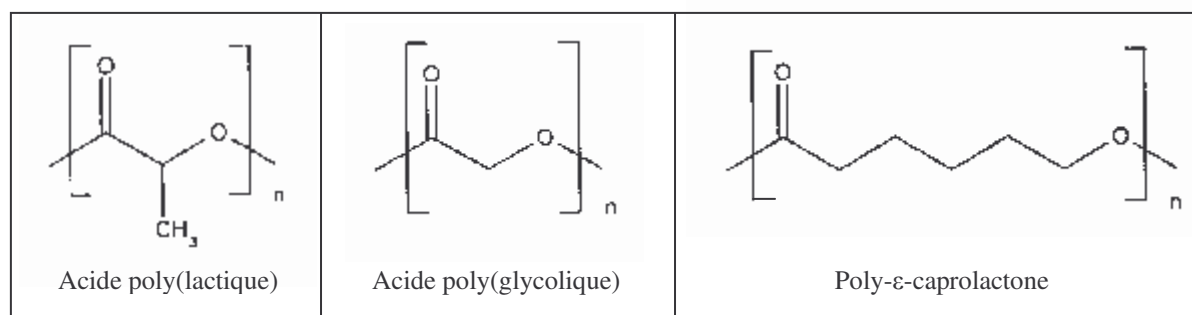


Figure I-18 : Formule développée des trois principaux polyesters

L'acide poly-L-lactique (PLLA) est un matériau fragile qui supporte mal les déformations en traction, son élongation à rupture étant de 3 à 5%. Bien que possédant un module de Young plus élevé, le PGA reste peu élastique pour un polymère (élongation à rupture entre 15 et 20%). Par contre le PCL et ses copolymères font preuve d'une très grande élongation à rupture (> 300%). Un classement croissant en terme d'élasticité peut-être établi :

PLLA < PGA < PCL

Les caractéristiques mécaniques présentées dans le tableau I-VI sont valables pour des milieux continus. Par essence, la matrice qu'on cherche à élaborer doit être très poreuse. Ainsi, les propriétés mécaniques vont indubitablement chuter, bien que conservant la même tendance.

Tableau I-VI : Propriétés mécaniques des principaux polyesters : (Yang S et col., 2001)

	Résistance à la traction [MPa]	Elongation à rupture [%]	Module de Young [GPa]
PLLA	66	3,1-5,8	2,8-4,2
PLDLA	27,6-41	3-10	1,4-2,8
PGA	>68,9	15-20	>6,9
PLGA (LA:GA)			
(90:10)	41,4-55,2	3-10	1,4-1,8
(50:50)	0,6	5	1,3
PCL	20,7-34,5	300-500	0,21
PLCL (LA:CL)			
(50:50)	0,55	>1000	0,7
(75:25)	10,25	>400	-
(85:15)	22,5	>400	-

En effet, chaque pore est un défaut où se concentreront les efforts, ce qui peut aboutir à une rupture. Cependant, outre les caractéristiques mécaniques, un autre paramètre est à prendre en compte. Il s'agit de la dégradation du polymère.

E-2-2-2 : Dégradation

La dégradation d'un polymère se traduit pas la détérioration des propriétés due à un changement de la structure chimique (Li S et col., 1995). Dans le cas des polyesters aliphatiques, la photodégradation sera écartée étant donné qu'elle sera ici négligeable comparée à d'autres mécanismes de dégradation (mécanique, chimique notamment). L'avantage des polyesters est dû au fait que leurs produits de dégradation sont assimilés par l'organisme. Il en découle leur application dans le contexte biomédical.

Tableau I-VII : Temps de dégradation des matériaux

Polymère	Dégradation (mois)
PGA	6 à 12
PLLA	> 24
PLGA	1 à 6
PCL	> 24
Soie	> 24

L'ingénierie tissulaire peut considérablement bénéficier de la nouvelle génération des matrices bioinductives, par exemple celles capables de livrer de multiples facteurs de croissance en fonction du temps, (**Richardson TP et col., 2001**) ou capables de libérer des facteurs de croissance en réponse à la contrainte mécanique (**Lee KY et col., 2000**).

D'autres structures ont été présentées, qui présentent un arrangement plus complexe des fibres. Une des structures récemment développée par **Altman** est une matrice composée de fibres en soie tordues. Cette structure possède l'avantage de présenter une matrice poreuse tridimensionnelle, ainsi que certaines propriétés viscoélastiques.

a) Matrices tissées en soie

La matrice en soie est une structure hiérarchique. Des faisceaux de fibres en soie sont enroulés dans les cordons qui sont enroulés dans des cordes et arrangées pour former une matrice semblable à l'arrangement des fibres de collagène dans le ligament et le tendon (figure I-19) (**Altman GH et col., 2003 ; Altman GH et col., 2002a**).

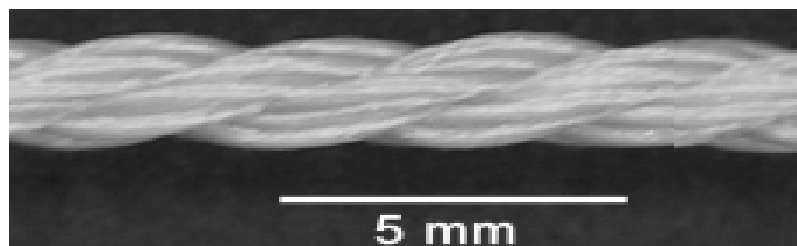


Figure I-19 : Cordes de soie (d'après Altman GH et col., 2003)

Cette matrice n'est pas cytotoxique. Son architecture «en torsion» des fibres de soie donne des propriétés mécaniques proches au LCA. Cependant, elle est faiblement biodégradable (**Horan RL et col., 2005**). **Altman et col.** ont potentialisé cette matrice par recouvrement de RGD (Arginine–Glycine–Aspartique) pour favoriser l'attachement cellulaire. De plus, cette potentialisation par RGD, a favorisé la production de MEC (collagène de type I) par les cellules stromales de moelle osseuse, permettent ainsi une régénération plus rapide et plus complète du tissu (**Chen J et col., 2003**).

b) Matrice de PLGA tricoté

Il a été montré qu'une matrice faite de fibre de PLGA (figure I-20), a permis la réparation du tendon d'Achille de lapin par formation d'une néo-matrice de fibre de collagène de types I et III (**Ouyang HW et col., 2002c, 2003**).



Figure I-20 : Matrice de poly lactide-co-glycolide (PLGA) tricoté (Université National de Singapour, d'après Ouyang HW)

c) Matrice de PLLA tressé

Des matrices de PLLA ont été développées par différentes équipes (**Lu HH et col., 2005 ; Cooper JA et col., 2005**). Cette matrice a été tressée avec une technique permettant la formation de pores de taille contrôlée, une résistance à la rupture, et des propriétés mécaniques comparables au LCA natif (**Lu HH et col., 2005**). Cette matrice tressée présente une structure hiérarchique semblable au ligament. Elle se compose de fibres dont le diamètre est semblable aux fibres de collagènes, arrangées en «paquets» et qui s'enroulent dans toute l'épaisseur de la matrice. Cette matrice tressée est composée de trois régions : un site d'attachement fémoral, le corps du ligament, et un site d'attachement tibial (figure I-21).

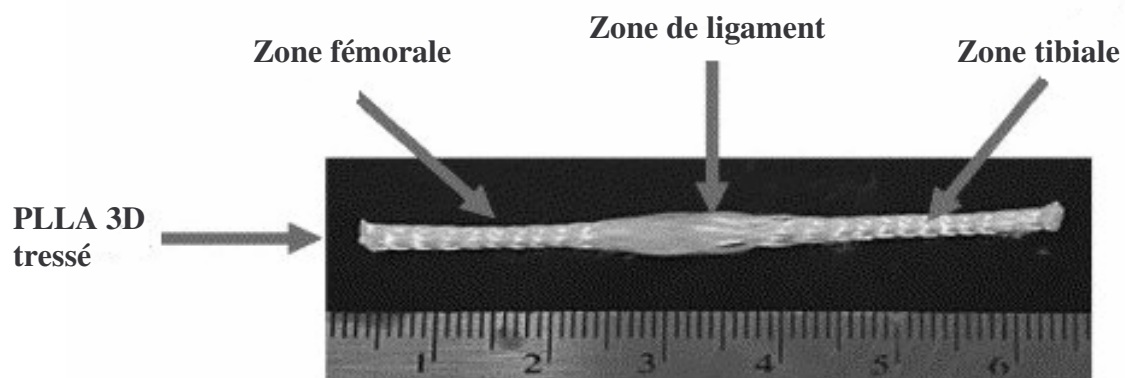


**Figure I-21 : Schéma 3D de matrice de PLLA tressé
(D'après Lu HH, et col., 2005)**

Ces trois régions sont induites par une orientation différente des fibres, ce qui entraîne une taille de pore différente dans chaque région, et donc une réponse cellulaire de la région dépendante. Le contrôle de la porosité dans ces matrices est important, comme nous l'avons

déjà montré, pour la colonisation homogène des cellules dans la matrice, ainsi que pour le passage des nutriments.

De plus, la taille optimale des pores varie en fonction du tissu considéré : si elle est décrite de 100 à 150 μm pour le tissu osseux, elle est de 250 μm pour les tissus mous (**Yahia L et col., 1997**).

En conclusion, tous ces composés présentent des propriétés adéquates pour être utilisés en ingénierie tissulaire : non-cytotoxiques, structures....

Cependant, le choix de la matrice est basé sur les propriétés de résorption de ces composés, ainsi que sur les propriétés du tissu natif : élasticité, temps de synthèse d'une nouvelle matrice, les propriétés d'attachement de cellules, la morphologie, la prolifération de cellules, et leurs propriétés mécaniques, ainsi que le temps de dégradation. Le PLLA peut être un matériau plus approprié pour l'ingénierie tissulaire du LCA comparé aux PLAGA ou PGA, en raison de ses propriétés et de la réponse cellulaire à son contact (prolifération, synthèses MEC...).

Considérant ce panel de biomatériaux, différentes approches sont possibles. Il faut toutefois prendre en compte le délai entre la conception du biomatériau et le moment de son implantation *in vivo*. Ce paramètre va permettre de choisir le matériau en fonction de son temps de dégradation pour éviter une rupture si la matrice néo-formée n'a pas la résistance adéquate lors de l'implantation.

Néanmoins, la matrice ne représente qu'un des paramètres régissant cette discipline. D'autres facteurs régulateurs sont à prendre en compte.

E-3 : Facteurs régulateurs

E-3-1 : Facteurs biochimiques et physicochimiques

Les facteurs biochimiques sont essentiels pour induire et/ou maintenir le phénotype des cellules différentes ainsi que des lignages spécifiques à partir de cellules souches mésenchymateuses (**Moreau JE et col., 2005**) ou de fibroblastes. Ces facteurs régulateurs peuvent être de différents types, qu'ils soient biochimiques ou physico-chimiques, tels que les facteurs de croissance, la vitamine C...

✓ Pression partielle en oxygène :

L'oxygène peut affecter les taux de synthèse de matrice extracellulaire et le développement des tissus reconstruits *in vitro*. Les effets de l'oxygène sont encore peu connus sur la différenciation de cellules souches en fibroblastes de ligament. Fermor. B et col. ont prouvé que les pressions élevées en oxygène (21%) favorisent la prolifération de fibroblastes de LCA. En revanche, des pressions partielles en O₂ inférieures (10%) favorisent la synthèse des molécules de la MEC (**Fermor B et col., 1998**).

✓ Vitamine C et dérivés :

L'ascorbate-2-phosphate, un dérivé de la vitamine C, augmente la croissance des cellules *in vitro* et assure la maintenance des tissus connectifs (**Meaney Murray M et col., 2003 ; Fermor B et col., 1998**). De plus, l'ascorbate-2-phosphate en présence de l'*insuline growth factors* (IGF) induit une augmentation significative de la transcription du collagène de type I après 14 jours de culture (**Moreau JE et col., 2005**).

✓ Les facteurs de croissance :

Les facteurs de croissance présentent une importance qui n'est plus à démontrer en ingénierie tissulaire. En effet, ils peuvent agir soit sur la prolifération cellulaire (**Attisano L et col., 2002 ; Murakami S et col., 1999 ; Deie M et col., 1997 ; Marui T et col., 1997**), soit sur la synthèse de la MEC (**Lo IK et col., 2003 ; Sakai T et col., 2002 ; Valentinis B et col., 2001 ; Deie M et col., 1997 ; Marui T et col., 1997**).

Le sérum, qui contient de nombreuses molécules indispensables (des acides aminés, des vitamines, des protéines, des hormones, des lipides, des minéraux, des inhibiteurs de différenciation) est une des premières sources de facteurs de croissance *in vitro* et, de ce fait, est encore indispensable en culture cellulaire (**Denk PO et col., 1999 ; Iyer VR et col., 1999 ; Lee J et col., 1998**).

Les facteurs de croissance sont des polypeptides de poids moléculaire peu élevé (6-30 kDa) qui régulent la croissance et les fonctions cellulaires, grâce à une fixation sur des récepteurs cellulaires spécifiques de grande affinité. L'activation de la cellule se traduit par une activation de signaux transmembranaires, puis par une cascade de phénomènes cytoplasmiques et aboutit à la transcription des gènes spécifiques d'une ou de plusieurs protéines. À la différence des hormones sécrétées à distance du tissu effecteur (sécrétion endocrine), la plupart des facteurs de croissance agit sur les cellules voisines (sécrétion paracrine), et leur concentration plasmatique est très faible. Certaines cellules ont des récepteurs pour leur propre production de facteurs de croissance (sécrétion autocrine).

Le terme «facteurs de croissance» n'est pas idéal pour décrire la fonction de ces polypeptides parce qu'ils ne favorisent pas uniquement la croissance cellulaire, mais aussi induisent les phénomènes de synthèse. Essentiellement, ils agissent en tant que modulateurs des activités cellulaires. En outre, ils peuvent avoir un même effet biologique. Les facteurs de croissance ne présentent pas des spécificités de synthèse ou d'activité : deux facteurs de croissance peuvent agir de manière semblable.

Des facteurs de croissance d'un même type ou d'une même famille peuvent être produits par différents types cellulaires et agir sur ces cellules de différentes manières, en fonction de leur concentration...

En fait, leur action dépend :

- des conditions physiologiques (état de la cellule, type cellulaire, présence de molécules d'intérêt biologique.....)
- des conditions physico-chimiques, mécaniques ainsi que de leur concentration.

Ils sont capables d'autorégulation. Ils peuvent sous ou sur-réguler l'expression de leurs récepteurs.

Leur liaison à leur récepteur spécifique est le signal de la mise en activité de leur voie d'action.

Le tableau I-VIII présente certaines des propriétés caractéristiques de quelques facteurs de croissance impliqués en ingénierie tissulaire.

Tableau I-VIII : Propriétés caractéristiques-Facteurs de croissances (liste non exhaustive)

Facteurs de croissance	Source principale	Cellules ou tissus de cible	Activité
PDGF	Plaquettes, macrophages, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses	Cellules musculaires lisses, fibroblastes	Favorise la prolifération du tissu conjonctif et des cellules musculaires lisses
EGF	Macrophages, monocytes	Épithélium, cellules endothéliales	Favorise la prolifération des cellules mésenchymateuses, gliales et épithéliales
FGF	Macrophages, monocytes, cellules endothéliales	Endothélium, fibroblastes	Favorise la prolifération de nombreuses cellules, le chimiotactisme
TGF-β	Plaquettes, os, autres types cellulaires	Cellules endothéliales, fibroblastes, lymphocytes, monocytes	Favorise la synthèse de MEC, la cicatrisation, le chimiotactisme

PDGF = platelet-derived growth factor, **EGF** = epidermal growth factor, **FGF** = fibroblast growth factor, **TGF- β** = transforming growth factor- β

Selon la proximité de leur emplacement de synthèse et leur emplacement d'action, des facteurs de croissance ont été classifiés selon la dénomination suivante (figure I-22) :

- **Autocrine** : la cellule cible est la cellule sécrétrice
- **Paracrine** : la cellule cible est une cellule voisine
- **Endocrine** : la cellule cible est éloignée

- **Juxtracrine** : la cellule cible est opposée au facteur de croissance/au complexe de récepteur

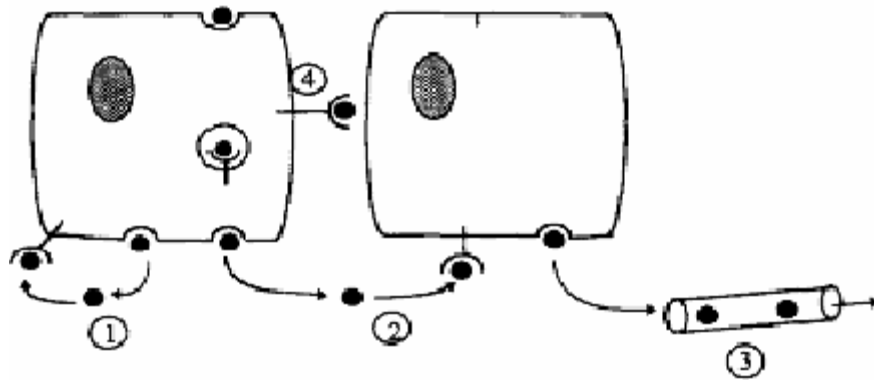


Figure I-22 : Classification des facteurs de croissance en fonction de leur synthèse et leur d'activité. Des facteurs de croissance (points noirs) sont produits par les cellules et peuvent agir dans les cellules ou dans le voisinage ou les cellules à distance pour moduler leurs activités par la réaction avec les récepteurs spécifiques. ① Autocrine, ② Paracrine, ③ Endocrine, ④ Juxtracrine

Les modes d'action autocrine et paracrine fonctionnent de telle manière que le facteur de croissance agit sur des cellules sous forme de solution, bien que les cellules sécrétant le facteur soient différentes l'une de l'autre. Dans le cas d'un facteur de croissance juxtracrine, le facteur de croissance est immobilisé sur la membrane d'une cellule, et agit sur une autre cellule. Il a été montré que les facteurs de croissance accélèrent la prolifération ou la différenciation cellulaire selon le mode d'addition, c.-à-d., sous forme de solution ou immobilisé. Ceci montre que l'effet du facteur de croissance sur des cellules est considérablement influencé par le mode d'addition (**Ito Y et col., 2001**). Cette dépendance peut s'avérer être intéressante pour la conception d'une matrice fonctionnalisée dans laquelle des molécules des facteurs de croissance sont immobilisées, permettant la régulation.

Des centaines de facteurs de croissance ont été identifiés, caractérisés et basés sur des homologies structurales, groupés dans vingt familles et super-familles (**Babensee JE et col., 2000**). Les facteurs de croissance existent habituellement en tant que précurseurs inactifs ou partiellement actifs et exigent une activation protéolytique, et peuvent se lier aux molécules de la matrice pour être activées ou stabilisées.

Les facteurs de croissance ont des demi-vies biologiques courtes (par exemple : le PDGF (*Platelet derived growth factor*), isolé dans les plaquettes, ne peut pas être détecté dans la circulation et a une demi-vie de moins de 2 minutes une fois injecté sous mode intraveineux) **(Carl-Henrik H, 2004)**.

Les facteurs de croissance peuvent induire la sécrétion et l'action d'autres facteurs de croissance avec lesquels ils peuvent avoir un effet synergique ou antagoniste. Il n'existe pas de pool de facteurs de croissance dans la cellule. Les ARNm codant pour les facteurs de croissance sont instables et leur synthèse est induite par la transcription d'un gène en réponse à un stimulus **(Nimni ME, 1997)**. Leur sécrétion est un événement bref, limité dans le temps.

En effet, bien que les facteurs de croissance aient une indication pour certaines applications cliniques, il est difficile d'aboutir à un conditionnement pharmacologique, en raison de leur durée de vie très courte. De plus, ils montrent une toxicité potentielle au niveau systémique **(Babensee JE et col., 2000)**.

Étant donné leur action sur la prolifération et la synthèse matricielle, ils sont impliqués dans les phénomènes de cicatrisation.

De nombreuses études ont cherché à définir le rôle des facteurs de croissance dans les phénomènes de cicatrisation du tissu osseux, cartilagineux, et également du ligament et le tendon et à déterminer ainsi des stratégies appropriées pour l'usage des facteurs de croissance en ingénierie tissulaire. L'utilisation de facteurs de croissance, tels que le *transforming growth factor* (TGF), le *Platelet derived growth factor* (PDGF), l'*insulin-like growth factor* (IGF) ont permis d'améliorer la prolifération de fibroblastes ou la formation d'une matrice *in vitro* ou *in vivo*.

L'existence d'un effet synergique permet de combiner différents facteurs de croissance, par exemple lors de la cicatrisation du ligament **(Lee J et col., 1995 ; Schmidt CC et col., 1995 ; Murphy PG et col., 1994)**. Les réponses des fibroblastes aux facteurs de croissance sont également dépendantes du tissu **(Yoshida M et col., 1999 ; Lee J et col., 1998)**. Il a été montré *in vitro* que les fibroblastes des explants du LLI migrent plus rapidement que ceux du LCA **(Kobayashi K et col., 2000)**.

Des facteurs de croissance sont souvent nécessaires pour favoriser la régénération d'un tissu grâce à leurs propriétés angiogéniques, qui favorisent l'approvisionnement en oxygène et en nutriments pour maintenir efficacement les fonctions biologiques des cellules transplantées dans le cas d'une greffe **(Tabata Y, 2005)**.

Le tableau I-IX rassemble, de manière non exhaustive, les études portant sur l'utilisation de facteurs de croissance pour la régénération ou l'ingénierie tissulaire de ligament et de tendon.

Tableau I-IX : Utilisation des facteurs de croissance pour la réparation et la régénération de tendon et de ligament

FC	Type cellulaire	Origine	Effet	Références
EGF	Fibroblaste de LCA	Chien	↑ Synthèse de protéoglycanes ↑ Prolifération cellulaire	DesRosiers EA et col., 1996
	Fibroblaste de LLI	Lapin	↑ Synthèse de collagènes et de protéines totales (effet de l'âge)	Deie M et col., 1997
	Cellules de LCA et LLI	Lapin	↑ Prolifération cellulaire	Scherping SC Jr et col., 1997, Schmidt CC et col., 1995
	Fibroblaste de LLI et LCA	Lapin	↑ Synthèse de collagènes (types I et III) et protéines non collagéniques	Marui T et col., 1997
	Fibroblaste de LCA	Humain	↑ Migration cellulaire dans la matrice GAG	Meaney MM et col., 2003
FGF	Cellules de LCA et LLI	Lapin	↑ Prolifération cellulaire	Scherping SC Jr et col., 1997, Schmidt CC et col., 1995
	Ligament péri-dentaire	Humain	Change l'expression des protéoglycanes	Worapamorn W et col., 2001
	Fibroblaste de LCA	Humain	↑ Prolifération cellulaire	Meaney MM et col., 2003
IGF	Fibroblaste de LLI	Lapin	↑ Synthèse de collagènes de types I et III	Murphy PG et col., 1994
	Tendon d'Achille	Rat	Accélère le rétablissement fonctionnel du tendon	Kurtz CA, et col., 1999
	Tendon fléchisseur	Cheval	↑ Synthèse de collagènes et prolifération cellulaire	Dahlgren LA et col., 2002

E-3-1-1 : Ingénierie tissulaire et facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont donc nécessaires en ingénierie tissulaire. Cependant, l'injection directe des facteurs de croissance sous forme soluble pour accélérer la régénération, n'est pas efficace. En effet, les facteurs de croissance se répandent rapidement loin de l'emplacement de l'injection. Pour permettre à des facteurs de croissance d'exercer efficacement leurs effets biologiques, un «Drug Delivery system» (DDS) devrait être employé. Par exemple, la diffusion contrôlée d'un facteur de croissance sur la lésion pendant une période prolongée est rendue possible en incorporant le facteur dans un porteur approprié, pour prolonger son activité *in vivo*. Le porteur de dégagement devra être dégradé dans le corps après dégagement de facteurs de croissance (Jessel N et col., 2006 ; Leguen E et col., 2006 ; Tabata Y, 2004, 2003).

L'ingénierie tissulaire peut être classifiée en deux catégories basées sur l'emplacement de la régénération ou la substitution d'organe :

- Ingénierie tissulaire *in vitro*
- Ingénierie tissulaire *in vivo*

L'ingénierie tissulaire *in vitro* implique la construction de tissu et la substitution d'organes, désignés sous le nom d'organes bio-artificiels (Freed LE et col., 2002).

L'ingénierie tissulaire *in vivo* a, à l'origine, l'avantage de disposer d'un environnement pour la régénération de tissu. La plupart des matériaux essentiels à la régénération de tissu sont automatiquement assurés par le corps vivant du centre serveur. Donc, *in vivo*, presque toutes les approches en ingénierie tissulaire sont effectuées actuellement avec ou sans matrice biodégradable. Si la MEC saine est encore disponible dans le corps, aucune matrice artificielle n'est nécessaire. Une des matrices les plus utilisées pour cette approche est l'éponge de collagène de type I (Hori Y et col., 2001).

La régénération de tissu est souvent induite par l'utilisation des facteurs de croissance sous forme soluble, mais le taux appliqué est beaucoup plus élevé que dans les conditions physiologiques, ce qui peut avoir des effets défavorables (Levy RJ et col., 1998). Il est également possible d'utiliser la thérapie génique et d'utiliser des cellules transfectées sécrétant le facteur de croissance désiré. Cependant, il est impossible de contrôler le niveau et la durée de l'expression du gène (Kasahara H et col., 2003 ; Taniyama Y et col., 2001 ; Schwarz ER et col., 2000).

E-3-1-2 : Principaux facteurs de croissance en ingénierie tissulaire

Il existe deux grandes familles de facteurs de croissance :

A. Famille des TGF- β (BMP)

Il s'agit d'une famille de super-gènes se composant de trois groupes :

- les TGF- β s
- les activines
- les protéines morphogénétiques d'os (BMPs)

Le TGF- β est une protéine multifonctionnelle sécrétée qui règle de nombreux aspects de la fonction cellulaire, y compris la prolifération de cellules, la différenciation et la synthèse de la matrice extracellulaire. Il se lie à un récepteur membranaire utilisant ensuite l'activation de sérine thréonine kinases. Le TGF- β représente une famille de 40 facteurs de croissance de polypeptides structurellement semblables qui régule une diversité fascinante de processus cellulaires comme l'apoptose, la prolifération aussi bien que la différenciation, l'adhérence... La connaissance des voies de signalisation de TGF- β ouvre ainsi les perspectives du développement de nouvelles thérapies.

Le TGF- β peut être utilisé notamment pour la cicatrisation de tissus mous et durs, le contrôle de maladies inflammatoires chroniques liées à la fibrose et la suppression des maladies autoimmunes (**Lieberman JR et col., 2002**).

Puisque le TGF- β est un agent pléiotropique qui peut stimuler, empêcher et moduler des événements cellulaires en fonction du temps et de la concentration, il est crucial de contrôler sa disponibilité biologique dans des usages thérapeutiques.

Le TGF- β actif est un homodimère formé de deux sous-unités de 12-15 kDa liées par des ponts disulfures avec des séquences comprenant sept cystéines. Six de ces cystéines forment une structure centrale rigide, un nœud de cystéine, qui fournit une stabilité optimale et une zone d'exposition de surface suffisante pour qu'il y ait interactions avec un récepteur (R).

Le TGF- β agit à travers une famille de récepteurs transmembranaires sérine/thréonine kinase appelée TBR-I (53 kDa) et TBR-II (75 kDa). L'activation du récepteur peut induire des réponses physiologiques très variées suivant le type cellulaire et suivant le récepteur, qui se distingue par sa capacité à adopter une forme phosphorylée sur les sites sérine et thréonine.

Six types de récepteurs (R) de TGF- β ont été décrits dans un certain nombre de cellules, mais seulement les types RI, RII et RIII ont été étudiés jusqu'ici. Il semble que les types I et II soient impliqués dans des processus de transduction de signal intra-cellulaire contrairement au type III, bien que le récepteur de type III joue un rôle dans l'attachement du facteur de croissance aux récepteurs I et II (**Massague J et col., 1994**).

Ces récepteurs sont des glycoprotéines ayant un domaine de liaison extracellulaire et un domaine d'action intracellulaire contenant une tyrosine kinase, qui transmet le signal par l'intermédiaire de protéines SMAD (facteur de transcription activé par le TGF- β 1) jusqu'au noyau pour y induire la transcription du signal (**de Caestecker M, 2004**).

Les protéines SMAD représentent une famille d'activateurs de transcription trouvée chez les vertébrés et les insectes. Ils ont été reconnus capables de propager le signal (**Massague J et col., 2000 ; Miyazono K et col., 2000**). Le récepteur de type II à la surface de cellules mène à la phosphorylation du récepteur de type I. Le récepteur de type I peut phosphoryler et activer la protéine Smad2 (R-Smad). Smad2, en combinaison avec Smad4, est transféré au noyau où le complexe activé de Smad recrute d'autres facteurs de transcription (TF) qui activent ensemble l'expression des gènes de cible qui régulent les effets biologiques de TGF- β (figure I-23). D'autres rôles physiologiques semblent lui être dévolus : différenciation cellulaire, chimiotactisme, stimulation des récepteurs d'intégrine (adhésion intercellulaire).

La concentration en TGF actif disponible sur ces récepteurs peut être régulée à trois niveaux :

- contrôle de la transcription de TGF- β
- activation et la libération de TGF- β actif de la matrice extracellulaire
- mouvement de TGF- β

Alternativement, la concentration extracellulaire de TGF- β actif peut s'auto-réguler.

Il a été montré que la contrainte mécanique peut induire le niveau d'expression de TGF- β 1 dans les cellules musculaires lisses humaines... (**Yang G et col., 2004 ; Sakata R et col., 2004 ; Nakatani T et col., 2002 ; Gutierrez JA et col., 1999**).

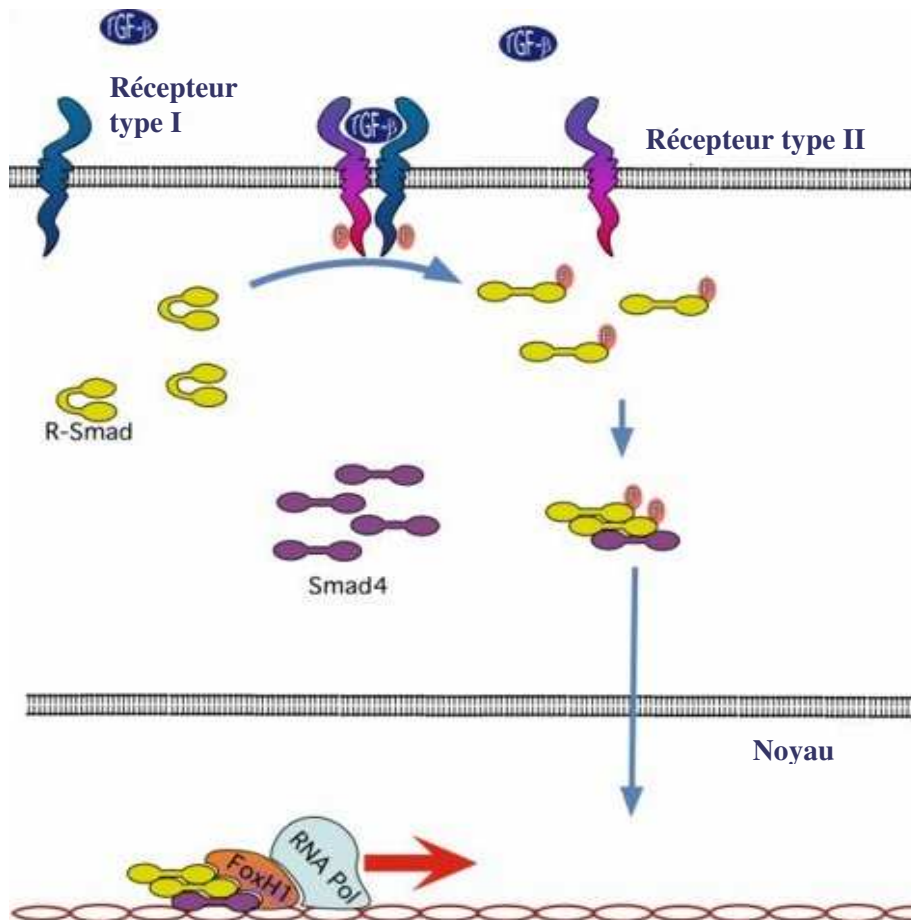


Figure I-23 : Voie générale de transduction du signal de TGF [www.nature.com]

Le tableau I-X rassemble de manière non exhaustive les études portant sur l'utilisation de TGF- β 1 pour la régénération ou l'ingénierie tissulaire du ligament et du tendon.

Tableau I-X : TGF- β et ingénierie tissulaire du tendon et du ligament

Type cellulaire	Origine	Effet	Références
Fibroblaste de LCA	Chien	↑ Synthèse de protéoglycanes et collagènes	DesRosiers EA et col., 1996
Fibroblaste de LLI	Lapin	↑ Synthèse de collagènes et de la protéine totale	Deie M et col., 1997, Murphy PG et col., 1994
Fibroblaste de LCA	Mouton	↑ Prolifération cellulaire	Spindler KP et col., 1996
Fibroblastes de LLI et LCA	Lapin	↑ Synthèse de collagènes (types I et III) et de protéines non collagéniques	Marui T et col., 1997
Fibroblaste de peau	Humain	Régulation de l'attachement cellulaire	Ihn H et col., 1995
Fibroblaste de LLI	Lapin	Rigidité	Spindler KP et col., 2003
Ligament périodentaire	Humain	Changement de l'expression des protéoglycanes	Worapamorn W et col., 2001
Fibroblaste de LCA	Humain	Inhibition de la croissance ↑ Synthèse de collagènes dans la matrice GAG	Murray MM et col., 2000, Meaney MM et col., 2003
Ligament humain	Humain	↑ Expression de ARNm du collagène types I et III	Nakatani T et col., 2002

B. *PDGF (platelet derived growth factor)*

Le PDGF semble également fortement impliqué dans la reconstruction tissulaire. Le PDGF a été observé initialement comme favorisant la croissance des fibroblastes, il est présent dans le sérum, mais il manque dans le plasma (**Balk SD et col., 1973**). En effet, les fibroblastes prolifèrent en présence du sérum (fluide dérivé du sang après la coagulation), mais non en présence de plasma, ceci a permis de découvrir que ce facteur spécifique de la croissance est sécrété par les plaquettes activées (**Ross R et col., 1974**).

Cinq formes de PDGF ont été caractérisées jusqu'ici. Le PDGF (~30 kDa) est formé de deux chaînes peptidiques distantes reliées par des ponts disulfures, nommées A et B qui

partagent une identité de 60% de séquences et qui donnent trois iso-formes (AA, BB, AB) qui diffèrent dans l'activité biologique. Un récepteur, PDGF-R α lie chacune de ces trois iso formes de PDGF, alors que le récepteur de PDGF-R β lie le PDGF-AB avec une basse affinité, et la PDGF-BB avec une haute affinité, mais pas l'isoforme de PDGF-AA (**Bonner JC, 2004**).

Le PDGF lié à son récepteur (PDGF-R) mène à la dimérisation et à l'autophosphorylation de récepteur, et ainsi à la formation des accepteurs de hautes affinités pour la signalisation des protéines telles que les molécules Shc, Shb et Grb2. Le Grb2 favorise l'association avec Sos pour activer les voies descendantes (figure I-24). Les mécanismes de signalisation mitogènes descendants incluent la voie de :

- Ras-ERK (extracellular-signal-regulated kinase)
- PI3-K (phosphatidylinositol 3 kinases)
- PKC (protéine kinase C)
- Canaux Ca²⁺/calmodulin dépendant-et Na⁺/H⁺.

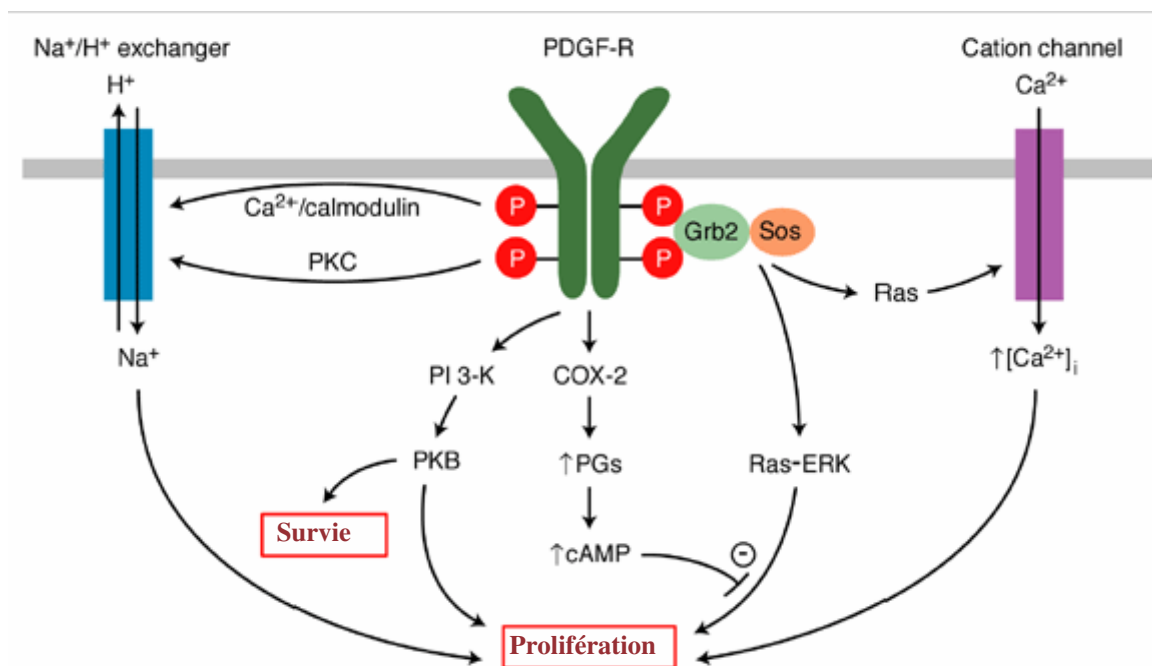


Figure I-24 : Voie générale de transduction du signal de PDGF (d'après Hui AY et col., 2003)

L'activation d'un canal cationique par l'intermédiaire de Ras favorise l'influx de Ca²⁺ et contribue également au signal mitogène via une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺. En plus de son effet mitogène, PI3-K et la voie de la protéine kinase B ont comme conséquence la production des signaux de survie et la diminution de l'apoptose.

La rétroaction négative de l'effet mitogène de PDGF est fournie par l'activation de la cascade des prostaglandines (PGs).

Le PDGF a montré une large spécificité, visant non seulement les fibroblastes, mais également la cellule musculaire lisse et d'autres cellules de tissu conjonctif. Il a également été montré qu'il peut être synthétisé par d'autres types cellulaires que les plaquettes. Au-delà de la prolifération, le PDGF est un fort chémoattractant pour les fibroblastes cutanés, dirigeant la migration cellulaire pendant la cicatrisation, et il peut prolonger la survie des cellules sous effort. Les effets chimiotactiques et/ou mitogènes ont pu expliquer les effets de PDGF sur la cicatrisation. La migration des granulocytes, des monocytes, et des lymphocytes a pu être augmentée ainsi par application simple du facteur de croissance à l'emplacement des lésions (Letson AK et col., 1994).

Le tableau I-XI rassemble les études portant sur l'utilisation de PDGF en ingénierie tissulaire de ligament et de tendon.

Tableau I-XI : PDGF et ingénierie tissulaire du tendon et du ligament

Origine	Type cellulaire	Effet	Références
Chien	Fibroblaste de LCA	↑ Prolifération cellulaire	DesRosiers EA et col., 1996
Mouton	Tendon rotulien	Induit la réponse de prolifération cellulaire à 10 ng/mL	Spindler KP et col., 1996
Lapin	Cellules de LCA et LLI	↑ Prolifération cellulaire (effet de l'âge de l'animal et de l'origine des cellules)	Scherping SC Jr et col., 1997, Schmidt CC et col., 1995
Humain	Fibroblaste de peaux	Régule l'attachement cellulaire	Ihn H et col., 1995
Lapin	Cellules de LLI	↑ Propriété structurale	Hildebrand KA et col., 1998
Humain	Ligament péri-dentaire	↑ Prolifération cellulaire (10 ng/mL) et synthèse de collagènes (1 ng/mL)	Ojima Y et col., 2003
Humain	Ligament péri-dentaire	Change l'expression des protéoglycanes	Worapamorn W et col., 2001
Humain	Fibroblaste de LCA	↑ Prolifération cellulaire et production de collagènes	Murray MM et col., 2003
Rat	Fibroblaste de LLI	↑ Rigidité et force de rupture	Letson AK et col., 1994

Des études sur l'action cutanée des fibroblastes pendant la cicatrisation suggèrent que le PDGF régule la migration, la prolifération et l'attachement des cellules, alors que d'autres facteurs de croissance stimulent uniquement la synthèse d'ADN (**Ihn H et col., 1995**).

En plus des PDGF et TGF, d'autres facteurs de croissance sont impliqués dans le processus de cicatrisation du ligament et du tendon, tels que :

- Le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) est un polypeptide simple de 16 kDa. Il est partiellement purifié de la glande pituitaire sur la base de son activité mitogène. Le bFGF est un facteur de croissance qui affecte la prolifération et la différenciation d'une grande variété de cellules telles que les fibroblastes. Il a également des activités biologiques diverses pour la régénération de tissu (angiogenèse, réparation osseuse...) (**Hankemeier S et col., 2005 ; Collin-Osdoby P et col., 2002 ; Chan BP et col., 2000**). Il a été montré que le bFGF a les capacités d'accélérer la prolifération de cellules souches, et que cet effet est plus important pour les cultures à basse densité cellulaire que dans les cultures à haute densité cellulaire (**Tsutsumi S et col., 2001**). Il est présent dans les vaisseaux sanguins. Le bFGF est responsable pour une part de la synthèse d'ADN dans la cellule musculaire lisse de vaisseaux (**Sudhir K et col., 2001**).

- VEGF (*Vascular endothelial growth factors*) une protéine glycosylée de 46-48 kDa composée de deux sous-unités reliées par des ponts disulfures. Le VEGF a été considéré longtemps comme un facteur angiogénique important. Le manque de vascularisation après la rupture de LCA est une des raisons de la mauvaise régénération de ligament. Le contrôle d'angiogenèse devrait donc être bénéfique (**Ju YJ et col., 2006**).

E-3-1-3 : Combinaison des facteurs de croissance

L'effet combiné de différents facteurs de croissance est très controversé, et dépend des conditions d'application (concentration, durée...).

D'après les travaux de **Spindler KP**, la combinaison de TGF- β et de PDGF, n'a eu aucune conséquence sur les propriétés mécaniques (**Spindler KP et col., 2003**), contrairement à ce qui a été montré dans d'autres travaux (**Kletsas D et col., 1998 ; Dennison DK et col., 1994 ; Stathakos D et col., 1993**). Un défaut de synergie entre TGF- β et PDGF utilisés pour stimuler la cicatrisation du ligament (**Woo SL et col., 1998 ; Letson AK et col., 1994**) ou la prolifération des cellules de LCA (**DesRosiers EA et col., 1996**) a également été décrit.

L'explication possible pour le manque apparent d'effets synergiques ou additifs entre les facteurs peut être due à un mauvais dosage (**Letson AK, et col., 1994**).

Lee J et col. ont montré que la combinaison de 4 facteurs de croissance (TGF- β , PDGF, bFGF, insulín bovine) augmente de manière dose-dépendante la croissance de cellules de LLI et LCA après 6 jours (**Lee J et col., 1995**). L'application des facteurs de croissance en combinaison (TGF- β et l'EGF, TGF- β et l'insuline) peut stimuler également la prolifération et la différenciation des fibroblastes et des cellules progénitrices (**Martin I et col., 2001 ; Mauri T et col., 1997**).

Néanmoins, l'utilisation d'une combinaison de facteurs de croissance reste controversée.

E-3-2 : Facteurs mécaniques

Les signaux mécaniques qui affectent la croissance et le développement du ligament natif *in vivo* jouent le même rôle pendant la culture des ligaments *in vitro*. L'application de la contrainte peut affecter le développement de tissu en deux voies :

- par augmentation du transport de masse des nutriments....
- par stimulation directe de cellules

En effet, la stimulation mécanique de fibroblaste de ligament *in vitro* augmente l'expression des collagènes de types I et III, de la fibronectine, et de la ténascine-C (**Altman GH et col., 2002a, 2002b**).

E-3-2-1 : Effet des contraintes mécaniques en ingénierie tissulaire

Les contraintes mécaniques peuvent moduler la physiologie des cellules, et peuvent améliorer ou accélérer la régénération de tissu et la réparation *in vitro*. En effet, il a été montré que les contraintes d'étirement à des elongations et des fréquences différentes ont un effet sur l'alignement, la morphologie, les modifications cellulaires du cytosquelette, la prolifération, et la synthèse protéique de différents types cellulaires (**Chiba M et col., 2004 , Yang G et col., 2004 ; Wang JH et col., 2000a ; Kim SG et col., 2002 ; Nakatani T et col., 2002 ; Sanchez-Esteban J et col., 2002**).

Or, l'organisation des cellules dans le tissu reconstruit et la qualité de la MEC sont des paramètres importants pour le maintien des propriétés mécaniques du tissu.

Comme les cellules et les tissus sont soumis à diverses formes de stimulations mécaniques *in vivo* (**Lee AA et col., 1996 ; Terracio L et col., 1990**), des systèmes *in vitro* ont été développés pour étudier ce phénomène dans un environnement contrôlé (**Wang H et col., 1995 ; Neidlinger-Wilke C et col., 1994**).

Dans le cas du ligament/tendon, la contrainte principale est l'étirement et la torsion. Les systèmes permettant la mise en place d'un étirement *in vitro* sont constitués d'un substrat élastique, souple dont la surface recevant les cellules est recouverte d'un composé favorisant l'adhésion cellulaire, comme un ligand RGD, collagène... (Wang H et col., 2005 ; Wang JH et col., 2003 ; Nakatani T et col., 2002 ; Neidlinger-Wilke C et col., 2001).

Les cellules de tissus connectifs s'alignent en réponse à l'étirement (Wang JH et col., 2003 ; Neidlinger-Wilke C et col., 2001 ; Wang JH et col., 2000a). L'alignement, plus généralement, reflète la sensibilité des cellules à leur environnement mécanique. L'orientation de cellules dépend du taux d'élongation (Takemasa T et col., 1997 ; Wang H et col., 1995). C'est une réponse tardive au stimulus mécanique. En effet, une gradation dans le temps peut être faite. Certaines réponses peuvent être très rapides, quelques secondes (flux ioniques, Ca^{2+} ...), quelques minutes (réarrangement du cytosquelette) (Helmke BP et col., 2000 ; Wang JH, 2000b ; Jacobs CR et col., 1998) alors que d'autres ont besoin d'heures ou de jours (orientation de cellules) (Iba T et col., 1991).

Expérimentalement, on peut trouver trois systèmes expérimentaux d'élongation :

- ✓ élongation simple, où la membrane est étirée dans une direction et se comprime pour une orientation à 90° (figure I-25-A).
- ✓ élongation uniaxiale pure, où la membrane est étirée dans une direction, mais les bords orthogonaux sont contrôlés de sorte qu'il n'y ait aucune déformation dans cette direction (figure I-25-B).
- ✓ élongation équi-biaxiale, dans laquelle la membrane est étirée également dans les deux directions orthogonales (figure I-25-C).

Sous les conditions d'étirement, la déformation de la membrane varie d'un maximum à 0° (la direction d'étirement) au minimum (négative par exemple : compression) à 90° (figure I-25-D). Pour une élongation Uniaxiale pure, la membrane est étirée dans la direction horizontale, mais il n'y a aucune déformation dans la direction verticale. La dépendance de la contrainte de la membrane sur la direction diffère légèrement de celle sous l'élongation simple. Elle est maximum à 0° et minimum à 90° et elle n'est jamais négative (figure I-25-E). Pour l'élongation équi-biaxiale, la déformation de la membrane est constante de 0° à 90° (figure I-25-F).

On note qu'avec une élongation simple ou une élongation uniaxiale, les modèles de déformation de substrat diffèrent selon l'angle en respectant la direction d'étirement (figure I-25-D, E).

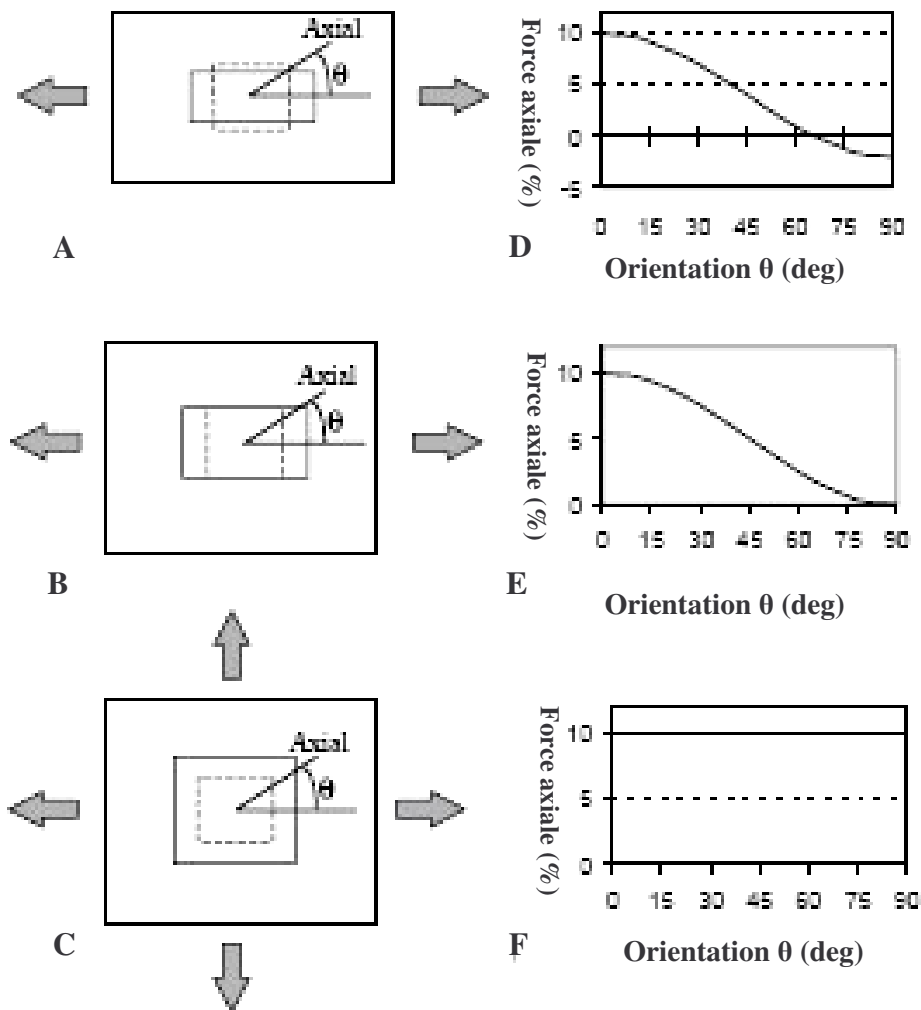


Figure I-25 : Schéma de trois types d'élongation d'après (Wang JH, 2001)

La ligne pointillée représente une zone centrale sur la membrane avant l'étirement, et les lignes continues représentent la même zone après l'étirement.

L'élongation équi-biaxiale, cependant, peut ne pas être physiologique pour beaucoup de types cellulaires. Par exemple, les fibroblastes de tendon ou de ligament sont soumis à une élongation Uniaxial et non biaxiale *in vivo* (Wang H et col., 2005).

La déformation de surface des substrats planaires est caractérisée par trois contraintes extérieures indépendantes. Ces forces décrivent comment dessiner un carré sur une surface déformée. Deux de ces trois forces mesurent les changements de longueur des côtés du carré et décrivent ainsi la conversion du carré en rectangle. La troisième force (cisaillement) mesure le départ des angles de coins (90°) et décrit ainsi la conversion du carré en losange.

Trois forces agissent sur le substrat :

- ✓ une force axiale égale à la force appliquée (la longueur change le long de l'axe principal des cellules), la force axiale diminue puisque les cellules s'orientent loin de la direction d'élongation et son zéro est proche de 60° .
- ✓ une force transversale égale à -38% de la force appliquée (la longueur change à travers la largeur de cellules).
- ✓ une force de cisaillement égale à zéro (changements d'angle entre les directions axiales et transversales) (figure I-26).

Ces trois forces changent avec l'orientation des cellules, mais les forces peuvent être calculées pour toutes les orientations (Neidlinger-Wilke C et col., 2001).

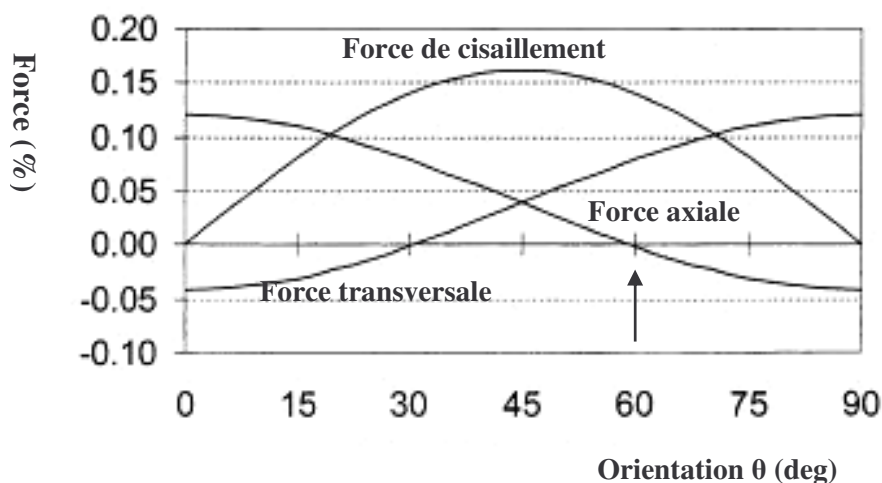


Figure I-26 : Forces agissant sur le substrat : axiale, transversale et cisaillement.
(Courbes théoriques, d'après Neidlinger-Wilke C et col., 2001)

E-3-2-2 : Réponse du ligament aux contraintes mécaniques

Le tableau I-XII rassemble les études sur la réponse des fibroblastes de différents types cellulaires à des contraintes mécaniques uniaxiales.

Tableau I-XII : Réponse des fibroblastes de différents types cellulaires à des contraintes mécaniques Uniaxials

Contrainte mécanique	Caractéristique	Origine cellulaire	Réponse des fibroblastes	Référence
Etirement cyclique Uniaxial	Fréquence = 0,1-1 Hz Elongation= 8-12% Durée= 4 h	Tendon rotulien humain	↑ PLA ₂ , LTB ₄ et PGE ₂ ↓ Prolifération et synthèse des collagènes	Li Z et col., 2004 Wang JH et col., 2004 Cilli F et col., 2004
Etirement cyclique Uniaxial	Fréquence = 1 Hz Elongation= 5% Durée= 15- 60 min	Tendon rotulien humain	↑ Activation de SAPK/JNK ↑ De l'apoptose	Skutek M et col., 2003
Etirement cyclique Uniaxial	Fréquence = 0,5-1 Hz Elongation= 8% Durée= 24 h	Lignée de fibroblaste (3T3) et tendon d'Achille de rat	↑ Expression de VEGF	Petersen W, 2004
Etirement cyclique Uniaxial	Fréquence = 1 Hz Elongation= 5% Durée= 15-60 min	Tendon rotulien humain	Production de NO	Van G M et col., 2003
Etirement cyclique Uniaxial	Fréquence = 0,2 Hz Elongation= 14% Durée= 24 h	Ligament gingival et périodontaire humain	↑ Expression de VEGF	Yoshino H et col., 2003
Etirement cyclique Uniaxial	Fréquence = 0,5 Hz Elongation= 8% Durée= 4 h	Tendon rotulien humain	↑ Expression de collagène type I	Yang G et col., 2004
Etirement cyclique Uniaxial	Fréquence = 0,1 Hz Elongation= 0,2, 1, 2, 3, 10, 18% Durée= 48 h	Ligament périodontaire bovin	↑ Expression du ARNm de collagène type I et décorine	Ozaki S et col., 2005
Etirement cyclique Uniaxial	Fréquence = 0,16 Hz Elongation= 10% Durée= 24 h	Ligament croisé antérieur humain	↑ Expression de ARNm du collagène types I et III	Kim SG et col., 2002
Etirement cyclique Uniaxial	Fréquence = 0,5 Hz Elongation= 15% Durée= 48 h	Ligament périodontaire humain	↓ De ALPase	Chiba M et col., 2004

Le tableau I-XIII rassemble les études sur la réponse des fibroblastes de différents types cellulaires à des contraintes mécaniques biaxiales

Tableau I-XIII : Réponse des fibroblastes de différents types cellulaires à des contraintes mécaniques biaxiales

Contrainte mécanique	Caractéristique	Origine cellulaire	Réponse des fibroblastes	Référence
Etirement cyclique Biaxial	Fréquence = 1 Hz Elongation= 5% Durée= 15- 60 min	Tendon rotulien humain	↑ Sécrétion de IL-6 ↑ Sécrétion de TGF- β , PDGF et bFGF	Skutek M et col., 2001a, b
Etirement cyclique Biaxial	Fréquence = 0,2 Hz Elongation= 10% Durée= 48 h	Ligament humain	↑ Expression de ARNm collagène types I et III	Nakatani T et col., 2002
Etirement cyclique Biaxial	Fréquence =1 Hz Elongation= 5% Durée= 24 h	Ligament de poumon de rat	↓ Prolifération ↑ Apoptose	Sanchez-Esteban J, 2002

E-3-2-3 : Mécano-transduction

Comment les fibroblastes sentent-ils l'effort mécanique, et comment emploient-ils cette information pour réguler la synthèse de la matrice extracellulaire ?

Le contact d'adhésion entre la cellule et la matrice forme un lien physique de la matrice extracellulaire à la membrane cellulaire et au cytosquelette. Les composants majeurs transmembranaires, les intégrines, sont essentiels pour transformer les signaux mécaniques en signal biochimique (**Galbraith CG et col., 1998 ; Shyy JY et col., 1997 ; Choquet D et col., 1997**). Les intégrines, principaux récepteurs d'adhésion couplée aux protéines du cytosquelette, participent non seulement à l'attachement des cellules à leur substrat, mais aussi à la transmission intracellulaire des signaux mécaniques. Le domaine cytoplasmique des intégrines interagit avec des protéines du cytosquelette qui sont fonctionnellement liées à une protéine tyrosine kinase, la FAK (focal adhesion kinase), qui pourrait intervenir dans la mécanotransduction (**Tanabe Y et col., 2000 ; Walker RG et col., 2000**).

E-4 : Modèles d'étude en mécanobiologie : culture et appareillage

Il existe sur le marché peu d'appareils permettant la mise en tension de tissus. La plupart du temps, les chercheurs utilisent des montages propres aux laboratoires, que ce soient des appareils de traction simple, ou des bioréacteurs.

Nous décrivons ici un rare appareil commercialisé, le FX-4000T

E-4-1 : Flexercell®

E-4-1-1 : FX-4000T

i. **FX-4000T** (Flexercell International Corp., McKeesport, PA. USA) : le bioréacteur se compose d'une unité sous vide réglé par une valve de solénoïde, sous la commande d'un programme d'ordinateur qui applique la contrainte aux cellules cultivées (figure I-27).

La contrainte est régulée par le vide pour déformer les surfaces flexibles sur lesquelles les cellules sont cultivées.



Figure I-27 : Système de Flexercell

(www.dunnlab.de/lab_flexcell_prod.htm)

- **BioFlex®** est une plaque de culture (35 mm) avec un fond flexible pour l'usage des systèmes de tension de FX3000T et de FX4000T. Elles fournissent une contrainte équi-biaxiale aux cultures de cellules en monocouche (figure I-28a).
- **Tissu Train®** est une plaque de culture pour l'usage de tension de FX4000T. Elle fournit une contrainte cyclique Uniaxial aux cellules dans une construction en gel 3D (figure I-28b).

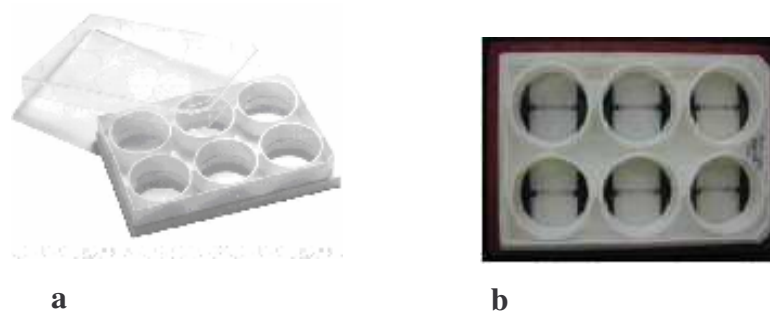


Figure I-28 : Puits de culture : a) BioFlex®, b) Tissu Train®

L'application d'un vide fournit une déformation hémisphérique de haut en bas sur le fond flexible de Flex II, ayant pour résultat un profil de contrainte non homogène avec un maximum en périphérie et un déclin géométrique vers le centre du fond de puits de culture (Chiba M et col., 2004 ; Nakatani T et col., 2002).

E-4-1-2: BioFlex Loading Station™ (LS-3000B) (Flexercell International Corp., McKeesport, PA. USA) : conçu pour fournir une contrainte équi-biaxiale à une surface de membrane de silicone (figure I-29).



Figure I-29 : System de BioFlex Loading Station™
(www.dunnlab.de/lab_flexcell_prod.htm)

E-4-2 : Bioréacteur

Les bioréacteurs *ex vivo* sont généralement définis comme un dispositif selon lequel les processus biologiques et/ou biochimiques se développent dans des conditions de fonctionnement environnementales étroitement surveillées et commandées (par exemple : pH, température, pression, apport nutritif et élimination des déchets). En tant que tels, construire un tissu en condition *ex vivo* dans un bioréacteur offre plusieurs perspectives passionnantes, telles qu'une meilleure compréhension du développement du tissu et des mécanismes pathologiques...

Différents systèmes commerciaux de bioréacteurs sont disponibles. Cependant, l'applicabilité de ces systèmes dans l'ingénierie du ligament est limitée par la généralité du dispositif, qui manque de la spécificité requise pour le ligament. Altman et col. ont développé un bioréacteur capable d'appliquer une combinaison de trois contraintes : la compression, la torsion et la tension pour imiter les conditions de charge physiologiques. Ils ont montré également que l'application des contraintes mécaniques multidimensionnelles aux cellules stromales de moelle osseuse dans un gel de collagène augmente les marqueurs fibroblastiques du ligament (collagène types I et III et la ténascine-C) (Altman GH et col., 2002b).

Le rôle des bioréacteurs, en appliquant les forces mécaniques aux constructions 3D, a pu être élargi au-delà de l'approche conventionnelle en induisant la différenciation de cellules et/ou le dépôt de matrice extra-cellulaire dans les tissus reconstruits (Altman GH et col., 2002c). Par exemple, ils ont pu également servir de modèle *in vitro* pour étudier les effets pathophysiologiques des forces mécaniques sur les tissus en développement, et pour prévoir les réponses d'un tissu aux forces physiologiques pour implantation chirurgicale.

En même temps que la caractérisation biomécanique, les bioréacteurs pourraient aider à définir le niveau d'intégrité mécanique du néo-tissu avant implantation (Demarteau O et col., 2003). L'analyse quantitative et la modélisation des contraintes éprouvées *in vivo* par les tissus normaux pour une variété d'activités et par les tissus reconstruits dans les bioréacteurs pourraient mener à des comparaisons plus précises du traitement mécanique *in vivo* et *in vitro*, et aider à déterminer les régimes potentiels de la réadaptation physique pour le patient (Butler DL et col., 2000).

E-5 : Technologie de transfert de gène

Les facteurs de croissance ont une demi-vie de quelques jours *in vivo*. Par conséquent, leur utilisation comme modalité de traitement rend nécessaire des applications répétitives afin de maintenir leur puissance. Comme la technologie de transfert de gène se développe, la capacité de contrôler l'expression et la régulation des protéines dans une cellule hôte a permis à des chercheurs et à des cliniciens d'administrer des traitements au cours de périodes prolongées sans besoin d'applications répétitives.

La technique de transfert de gène consiste à fournir un matériel génétique à la cellule cible destiné à changer sa fonction. Des gènes peuvent être placés dans les cellules *in vivo* et *in vitro*. La technique permet de maintenir une concentration élevée de facteurs de croissance à l'emplacement de la réparation par expression continue du gène. Pour cette raison, elle peut intervenir dans le processus de réparation de tendon et de ligament pour améliorer la cicatrisation et éviter les phénomènes d'adhérence.

L'utilisation des méthodes de transfert de gène pour le traitement des ligaments endommagés en est encore à ses débuts. Cliniquement, les interventions de thérapie génique ont pu avoir un impact significatif sur la réparation de LCA et des tendons fléchisseurs. Pour les LCA, la thérapie génique peut être efficace en favorisant la cicatrisation et la régénération des déchirures partielles. Pour les dommages de tendon de fléchisseur, la thérapie génique peut être employée pour favoriser la régénération de tissu et empêcher le début de l'adhérence.

Des études récentes ont montré que le gène de marqueur de *lacZ* a été présenté et exprimé avec succès sur du LLI et du LCA de lapin. **Hildebrand KA** a détecté l'expression de ce gène dans LLI et LCA entre 10 jours et 3 semaines (**Hildebrand KA et col., 1999**).

Menertey J et col. ont étudié la faisabilité de deux approches différentes de thérapie génique :

- i) transfert de gène aux LCA de façon directe
- ii) transfert de gène aux LCA par l'intermédiaire de fibroblastes, ou myoblastes

Les fibroblastes et les myoblastes allogéniques transformés ont été trouvés dans le tissu ligamentaire (**Menetrey J et col., 1999**). Les études du transfert de gène comme méthode thérapeutique ont également montré des effets positifs sur le diamètre et la distribution de fibre de collagène, ainsi bien que l'augmentation significative ($P < 0,05$) des propriétés mécaniques (**Nakamura N et col., 2001 ; Nakamura N et col., 2000 ; Nakamura N et col., 1998**).

Plusieurs études ont indiqué que les cellules progénitrices de la moelle osseuse (cellules souches mésenchymateuses) peuvent offrir des possibilités intéressantes pour améliorer la

cicatrisation du tendon d'Achille et du tendon rotulien (**Awad HA et col., 1999 ; Young RG et col., 1998**). **Lee K et col.**, ont montré que les cellules souches mésenchymateuses (CSM) peuvent être utilisées comme vecteur pour la livraison de gène. Cependant, le transfert de gène aux tendons et ligament par CSM n'a pas encore été adopté pour les ligaments intra-articulaires tels que le LCA. Cependant, cette technique reste difficile à appliquer et à mettre en œuvre (**Lee K et col., 2001**).

E-6 : Thérapie cellulaire

Un autre domaine de recherche avec des applications potentielles dans la cicatrisation du ligament est la thérapie cellulaire. Le concept est que l'implantation des cellules génétiquement manipulées peut augmenter la réparation des ligaments pendant que ces cellules deviennent des constituants du tissu cicatriciel. Les études *in vivo* et *in vitro* avec les cellules souches mésenchymateuses ont montré leur capacité de se différencier en différents types de cellules s'impliquant dans plusieurs phases de la cicatrisation du ligament. Dans une étude, la transplantation de cellules nucléées, y compris des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse dans une poche autour du LLI traité de rats, a été étudiée. Les cellules du donneur ont pu être identifiées sur les ligaments après 7 jours, démontrant le potentiel de migration des cellules transplantées. Cette étude souligne que la thérapie cellulaire a la possibilité d'être une nouvelle méthode de traitement du ligament endommagé à long terme (**Watanabe N et col., 1998**).

	CHAPITRE II MATERIELS ET MÉTHODES	
--	--	--

Méthodologie générale

A. Culture cellulaire

Dans notre travail, nous avons utilisé deux types de cellules fibroblastiques.

- Lignée cellulaire humaine de fibroblastes de peau (F-CRL.2703, ATCC™ N° 2584882). C'est une lignée qui a été établie à partir d'un prépuce normal de nouveau né. Elle a été achetée chez American Type Culture Collection (ATCC™, USA). Les cellules sont capables d'accomplir au moins 49 divisions avant d'atteindre le seuil de sénescence.
- Culture primaire de fibroblastes de ligament croisé antérieur (LCA).

A-1 : Réactifs et matériels

A-1-1 : Lignée cellulaire F-CRL.2703

a) Milieu de culture et additifs

Produits	Concentration	Référence
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Nut Mix F-12		21331, GibcoBRL, France.
Pénicilline	100 U/mL	15070, GibcoBRL, France
Streptomycine	100 µg/mL	15070, GibcoBRL, France
Fungizone®	2,5 µg/mL	15290, GibcoBRL, France
Acide ascorbique	0,85 mM	A4544, Sigma, France
Acides aminés non essentiels	1 %	11140, GibcoBRL, France
L-glutamine	4 mM	25030, GibcoBRL, France
NaHCO ₃	18 mM	S 8875, Sigma, France
Sérum de veau fœtal	10%	2010, GibcoBRL, France

Le sérum est préalablement décongelé, puis décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 minutes. Les additifs ci-dessus sont filtrés sur 0,22 µm (réf SLG.P033RSM, Millipore, France), puis ajoutés au milieu DMEM.

b) Tampon HBSS (Hank's balanced salts solution)

HBSS (réf. H2387, Sigma, France) sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} . Ce tampon contient : KCl 0,4 g/L, NaCl 8,0 g/L, KH_2PO_4 0,06 g/L, Na_2HPO_4 0,04778 g/L, D-glucose 1,0 g/L et rouge de phénol 0,011 g/L.

L'HBSS sous forme de poudre est reconstitué de la manière suivante :

⇒ Dissoudre la poudre de HBSS dans 900 mL d'eau distillée.

⇒ Agiter la solution.

⇒ Ajuster le pH à 7,2 en ajoutant 0,35 g de NaHCO_3 (réf. S 8875, Sigma, France).

⇒ Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 1000 mL (pH=7,2).

⇒ Filtrer la solution sur 0,22 μm .

⇒ Conserver à 4°C.

c) Tampon PBS (Phosphate buffered saline)

Produits	Concentration	Référence
NaCl	137 mM	BDH, France
KCl	27 mM	Prolabo, France
Na_2HPO_4	10 mM	Prolabo, France
KH_2PO_4	1,4 mM	Prolabo, France

d) Solutions de trypsine-EDTA

La solution de trypsine-EDTA (réf. T3224, Sigma, France) est préparée dans le tampon de HBSS pour avoir une concentration de 0,125%, aliquotée et conservée à -20°C. Cette solution est utilisée pour détacher les cellules des supports de culture.

A-1-2 : Culture primaire de fibroblastes de ligament croisé antérieur (LCA)

a) Origine du ligament

Les fibroblastes du ligament croisé antérieur (LCA) sont issus de l'ablation de LCA sur des patients du service ATOL du CHU de Nancy, ayant subi une pose de prothèse. La séparation et la mise en culture sont effectuées selon la méthode de Chen modifiée (**Chen H et col., 2002**).

b) Réactifs

Produits	Concentration	Référence
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Nut Mix F-12		21331, GibcoBRL, France
Pénicilline	100 U/mL	15070, GibcoBRL, France
Streptomycine	100 µg/mL	15070, GibcoBRL, France
Fungizone®	2,5 µg/mL	15290, GibcoBRL, France

c) Protocole de prélèvement

Les morceaux de ligament sont coupés après ablation chirurgicale et immédiatement mis dans une boîte de culture de 75 cm² contenant 100 à 150 mL de milieu DMEM + 100 U/mL de pénicilline + 100 µg/mL de streptomycine + 2,5 µg/mL de Fungizone®. Porté rapidement au réfrigérateur à 4°C, le ligament est utilisé dans les 24 heures.

d) Digestion des échantillons de ligament

❖ *Enzyme de digestion*

La collagénase 400 U/mL (réf. C9407, Sigma, France) est reconstituée dans du milieu DMEM Nut Mix F-12 complet.

La solution digestive est préparée, aliquotée, et congelée à -20°C. Elle est décongelée extemporanément.

❖ *Matériel*

Pour recueillir le LCA et récolter les fibroblastes, tout le matériel utilisé doit être stérile.

⇒ Pinces de chirurgien, ciseaux de chirurgien pointus, lames, scalpels, gants stériles.

⇒ Plastiques : boîte de culture rectangulaire, flacons de culture 25 cm².

⇒ Verrerie : erlenmeyer de 100 mL.

⇒ Bain-marie avec agitation à 37°C.

❖ *Protocole de digestion*

⇒ Plonger le LCA trois fois dans du milieu de culture sans sérum ou un tampon de lavage (HBSS).

⇒ Enlever tous les tissus péri-ligamenteux et la membrane synoviale en grattant à l'aide d'un scalpel.

⇒ Couper le LCA en petits morceaux (1 mm³), placer les morceaux dans l'erlenmeyer contenant 10-20 mL de collagénase de type XI.

- ⇒ Laisser les morceaux de ligament dans la collagénase pendant 15-16 h sous agitation magnétique et à 37°C (température optimale pour l'action de l'enzyme).
- ⇒ Après la digestion, ajouter 30 mL de milieu, puis centrifuger la suspension cellulaire 10 min à 300g.
- ⇒ Les cellules sont remises en suspension dans 5 mL de milieu de culture complet et ensemencées dans une boîte de culture de 25 cm², puis sont mises dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂, 95% d'air.
- ⇒ Après 3 jours, le milieu est jeté, les cellules sont lavées deux fois dans la boîte avec le milieu complet pour éliminer les cellules non adhérentes.
- ⇒ Les cellules sont remises dans l'incubateur avec 5 mL de milieu de culture complet.
- ⇒ La confluence est obtenue après 7-10 jours.

A-2 : Mise en culture et passages

A-2-1 : Matériels et supports

- ⇒ *Boîte de culture* : 75 cm² en polypropylène (réf. 353136, Dutscher, France).
- ⇒ *Boîte de culture* : 25 cm² en polypropylène (réf. 353109, Dutscher, France).
- ⇒ *Lamelles de verre rondes* : diamètre 14 mm (réf. 631-0692, VWR, France), diamètre 32 mm (réf. 79724.02, VWR, France).
- ⇒ *Plaques 24 puits*: (réf. 662106, Dutscher, France), *plaques 6 puits* (réf. CLS3516, Sigma, France).
- ⇒ *Boîte de Pétri ronde* : diamètre 35 mm (réf. 391-2072, VWR, France), 90 mm (réf. 391-0877, VWR, France).
- ⇒ *Membrane de silicone* : épaisseur 0,0254 cm (Specialty manufacturing INC, USA).

A-2-2 : Passage en subculture

Lorsque les cellules sont arrivées à confluence, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont lavées 2 fois avec 5 mL de tampon HBSS préchauffé à 37°C. La solution de digestion trypsine-EDTA 0,125% filtrée est ajoutée dans la boîte, et laissée au contact des cellules 2-3 minutes à 37°C. Le détachement du tapis cellulaire est contrôlé au microscope optique. Ensuite, la digestion est stoppée avec 4 mL de milieu de culture complet. La suspension cellulaire est recueillie dans des tubes coniques stériles, puis centrifugée à 300g pendant 6 minutes. Après avoir été lavées, les cellules sont remises en suspension dans 10 mL de milieu de culture. La numération cellulaire et l'estimation de la viabilité cellulaire sont alors réalisées.

A-2-3 : Numération et viabilité cellulaire

a. Matériels

⇒ Bleu de trypan : (réf. T8154, Sigma, France).

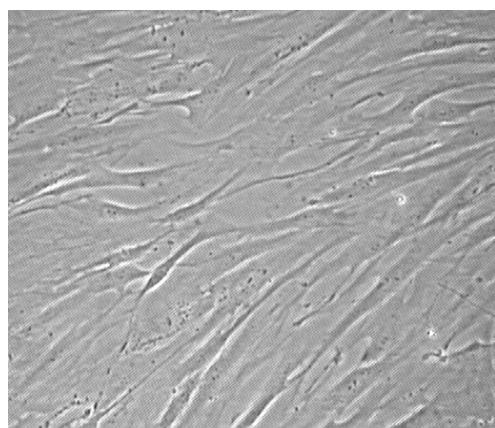
⇒ Cellule de Thoma : (réf. A1401021, Fisher, France).

b. Méthode

Les cellules sont comptées sur une cellule de Thoma et la viabilité est évaluée selon le test d'exclusion au bleu de trypan. La viabilité est supérieure à 90%.

La suspension cellulaire est ajustée à une concentration de 1×10^6 cellules/boîtes de 75 cm² pour la lignée cellulaire ou 3×10^5 cellules/boîtes de 25 cm² pour les fibroblastes de LCA avec le milieu complet. Cette suspension cellulaire servira à ensemercer les différents supports de cultures utilisés.

A confluence, les cellules sont minces et fusiformes ou étoilées et possèdent de longs prolongements cytoplasmiques caractéristiques des fibroblastes (figure II-1). Leur cytoplasme est peu visible et seul leur noyau, ovoïde, allongé, avec un ou deux nucléoles, est bien visible.



a



b

Figure II-1 : Aspect des fibroblastes. a. Lignée cellulaire de fibroblastes, b. Culture primaire de fibroblastes de LCA. Images obtenues au microscope inversé à contraste de phase (Olympus, IMT-2 ; objectif x 20)

A-2-4 : Préparation des échantillons

a) Nettoyage et stérilisation des supports

❖ *Protocole de nettoyage*

⇒ Plonger les supports (lamelles de verre ou membranes de silicone) dans l'éthanol pendant 24 h.

⇒ Déposer stérilement les supports dans des boîtes ou des plaques selon leur diamètre.

⇒ Exposer l'ensemble sous une lampe UV germicide pendant 15 min sous hotte.

b) Préparation de gélatine

❖ *Matériels*

⇒ Gélatine (réf. G-1890, Sigma, France).

❖ *Protocole*

⇒ Dissoudre la gélatine (1% p/v) dans l'eau distillée au bain-marie à 60°C.

⇒ Filtrer la solution de gélatine sur un filtre de 0,22 µm.

c) Revêtement des supports avec la gélatine

⇒ Incuber 1 h à 4°C.

⇒ Au moment de l'utilisation des supports, les boîtes de pétri ou les plaques sont placées à 37°C pendant 15-20 minutes et la solution superflue est éliminée.

⇒ Laisser les supports sécher sous la hotte.

B. Stimulation et traitement des cellules

B-1 : Stimulation biochimique

B-1-1 : Facteurs de croissance

a) TGF-β1 (Transforming Growth Factor-β1)

TGF-β1 Human, Recombinant Expressed in mammalian cells (réf. T7039, Sigma, France).

La préparation de la solution de TGF-β1 s'effectue à partir d'une solution de 2 µg de TGF-β1 dans 2 mL de milieu complet, répartie dans 20 tubes de 1,5 mL à raison de 100 µL par tube (concentration finale : 1 µg/mL). Le TGF-β1 ainsi préparé est conservé à -80°C.

Les fibroblastes sont stimulés 72 h à 37°C avec différentes concentrations de TGF-β1 (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ng/mL).

b) PDGF-AB (Platelet Derived Growth Factor)

PDGF-AB Human, Recombinant Expressed in E. coli. (réf. P 3326, Sigma, France).

La préparation de la solution de PDGF-AB s'effectue à partir d'une solution de 10 µg de PDGF dans une solution de 10 mL de HCl (4 mM) + BSA (0,1%) (réf. T-0157, Sigma, France) filtrée, répartie dans 50 tubes de 1,5 mL à raison de 200 µL par tube (concentration finale : 1 µg/mL). Cette solution est conservée à -20°C.

Les fibroblastes sont stimulés 72 h à 37°C avec différentes concentrations de PDGF-AB (1 ; 5 ; 10 ; 50 ng/mL).

❖ *Test MTT*

⇒ Lamelles de verre rondes (diamètre 14 mm) en raison de 5×10^4 cellules/puits.

⇒ Membranes de silicone rondes (diamètre 14 mm) recouvertes avec 1% de gélatine.

❖ *Analyse du cycle cellulaire*

⇒ Lamelles de verre rondes (diamètre 14 mm) en raison de 5×10^4 cellules/puits.

⇒ Membranes de silicone rondes (diamètre 14 mm) recouvertes ou non avec 1% de gélatine.

Ces supports sont insérés dans les puits de plaques à 24 puits.

❖ *RT-PCR*

⇒ Lamelles de verre rondes (diamètre 32 mm) en raison de 1×10^6 cellules/puits.

⇒ Membranes de silicone rondes (diamètre 32 mm) recouvertes ou non avec 1% de gélatine.

Ces supports sont insérés dans des boîtes rondes (diamètre 35 mm).

B-2 : Stimulation mécanique : étirement

L'application d'une contrainte mécanique, l'étirement, a été réalisée grâce à un appareil prototype réalisé par M. Marchand. Cet appareil permet de soumettre les cellules à des tractions cycliques de 5 à 20% à des fréquences de 0 à 2 Hz.

Les fibroblastes, lignée ou culture primaire, sont exposés à une traction de 5% et à des fréquences de 0,5 ou 1 Hz (30 ou 60 cycles/minutes), pendant 24 h.

Des membranes de silicone recouvertes de gélatine 1% sontensemencées à des densités cellulaires de 3×10^5 cellules de fibroblastes. Les membranes ont des dimensions de 44X70 mm et sont contenues dans des boîtes de Pétri. Après 4 h de sédimentation au repos, les cellules ont adhéré en majeure partie à la membrane de silicone. 7 mL de milieu complet sont ajoutés. Les boîtes sont placées dans l'étuve à 37°C durant 24 h. Après 24 h le milieu est changé avec un milieu contenant 10% ou 0,5% de SVF.

Deux membranes peuvent être placées dans le prototype d'étirement. Les membranes sont fixées par une pince à chaque extrémité (figure II-2). Une des pinces est fixe tandis que l'autre est reliée à un piston mobile entraîné par un moteur. Les membranes sont recouvertes avec 35 mL de milieu (10% ou 0,5% de SVF). La chambre d'étirement est parcourue par un flux de CO₂ à 5%. Le système est placé dans une étuve à 37°C.

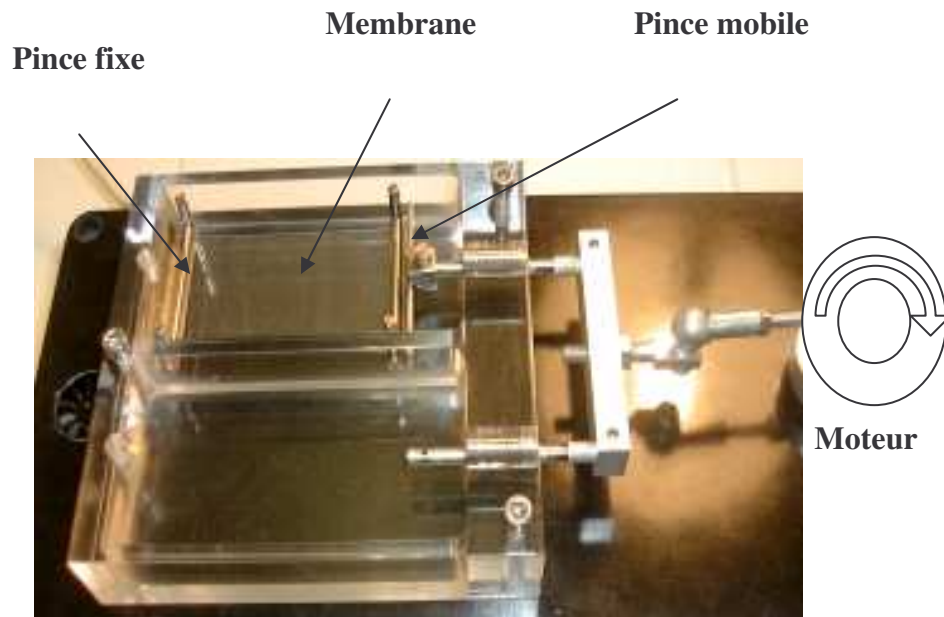


Figure II-2 : Chambre d'étirement

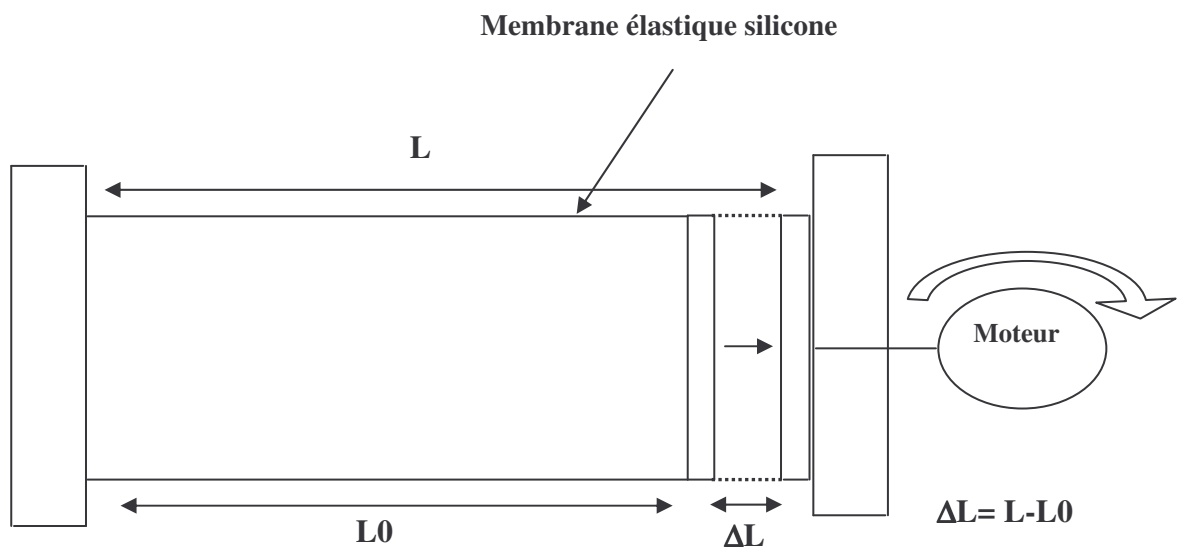


Figure II-3 : Schéma de la chambre d'étirement

Avant de commencer les expériences d'étirement, nous avons dû valider l'appareil de traction d'un point de vue mécanique en étudiant l'homogénéité de la contrainte d'étirement sur la membrane de silicone (figure II-3), et également d'un point de vue physico-chimique en contrôlant plusieurs facteurs tels que le pH (CO_2), la température, et la stérilité.

Afin d'étudier la zone d'homogénéité de la membrane de silicone, nous l'avons compartimentée en 56 points de repère. La membrane a été soumise à deux pourcentages d'étirement (10 et 20%) grâce à une pince.

Nous avons ensuite observé les points sous microscope à contraste de phase, puis mesuré leur épaisseur en X, Y et ainsi que la diagonale Z à l'aide du logiciel vislog (Olympus, IMT-2). Nous avons ensuite calculé les rapports entre les dimensions obtenues au repos et celles obtenues après 10 et 20% d'étirement (figure II-4).

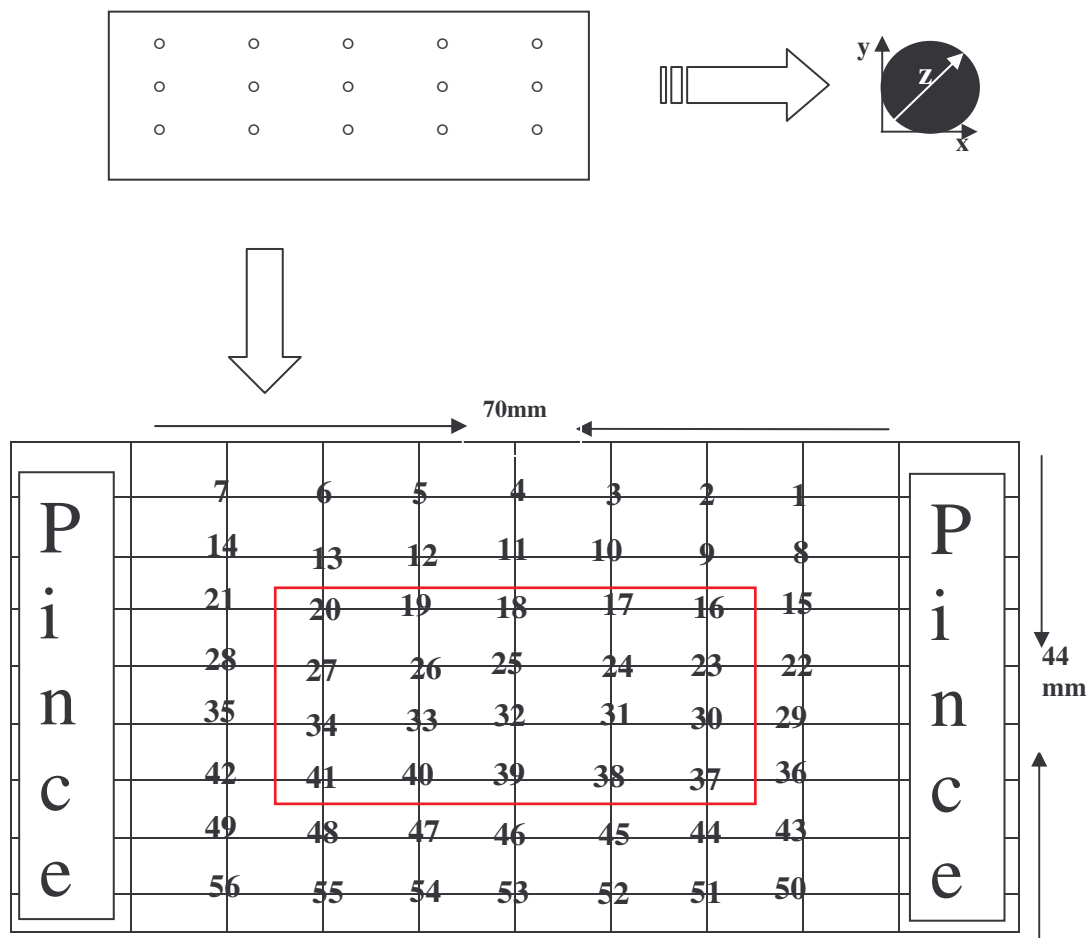


Figure II-4 : Schéma de la membrane de silicone

Une zone d'intérêt a ainsi été déterminée sur la membrane de silicone, où le coefficient de variation des membranes l'épaisseur ne dépasse pas 5% (la zone rouge délimitant la zone homogène du point de vue de la contrainte).

C. Méthodologie spécifique

C-1 : Activité métabolique (test MTT)

C-1-1 : Principe

Le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) est un colorant vital, marqueur fonctionnel des mitochondries. Le principe du test MTT consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale (NADH^+ dépendante) des cellules vivantes (figure II-5).

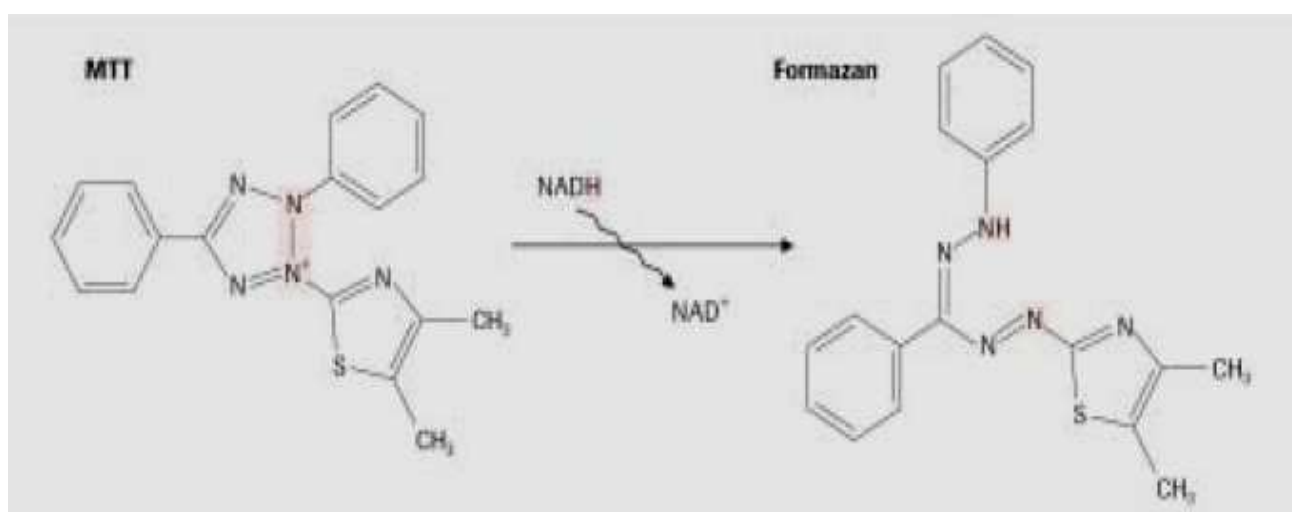


Figure II-5 : Principe de la réaction de réduction du MTT

Cette enzyme, par coupure du cycle tétrazolium, transforme le MTT, de couleur jaune, en cristaux de formazan pourpres. Après dissolution de ces cristaux dans l'isopropanol, une lecture spectrophotométrique est réalisée à 570 nm.

La densité optique lue est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes et est fonction du temps de culture. Ce test nous permettra d'évaluer la cytotoxicité éventuelle des différents supports de culture. Ainsi, une cellule viable sera bleu intense alors qu'elle sera incolore en cas de nécrose.

C-1-2 : Réactifs et matériels

Produits	Concentration	Référence
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sans rouge de phénol		11880-028, GibcoBRL, France
Phosphate Buffer Saline (PBS)		
MTT	2 mg/mL dans du PBS	M5655, Sigma, France
Isopropanol acidifié	0,04 N HCl dans de l'isopropanol absolu	27, 8475, Sigma, France
Spectrophotomètre		DU 600, Beckman, USA

C-1-3 : Protocole

Les cellules sontensemencées à une densité de 3×10^4 cellules/cm² (5×10^5 cellules/puits) sur les différentes surfaces préparées. Les cellules sont stimulées avec différentes concentrations de PDGF-AB pendant 72 h. Le milieu de culture est alors enlevé dans chaque puits et remplacé par 500 µL de DMEM sans rouge de phénol, préalablement chauffé à 37°C. Puis 125 µL de MTT dissous dans du PBS à 2 mg/mL sont ajoutés dans chaque puits.

Après 4 h d'incubation à 37°C, les cristaux pourpres de formazan sont dissous dans 800 µL d'isopropanol acidifié à l'aide d'une pipette. Le surnageant est placé dans des tubes «eppendorff» et centrifugé (2 min à 600g). Enfin, la densité optique est mesurée à 570 nm (λ de mesure) et à 700 nm (λ de référence).

C-2 : Analyse du cycle cellulaire

C-2-1 : Principe

On appelle cycle cellulaire l'intervalle entre chaque division cellulaire. C'est l'ensemble des modifications qu'une cellule subit entre sa formation par division de la cellule mère et le moment où cette cellule a fini de se diviser en deux cellules filles

Chaque cycle cellulaire consiste en différentes phases (figure II-6) :

☞ **Phase G₀** (phase de quiescence) : on appelle G₀ l'état de repos des cellules qui ne se divisent pas.

☞ **Phase G₁** (phase de croissance) : étape de préparation à la synthèse de l'ADN. C'est la phase qui caractérise la plupart des événements régulateurs de la croissance et de la division cellulaire. C'est la phase du cycle cellulaire dont la durée est la plus longue, et la plus variable selon le type cellulaire.

☞ **Phase S** (duplication de l'ADN) : phase de réplication du génome cellulaire.

☞ **Phase G₂** (phase de synthèse des protéines mitotiques) : phase de préparation à la mitose et elle est essentiellement caractérisée par des modifications de conformation chromatidienne.

☞ **Phase M** (phase de mitose) : division cellulaire. Elle est caractérisée par une condensation de l'ADN qui permet ainsi la formation des chromosomes. La durée de la phase M est en général très courte, inférieure à une heure.

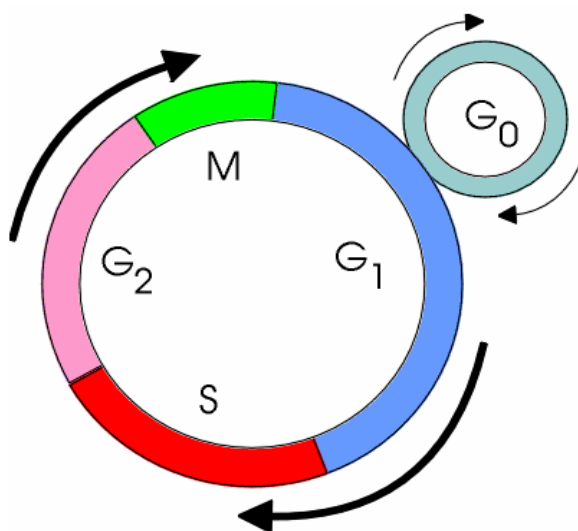


Figure II-6 : Représentation schématique du cycle cellulaire

La quantité d'ADN contenue dans un noyau interphasique en G₀/G₁ est stable et constante pour une espèce donnée. Chez l'homme, elle est de l'ordre de 5 à 6 pg dans les cellules somatiques.

A l'état physiologique, cette quantité ne varie qu'au cours du cycle cellulaire. Elle est de 2N dans le noyau interphasique en G₀/G₁. Elle augmente progressivement pendant la phase S pour atteindre 4N en phase G₂. Lors de la phase M, la division de la cellule mère dont le contenu en ADN est de 4c donne deux cellules filles de contenu en ADN égal à 2N.

C-2-2 : Réactifs et matériels

⇒ Kit Coulter DNA-Prep Reagents (réf. 6607055, Beckman-Coulter, USA)

- DNA prep LPR, qui fixe les cellules
- DNA-Prep Stain, contenant des RNases et de l'iodure de propidium (PI)

⇒ Trypsine-EDTA à 0,125% (réf. T3224, Sigma, France)

⇒ Milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) complet

⇒ Phosphate Buffer Saline (PBS)

C-2-3 : Marquage de l'ADN

L'ADN a été marqué par l'iodure de propidium (IP) ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$). C'est un fluorochrome qui s'intercale entre les bases de la double hélice d'ADN.

C-2-4 : Protocole

Les cellules sontensemencées à une densité de 3×10^4 cellules/cm² sur les différentes surfaces, et stimulées avec différentes concentrations de PDGF-AB pendant 72 h. Au temps fixé, les puits sont vidés et les cellules sont incubées 5 min à 37°C avec 1 mL/puits de trypsine à 0,125%. Le détachement du tapis cellulaire est contrôlé au microscope optique inversé, et la trypsine est inactivée par l'ajout de 1 mL de milieu complet dans chaque puits. La suspension présente dans chaque puits est homogénéisée à l'aide d'une micropipette.

La totalité des cellules de 3 puits identiques est versée dans un tube, les tubes sont centrifugés 10 min à 300g. Les culots sont lavés avec du PBS, le surnageant est jeté, 2 mL de PBS sont ajoutés, les tubes sont agités durant 30 s puis centrifugés 10 min à 300g.

Un deuxième lavage est effectué et les cellules sont resuspendues dans 200 μL de PBS. 50 μL de suspension cellulaire sont prélevés et répartis dans des tubes à hémolyse auxquels sont ajoutés 50 μL de DNA prep LPR, les tubes sont agités durant 30-60 secondes. Puis 500 μL de DNA-Prep Stain sont ajoutés, les tubes sont agités encore 30-60 secondes. Les tubes sont prêts à être analysés par cytométrie en flux.

C-2-5 : Analyse des échantillons

Les échantillons sont analysés au cytomètre en flux (EPICS XL-MCL , Coulter ; Beckman-Coulter) (cf. annexe 1). Chaque échantillon est d'abord analysé en diffusion [FSC (forward scatter detector)] et [SSC (side scatter detector)] afin d'identifier les cellules en fonction de leur taille et de leur granulosité. Une fenêtre prenant en compte uniquement cette population est dessinée afin d'éliminer les débris cellulaires. L'acquisition se fait sur 10000 évènements analysés apparaissant dans la zone d'intérêt (R1) (figure II-7A). L'intensité de fluorescence de chaque cellule est proportionnelle à leur teneur en ADN.

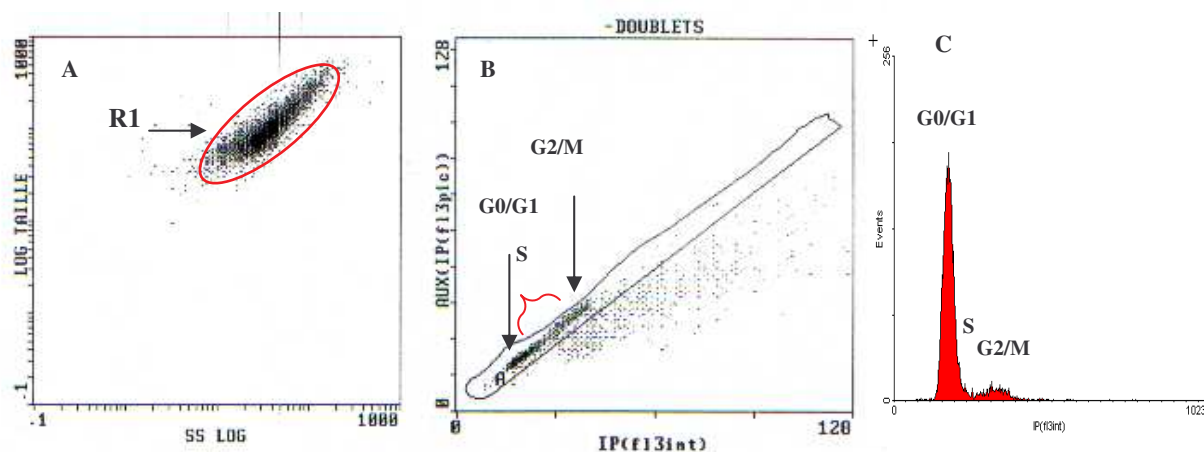


Figure II-7 : A : Cytogramme FSC en fonction de SSC qui reflète la taille et la granulosité des cellules. B : Histogramme montrant les populations cellulaires. C : histogramme représentant les phases du cycle cellulaire

La relation de proportionnalité existant entre IF_{IP} et le pic de fluorescence est établie en réglant les PMT de manière à positionner les cellules selon un angle de 45° et en excluant ainsi les doublets (figure II-7B) (cf. annexe 2).

Pour l'interprétation de ses différentes phases, le cycle cellulaire fait l'objet d'une modélisation mathématique en utilisant une analyse polynomiale du modèle de Dean et Jett [Multi Cycle AV (Phoenix Flow System, San Diego, USA)] qui calcule le pourcentage de cellules dans les différentes phases (Figure II-8).

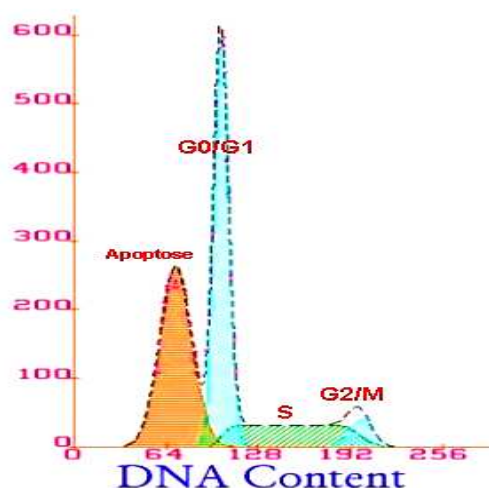


Figure II-8 : Histogramme de répartition des phases du cycle cellulaire

http://sciencepark.mdanderson.org/flow/files/DNA_PI.html

C-3 : Détection des ARNm par RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerisation Chain Reaction*)

Nous avons mesuré le niveau d'expression de l'ARN messager des collagènes de types I, III et de la ténascine-C dans les fibroblastes (F-CRL.2703 et des fibroblastes provenant de prélèvements de LCA) par une méthode de RT-PCR semi-quantitative.

C-3-1 : ARNm et RT-PCR

a) Principe

Etude de l'ARN (expression monocaténaire de l'ADN) par formation d'un ADN complémentaire (ADNc) grâce à la transcriptase reverse, puis amplification de celui-ci par PCR.

Dans la première partie, l'ARNm à étudier est détecté en utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique (amorce 1 qui s'hybride à l'extrémité 3' de l'ARNm cible), puis la transcriptase inverse permet la synthèse du brin complémentaire (sous forme d'un ADNc simple brin). Une seconde amorce oligonucléotidique spécifique (amorce 2) permettra la synthèse du second brin par extension.

L'ADN complémentaire synthétisé sera amplifié par action de la Taq polymérase (enzyme travaillant à haute température), d'amorces spécifiques et de nucléotides dans un thermocycleur (BioRad, USA).

Avant la réaction, tous les « acteurs » de la PCR sont mis en présence. Il s'agit de l'ADN à amplifier (**séquence cible**), des oligonucléotides (ou amorces) spécifiques du segment d'ADN voulu, de l'ADN polymérase (ici la Taq polymérase) et enfin du mélange des quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN. Tous sont ajoutés en excès par rapport à l'ADN.

La séquence cible (figure II-9) représente le segment d'ADN qui sera amplifié (recopié entre 20-30 fois). Elle est déterminée lors du choix du couple d'amorces. Cette étape est déterminante. Le choix des amorces doit tenir compte de plusieurs paramètres (spécificité, taille, paramètres physico-chimiques...) pour obtenir des résultats satisfaisants. Des règles basées sur ces paramètres permettent de définir le couple d'amorces le mieux adapté.

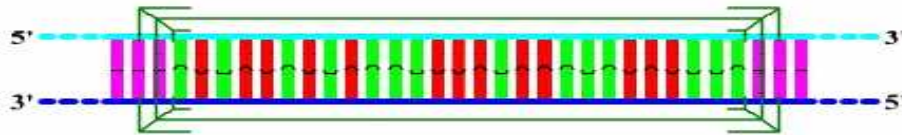


Figure II-9 : Séquence cible

La technique de PCR comporte des cycles successifs. Chaque cycle est constitué de trois phases différentes à trois températures différentes :

⇒ **La dénaturation** par la chaleur pour séparer les brins d'ADN (92-95°C) (30 secondes à 1 minute).

A cette température, les liaisons faibles qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN (figure II-10).

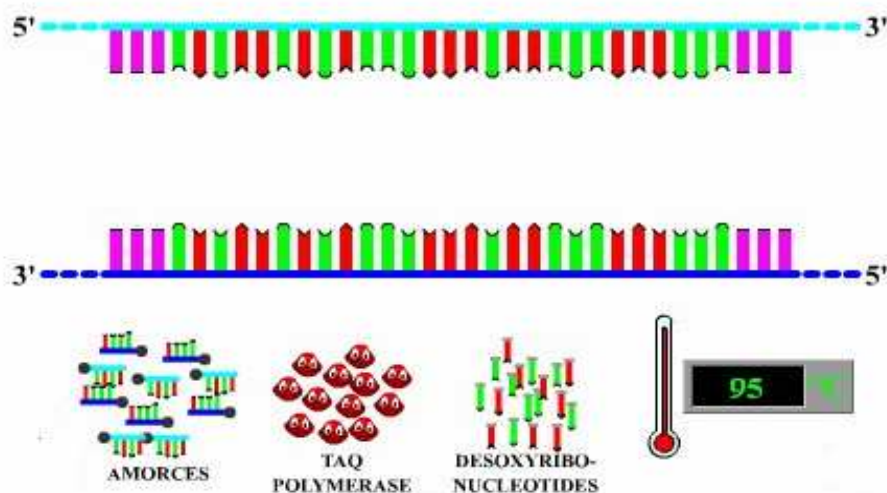


Figure II-10 : Etape de dénaturation des brins d'ADN

⇒ **L'hybridation (ou anelage)**, avec les deux amorces spécifiques entre 55-65°C. La première amorce se fixe sur un brin d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire (30 secondes-1 minute).

L'hybridation des amorces sur l'ADN repose sur le principe de l'appariement des bases complémentaires (figure II-11).

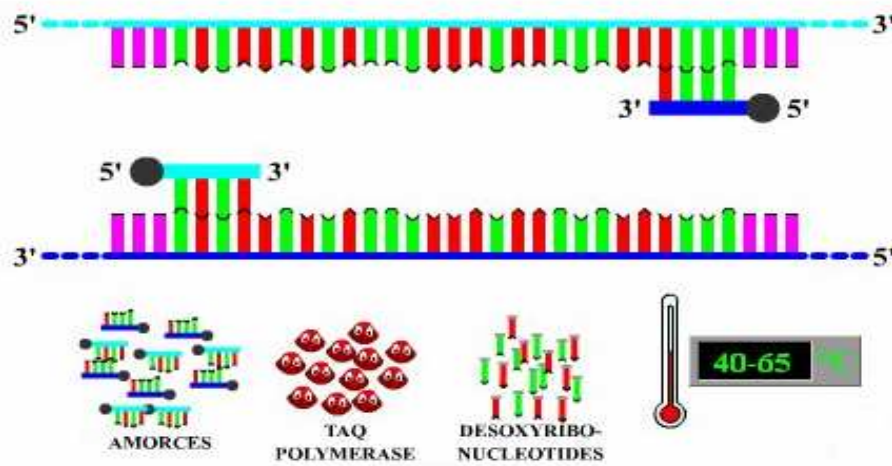


Figure II-11 : Etape d'hybridation des amorces d'ADN

Le choix de la température d'hybridation résulte d'un compromis entre plusieurs paramètres. Elle est calculée en fonction de la longueur et de la séquence des amorces. La température d'hybridation est inférieure à la température de dénaturation.

⇒ *L'élongation (ou extension des amorces)*, est réalisée par l'ADN polymérase à partir des amorces à 70-72°C pendant 1 à 2 minutes. Les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice. La polymérisation se fait par ajouts successifs des désoxyribonucléotides. Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice (figure II-12).

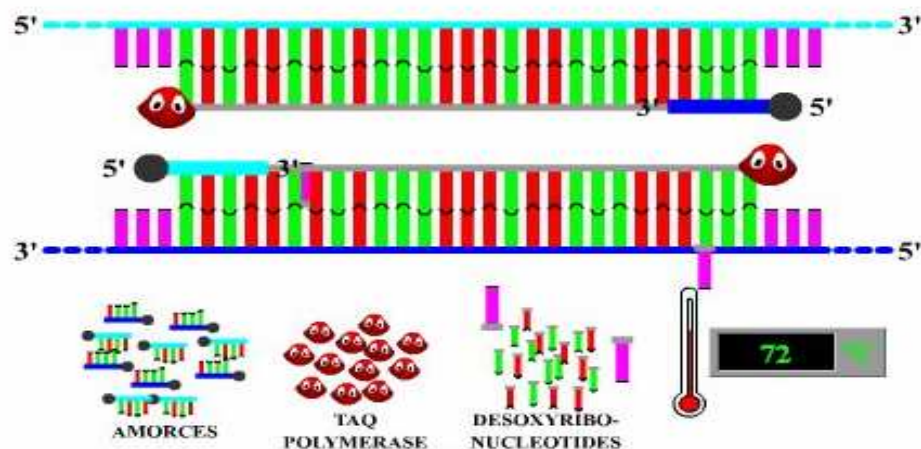


Figure II-12 : Etape d'extension des amorces

Les ADN polymérases sont des enzymes qui synthétisent l'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. La polymérase extraite de *Thermophilus aquaticus* (microorganisme vivant près des sources hydrothermales où la température dépasse les 100°C) a la propriété de résister à de très hautes températures, comme celles utilisées lors de la PCR, et donc de rester active pendant la réaction.

Au cours du premier cycle, les brins initiaux sont donc copiés, chacun servant de matrice pour l'autre. Le nombre de cycles ne dépasse pas 30 à 40. En effet, si on effectue un trop grand nombre de cycles, il ne sera plus possible de faire de la quantification. Cette méthode permet d'amplifier l'ADN compris entre les deux amorces d'un facteur de 10^5 et 10^6 .

b) Migration des fragments d'acide nucléique dans des gels

Il est possible de déterminer le poids moléculaire des acides nucléiques obtenus par PCR par migration électrophorétique dans un gel d'agarose (figure II-13). L'électrophorèse des fragments d'ADNc en gel d'agarose permet des séparations jusqu'à 20-25 kb. Un générateur crée un champ électrique grâce à deux électrodes plongeant de part et d'autre dans une cuve qui contient le gel et une solution tampon utilisée pour la migration électrophorétique appelée TBE = Tris-Borate-EDTA pour inhiber l'ADNase par chélation de Ca^{2+} ou d'ions bivalents (pH basique = 8,3).

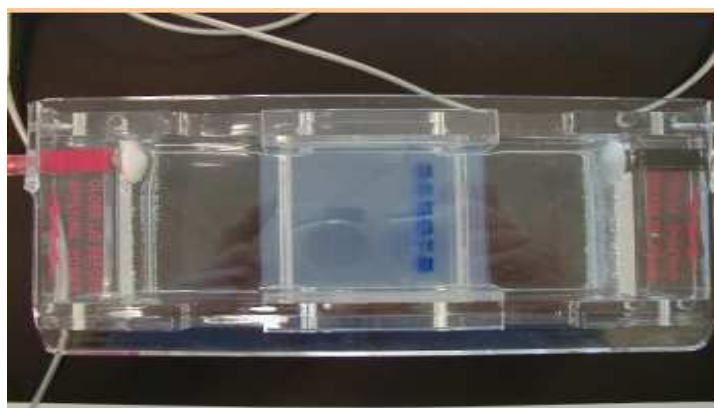


Figure II-13 : Migration d'acide nucléique dans des gels

c) Détection des nucléotides

La détection des nucléotides après migration est réalisée par un marquage au bromure d'éthidium (produit intercalant de l'ADN : qui se fixe entre les deux chaînes nucléotidiques) qui est incorporé dans le gel ($\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ et 530 nm ; $\lambda_{\text{em}} = 622 \text{ nm}$).

C-3-2 : Protocoles expérimentaux

a) Isolation de l'ARN total

❖ Protocole d'extraction

L'extraction de l'ARN des fibroblastes est réalisée à partir de $1 \text{ à } 2 \times 10^6$ cellules (figure II-14).

⇒ Laver les cellules avec du PBS.

⇒ Ajouter 1 mL de Trizol (réf. 15596-026, Invitrogen, USA) dans une boîte de culture de $3,5 \text{ cm}^2$ de diamètre, puis homogénéiser le lysat cellulaire avec une pipette.

⇒ Incuber l'échantillon homogénéisé à température ambiante pendant 5 à 10 minutes.

⇒ Passer l'échantillon dans un tube de 1,5 mL et ajouter 0,2 mL de chloroforme (réf. C2432, Sigma, France).

⇒ Secouer vigoureusement le tube pendant 15 à 20 secondes et incuber à température ambiante pendant 2 à 3 minutes.

⇒ Centrifuger l'échantillon à 4°C à 12000g pendant 15 minutes. Après la centrifugation le mélange forme 3 phases :

- la phase supérieure est une phase aqueuse incolore contenant l'ARN
- l'interphase contient l'ADN
- la phase inférieure rose formée par le phénol et le chloroforme contient notamment des protéines et des lipides.

⇒ Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube de 1,5 mL.

⇒ Ajouter 0,5 mL d'isopropanol (réf. I0398, Sigma, France) et agiter doucement par retournement du tube puis incuber à température ambiante pendant 10 minutes.

⇒ Centrifuger le tube à 4°C à 12000g pendant 10 minutes.

⇒ Retourner doucement le tube pour éliminer le surnageant puis ajouter 1mL d'éthanol à 75%.

⇒ Centrifuger à 4°C à 7500g pendant 5 minutes.

⇒ Retourner doucement le tube pour éliminer le surnageant et laisser sécher le culot à l'air libre pendant 10 minutes.

⇒ Ajouter 50 μL de DEPC- H_2O (réf. 750024, Invitrogen, USA), incuber l'échantillon à 56°C pendant 10 minutes, puis le placer sur la glace.

⇒ Prendre 5 μL de la solution d'ARN pour mesurer sa concentration et sa pureté par spectrophotométrie. Le reste peut être utilisé pour la RT-PCR ou stocké à -80°C .

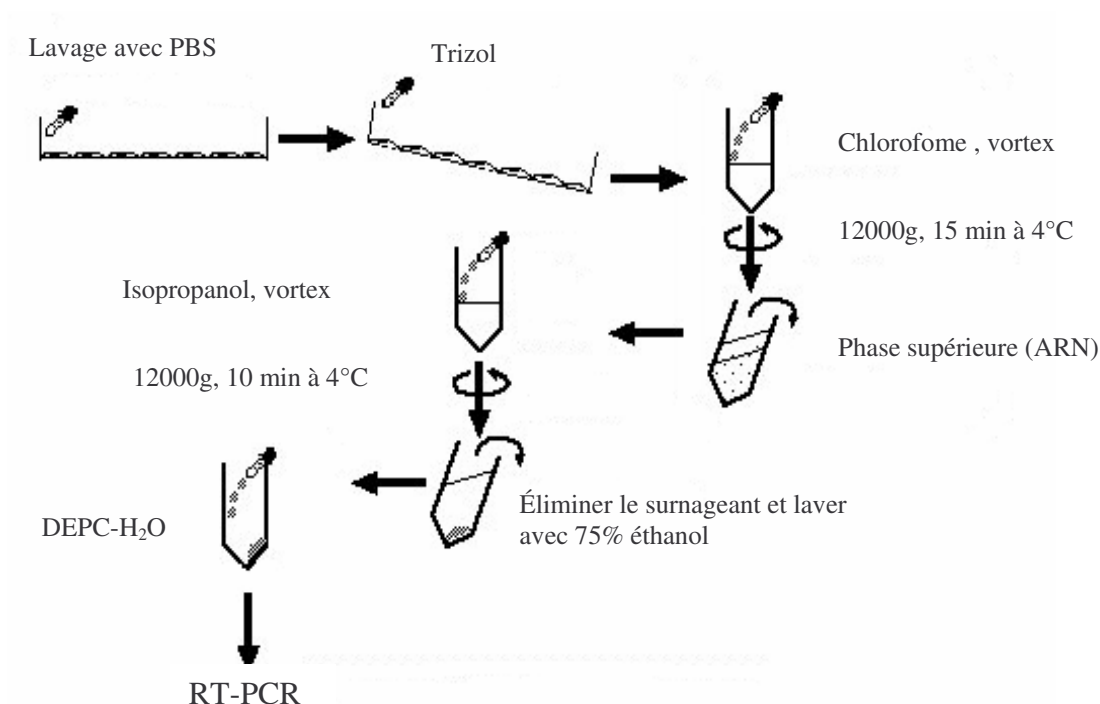


Figure II-14 : Représentation schématique de l'extraction de l'ARN

❖ *Mesure de la concentration et de la pureté des ARN*

Le rapport A_{260}/A_{280} nous renseigne sur la pureté en ARN de la solution. La densité optique à 280 nm reflète la quantité de protéines contaminantes présentes dans l'ARN total extrait. Celle à 260 nm est spécifique des acides nucléiques. Le rapport des absorbances à 260 nm et 280 nm atteste de la qualité de l'ARN :

- ⇒ $A_{260}/A_{280} = 1,8 \text{ à } 2,0$ la pureté de l'ARN est élevée
- > 2,2 l'ARN est contaminé par les sels
- < 1,6 l'ARN est contaminé par des protéines

La concentration des ARN est déterminée par la mesure de la densité optique (DO) à 260 nm sur un spectrophotomètre (DU 600, Beckman, USA).

$$\Rightarrow \text{Concentration ARN } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \text{DO}_{260} \times 40 \mu\text{g/mL} \times \text{dilution}$$

1 unité de DO à 260 nm correspond à 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ d'ARN simple brin.

b) Transcription inverse (RT)

❖ *Réactifs et matériels*

- ⇒ Tube 0,2 mL (réf. 223-9473, BioRad, USA).
- ⇒ iScript cADN Synthesis Kit (réf. 170-8891, BioRad, USA).

⇒ Thermocycleur (MyCycler™) (réf. 578BR 0159, BioRad, USA).

❖ *Protocole*

⇒ Centrifuger tous les réactifs avant utilisation et les placer sur la glace.

⇒ Préparer les tubes de réaction sur la glace.

⇒ Ajouter les réactifs suivants dans chaque tube de 0,2 mL pour avoir un volume final de 20 µL :

5x iScript™ Reaction Mix ADNc Synthesis	4 µL
iScript Reverse Transcriptase	1 µL
Nuclease – Free water	x µL
Échantillon d'ARN	(0,1-0,5 µg)
Volume total	20 µL

⇒ Placer les tubes dans le thermocycleur et lancer le programme d'incubation (iScript cADN Synthesis Kit):

5 minutes à 25°C

30 minutes à 42°C

5 minutes à 85°C

Les ADNc peuvent être stockés à -20°C jusqu'à la réalisation de la PCR

c) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Sur le tableau II-I sont rassemblées les séquences des amorces utilisées (Nakamura Y et col., 2004 ; Nakatani T et col., 2002).

Tableau II-I : Représentatif des séquences des amorces

<i>ARNm</i>	<i>Les séquences des amorces</i>	<i>Taille (bp)</i>
Collagène Type I	5'-TCC CCA GCC ACA AAG AGT CTA CA-3' 5'-GTG ATT GGT GGG ATG TCT TCG TC-3'	155
Collagène Type III	5'-CTG CCA TCC TGA ACT CAA GAG TGG-3' 5'-CCA TCC TCC AGA ACT GTG TAG G-3'	447
Ténascine-C	5'-CAG CTC CAC ACT CCA GGT AC-3' 5'-CTT TCG CTG GGC TCT GAA GG -3'	448
β-actine	5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG-3' 5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3'	838

L'étude comparative de l'expression de ces gènes par les cellules ayant subi différents traitements est possible par utilisation d'un étalon interne comme la β -actine ou la glycéraldéhyde 3-phosphate dehydrogénase (GAPDH). Dans notre cas, nous avons choisi la β -actine.

Les conditions de PCR ont été optimisées pour chaque paire d'amorces.

La phase d'amplification est réalisée dans un mélange final de 50 μ L:

Tampon – $MgCl_2$ (10x)	5 μ L
$MgCl_2$ (50 mM)	1,5 μ L
dNTPs Mix (10 mM)	1 μ L
Amorce 1	1 μ L
Amorce 2	1 μ L
Taq polymérase	0,2 μ L
ADNc	2 μ L
H2O DEPC	38,3 μ L
Volume total	50 μ L

Les tubes sont placés dans le thermocycleur (BioRad, USA) et le programme d'incubation des trois différentes étapes de PCR est lancé.

d) Electrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose

En milieu basique, les fragments d'ADN sont chargés négativement. Placés dans un champ électrique, ils vont donc se déplacer vers l'anode, mais, leurs charges respectives étant à peu près équivalentes, c'est leur masse moléculaire qui va régler leur vitesse de déplacement à travers les mailles du gel dans lequel ils ont été placés. Plus les fragments sont petits, plus ils vont migrer rapidement et plus ils seront loin de leur point de départ.

❖ *Réactifs et matériels*

⇒ Gel d'agarose	(réf. A9539, Sigma, France).
⇒ TBE (Tris-Borate-EDTA) 10x	(réf. 161-0733, BioRad, USA).
⇒ 100 bp ADN Ladder	(réf. 15628-019, Invitrogen, USA).
⇒ Tampon de charge	(réf. 161-0767, BioRad, USA).
⇒ Bromure d'éthidium	(réf. 161-0433, BioRad, USA).

❖ *Préparation du gel*

- ⇒ Dissoudre la poudre d'agarose dans un tampon de 0,5x TBE à pH= 8.2 (2% p/v).à $\approx 100^{\circ}\text{C}$.
- ⇒ Verser lentement le gel dans la cuve sans dépasser le niveau supérieur des dents du peigne.
- ⇒ Laisser refroidir 30 min environ avant d'enlever délicatement le peigne. Les puits sont alors prêts pour recevoir les dépôts d'ADN.
- ⇒ Mettre en place le gel dans la cuve, les puits sont placés du côté de la cathode (négatif) et la cuve est remplie de tampon TBE jusqu'au niveau supérieur du gel.

❖ *Préparation d'échantillons d'ADN*

- ⇒ Mélanger l'échantillon d'ADN avec un tampon de charge (*en proportion : 5 μL de tampon de charge pour 20 μL d'ADN*) et déposer chaque échantillon, ainsi que le marqueur de taille (ADN Ladder) à chaque extrémité des puits.
- ⇒ Laisser migrer jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel (environ 80 min à 100 V).

❖ *Révélation de bandes d'ADN*

Le gel est immergé dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 $\mu\text{g/mL}$) pendant 20 min. Les bandes sont visualisées sous UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$) (réf. GS-2000, Bio-Rad, USA) avec enregistrement de l'image grâce au logiciel Gel Doc 1000® (Bio-Rad, USA). La taille des produits de PCR obtenus est évaluée en utilisant un témoin de masse moléculaire, le marqueur de taille. L'analyse densitométrique est alors réalisée avec le logiciel *Quantity One Image* software (Bio-Rad, USA). Le pourcentage de variation entre la bande caractéristique de chaque échantillon par rapport à la β -actine est calculé ainsi :

$$\text{DO (\%)} = \text{DO de la bande d'intérêt} / \text{DO de la bande de } \beta\text{-actine}$$

C-4 : Fluorescence - immunofluorescence

Les molécules de collagène et de ténascine-C exprimées à l'extérieur de la cellule sont marquées par immunofluorescence indirecte après stimulation biochimique ou mécanique.

C-4-1 : Principe de l'immunomarquage indirect

Des molécules exprimées à la surface cellulaire ou à l'intérieur des cellules (marqueurs cellulaires) sont reconnues spécifiquement par un anticorps (Anticorps primaire). Afin de mettre en évidence la formation du complexe molécules-anticorps primaire, un deuxième anticorps est utilisé (Anticorps secondaire). Ce dernier est couplé à un fluorochrome et il est

dirigé spécifiquement contre la partie Fc (fragment commun) de l'anticorps primaire (figure II-15).

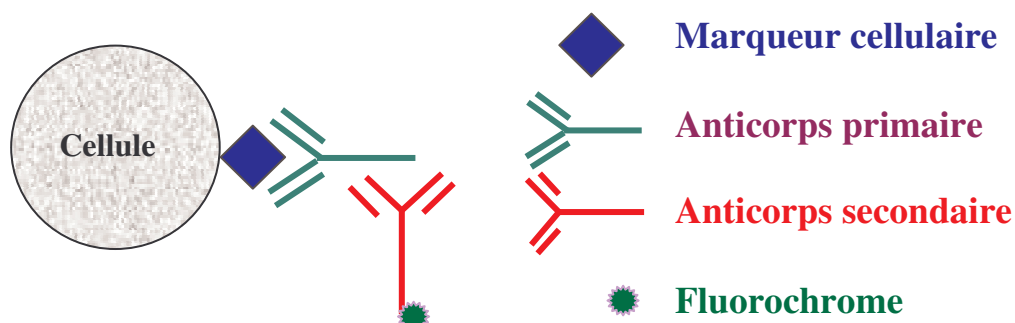


Figure II-15 : Schéma de principe de l'immunofluorescence indirecte

a) Marquage des molécules étudiées

Les caractéristiques des anticorps polyclonaux dirigés contre les molécules de collagène de type I et type III, et de ténascine-C, ainsi que celles des anticorps secondaires sont présentées dans le tableau II-II.

Tableau II-II : Caractéristiques des anticorps utilisés pour les marquages en immunofluorescence indirectes

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Origine commerciale
<i>Anticorps anti collagène I</i>	Humain	Lapin	Calbiochem (réf. 234183)
<i>Anticorps anti collagène III</i>	Humain	Lapin	Calbiochem (réf. 234189)
<i>Anticorps anti ténascine-C</i>	Humain	Lapin	Santa Cruz (réf. Sc-20932)
<i>Anticorps anti IgG-Alexa fluor® 488</i> (λ_{ex} : 488 nm, λ_{em} : 519 nm)	Lapin	Chèvre	Molecular Probes (réf. A-11008)
<i>Anticorps anti IgG-Alexa fluor® 633</i> (λ_{ex} : 633 nm, λ_{em} : 647 nm)	Lapin	Chèvre	Molecular Probes (réf. A-21050)

b) Réactifs

⇒ DMEM-BSA 0,5% (BSA : Albumine Sérique Bovine, Sigma, France) utilisé à 0,5% (p/v dans DMEM sans rouge phénol). La BSA est utilisée afin d'empêcher toute fixation aspécifique des anticorps.

⇒ Solution de fixation (PAF) Paraformaldéhyde (réf. Sigma, France) à 1% p/v dans PBS.

⇒ Solution de perméabilisation : Triton X100 (réf. Sigma, France) à 0,5% dans PBS.

c) Préparation des échantillons

Après les stimulations chimiques ou mécaniques, les cellules sont lavées 2 fois avec du DMEM, le marquage par immunofluorescence indirect est effectué in situ.

d) Protocole

⇒ Incubation avec l'AC primaire (dilution 1:50 dans un DMEM-BSA 0,5%), pendant 45 min à température ambiante.

⇒ Trois lavages avec DMEM.

⇒ Incubation avec l'AC secondaire (dilution 1:100 dans un DMEM-BSA 0,5%), pendant 30 min à 37°C à l'abri de la lumière.

⇒ Deux lavages avec DMEM.

⇒ Fixation avec PAF à 1% pendant 10 min à température ambiante.

⇒ Deux lavages avec DMEM. Les cellules sont prêtes pour l'examen au microscope à fluorescence.

Un contrôle négatif (cellules sans anticorps) et un contrôle iso typique (marquage aspécifique) sont préparés et analysés en même temps que les échantillons.

C-4-2 : Marquage du cytosquelette

La phalloïdine couplée à un fluorochrome permet de visualiser le cytosquelette. Il s'agit d'une toxine trouvée dans un champignon (*Amanita phalloïdes*) et qui présente une grande affinité pour la F-actine.

Le marquage des microfilaments de F-actine est réalisé en présence de phalloïdine - Alexa 488 ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 519 \text{ nm}$) (réf. A-12379, Molecular Probes, USA) après avoir fixé et perméabilisé les échantillons. L'incubation dure 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les échantillons sont ensuite rincés dans du DMEM, les cellules sont prêtes à être observées en microscopie à fluorescence.

C-4-3 : Préparation des échantillons cellulaires pour AFM – acquisition des images

Les cellules sont ensemencées et cultivées pendant 10 jours sur du verre. Au temps désiré, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS à 37°C, puis fixées avec une solution de glutaraldéhyde à 2,5% pendant 15 min. Ensuite les cellules sont lavées avec du PBS et déshydratées dans différents bains successifs d'éthanol (50, 75, 90, 100%) pendant 10 min. Les cellules sont ensuite conservées à 4°C jusqu'à l'acquisition des images.

Les images sont réalisées en mode contact sur un microscope à force atomique Nanoscope IV (Digital Instruments, CA, USA) équipé d'un cantilever en silicone nitrure à une fréquence de 1,97 Hz (Annexe 3 B).

C-5 : Microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence permet de compléter les résultats obtenus en RT-PCR par une étude qualitative. Nous avons utilisé :

- Microscopie confocale à balayage laser ou CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope, SP2 Leica, Germany) (cf. annexe 3 A)

D. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés par la moyenne $\pm$ écart type [SD] (excepté pour les expériences de combinaison qui sont exprimés par la moyenne $\pm$ écart type [SE]). Une analyse de la variance a été réalisée par comparaison des échantillons avec un test a posteriori PLSD de Fisher (Statview IV®, Abacus Concepts Inc., Berkley, CA, USA). Les valeurs de probabilité (p) inférieures à 0,05% ont été considérées comme significatives.

	CHAPITRE III RÉSULTATS ET DISCUSSION	
--	---	--

A. Influence des facteurs de croissance

Ainsi que nous l'avons décrit plus haut, (cf. Chapitre I), les facteurs de croissance sont des polypeptides de poids moléculaire peu élevé (6-30 kDa) qui régulent la croissance et les fonctions des cellules, grâce à une fixation sur des récepteurs spécifiques cellulaires de grande affinité. De nombreuses études décrivent le rôle des facteurs de croissance dans la cicatrisation du ligament et du tendon, et ont déterminé des stratégies appropriées pour l'usage des facteurs de croissance dans l'ingénierie tissulaire du tendon et du ligament. Divers facteurs de croissance, tels que le *transforming growth factor* (TGF), le *platelet derived growth factor* (PDGF), l'*insulin-like growth factor* (IGF) sont connus pour améliorer la prolifération de cellules de tendon et de ligament ou la formation de matrice *in vitro* ou *in vivo*. Cependant, il y a une grande dispersion dans les protocoles expérimentaux et les conditions optimales sont encore à définir.

Cette étude a été conduite dans le but d'optimiser les conditions biochimiques de culture *in vitro*. Dans le cas de l'ingénierie tissulaire du ligament, les facteurs de croissance ont été choisis de façon à intervenir sur deux points essentiels :

- la prolifération cellulaire
- la synthèse de la matrice

Dans cette optique, nous avons choisi deux facteurs de croissance le PDGF-AB et le TGF- β , connus respectivement pour leurs actions sur la prolifération et sur la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC).

Dans un premier temps, l'objectif de nos travaux a été d'étudier les effets des facteurs biochimiques tels que les facteurs de croissance (TGF- β 1 et PDGF-AB) sur une lignée cellulaire de fibroblastes humains de peau (F-CRL.2703, ATCC N°.2584882) cultivés sur différentes surfaces présentant un intérêt dans notre étude :

- membrane de silicone, recouvert ou non avec 1% de gélatine qui servira de support à l'étude de mise sous contrainte d'étirement
- verre, comme surface de référence en culture cellulaire

Les effets des deux facteurs de croissance ont été étudiés sur leurs activités spécifiques en fonction de leur concentration, du temps d'incubation et de leur action combinées :

- le TGF- β (*transforming growth factor- β*) pour la synthèse des éléments de la matrice extracellulaire collagène de type I, de type III considérés comme des marqueurs spécifiques pour distinguer les fibroblastes de ligament.

Chapitre III : Résultats et discussion

- le PDGF-AB (*platelet derived growth factor*) pour la croissance et la prolifération cellulaire.

Toutefois, quelques travaux préliminaires ont été nécessaires pour définir l'action des deux facteurs de croissance, afin de justifier notre choix final.

A-1 : Résultats préliminaires – Action des facteurs de croissance sur la prolifération cellulaire

Ces études ont été réalisées sur le substrat de référence, le verre.

A-1-1 : Action du TGF- β sur la prolifération et l'activité métabolique des cellules

Nous avons étudié l'effet de différentes concentrations de TGF- β 1 (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ng/mL) sur la prolifération, pour une lignée de fibroblastes cultivés sur une lamelle de verre pendant différents temps (24, 48, 72 h). Nous avons contrôlé ces résultats du point de vue de l'activité métabolique des cellules.

La figure III-1 montre une évolution de taux de prolifération des fibroblastes en fonction du temps (augmentation de l'absorbance à 570 nm, test MTT), quelle que soit la concentration de TGF- β 1.

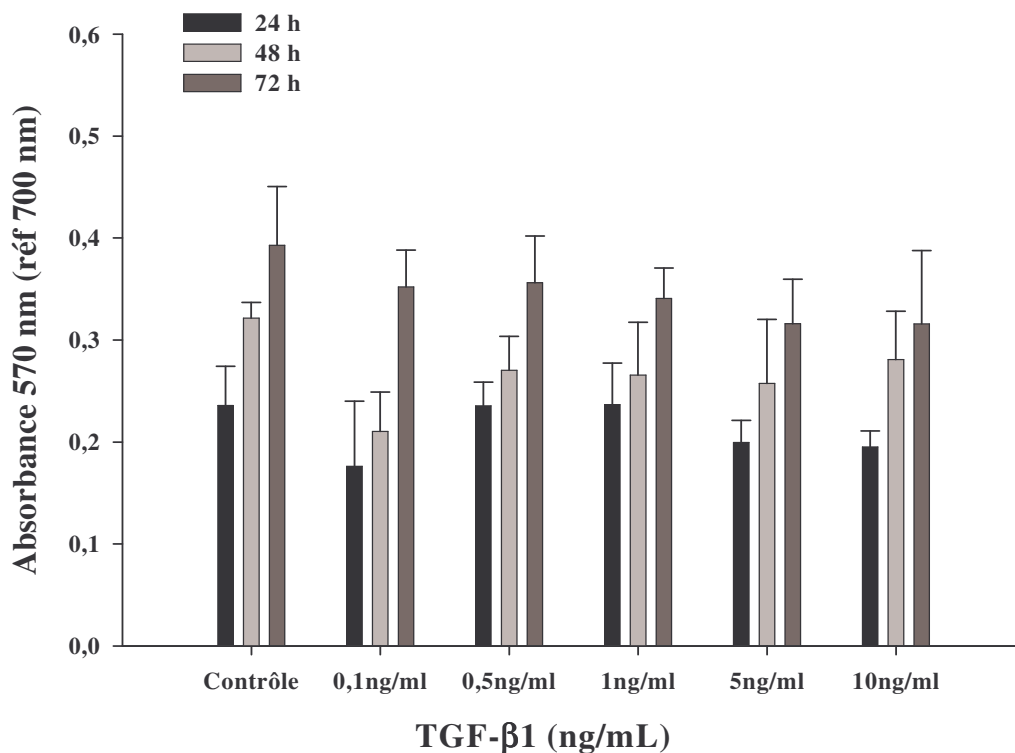


Figure III-1 : Influence de différentes concentrations de TGF- β 1 (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ng/mL) sur la prolifération cellulaire de fibroblastes. Les cellules sont cultivées sur une lamelle de verre pendant 24, 48, 72 heures, n= 6.

Sur la figure III-2 sont rassemblés les résultats concernant le métabolisme cellulaire approché mesuré en ramenant les mesures de DO observées lors du test MTT au nombre de cellules en fonction du temps et des concentrations.

En effet, l'absorbance mesurée après le Test MTT est proportionnelle à l'activité mitochondriale cellulaire. Si l'on ramène cette valeur au nombre de cellules, il est possible de parler d'activité métabolique et non plus simplement de prolifération. L'activité métabolique sera donc calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité métabolique par cellules} = \text{Absorbance}_{570\text{ nm}} / \text{Nb de cellules}$$

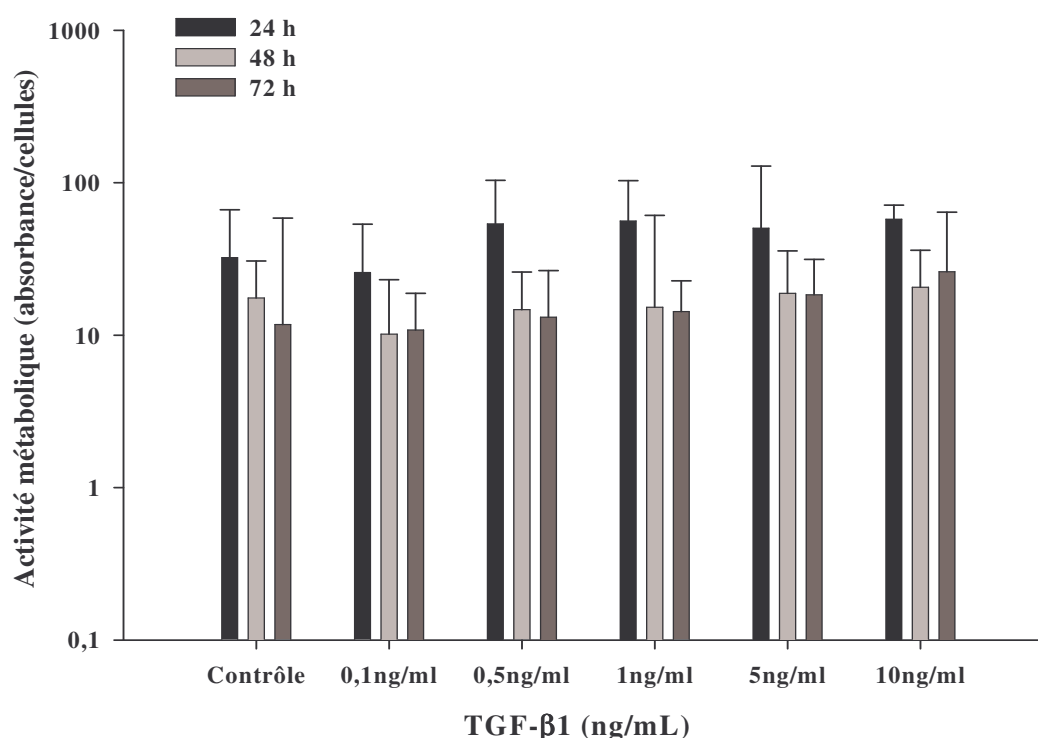


Figure III-2 : Mesure de l'activité métabolique cellulaire (test MTT) après 24, 48 et 72 heures de culture. Les fibroblastes sont cultivés sur une lamelle de verre avec différentes concentrations de TGF-β1 (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ng/mL), n = 6

D'après nos résultats, nous observons aucune modification du métabolisme cellulaire en présence de TGF-β. Il semble donc que le facteur de croissance ait peu d'influence sur les paramètres de prolifération cellulaire. Nous avons ensuite comparé son action à celle du PDGF-AB, que lui, est décrit comme un facteur mitogène, activateur de la prolifération (Meaney MM et col., 2003 ; Ojima Y et col., 2003).

A-1-2 : Effet du PDGF – AB sur la prolifération cellulaire. Comparaison avec le TGF-β1

Les concentrations de PDGF-AB décrites dans la littérature, varient de 0 à 200 ng/mL (Hetzel M et col., 2005 ; Thomopoulos S et col., 2004 ; Worapamorn W et col., 2001). En raison de cette disparité, nous avons dans un premier temps testé des concentrations intermédiaires, de manière à choisir une concentration maximale optimale, dans un souci de non-toxicité et de contingence économique.

Nous avons donc testé sur 24 et 72 heures, l'effet de deux concentrations de PDGF-AB : 10 et 50 ng/mL et nous avons comparé ces résultats à ceux obtenus avec le TGF-β. Pour cette étude, seuls deux temps ont été retenus : 24 et 72 h.

Par ailleurs, étant donné que nous avons travaillé par la suite, sur des cellules ligamentaires du LCA, nous avons testé ce facteur de croissance sur les deux types cellulaires.

Sur la figure III-3 sont rassemblés les résultats obtenus sur la prolifération cellulaire (mesuré par test MTT).

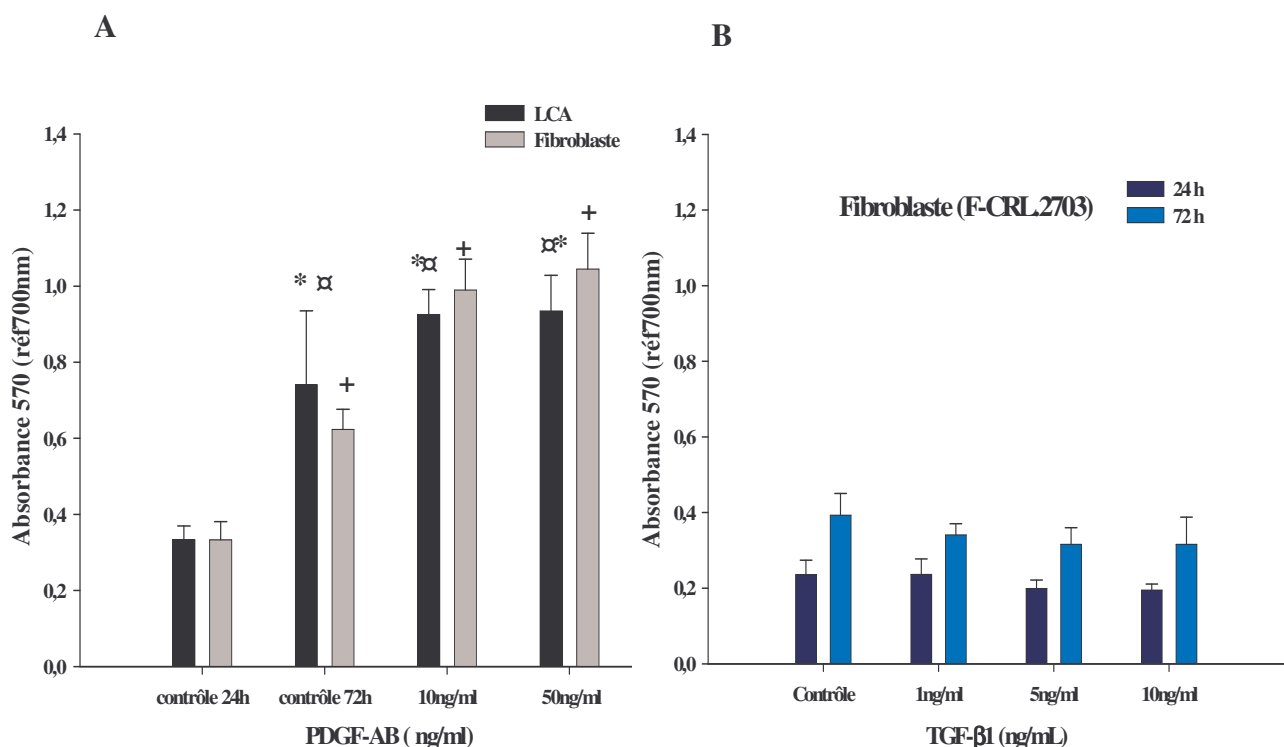


Figure III-3 : Influence de différentes concentrations de : A) PDGF-AB (10 et 50 ng/mL), B) TGF-β1 (1 ; 5 ; 10 ng/mL) sur la prolifération cellulaire. Les cellules sont cultivées sur une lamelle de verre pendant 24 et 72 heures. + $p \leq 0,01$ fibroblaste versus contrôle fibroblaste 24 h et * $p \leq 0,01$ LCA versus contrôle LCA 24 h, α $p \leq 0,05$ LCA versus fibroblaste (F-CRL.2703), n = 14

D'après la figure III-3A, aucune différence entre les deux types cellulaires n'est observée à 24 h, en absence de facteurs de croissance. Il apparaît qu'après 72 h de culture, les cellules de LCA montrent une prolifération plus élevée que la lignée de fibroblastes F-CRL.2703. En revanche, ces cellules répondent de manière plus faible au PDGF-AB. En effet, on observe une prolifération significativement plus élevée pour la lignée de fibroblastes F-CRL.2703 en présence de PDGF.

En résumé, le PDGF-AB a un effet significatif sur la prolifération des deux types cellulaires, avec un effet plus marqué pour la lignée de fibroblastes F-CRL.2703.

Par ailleurs, il n'y a pas de différence significative au niveau des deux doses de PDGF-AB. Il semble donc que l'activité maximale ait déjà été atteinte à 10 ng/mL PDGF-AB.

À partir de ces résultats, nous testerons donc des concentrations plus faibles de PDGF-AB (1 à 50 ng/mL).

D'autre part, si nous comparons l'effet des deux facteurs de croissance, nous pouvons conclure, d'après la figure III-3B, que le TGF- β 1 ne présente pas d'effet sur la prolifération cellulaire, ainsi que nous l'avons déjà rapporté ci-dessus, contrairement au PDGF-AB.

A-2 : Optimisation des conditions biochimiques et influence du substrat *in vitro* en ingénierie tissulaire

Suite à ces résultats préliminaires sur la prolifération cellulaire, nous avons défini les conditions biochimiques optimales de notre étude en prenant en compte un certain nombre de paramètres tels que :

- la prolifération cellulaire, par test MTT et cycle cellulaire
- la synthèse d'une nouvelle matrice, l'expression des protéines matricielles (collagène de types I et III), par différentes techniques d'approches :
 - ❖ qualitative par microscopie confocale
 - ❖ quantitative par RT-PCR (étude des ARNm)

Ainsi que nous l'avons dit plus haut, ces travaux ont été réalisés en condition statique, mais sur des matériaux utilisés sous conditions d'étirement (membrane de silicone recouverte ou non avec 1% de gélatine, le verre étant considéré comme une surface contrôle).

Les travaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication (voir ci-après).

“Optimisation of biochemical condition and substrates *in vitro* for Tissue engineering of ligament”, Fawzi-Grancher S et col., 2006 (Annals of biomedical engineering)

L'objectif de ce travail a été de définir les conditions de reconstruction *in vitro* d'un tissu ligamentaire. En voici un résumé succinct.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet du PDGF-AB à différentes concentrations (1 ; 5 ; 10 ; 50 ng/mL) sur la prolifération cellulaire, mise en évidence par test MTT et cycle cellulaire. En effet, l'étude des phases S et G2/M sont des marqueurs potentiels de la prolifération cellulaire.

Nous avons montré que le PDGF-AB présente un effet positif sur la prolifération cellulaire. Quel que soit le support, nous avons montré que le pourcentage de cellules en phase de synthèse S et de mitose G2/M augmente, (analysé par cytométrie en flux) avec pour corollaire une baisse significative de la phase G0/G1. Par ailleurs, il semble que la présence de gélatine entraîne également une augmentation de la prolifération cellulaire (G0/G1= 61% membrane de silicone avec la gélatine et 80% sans gélatine et le verre). Ce résultat peut être expliqué par les propriétés physiques de la surface du substrat. Il a été montré que la prolifération cellulaire augmente quand les cellules sont cultivées sur des substrats où leurs

angles de contact est de 60-80° comme des plaques de culture recouverte par des protéines telle que la gélatine (**Hori Y et col., 2004**).

Les résultats de cycle cellulaire sont confirmés par le test métabolique au MTT. Nous avons observé que la prolifération de fibroblastes augmente quand les cellules sont traitées pendant 3 jours avec les différentes concentrations de PDGF-AB quelle que soit la surface étudiée.

D'après ces résultats, il nous semble qu'une concentration de 10 ng/mL soit une valeur optimale pour induire une réponse maximale des fibroblastes. En effet, la réponse cellulaire augmente jusqu'au 10 ng/mL, puis un plateau apparaît.

Ainsi que nous l'avons dit plus haut, l'action du TGF- β 1 sur la synthèse des collagènes a été réalisée par l'analyse des ARNm par RT-PCR (effet précoce) et par observation des molécules présentes par microscopie de fluorescence (effet plus tardif).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence de différentes concentrations de TGF- β 1 (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ng/mL) sur la synthèse de différents composants matriciels : collagène de type I et de type III, le TGF- β 1 agissant sur ces voies métaboliques, et non sur la prolifération cellulaire, ainsi que nous l'avons montré dans notre étude préliminaire.

Pour définir la concentration optimale de TGF- β 1, nous avons choisi 5 concentrations de TGF- β 1 allant de 0,1 à 10 ng/mL, ces dernières étant le plus souvent citées dans la littérature (**Murray MM et col., 2002 ; Nakatani T et col., 2002**).

Parallèlement à ces travaux sur l'expression du collagène péri-cellulaire, nous avons également effectué une étude en AFM afin de visualiser la sortie des fibres de collagène de la cellule. Sur la figure III-4 sont rassemblées les images obtenues par microscopie à force atomique (AFM).

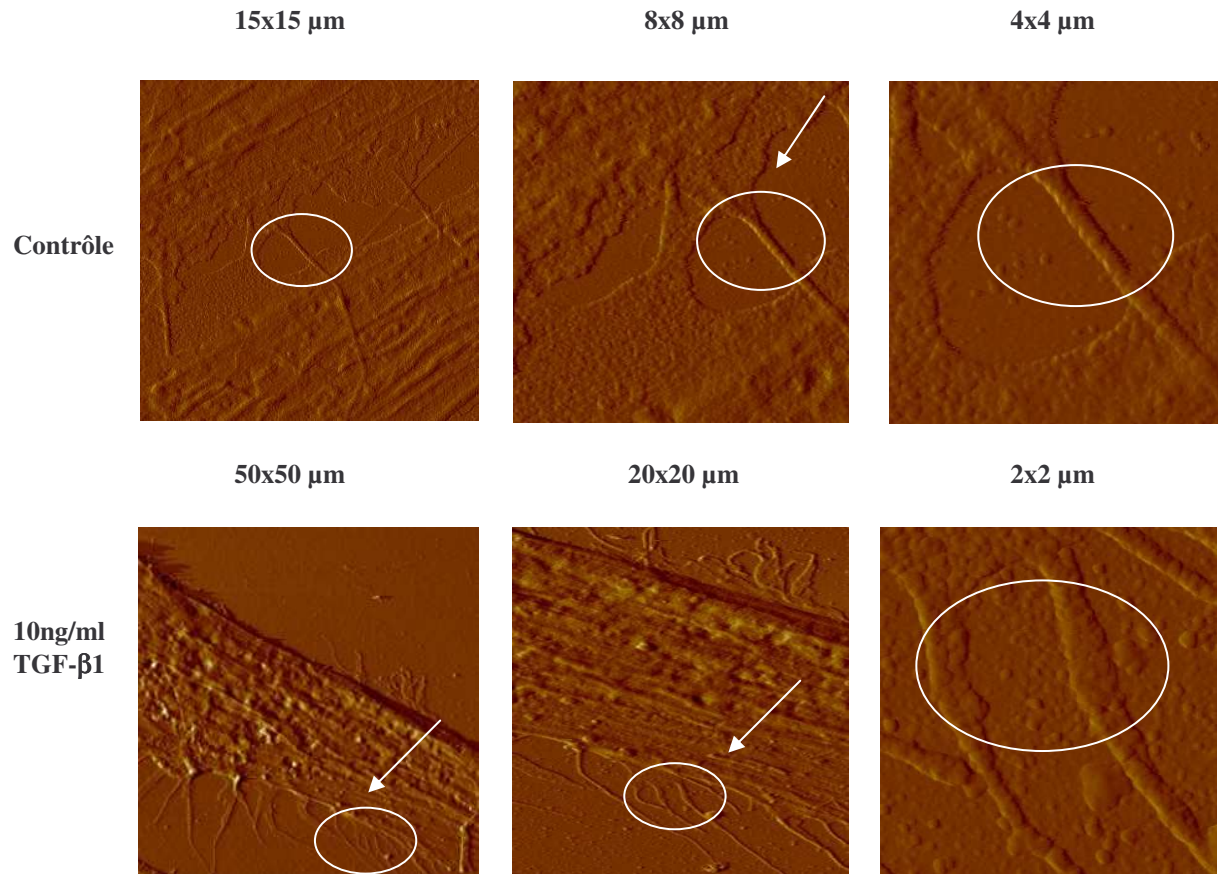


Figure III-4 : Images AFM des fibroblastes cultivés sur une lamelle de verre pendant 10 jours. Visualisation de fibres de collagène. Les cellules sont fixées et déshydratées (AFM en mode contact). Les flèches montrent la présence de fibres de collagène. Les ronds définissent la zone soumise au grossissement

Cette technique nous permet d'obtenir des images sur la topographie des cellules. Pourtant, cette technique est descriptive et ne permet pas de caractériser le type de collagène, si ce n'est au niveau de la périodicité de la torsion. De plus, elle ne permet pas une vue d'ensemble sur le tissu.

Nous avons donc étudié de manière semi-quantitative l'expression d'ARNm du collagène de type I et de type III.

▪ **Collagène de type I :**

Les résultats ont montré qu'aucune différence significative n'a été observée sur l'expression de l'ARNm du collagène de type I entre le groupe traité par TGF- β 1 et le contrôle (sans TGF- β 1) quand les cellules sont cultivées sur la membrane de silicone couverte de 1% de gélatine et le verre. En revanche, sur la membrane de silicone seule, l'expression de l'ARNm du collagène de type I est significativement augmentée en présence de 0,1 ng/mL de TGF- β 1 ($p < 0,05$).

▪ **Collagène de type III :**

Nous observons que l'expression des ARNm du collagène de type III est dépendante du substrat et des doses de TGF- β 1.

Sur le verre, nous observons un effet cyclique de TGF- β 1 sur l'expression des ARNm du collagène de type III pour une réponse maximale à 10 ng/mL de TGF- β 1.

D'autre part, nous avons pu étudier de manière qualitative la synthèse de collagène *in situ* par microscopie confocale, après trois jours de culture sur verre, en présence de TGF- β 1. Une importante apparition d'un réseau de fibres de collagène III a été observée. En revanche, le collagène de type I n'est pas exprimé de façon très forte, corroborant ainsi les résultats obtenus en RT-PCR. Cette augmentation du réseau de collagène de type III est d'une importance primordiale dans la formation de la nouvelle matrice.

Ces travaux nous ont permis de déterminer les paramètres biochimiques de la culture, PDGF-AB : 10 ng/mL ; TGF- β 1 : 0,1 ou 10 ng/mL.

- cf. article 1 -

A-3 : Influence de la Combinaison du TGF- β 1 et du PDGF-AB sur les paramètres physiologiques des fibroblastes

Bien que nous ayons montré que le TGF- β 1 n'a aucune influence, dans nos conditions de travail, sur la prolifération cellulaire, nous avons voulu contrôler s'il existait un effet synergique entre ces deux facteurs de croissance, ainsi que cela a été montré dans la littérature. (Woo SL et col., 1998 ; DesRosiers EA et col., 1996 ; Letson AK, et col., 1994). Nous avons donc testé l'effet du TGF- β 1 en présence de la concentration optimale de PDGF-AB, c'est-à-dire 10 ng/mL. En effet, il a été montré que la combinaison des facteurs de croissance peut avoir un effet synergique dans les applications cliniques pour la cicatrisation du ligament.

Cette étude devant être réalisée par la suite sur des membranes de silicone, en conditions de contraintes mécaniques, nous avons travaillé dans les conditions suivantes :

- membrane de silicone avec 1% de gélatine
- PDGF-AB à 10 ng/mL
- TGF- β 1 à (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ng/mL)

Nous avons étudié la combinaison du PDGF-AB et du TGF- β 1 d'une part sur la prolifération cellulaire mesurée par les différentes phases du cycle cellulaire, et d'autre part sur la synthèse de composants matriciels, tels que les collagènes de type I et de type III.

A-3-1 : Prolifération cellulaire – mesure du cycle cellulaire

Sur la figure III-5 A et B sont rassemblés les pourcentages des différentes phases du cycle cellulaire après 3 et 10 jours de culture en présence ou non de facteurs de croissance.

Premièrement, nous observons l'existence d'un phénomène de prolifération cellulaire à J3, les cellules en phases S et G2/M représentant entre 40-50% de la population cellulaire.

En revanche, à J10, cette proportion tombe à 15-20%. Il semble donc que la prolifération cellulaire soit plus importante les premiers jours de la culture, mais ne dépende pas de l'action conjointe des deux facteurs de croissance.

En effet, il semble que, lorsque les cellules sont en phase de prolifération à J3, le meilleur taux de synthèse soit observé pour 10 ng/mL de PDGF-AB, en absence de TGF- β 1. Il n'y a donc pas d'effet synergique des deux facteurs de croissance pour la prolifération cellulaire (figure III-5A).

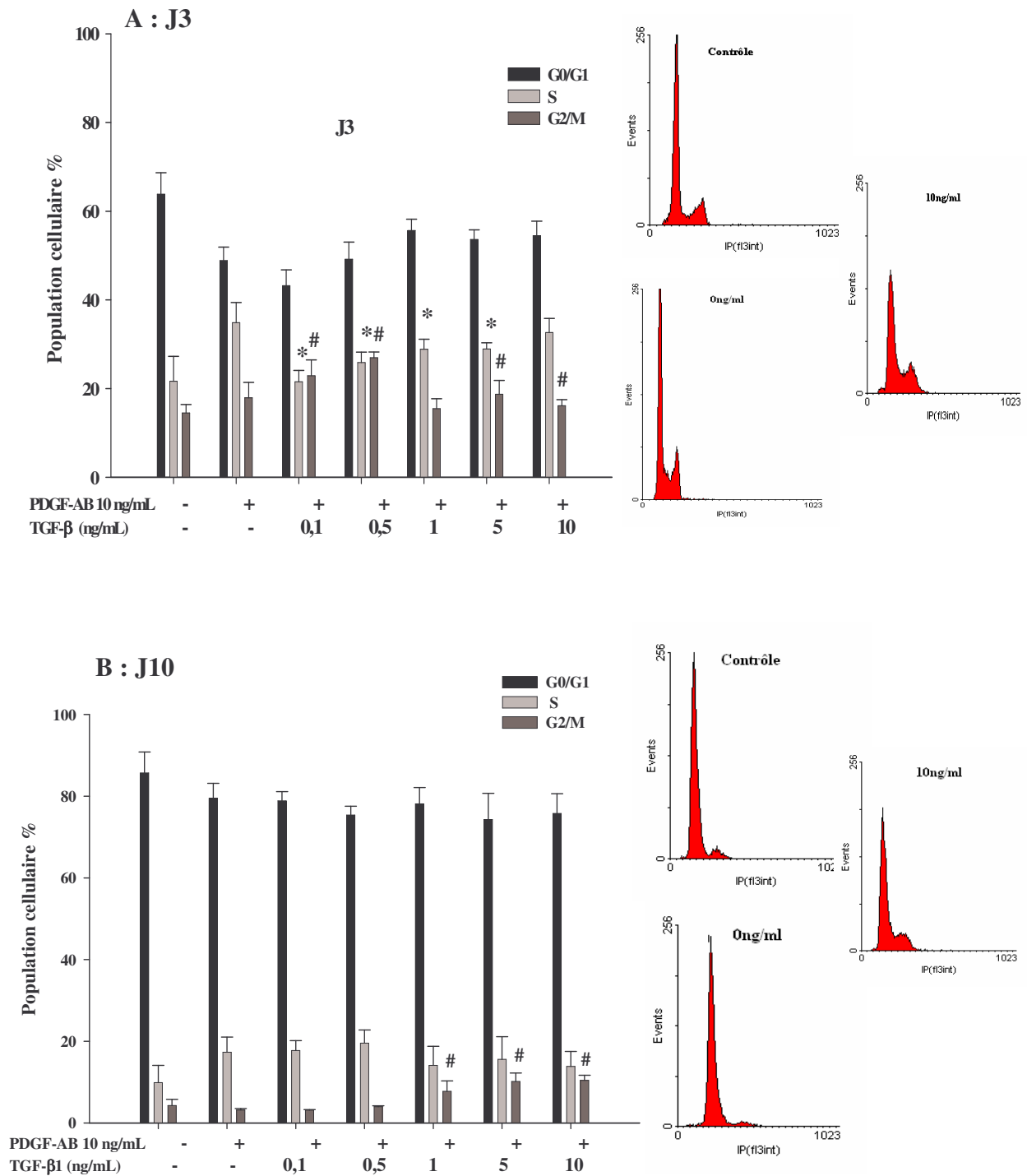


Figure III-5 : Influence de la combinaison des facteurs de croissance (TGF- β 1 + PDGF-AB) sur la prolifération de fibroblastes en fonction de temps (J3 et J10). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD, n = 6.* $p \leq 0,05$ versus phase S 10 ng/mL PDGF-AB, # $p \leq 0,05$ versus phase G2/M 10 ng/mL PDGF-AB

Il en est de même à J10, avec toutefois des pourcentages cellulaires en phases de synthèses (S) et de mitose (G2/M) plus faibles qu'à J3, mais qui n'augmentent pas en fonction de la concentration en TGF- β 1 (figure III-5B).

Seul un léger effet sur la phase de mitose est observé pour des concentrations de 5 et 10 ng/mL de TGF- β 1, combiné au PDGF-AB, à J10.

Ces résultats ne sont cependant pas suffisants pour en conclure l'utilité de la combinaison des deux facteurs de croissance pendant l'étape de prolifération.

A-3-2 : Synthèses de la matrice extracellulaire - mesure par RT-PCR

Conjointement à l'étude de la prolifération, nous avons étudié la synthèse de composants matriciels, tels que les collagènes de types I et III.

La figure III-6 rassemble les résultats montrant l'influence de la combinaison des facteurs de croissance (TGF- β 1 + PDGF-AB) sur la synthèse de collagène de types I et III par des fibroblastes ensemencés sur une membrane de silicone recouverte de 1% de gélatine pendant 3 et 10 jours.

Premièrement, en ce qui concerne le collagène de type I, nous avons remarqué qu'à J3, aucune variation n'est observée, quelque soit la dose de TGF- β . Nous remarquons toutefois une augmentation de l'expression des ARNm de collagène type I par rapport au contrôle (figure III-6B).

En revanche, à J10, nous observons une augmentation significative à partir de 1 ng/mL de TGF- β . Nous observons également une baisse de l'expression des ARNm du collagène I en présence de PDGF-AB seul, par rapport au contrôle. Cette baisse est ensuite comblée en présence de TGF- β .

Deuxièmement, en ce que concerne l'expression des ARNm du collagène de type III (figure III-6C), nous remarquerons une faible réponse à J3, avec une augmentation significative à 10 ng/mL de TGF- β .

En revanche, nous n'observons pas la même évolution à J10. Nous retrouverons, comme pour l'expression des ARNm du collagène I, une diminution en présence de PDGF-AB seul à 10 ng/mL par rapport au contrôle.

Un pic réponse est observé pour 1 ng/mL, mais est suivi d'une baisse pour des valeurs plus élevées de TGF- β .

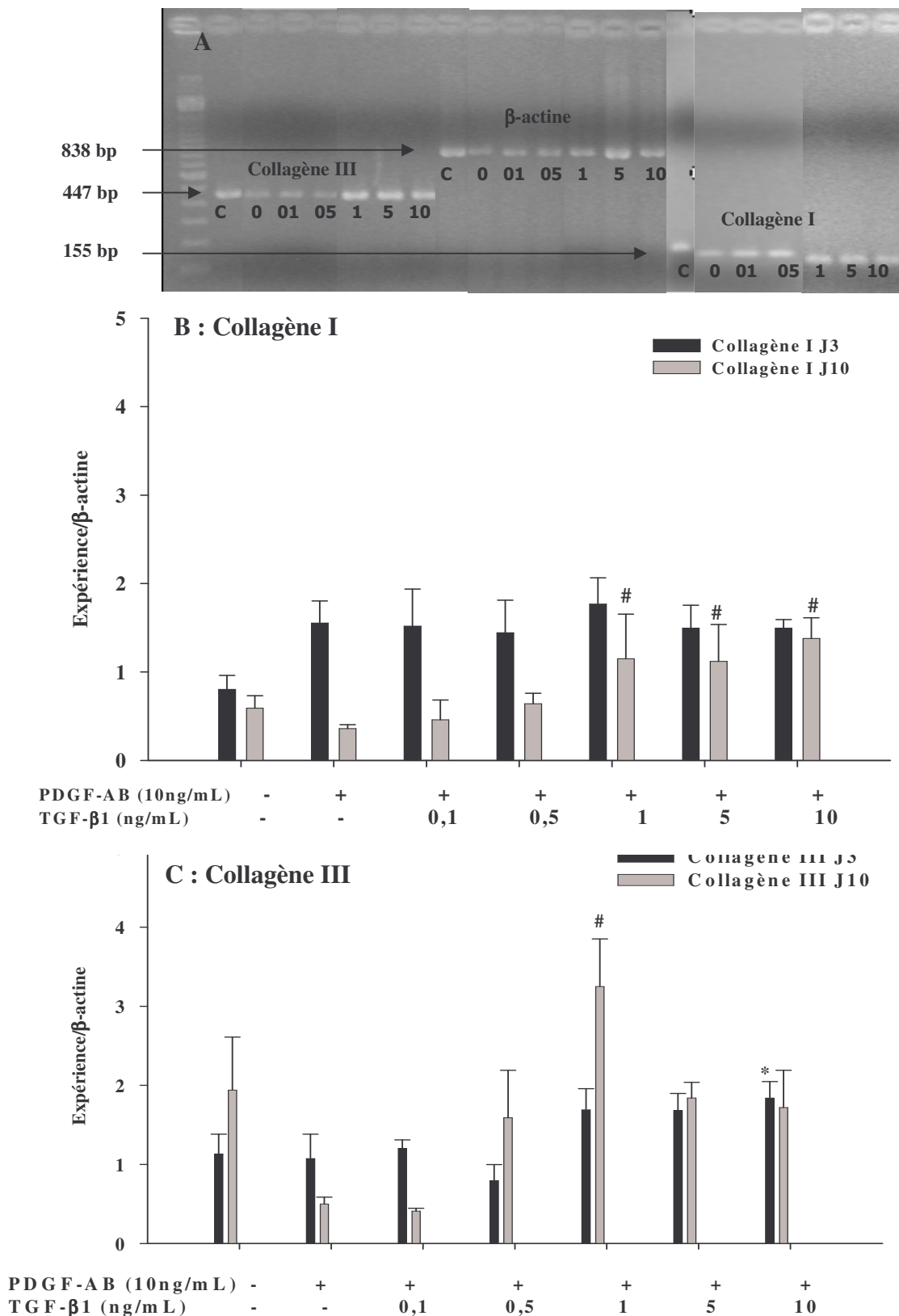


Figure III-6 : Effet de la combinaison des facteurs de croissance (TGF-β1 + PDGF-AB) sur la synthèse de collagène de fibroblastes en fonction du temps (J3 et J10). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SE, $n = 4$, $p \leq 0,05$ versus 10 ng/mL PDGF. A) Résultats représentatifs des bandes obtenues par RT-PCR à J3. B) Collagène I. C) Collagène III.

A-3-3 : Discussion

Il a été montré que les facteurs de croissance TGF- β et PDGF-AB ont une action positive dans le processus de cicatrisation (**Kletsas D et col., 1998 ; Murray MM et col., 2003**). Le PDGF a été localisé dans le comportement intracellulaire du fibroblaste de tendon et est à son maximum à J4 après la lésion. En revanche, le TGF- β intracellulaire augmente dans le tendon ou le ligament à l'emplacement de la lésion, pour un maximum à J7 après la lésion (**Lee J et col., 1998**). Mais bien que la présence de PDGF et TGF dans le ligament endommagé suggère qu'ils puissent avoir un rôle dans la première phase de la cicatrisation, leur action conjointe n'est pas prouvée.

En fait, il est connu que le PDGF n'induit pas directement la synthèse de procollagène par des fibroblastes ou des macrophages, mais il peut induire la production de TGF- β 1, qui conduit à la synthèse de collagène. Par ailleurs, il a été montré que le TGF- β 1 est un inhibiteur efficace de la prolifération des certaines cellules (par exemple : cellules musculaires lisses) qui a un effet modérateur sur la transcription du procollagène α I. Cependant, il régule partiellement l'expression de procollagène type I en induisant le PDGF-A comme cofacteur. (**Nimni ME, 1997**).

Néanmoins, nous pouvons dire à partir de ces résultats obtenus qu'après 3 jours ou 10 jours de culture, que la combinaison simple de deux facteurs de croissance ne semble pas un facteur déterminant dans la reconstruction tissulaire. La combinaison simple des deux facteurs de croissance n'est donc pas une solution adaptée dans notre cas. En revanche, l'apport progressif de chacun d'entre eux pourrait être envisagé. Il semble en effet que la présence seul de PDGF-AB peut aller jusqu'à induire une baisse de la synthèse matricielle, de même que le TGF- β n'a pas une influence positive sur la prolifération cellulaire.

En effet, la combinaison des deux facteurs de croissance n'induit pas une synthèse de collagène de type III plus importante.

À J3 l'expression des ARNm du collagène III se trouve à une valeur similaire (légèrement plus faible) à celle observée dans l'étude du facteur de croissance simple. Seule la synthèse de collagène I a légèrement augmenté avec les deux facteurs de croissance, mais ce phénomène n'est pas dose dépendante.

Ceci peut s'expliquer de différentes façons :

➤ les différences par rapport au contrôle peuvent être dues à la présence de sérum, qui active certaines voies, en l'absence de facteurs de croissance. En effet, le sérum contient lui-même certains facteurs de croissance et peut avoir lui-même un effet synergique

ou antagoniste par rapport au TGF- β et au PDGF-AB. Dans les travaux destinés uniquement à l'étude de facteur de croissance, le sérum est souvent absent, pour avoir une réponse brute sur l'action de la molécule étudiée (**Moreau JE et col., 2005 ; Thomopoulos S et col., 2004 ; Worapamorn W et col., 2001**). Cependant, en ingénierie tissulaire, la première considération porte sur l'expansion cellulaire dans une matrice avant de débiter tout phénomène de différenciation cellulaire. Or, cette expansion est maximale en présence de forte concentration de sérum (due à la présence d'un cocktail non identifié de facteur de croissance, des protéines, des acides aminés, des hormones, des lipides, des minéraux, et des inhibiteurs de différenciation) (**Denk PO et col., 1999 ; Iyer VR et col., 1999 ; Lee J et col., 1998**). Par ailleurs, le SVF n'est pas actuellement défendu dans les protocoles d'essais cliniques, d'après les derniers textes légaux en France. Cependant, son action sur la différenciation cellulaire, l'évolution vers un phénotype déterminé, qu'il soit ligamentaire ou autre, n'est pas encore prouvée.

Enfin, d'après nos résultats, il semble que le phénomène de prolifération cellulaire, et celui de différenciation cellulaire, qui peuvent se traduire en particulier par la synthèse des composés matriciels spécifiques au phénotype du tissu souhaité, suivent deux voies différentes, de même que les deux facteurs de croissance. Ces considérations sont en accord avec notre conclusion ; l'utilisation conjointe des deux facteurs de croissance n'est pas nécessaire.

Au contraire, il semble souhaitable d'utiliser ces facteurs de croissance dans des étapes de construction du néo-tissu distinctes :

- le PDGF-AB en phase précoce, pour favoriser la colonisation de la matrice synthétique
- le TGF- β 1 pour la synthèse d'une nouvelle matrice

Par ailleurs, les facteurs de croissance ne sont pas seuls à agir sur ces deux voies métaboliques. En effet, il est connu que les contraintes mécaniques ont également une action sur les voies métaboliques. Elles agissent sur la prolifération cellulaire, de manière agoniste ou antagoniste en fonction de leur caractéristique, et sur la synthèse matricielle et la différenciation cellulaire (**Chiba M et col., 2004 ; Yang G et col., 2004 ; Kim SG et col., 2002 ; Nakatani T et col., 2002 ; Sanchez-Esteban J et col., 2002**).

Nous avons donc, dans un deuxième temps, étudié l'effet des contraintes mécaniques sur ces paramètres, en présence ou absence de sérum, afin de connaître l'effet réel de ces contraintes sur les voies métaboliques concernées.

B. Etude des contraintes mécaniques (étirement)

Ainsi que nous l'avons dit plus tôt, les forces mécaniques jouent un rôle important dans l'homéostasie de nos tissus ligamentaires pendant le développement normal qui induisent une variété de réponses cellulaires comprenant les changements morphologiques, la synthèse de protéines, et l'expression de gènes (**Vunjak-Novakovic G et col., 2004**). La contrainte principale affectée au ligament est la contrainte d'étirement dite de «*stretching*». Cependant, un tendon ou un ligament conserve ses propriétés élastiques tant que la contrainte n'excède pas 4% (**Liu SH et col., 1995**).

Les fibroblastes de ligament sont à plusieurs reprises étirés pendant les activités physiologiques. Une privation de contrainte induit une modification des caractéristiques morphologiques et biochimiques du tissu ligamentaire. Étant donné qu'il a été montré que les contraintes mécaniques ont un effet similaire, et/ou complémentaire à ceux des facteurs de croissance (**Petersen W et col., 2004 ; Kletsas D et col., 1998**), sur les paramètres capitaux en ingénierie tissulaire, tels que la prolifération cellulaire et la synthèse de la matrice extracellulaire, nous avons étudié l'influence *in vitro* des contraintes d'étirement sur ces paramètres.

Dans un premier temps, nous avons effectué ces travaux en l'absence de facteurs de croissance, afin de contrôler l'action directe de la contrainte mécanique sur le métabolisme cellulaire.

Néanmoins, nous avons dû tenir compte de la présence de sérum dans le milieu de culture. D'après nos résultats précédents, nous avons vu que le SVF présent dans le milieu de culture pouvait interférer sur le métabolisme cellulaire. De plus, il est connu que le SVF a un effet positif sur la prolifération cellulaire. En effet, une technique conduisant à l'arrêt et à la synchronisation de cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire consiste à priver les cellules de sérum pendant 24 h à 48 h (**Yang G et col., 2004 ; Skutek M et col., 2003 ; Sanchez-Esteban J et col., 2002 ; Skutek M et col., 2001**).

B-1 : Influence de la présence de contrainte mécanique et de sérum sur la prolifération cellulaire et la synthèse matricielle des fibroblastes

Dans une première partie de ces travaux réalisés sous contrainte mécanique, pour contrôler de manière plus exhaustive les effets de ces contraintes, nous avons testé les paramètres de prolifération cellulaire, et de synthèse matricielle en présence (10%) ou en absence relative (0,5%) de SVF, très peu d'étude ayant tenu compte de ce paramètre.

La prolifération a été étudiée par l'analyse du cycle cellulaire, ainsi que nous l'avons précédemment décrit. La synthèse matricielle a été suivie par l'étude de l'expression des collagènes de type I et de type III, mais également de la ténascine, protéine qui est exprimée spécifiquement dans les tissus soumis à l'étirement tel que le ligament (**Chiquet M et col., 2003 ; Fluck M et col., 2000 ; Chiquet-ER et col., 1994b**). L'expression de ces protéines a été observée d'une part d'une manière qualitative, en microscopie confocale, après marquage en immunofluorescence indirecte, et d'autre part, d'une manière semi-quantitative, par RT-PCR.

Par ailleurs, nous avons également contrôlé les modifications morphologiques des cellules par microscopie à contraste de phase.

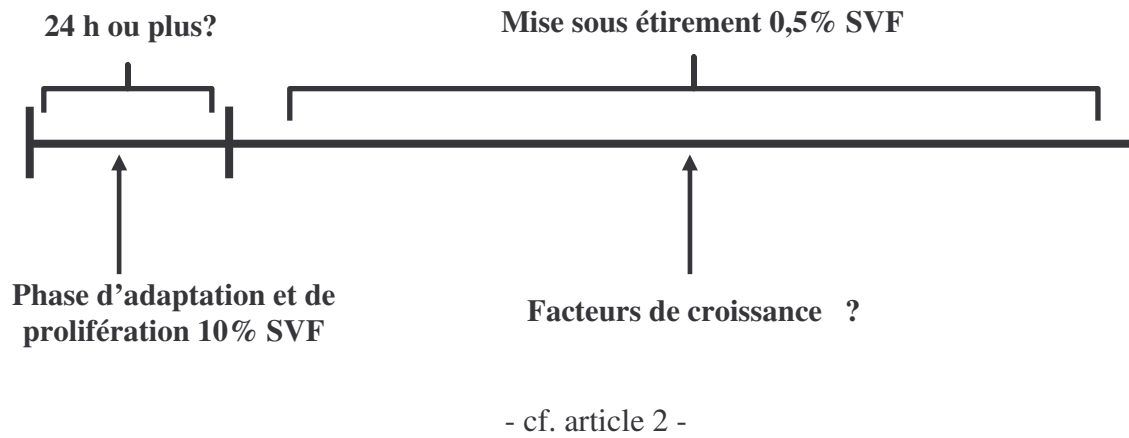
Ces travaux ont été réalisés sur une lignée cellulaire de fibroblastes humains de peau (F-CRL.2703) cultivée sur une membrane de silicone recouverte avec 1% de gélatine et soumises à une élongation de 5% et une fréquence de 0,5 Hz (30 cycle/min) pendant 24 h. Ces paramètres présentent une similitude avec des valeurs de contraintes physiologiques et sont utilisés comme valeur de référence dans la bibliographique (**Petersen W et col., 2004 ; Yang G et col., 2004 ; Chiba M et col., 2004**).

Du point de vue de la prolifération cellulaire, nous avons montré qu'en présence de sérum, l'activité de prolifération cellulaire était significativement augmentée par rapport aux cellules cultivées en absence de sérum ($G2/M = 25\%$ pour 10% SVF versus 15% pour 0,5% SVF). En revanche, l'étirement ne semble pas ou peu influencer sur la prolifération cellulaire, en présence ou en absence de sérum.

Du point de vue de la synthèse matricielle, nous notons une nette augmentation de synthèse de ténascine-C et de collagène de type III en absence de sérum, ainsi qu'un effet synergique de la contrainte sur la synthèse de ces composants.

Nous pouvons donc conclure à l'effet positif de la contrainte sur la synthèse matricielle, qui est optimale en absence de sérum. Ceci peut répondre à l'hypothèse que nous avons posée précédemment, concernant les deux voies métaboliques distinctes entre prolifération et synthèse.

A ce stade de notre étude, nous pourrions définir ainsi le protocole optimal pour les études en ingénierie tissulaire.



B-2 : Influence des caractéristiques de la contrainte mécanique et du type cellulaire

Les contraintes d'étirement agissent sur les fibroblastes en activant la synthèse matricielle et en induisant une certaine différenciation vers des fibroblastes ligamentaires. En effet, nous avons vu que l'étirement induit non seulement une synthèse de collagène de type III, mais également une synthèse de ténascine. Or la présence de ces différentes molécules donne une indication sur le phénotype des cellules et montre donc l'initiation vers un phénotype ligamentaire. Cependant, il est nécessaire de comparer la réponse de la lignée fibroblastique F-CRL.2703 avec des fibroblastes ligamentaires natifs (LCA).

Par ailleurs, une seule condition de contrainte a été testée. Bien que cette contrainte ait été choisie selon les normes physiologiques, il est également intéressant, du point de vue ingénierie tissulaire, de connaître la réponse des cellules à une contrainte plus forte, qui pourrait induire une synthèse plus importante. Nous avons donc, dans ce dernier volet de nos travaux, étudié la réponse non seulement des fibroblastes de la lignée CRL.2703 (notés : F-CRL.2703), mais également celle de fibroblaste issu de cultures primaires de ligament croisé antérieur (notés : LCA) à deux fréquences : 0,5 Hz et 1 Hz pendant 24 h. De même que précédemment, les cellules seront cultivées sur membrane de silicone (1% gélatine) et soumises à un étirement de 5% (cf. Matériels et Méthodes, page 99). Comme dans les études précédentes Les paramètres étudiés sont les suivants :

- prolifération cellulaire, par étude des phases du cycle cellulaire
- synthèse matricielle du collagène des types I, III et synthèse de ténascine-C de manière :
 - quantitative par RT-PCR
 - qualitative par microscopie confocale, après immunomarquage indirect

B-2-1 : Prolifération cellulaire – étude des phases du cycle cellulaire

Les résultats de l'analyse du cycle cellulaire obtenus pour les deux types cellulaires et les deux fréquences sont rassemblés sur la figure III-7.

Premièrement, nous observons que les cellules de la lignée de fibroblastes F-CRL.2703 montrent une prolifération plus importante que les cellules de ligament LCA utilisées en P2 (passage 2), (G0/G1 : 75% pour F-CRL.2703 versus 90% pour LCA), ce qui est classique dans le cas d'une lignée cellulaire, caractérisée par un taux de prolifération importante.

Deuxièmement, nous avons mis en évidence un effet de l'étirement sur les deux types cellulaires :

- pour la lignée cellulaire de fibroblastes F-CRL.2703, l'étirement augmente de façon différentielle les phases typiques de la prolifération cellulaire : S et G2/M. Toutefois, notons que les pourcentages de cellules en phase G2/M sont significativement plus élevés à 0,5 Hz, alors qu'à 1 Hz, les pourcentages de cellules en phase S est supérieure. Il semble donc qu'un étirement à fréquence plus élevée ait un effet positif sur la synthèse d'ADN, et à plus long terme (> 24 h), sur la prolifération (figure III-7A).

- en ce qui concerne le LCA, il semble que l'étirement induise une réponse plus faible de la part des cellules quelle que soit sa fréquence (figure III-7B).

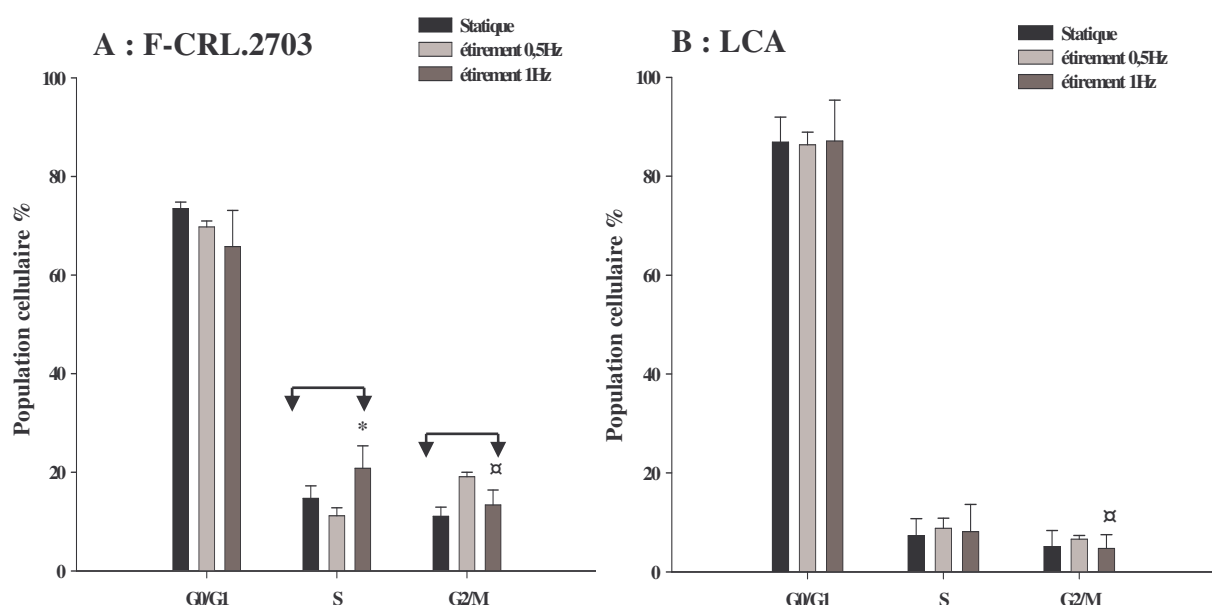


Figure III-7 : Effet de l'étirement sur les phases du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire. Les cellules sont soumises à un étirement uniaxial (5% élongation), pendant 24 h, n = 6, * $p < 0,05$ étirement versus statique, α $p < 0,05$ étirement 1 Hz versus étirement 0,5 Hz

B-2-2 : Synthèse de la matrice extracellulaire

B-2-2-1 : Etude semi-quantitative de l'expression des ARNm des collagènes I, III et de la ténascine-C - étude par RT-PCR

Pour la lignée cellulaire de fibroblastes F-CRL.2703, l'analyse des résultats de RT-PCR nous a révélé qu'une fréquence de 1 Hz augmente d'un facteur 2 l'expression de l'ARNm du collagène de type III et d'un facteur 3 pour la ténascine-C par rapport à la condition statique (figure III-8A).

En ce qui concerne le LCA, tout d'abord, il semble que l'étirement induise une réponse plus faible de la part de cellules quelle que soit sa fréquence par rapport aux cellules de fibroblaste F-CRL.2703.

Par ailleurs, nous observons que l'expression des ARNm du collagène de type III et de la ténascine-C est significativement augmentée à 1 Hz par rapport à la condition statique (figure III-8B).

Ceci peut s'expliquer par une expression de la ténascine-C plus élevée en condition statique sur les cellules ligamentaires par rapport à la lignée cellulaire.

Néanmoins, ces cellules se trouvent au stade P2 (2^{ème} passage), l'expression de la ténascine-C est peut-être sous-estimée par rapport aux cellules natives de ligaments. Il sera nécessaire de contrôler les valeurs de ténascine sur des cellules de ligament avant passage, c'est-à-dire avant qu'elles aient perdu l'intégrité de leur phénotype ligamentaire natif. En effet, les différents passages peuvent induire une perte phénotypique et entraîner les cellules vers un phénotype fibroblastique indifférencié (Schnabel M et col., 2002 ; Haudenschild DR et col., 2001).

A : F-CRL.2703

B : LCA

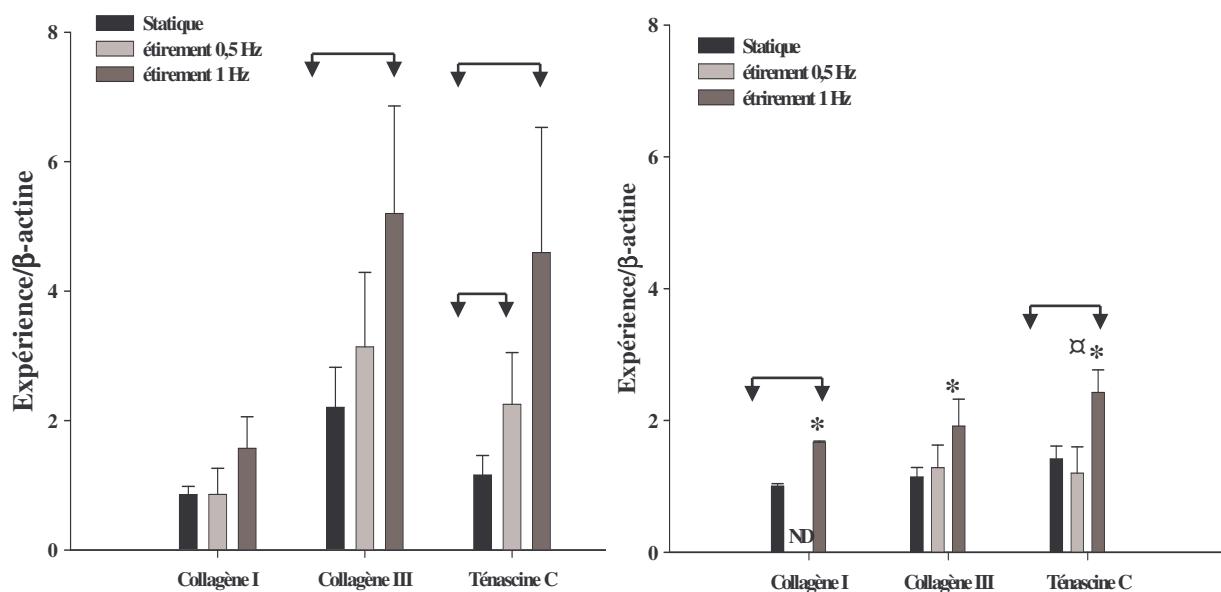


Figure III-8 : Effet de l'étirement sur l'ARNm du collagène des types I, III et de ténascine-C. Les fibroblastes sont soumis à un étirement uniaxial de 5% d'élongation, pendant 24 h, * $p < 0,05$ étirement versus statique, ⊠ $p < 0,05$ étirement 1 Hz versus étirement 0,5 Hz, n = 4

B-2-2-2 : Etude qualitative des composants matriciels – étude en microscopie confocale

Dans cette étude, nous avons d'une part observé les modifications morphologiques des cellules en présence de contraintes mécaniques et d'autre part, nous avons étudié de manière qualitative et «semi-quantitative» l'expression des molécules d'intérêt de la matrice extracellulaire.

Nous avons donc réalisé un double marquage :

- cytosquelette, par Phalloïdine-Alexa 488 (cf. Matériels et Méthodes, page 117).
- collagènes de type I, III et ténascine-C par immunomarquages fluorescents (cf. Matériels et Méthodes, page 115).

Les conditions d'observation (réglages du microscope, photomultiplicateurs, marquages) n'ont pas variés suivant les expérimentations, nous pouvons donc comparer les images obtenues.

Dans le but de confirmer les résultats de RT-PCR, les deux types cellulaires ont été marqués après avoir été soumis à une stimulation mécanique par étirement (1 Hz).

Premièrement, l'observation du cytosquelette en microscopie confocale montre que, quelles que soient les conditions appliquées, l'actine apparaît comme un réseau de longs filaments (Figure III-9). Les fibres d'actine des cellules soumises à des contraintes mécaniques se réorientent perpendiculairement au sens de la contrainte (figure III-9D, E, F), contrairement aux fibres d'actine des cellules non soumises à l'étirement, qui ne présentent aucune orientation particulière (Figure III-9A, B,C).

Deuxièmement, en condition statique, nous avons montré que l'expression du collagène de type III sur la lignée cellulaire de fibroblastes F-CRL.2703 (figure III-9B) est moins exprimée que le collagène de type I (figure III-9A), et aucune expression de la ténascine-C n'a été remarquée (figure III-9C).

Troisièmement, après 24 h d'étirement, l'expression de collagène de type III et ténascine-C est fortement augmentée (figure III-9E, F) par rapport à ce qui a été observé sur des cellules en condition statique. En revanche, nous ne notons qu'une faible augmentation de l'expression de collagène de type I (figure III-9D).

De plus, des molécules de ténascine-C apparaissent à l'intérieur de la cellule (figure III-9F). L'apparition de cette molécule sur la lignée de fibroblastes F-CRL.2703 après contrainte montre donc un début de différenciation de la lignée fibroblastique.

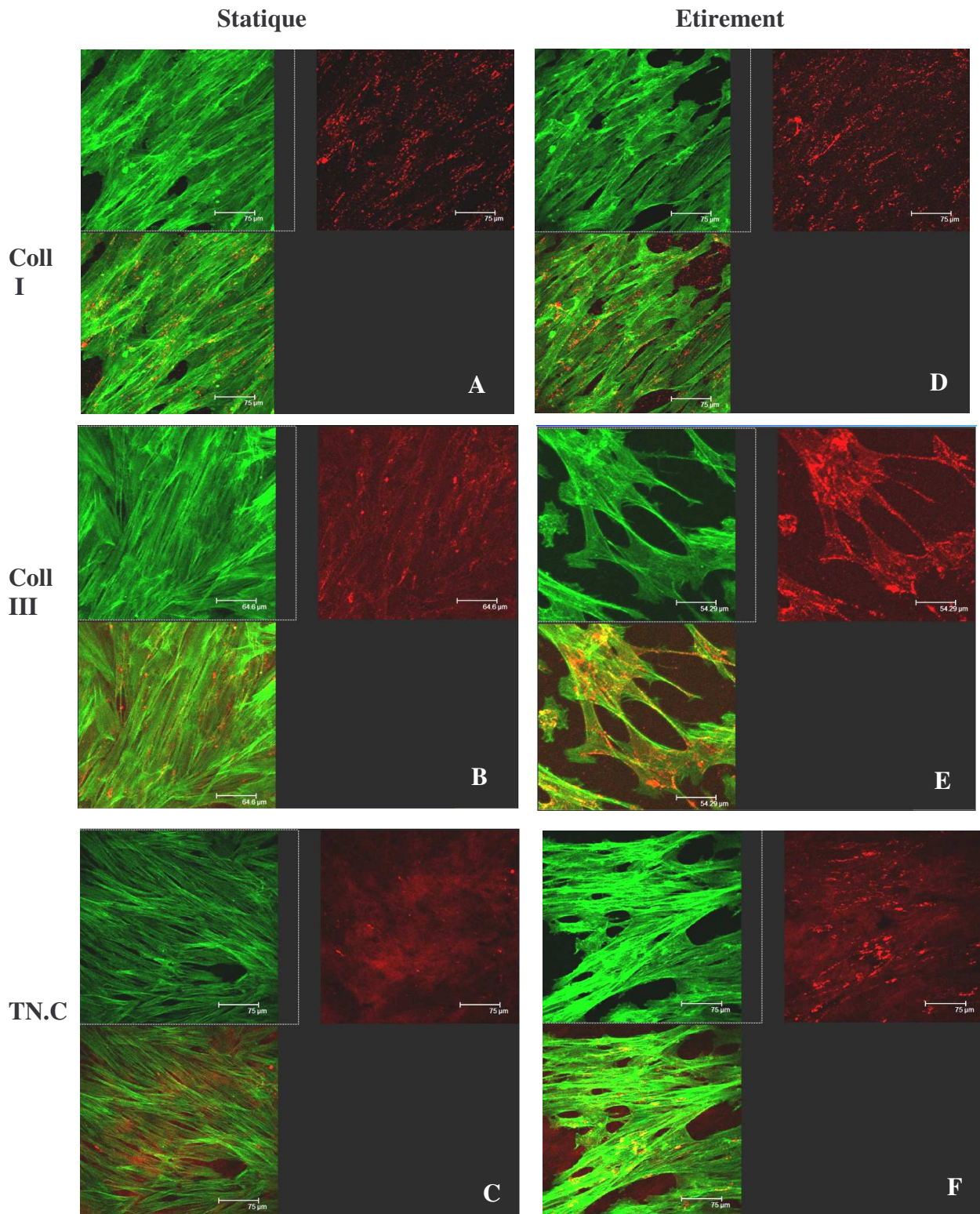


Figure III-9 : Détection des collagènes de types I et III et de la ténascine-C sur la lignée de fibroblaste F-CRL.2703 (Leica, Allemagne, objectif x40, immersion eau, ON 0,80) après immunomarquage des collagènes de types I et III (coll I, coll III) et de la ténascine-C (TN.C) à l'aide d'anticorps spécifiques (rouge) et marquage du cytosquelette (F-actine) avec Phalloïdine-Alexa 488 (vert). La lignée cellulaire de fibroblaste humaine de peau F-CRL.2703 est soumise à un étirement de 5% d'élongation et une fréquence de 1 Hz pendant 24 h

Par ailleurs, comme nous l'avons montré dans les travaux précédents en présence de facteurs de croissance, l'expression des molécules de collagène de type III est apparue comme un réseau de fibres. De plus, on remarque une co-localisation avec les fibres d'actine (fibres de stress) du cytosquelette en présence de contraintes d'étirement (figure III-9E).

En revanche, en ce qui concerne les molécules du collagène de type I, elles apparaissent comme des petits spots à l'intérieur des cellules, et aucune colocalisation n'a été remarquée avec les fibres d'actine du cytosquelette (figure III-9D).

Une étude similaire a été réalisée pour les fibroblastes de LCA.

Tout d'abord, nous remarquerons une différence importante entre les fibroblastes F-CRL.2703 et les cellules de LCA :

- D'une part, en condition statique, les collagènes de types I et III sont exprimés avec une même intensité, contrairement à la lignée de fibroblaste F-CRL.2703 (figure III-10A, B), et la ténascine-C est légèrement exprimée (figure III-10C).

- D'autre part, sous contrainte d'étirement, nous avons observé une réponse similaire sur la réorganisation du cytosquelette en réponse à l'étirement. Nous observons également une forte augmentation de collagène III et de ténascine, ainsi que nous l'avons observé sur la lignée de fibroblastes F-CRL.2703. Il semble donc que la contrainte induit une surexpression de collagène III et de ténascine, à des degrés différents sur les deux types cellulaires (figure III-10E, F).

Cette étude qualitative confirme les résultats quantitatifs que nous avons décrits précédemment.

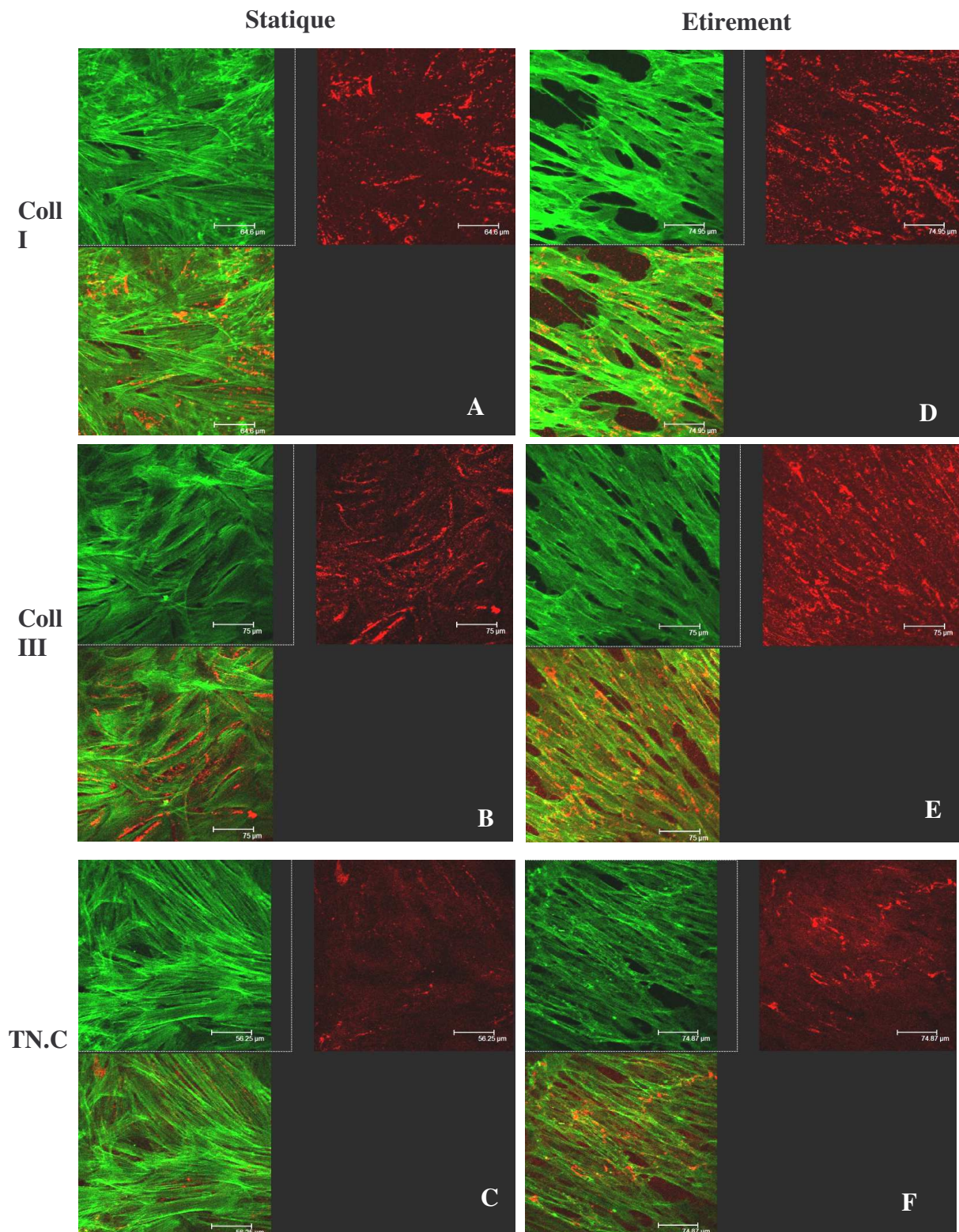


Figure III-10 : Détection des collagènes de types I et III et de la ténascine-C sur des cellules de fibroblaste de LCA (*Leica, Allemagne, objectif 40x, immersion eau, ON 0,80*) après immunomarquage des collagènes de type I et III (coll I, coll III) et de la ténascine-C (TN.C) à l'aide d'anticorps spécifiques (rouge) et marquage du cytosquelette avec Phalloïdine-Alexa 488 (vert). Les fibroblastes de ligament croisé antérieur (LCA) sont soumis à un étirement de 5% d'élongation et une fréquence de 1 Hz pendant 24 h

B-2-3 : Discussion

Les contraintes mécaniques peuvent moduler la physiologie des cellules, et peuvent améliorer ou accélérer la régénération de tissu et la réparation *in vitro*. En effet, il a été montré que les contraintes mécaniques d'étirement ont un effet sur l'alignement, la morphologie, la prolifération, les réarrangements du cytosquelette, et la synthèse protéique des différents types cellulaires soumis à différentes elongations et à des fréquences différentes (**Chiba M et col., 2004 ; Yang G et col., 2004 ; Kim SG et col., 2002 ; Nakatani T et col., 2002 ; Sanchez-Esteban J et col., 2002**).

Les signaux mécaniques qui affectent la croissance et le développement du ligament natif *in vivo* jouent le même rôle pendant la culture des ligaments *in vitro*. Les études sur la stimulation mécanique de fibroblastes de LCA suggèrent que les collagènes de type I et type III et la ténascine-C répondent à la stimulation mécanique (**Eckes B et col., 1998 ; Toyoda T et col., 1998**), ainsi que nous l'avons montré pour les trois molécules.

Dans cette partie de notre travail, nous avons comparé la réponse de la lignée de fibroblastes F-CRL.2703 avec des fibroblastes ligamentaires en P2 à une contrainte d'étirement (0,5 et 1 Hz, 5% d'elongation pendant 24 h) sur la prolifération cellulaire et la synthèse des composants matriciels (collagène des types I, III) et sur la synthèse de ténascine-C.

Premièrement, en ce qui concerne l'effet de la contrainte mécanique sur la prolifération cellulaire, les résultats montrent que l'étirement induit généralement une légère prolifération quel que soit le type cellulaire, mais il ne semble pas qu'une contrainte très élevée ait un résultat positif. Ces résultats restent toutefois modérés, ainsi que nous l'avons montré et encore avec ce qui était déjà décrit dans la littérature (**Yang G et col., 2004**).

Dans d'autres études, sur d'autres tissus, il a par ailleurs été montré qu'un excès de contraintes mécaniques avait un effet délétère sur le tissu en modification de l'homéostasie tissulaire et en induisant des réactions des catabolismes cellulaires (**Stoltz JF et col., 2005 ; Kurz B et col., 2005**).

Deuxièmement, concernant l'étude de la MEC via les collagènes, et l'étude de la ténascine-C, nous pouvons donc conclure sur le degré de différenciation induit *in vitro* :

- a) les cellules des fibroblastes n'expriment pas en conditions statiques de ténascine-C, contrairement aux cellules ligamentaires.
- b) la contrainte mécanique entraîne l'expression de cette molécule.

La contrainte mécanique d'étirement entraîne donc une différenciation des fibroblastes vers un phénotype ligamentaire. En effet, cette molécule reste un marqueur ligamentaire, et est bien augmentée après contrainte sur les deux types cellulaires comme cela était déjà montré dans la littérature (**Chiquet M et col., 2003 ; Fluck M et col., 2000 ; Chiquet-ER et col., 1994b**).

En fait, la fréquence de stimulation peut affecter également les réactions cellulaires. Les plupart des auteurs a étudié l'effet d'une contrainte Uniaxial sur des cellules en utilisant une fréquence de 1 Hz, parce que ces conditions sont considérées comme physiologiques (**Kaspar D et col., 2002**).

Dans cette étude, nous avons travaillé avec deux fréquences (0,5 ou 1 Hz), nous avons montré que les deux types de cellules répondent de manière similaire au stimulus mécanique quelle que soit la condition mécanique et il y a peu de différence entre les deux contraintes.

Nous pouvons dire à partir de ces résultats que la stimulation mécanique augmente le taux de prolifération des fibroblastes, hausse spécifiquement la synthèse de collagène de type III et de la ténascine-C. Ceci concorde bien avec les caractéristiques de la cicatrisation initiale qui est hypercellulaire, formée de collagène majoritairement de type III. Pour améliorer la guérison ligamentaire, il semble impératif de reproduire l'organisation du collagène, principale responsable des propriétés mécaniques du tissu sain.

	CHAPITRE IV CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	
--	--	--

Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, un des points principaux à prendre en compte est le choix des conditions de culture du tissu néo-formé afin d'obtenir la synthèse de novo d'une matrice extracellulaire proche de celle que l'on peut trouver dans le tissu natif. Les deux conditions primordiales en bioingénierie tissulaire étant la prolifération cellulaire et le maintien des fonctions mécaniques (dus à la composition de la matrice extracellulaire) et biologiques du tissu néo-formé, il est nécessaire de prendre en compte l'action de facteurs de croissance sur ces paramètres essentiels ainsi que l'action combinée de ces molécules avec un stress mécanique.

L'objectif de ce travail de thèse était d'optimiser les conditions biochimiques et mécaniques de culture des cellules fibroblastiques du ligament. En effet, ces cellules sont soumises à différentes contraintes (biochimiques et mécaniques) *in vivo* et il est connu maintenant que ces contraintes agissent sur la synthèse de la matrice extracellulaire et la fonctionnalité des cellules. Ces stimulations représentent donc un intérêt fondamental puisqu'elles définissent la qualité de la matrice néo-synthétisée et donc les propriétés mécaniques du nouveau tissu.

Plusieurs types de stimulation s'appliquant au ligament ont alors été étudiés :

- les stimulations biochimiques par les facteurs de croissance (PDGF-AB et TGF- β 1), appliquées sur des cellules cultivées en système monocouche.
- les contraintes d'étirement.

Dans un premier temps, nous avons défini les conditions d'utilisation du PDGF-AB pour optimiser la croissance cellulaire et du TGF- β 1 pour synthétiser la matrice extracellulaire par, notamment les collagènes de types I et III.

Ces deux facteurs de croissance ayant été sélectionnés en raison de leur capacité à induire la synthèse de MEC et la prolifération cellulaire, ainsi que leur implication dans la cicatrisation du ligament et du tendon (Lo IK et col., 2003 ; Attisano L et col., 2002 ; Sakai T et col., 2002 ; Valentinis B et col., 2001 ; Murakami S et col., 1999 ; Deie M et col., 1997).

Nos résultats ont montré que:

- une concentration de 10 ng/mL de PDGF-AB suffit et a été choisie comme condition optimale pour nos travaux, ainsi que cela été déjà montré dans la littérature (Ihn H et col., 1995 ; Ojima Y et col., 2003).

- le TGF- β 1 seul a un effet dose-dépendant sur l'expression et la synthèse matricielle (collagène de type I et III). Les résultats de cette étude confirment les travaux précédents qui ont montré que 10 ng/mL de TGF- β 1 peuvent favoriser l'attachement des fibroblastes, et que l'effet de TGF- β 1 est dose-dépendant sur la production de collagène (**Lieb E et col., 2004 ; Bosman FT et col., 2003 ; Meaney MM et col., 2003 ; Deie M et col., 1997 ; Marui T et col., 1997 ; Murphy PG et col., 1994**).

- la combinaison des deux facteurs de croissance n'est pas une solution adaptée dans notre cas. La présence de PDGF-AB seul peut aller jusqu'à induire une baisse de la synthèse matricielle, de même que le TGF- β 1 n'a pas une influence positive sur la prolifération cellulaire. Il semble que la voie de synthèse soit différente de la voie de prolifération, les facteurs de croissance TGF- β 1 et PDGF suivent deux voies de signalisation différentes. Donc, il est difficile de parler d'effet combinatoire, d'autant plus que le TGF- β présente une réponse cyclique et donc difficile à contrôler. Il faut donc, avant toute chose, mener à bien des études sur les voies de régulation de chaque facteur de croissance.

D'autre part, nous avons montré l'effet primordial et sélectif de la contrainte d'étirement puisqu'elle induit la synthèse du collagène de type III présent lors du 1^{er} stade de la cicatrisation de ligament et tendon, et non la synthèse du collagène de type I, et elle agit sur la synthèse de la ténascine, qui peut être considérée comme un facteur de différenciation cellulaire.

En effet, nos résultats ont montré :

- d'une part, l'effet positif de la contrainte sur la synthèse matricielle, qui est optimale en absence de sérum.
- d'autre part, qu'une forte contrainte (1 Hz) augmente l'expression des ARNm de collagène de type III et de la ténascine-C de LCA et F-F-CRL.2703. En plus, les études qualitatives par microscopie confocale ont confirmé ces résultats.

Étant donné que les stimulations biochimiques et mécaniques induisent des réponses similaires du point de vue de la synthèse matricielle, nous nous sommes posés la question suivante : quelles sont les voies de synthèse, et donc les voies de mécanotransduction qui sont impliquées dans ces réponses à la contrainte mécanique ?

Ces travaux, réalisés sur des cellules fibroblastiques, ont montré l'apparition d'un certain degré de différenciation. Les conditions biochimiques et mécaniques étant définies, nous poursuivons ces travaux dans l'optique de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse.

En effet, la connaissance des voies de mécanotransduction est incontournable en ingénierie tissulaire, puisque ces voies contrôlent non seulement la différenciation cellulaire, la prolifération cellulaire mais également la synthèse de la matrice extracellulaire, et ceci conjointement aux voies des facteurs de croissance utilisés couramment pour la stimulation cellulaire. En fait, ces stress mécaniques sont complémentaires et indispensables pour arriver à un bio-tissu présentant des propriétés mécaniques satisfaisantes. Elles peuvent induire également la synthèse de novo de facteurs de croissance, servent de régulateurs externes, et peuvent activer la synthèse de la matrice via la voie des facteurs de croissance et modifier ainsi le phénotype de ces cellules.

Une des voies de transduction conduisant à la synthèse des collagènes passe par la voie du TGF-beta, via des médiateurs intracellulaires connus comme les protéines SMADs. L'activation des SMADs cause leur translocation du cytoplasme vers le noyau et ainsi contrôle l'expression génique (**de Caestecker M, 2004**) (figure IV-1).

La production du TGF-beta, comme celle des différents types de collagènes, étant régulées par les contraintes mécaniques, il sera donc particulièrement intéressant d'étudier l'effet de ces contraintes sur cette voie de transduction, qui n'est pas encore étudiée dans le cas de la mécano-transduction.

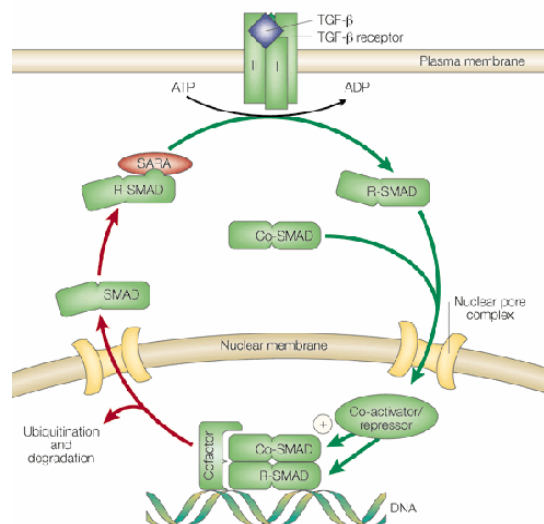


Figure IV-1 : Voies de signalisation de TGF-β

Ces travaux pourraient aboutir à la connaissance des étapes clés de la différenciation ou de la synthèse matricielle et améliorer sa production, d'un point de vue quantitatif et qualitatif et s'avérer d'un grand intérêt en ingénierie tissulaire.

	CHAPITRE V RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
--	---	--

Références bibliographiques

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter KP. Molecular Biology of the Cell, Fourth edition, Chapter 19. Garland Science Publishing, 2002.
2. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan DL. Silk-based Biomaterials. Biomaterials, 2003, 24 : 401-16.
3. Altman GH, Horan RL, Lu HH, Moreau J, Martin I, Richmond JC, Kaplan DL. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. Biomaterials, 2002a, 23 : 4131-41.
4. Altman GH, Horan RL, Martin I, Farhadi J, Stark PR, Volloch V, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Cell differentiation by mechanical stress. FASEB J, 2002b, 16 : 270-2.
5. Altman GH, Lu HH, Horan RL, Calabro T, Ryder D, Kaplan DL, Stark P, Martin I, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G. Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering. J Biomech Eng, 2002c, 124 : 742-9.
6. Amiel D, Kleiner JB, Roux RD, Harwood FL, Akeson WH. The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. J Orthop Res, 1986, 4 : 162-72.
7. Amiel D, Nagineini CN, Choi SH, Lee J. Intrinsic properties of ACL and MCL cells and their responses to growth factors. Med Sci Sports Exerc, 1995, 27 : 844-51.
8. Amiel D, Woo SL, Harwood FL, Akeson WH. The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: a biochemical-biomechanical correlation. Acta Orthop Scand, 1982, 53 : 325-32.
9. Archambault JM, Wiley JP, Bray RC. Exercise loading of tendons and the development of overuse injuries. A review of current literature. Sports Med, 1995, 20 : 77-89.
10. Arnoczky SP. Biology of ACL reconstructions: what happens to the graft? Instr Course Lect, 1996, 45 : 229-33.
11. Aspenberg, P., and C. Forslund. Enhanced tendon healing with GDF 5 and 6. Acta Orthop Scand, 1999, 70 : 51-4.
12. Atala A, Monney D, Vacanti J.P, and Langer R. Synthetic biodegradable polymer scaffolds. Atala A, Monney D. EDTS, 1997 Chap 1:5.
13. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. Science, 2002, 31 : 1646-7.
14. Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan AI. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. Tissue Eng, 1999, 5: 267-77.

Références bibliographiques

15. Awad HA, Butler DL, Harris MT, Ibrahim RE, Wu Y, Young RG, Kadiyala S, Boivin GP. In vitro characterization of mesenchymal stem cell-seeded collagen scaffolds for tendon repair: effects of initial seeding density on contraction kinetics. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51: 233-40.
16. Babensee JE, McIntire LV, Mikos AG. Growth factor delivery for tissue engineering. *Pharm Res*, 2000, 17 : 497-504.
17. Balk SD, Whitfield JF, Youdale T, Braun AC. Roles of calcium, serum, plasma, and folic acid in the control of proliferation of normal and Rous sarcoma virus-infected chicken fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70 : 675-9.
18. Barbour SA, King W. The safe and effective use of allograft tissue--an update. *Am J Sports Med*, 2003, 31 : 791-7.
19. Best TM, McElhaney J, Garrett WE Jr, Myers BS. Characterization of the passive responses of live skeletal muscle using the quasi-linear theory of viscoelasticity. *J Biomech*, 1994, 27 : 413-9.
20. Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: the first decade and beyond. *J Cell Biochem Suppl*, 1998, 30-31 : 297-303.
21. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15 : 255-73.
22. Bosman, F. T., Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*, 2003, 200 : 423-8.
23. Boura, C., P. Menu, E. Payan, C. Picart, J. C. Voegel, S, Muller, J. F. Stoltz. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials*, 2003, 24 : 3521-30.
24. Butler DL, Goldstein SA, Guilak F. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *J Biomech Eng*, 2000, 122 : 570-5.
25. Calve S, Dennis RG, Kosnik PE 2nd, Baar K, Grosh K, Arruda EM. Engineering of functional tendon. *Tissue Eng*, 2004, 10 : 755-61.
26. Carl-Henrik Heldin. Platelet-derived growth factor—an introduction. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2004, 15 : 195-196.
27. Chan BP, Fu S, Qin L, Lee K, Rolf CG, Chan K. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta Orthop Scand*, 2000, 71 : 513-8.
28. Chen G., Takashi U., Hirochika R., Shirasaki Y., Ochiai N., Tateishi T., The use of a novel PLGA/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness. *J. Biomed. Mat. Res*, 2003, 67A : 1170-1180.

Références bibliographiques

29. Chen H, Tang Y, Li S, Shen Y, Liu X, Zhong C. Biologic characteristics of fibroblast cells cultured from the knee ligaments. *Chin J Traumatol*, 2002, 5 : 92-6.
30. Chen J, Altman GH, Karageorgiou V, Horan R, Collette A, Volloch V, Colabro T, Kaplan DL. Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers. *J Biomed Mater Res A*, 2003, 1 : 559-70.
31. Cheung DT, DiCesare P, Benya PD, Libaw E, Nimni ME. The presence of intermolecular disulfide cross-links in type III collagen. *J Biol Chem*, 1983, 25 : 7774-8.
32. Chiba M, Mitani H. Cytoskeletal changes and the system of regulation of alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament cells induced by mechanical stress. *Cell Biochem Funct*, 2004, 22 : 249-56.
33. Chiquet-E R. Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004, 36 : 986-90.
34. Chiquet-E R, Chiquet M. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol*, 2003, 200 : 488-99.
35. Chiquet-E R, Hagios C, Matsumoto K. The tenascin gene family. *Perspect Dev Neurobiol*, 1994a, 2 : 3-7.
36. Chiquet-E R, Hagios C, Schenk S. The complexity in regulating the expression of tenascins. *Bioessays*, 1995, 17 : 873-8.
37. Chiquet-E R, Tannheimer M, Koch M, Brunner A, Spring J, Martin D, Baumgartner S, Chiquet M. Tenascin-C expression by fibroblasts is elevated in stressed collagen gels. *J Cell Biol*, 1994b, 127 : 2093-101.
38. Chiquet M, Renedo AS, Huber F, Fluck M. How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biol*, 2003, 22 : 73-80.
39. Choquet D, Felsenfeld DP, Sheetz MP. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell*, 1997, 10 : 39-48.
40. Christel P. Prosthetic replacement of the anterior cruciate ligament : a challenge. *Clin. Materials*, 1994, 15 : 3-13.
41. Cilli F, Khan M, Fu F, Wang JH. Prostaglandin E2 affects proliferation and collagen synthesis by human patellar tendon fibroblasts. *Clin J Sport Med*, 2004, 14 : 232-6.
42. Clark, J. G., D. K. Madtes, G. Raghu. Effects of platelet-derived growth factor isoforms on human lung fibroblast proliferation and procollagen gene expression. *Exp Lung Res*, 1993, 19 : 327-44.
43. Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Huang Y, Osdoby P. Basic fibroblast growth factor stimulates osteoclast recruitment, development, and bone pit resorption in association with angiogenesis in vivo on the chick chorioallantoic membrane and activates isolated avian osteoclast resorption in vitro. *J Bone Miner Res*, 2002, 17 : 1859-71.

Références bibliographiques

44. Cooper JA Jr, Bailey LO, Carter JN, Castiglioni CE, Kofron MD, Ko FK, Laurencin CT. Evaluation of the anterior cruciate ligament, medial collateral ligament, achilles tendon and patellar tendon as cell sources for tissue-engineered ligament. *Biomaterials*, 2006, 27 : 2747-54.
45. Cooper JA, Lu HH, Ko FK, Freeman JW, Laurencin CT. Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation. *Biomaterials*, 2005, 26 : 1523-32.
46. Cowin SC. How is a tissue built? *J Biomech Eng*, 2000, 122 : 553-69.
47. Cui W, Bryant MR, Sweet PM, McDonnell PJ. Changes in gene expression in response to mechanical strain in human scleral fibroblasts. *Exp Eye Res*, 2004, 78 : 275-84.
48. Dahlgren LA, van der Meulen MC, Bertram JE, Starrak GS, Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *J Orthop Res*, 2002, 20 : 910-9.
49. de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15 : 1-11.
50. Deie M, Marui T, Allen CR, Hildebrand KA, Georgescu HI, Niyibizi C, Woo SL. The effects of age on rabbit MCL fibroblast matrix synthesis in response to TGF-beta 1 or EGF. *Mech Ageing Dev*, 1997, 97 : 121-3.
51. Demarteau O, Wendt D, Braccini A, Jakob M, Schafer D, Heberer M, Martin I. Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 310 : 580-8.
52. Denk PO, Knorr M. Serum-free cultivation of human Tenon's capsule fibroblasts. *Curr Eye Res*, 1999, 18 : 130-4.
53. Dennison DK, Vallone DR, Pinero GJ, Rittman B, Caffesse RG. Differential effect of TGF-beta 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J Periodontol*, 1994, 65 : 641-8.
54. Desrosiers EA, Methot S, Yahia L, Rivard CH. Responses of ligamentous fibroblasts to mechanical stimulation. *Ann Chir*, 1995, 49 : 768-74.
55. DesRosiers EA, Yahia L, Rivard CH. Proliferative and matrix synthesis response of canine anterior cruciate ligament fibroblasts submitted to combined growth factors. *J Orthop Res*, 1996, 14 : 200-8.
56. Dunn MG, Liesch JB, Tiku ML, Zawadsky JP. Development of fibroblast-seeded ligament analogs for ACL reconstruction. *J Biomed Mater Res*, 1995, 29 : 1363-71.
57. Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, Merckling A, Langa F, Aumailley M, Delougee A, Koteliensky V, Babinet C, Krieg T. Impaired

Références bibliographiques

- mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci*, 1998, 111 : 1897-907.
58. Eckes, B., P. Zigrino, D. Kessler, O. Holtkotter, P. Shephard, C. Mauch, T. Krieg. Fibroblast matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol*, 2000, 19 : 325-32.
59. Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, Perruchoud AP, Roth M. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3. *Am J Physiol*, 1999, 276 : L814-24.
60. Evans M. Embryonic stem cells: a perspective. *Novartis Found Symp*, 2005, 265:98-103, discussion 103-6, 122-8.
61. Fawzi-Grancher Shalaw, Said Slimani, M.N Kolopp-Sarda, Michel Marchand, G Faure, Jean-François Stoltz, Sylvaine Muller. Effect of cyclic stretching and foetal bovine serum (FBS) on proliferation and extra cellular matrix synthesis of fibroblast. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2006, 16 : S137-44.
62. Fermor B, Urban J, Murray D, Pocock A, Lim E, Francis M, Gage J. Proliferation and collagen synthesis of human anterior cruciate ligament cells in vitro: effects of ascorbate-2-phosphate, dexamethasone and oxygen tension. *Cell Biol Int*, 1998, 22 : 635-40.
63. Fichard A, Chanut-Delalande H, Ruggiero F. The Ehlers-Danlos syndrome: the extracellular matrix scaffold in question. *Med Sci (Paris)*, 2003, 19 : 443-52.
64. Fluck M, Tunc-Civelek V, Chiquet M. Rapid and reciprocal regulation of tenascin-C and tenascin-Y expression by loading of skeletal muscle. *J Cell Sci*, 2000, 113 : 3583-91.
65. Franck C.B, McDonald D.B, Bary D, Bary R, et al. Collagen fibril diameters in the healing adult medial collateral ligament. *Connect. Tissue Res*, 1992, 27, 251.
66. Franck C.B, Shrive N.G, and McDonald D.B. Collagen fibril diameters in ligament scars: Along term assessment. Abstract presented at the 42 nd Orthopaedic Research Society Annual Meeting, Atlanta, GA, 1996.
67. Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Spaceflight bioreactor studies of cells and tissues. *Adv Space Biol Med*, 2002, 8 : 177-95.
68. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, Langer R. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology (N Y)*, 1994, 12 : 689-93.
69. Fu FH, Schulte KR. Anterior cruciate ligament surgery State of the Art ? *Clin Orthop*, 1996, 325 : 19-24.
70. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell*, 2000, 7,100 : 143-55.
71. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000, 287 : 1433-8.

Références bibliographiques

72. Galbraith CG, Sheetz MP. Forces on adhesive contacts affect cell function. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10 : 566-71.
73. Ge Z, Goh JC, Lee EH. Selection of cell source for ligament tissue engineering. *Cell Transplant*, 2005, 14 : 573-83.
74. Ge Z, Yang F, Goh JC, Ramakrishna S, Lee EH. Biomaterials and scaffolds for ligament tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 77 : 639-52.
75. Gillquist J, Odensten M. Reconstruction of old anterior cruciate ligament tears with a dacron prosthesis. A prospective study. *Am J Sports Med*, 1993, 21 : 358-366.
76. Goh JC, Ouyang HW, Teoh SH, Chan CK, Lee EH. Tissue-engineering approach to the repair and regeneration of tendons and ligaments. *Tissue Eng*, 2003, 9 : S31-44.
77. Gutierrez JA, Perr HA. Mechanical stretch modulates TGF-beta1 and alpha1(I) collagen expression in fetal human intestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1999, 277 : G1074-80.
78. Hankemeier S, Keus M, Zeichen J, Jagodzinski M, Barkhausen T, Bosch U, Krettek C, Van Griensven M. Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth factor 2: potential implications for tissue engineering of tendons and ligaments. *Tissue Eng*, 2005, 11 : 41-9.
79. Haudenschild DR, McPherson JM, Tubo R, Binette F. Differential expression of multiple genes during articular chondrocyte redifferentiation. *Anat Rec*, 2001, 263 : 91-8.
80. Health, C. A. Cells for tissue engineering. *Trends Biotechnol*, 2000, 18 : 17-19.
81. Helmke BP, Goldman RD, Davies PF. Rapid displacement of vimentin intermediate filaments in living endothelial cells exposed to flow. *Circ Res*, 2000, 14,86 : 745-52.
82. Hetzel M, Bachem M, Anders D, Trischler G, Faehling M. Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Lung*, 2005, 183 : 225-37.
83. Hildebrand KA, Deie M, Allen CR, Smith DW, Georgescu HI, Evans CH, Robbins PD, Woo SL. Early expression of marker genes in the rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments: the use of different viral vectors and the effects of injury. *J Orthop Res*, 1999, 17 : 37-42.
84. Hildebrand KA, Woo SL, Smith DW, Allen CR, Deie M, Taylor BJ, Schmidt CC. The effects of platelet-derived growth factor-BB on healing of the rabbit medial collateral ligament. An in vivo study. *Am J Sports Med*, 1998, 26 : 549-54.
85. Horan RL, Antle K, Collette AL, Wang Y, Huang J, Moreau JE, Volloch V, Kaplan DL, Altman GH. In vitro degradation of silk fibroin. *Biomaterials*, 2005, 26 : 3385-93.

Références bibliographiques

86. Hori Y, Inoue S, Hirano Y, Tabata Y. Effect of culture substrates and fibroblast growth factor addition on the proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Tissue Eng*, 2004, 10 : 995-1005.
87. Hori Y, Nakamura T, Matsumoto K, Kurokawa Y, Satomi S, Shimizu Y. Tissue engineering of the small intestine by acellular collagen sponge scaffold grafting. *Int J Artif Organs*, 2001, 24 : 50-4.
88. Howe PH, Draetta G, Leof EB. Transforming growth factor beta 1 inhibition of p34cdc2 phosphorylation and histone H1 kinase activity is associated with G1/S-phase growth arrest. *Mol Cell Biol*, 1991, 11 : 1185-94.
89. Howell SM, Clark JA. Tibial tunnel placement in anterior cruciate ligament reconstructions and Graft Impingement. *Clin Orthop*, 1992, 283 : 187-195.
90. Howell SM, Taylor MA. Failure of reconstruction of the anterior cruciate ligament due to impingement by the intercondylar roof. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1993, 75A : 1044-1055.
91. Hsieh AH, Tsai CM, Ma QJ, Lin T, Banes AJ, Villarreal FJ, Akeson WH, Sung KL. Time-dependent increases in type-III collagen gene expression in medical collateral ligament fibroblasts under cyclic strains. *J Orthop Res*, 2000, 18 : 220-7.
92. Hui AY, Friedman SL. Molecular basis of hepatic fibrosis. *Expert Rev Mol Med*, 2003, 14 : 1-23.
93. Hung LM, Tsai CH, Chen JK. TGF-beta1 selectively suppresses PDGF receptor signaling pathways in MG-63 human osteosarcoma cell. *Life Sci*, 1997, 61 : 685-93.
94. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 2000, 21 : 2529-43.
95. Hynes RO. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol*, 1999, 9 : M33-7.
96. Iba T, Sumpio BE. Morphological response of human endothelial cells subjected to cyclic strain in vitro. *Microvasc Res*, 1991, 42 : 245-54.
97. Ihn H, Kikuchi K, Soma Y, Sato S, Fujimoto M, Tamaki T, Igarashi A, Takehara K. The stimulatory effects of PDGF and TGF-beta 1 on dermal fibroblast attachment. *Acta Derm Venereol*, 1995, 75 : 367-71.
98. Ito Y, Chen G, Imanishi Y, Morooka T, Nishida E, Okabayashi Y, Kasuga M. Differential control of cellular gene expression by diffusible and non-diffusible EGF. *J Biochem (Tokyo)*, 2001, 129 : 733-7.
99. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson J Jr, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science*, 1999, 283 : 83-7.

Références bibliographiques

100. Jacobs CR, Yellowley CE, Davis BR, Zhou Z, Cimbala JM, Donahue HJ. Differential effect of steady versus oscillating flow on bone cells. *J Biomech*, 1998, 31 : 969-76.
101. Jessel N, Oulad-Abdelghani M, Meyer F, Lavalley P, Haikel Y, Schaaf P, Voegel JC. Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by beta-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 : 8618-21.
102. Ju YJ, Tohyama H, Kondo E, Yoshikawa T, Muneta T, Shinomiya K, Yasuda K. Effects of local administration of vascular endothelial growth factor on properties of the in situ frozen-thawed anterior cruciate ligament in rabbits. *Am J Sports Med*, 2006, 34 : 84-91.
103. Kasahara H, Tanaka E, Fukuyama N, Sato E, Sakamoto H, Tabata Y, Ando K, Iseki H, Shinozaki Y, Kimura K, Kuwabara E, Koide S, Nakazawa H, Mori H. Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41 : 1056-62.
104. Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, Beck A, Claes L, Ignatius A. Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain. *Biomech*, 2002, 35 : 873-80.
105. Kdolsky R, Kwasny O, Schabus R. Synthetic augmented repair of proximal ruptures of the anterior cruciate ligaments. Long-term results of 66 patients. *Clin Orthop*, 1993, 295 : 183-189.
106. Kim SG, Akaike T, Sasagawa T, Atomi Y, Kurosawa H. Gene expression of type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells. *Cell Struct Funct*, 2002, 27 : 139-44.
107. Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG. Mechanical stress induces DNA synthesis in PDL fibroblasts by a mechanism unrelated to autocrine growth factor action. *FEBS Lett*, 1998, 3,430 : 358-62.
108. Kletsas D, Stathakos D, Sorrentino V, Philipson L. The growth-inhibitory block of TGF-beta is located close to the G1/S border in the cell cycle. *Exp Cell Res*, 1995, 217 : 477-83.
109. Kobayashi K, Healey RM, Sah RL, Clark JJ, Tu BP, Goomer RS, Akeson WH, Moriya H, Amiel D. Novel method for the quantitative assessment of cell migration: a study on the motility of rabbit anterior cruciate (ACL) and medial collateral ligament (MCL) cells. *Tissue Eng*, 2000, 6 : 29-38.
110. Kuroda, R., M. Kurosaka, S. Yoshiya, K. Mizuno. Localization of growth factors in the reconstructed anterior cruciate ligament: immunohistological study in dogs. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2000, 8 : 120-6.

Références bibliographiques

111. Kurtz CA, Loebig TG, Anderson DD, DeMeo PJ, Campbell PG. Insulin-like growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model. *Am J Sports Med*, 1999, 27 : 363-9.
112. Kurz B, Lemke AK, Fay J, Pufe T, Grodzinsky AJ, Schunke M. Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. *Ann Anat*, 2005, 187 : 473-85.
113. Langer, R., J.P. Vacanti. Tissue engineering. *Science*, 1993, 260 : 920-6.
114. Laurencin CT, Freeman JW. Ligament tissue engineering: An evolutionary materials science approach. *Biomaterials*, 2005, 26 : 7530-6.
115. Lee AA, Delhaas T, Waldman LK, MacKenna DA, Villarreal FJ, McCulloch AD. An equibiaxial strain system for cultured cells. *Am J Physiol*, 1996, 271 : C1400-8.
116. Lee CH, Shin HJ, Cho IH, Kang YM, Kim IA, Park KD, Shin JW. Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast. *Biomaterials*, 2005, 26 : 1261-70.
117. Lee C.R., Grodzinsky, Spector M., Bionsynthetic response of passaged chondrocytes in a type II collagen scaffold to mechanical compression. *J Biomed Mat Res*, 2002, 64A: 560-569.
118. Lee J, Green MH, Amiel D. Synergistic effect of growth factors on cell outgrowth from explants of rabbit anterior cruciate and medial collateral ligaments. *J Orthop Res*, 1995, 13 : 435-41.
119. Lee J, Harwood FL, Akeson WH, Amiel D. Growth factor expression in healing rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments. *Iowa Orthop J*, 1998, 18 : 19-25.
120. Lee K, Majumdar MK, Buyaner D, Hendricks JK, Pittenger MF, Mosca JD. Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation. *Mol Ther*, 2001, 3 : 857-66.
121. Lee KY, Peters MC, Anderson KW, Mooney DJ. Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices. *Nature*, 2000, 21-28,408 : 998-1000.
122. Leguen E, Chassepot A, Decher G, Schaaf P, Voegel JC, Jessel N. Bioactive coatings based on polyelectrolyte multilayer architectures functionalized by embedded proteins, peptides or drugs. *Biomol Eng*, 2006, [Epub ahead of print].
123. Letson AK, Dahners LE. The effect of combinations of growth factors on ligament healing. *Clin Orthop Relat Res*, 1994, 308 : 207-12.
124. Levy RJ, Goldstein SA, Bonadio J. Gene therapy for tissue repair and regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 33 : 53-69.
125. Li S., Vert M. Biodegradation of aliphatic polyester, *Degradable polymers principles and applications*. Chapman & Hall Edts, 1995, Chap 5 : 43-87.

Références bibliographiques

126. Li Z, Yang G, Khan M, Stone D, Woo SL, Wang JH. Inflammatory response of human tendon fibroblasts to cyclic mechanical stretching. *Am J Sports Med*, 2004, 32 : 435-40.
127. Lieb, E., T. Vogel, S. Milz, M. Dauner, M. B. Schulz. Effects of transforming growth factor beta1 on bonelike tissue formation in three-dimensional cell culture. I. Culture conditions and tissue formation. *Tissue Eng*, 2004, 10 : 1399-413.
128. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*, 2002, 84 : 1032-44.
129. Liebeskind, A., S. Srinivasan, D. Kaetzel, M. Bruce. Retinoic acid stimulates immature lung fibroblast growth via a PDGF-mediated autocrine mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279 : L81-90.
130. Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJ. Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech*, 2004, 37 : 865-77.
131. Lin VS, Lee MC, O'Neal S, McKean J, Sung KL. Ligament tissue engineering using synthetic biodegradable fiber scaffolds. *Tissue Eng*, 1999, 5 : 443-52.
132. Liu SH, Yang RS, al-Shaikh R, Lane JM. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin Orthop*, 1995, 318 : 265-78.
133. Lo IK, Marchuk L, Hart DA, Frank CB. Messenger ribonucleic acid levels in disrupted human anterior cruciate ligaments. *Clin Orthop Relat Res*, 2003 : 249-58.
134. Lo YY, Conquer JA, Grinstein S, Cruz TF. Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species. *J Cell Biochem*, 1998, 69 : 19-29.
135. Lu HH, Cooper JA Jr, Manuel S, Freeman JW, Attawia MA, Ko FK, Laurencin CT. Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies. *Biomaterials*, 2005, 26 : 4805-16.
136. Mackie EJ. Molecules in focus: tenascin-C. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29 : 1133-7.
137. Mackie EJ. Tenascin in connective tissue development and pathogenesis. *Perspect Dev Neurobiol*, 1994, 2 : 125-32.
138. Makisalo S, Skutnabb K, Holmstrom T, Gronblad M, Paavolainen P. Reconstruction of anterior cruciate ligament with carbon fiber. An experimental study on pigs. *Am J Sports Med*, 1988, 16 : 589.
139. Maroudas NG, Wray S. Activation of nuclear chromatin in stretch-dependent growth of tissues. *Connect Tissue Res*, 1985, 13 : 217-25.
140. Martin I, Shastri VP, Padera RF, Yang J, Mackay AJ, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Selective differentiation of mammalian bone marrow stromal cells cultured on three-dimensional polymer foams. *J Biomed Mater Res*, 2001, 55 : 229-35.

Références bibliographiques

141. Marui T, Niyibizi C, Georgescu HI, Cao M, Kavalkovich KW, Levine RE, Woo SL. Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts. *J Orthop Res*, 1997, 15 : 18-23.
142. Massague J, Attisano L, Wrana JL. The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol*, 1994, 4 : 172-8.
143. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*, 2000, 19 : 1745-54.
144. McCarthy DM, Tolin BS, Schwenderman L. In: Jackson DW, editor. The anterior cruciate ligament: current and future concepts. New York: Raven Press, Ltd., 1993, p. 343-56.
145. Meaney Murray M, Rice K, Wright RJ, Spector M. The effect of selected growth factors on human anterior cruciate ligament cell interactions with a three-dimensional collagen-GAG scaffold. *J Orthop Res*, 2003, 21 : 238-44.
146. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Fu FH, Moreland MS, Huard J. Direct-, fibroblast- and myoblast-mediated gene transfer to the anterior cruciate ligament. *Tissue Eng*, 1999, 5 : 435-42.
147. Michna H, Hartmann G. Adaptation of tendon collagen to exercise. *Int Orthop*, 1989, 13 : 161-5.
148. Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol*, 2000, 75 : 115-57.
149. Moreau JE, Chen J, Bramono DS, Volloch V, Chernoff H, Vunjak-Novakovic G, Richmond JC, Kaplan DL, Altman GH. Growth factor induced fibroblast differentiation from human bone marrow stromal cells in vitro. *J Orthop Res*, 2005, 23 : 164-74.
150. Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, Shimabukuro Y, Kitamura M, Nozaki T, Terashima A, Asano T, Okada H. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J Periodontal Res*, 1999, 34 : 425-30.
151. Murphy PG, Loitz BJ, Frank CB, Hart DA. Influence of exogenous growth factors on the synthesis and secretion of collagen types I and III by explants of normal and healing rabbit ligaments. *Biochem Cell Biol*, 1994, 72 : 403-9.
152. Murray MM, Bennett R, Zhang X, Spector M. Cell outgrowth from the human ACL in vitro: regional variation and response to TGF-beta1. *J Orthop Res*, 2002, 20 : 875-80.
153. Murray MM, Martin SD, Spector M. Migration of cells from human anterior cruciate ligament explants into collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *J Orthop Res*, 2000, 18 : 557-64.

Références bibliographiques

154. Murray MM, Weiler A, Spindler KP. Interspecies variation in the fibroblast distribution of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med*, 2004, 32 : 1484-91.
155. Nakamura N, Hart DA, Boorman RS, Kaneda Y, Shrive NG, Marchuk LL, Shino K, Ochi T, Frank CB. Decorin antisense gene therapy improves functional healing of early rabbit ligament scar with enhanced collagen fibrillogenesis in vivo. *J Orthop Res*, 2000, 18 : 517-23.
156. Nakamura N, Hart DA, Frank CB, Marchuk LL, Shrive NG, Ota N, Taira K, Yoshikawa H, Kaneda Y. Efficient transfer of intact oligonucleotides into the nucleus of ligament scar fibroblasts by HVJ-cationic liposomes is correlated with effective antisense gene inhibition. *J Biochem (Tokyo)*, 2001, 129 : 755-9.
157. Nakamura N, Timmermann SA, Hart DA, Kaneda Y, Shrive NG, Shino K, Ochi T, Frank CB. A comparison of in vivo gene delivery methods for antisense therapy in ligament healing. *Gene Ther*, 1998, 5 : 1455-61.
158. Nakamura Y, Esnault S, Maeda T, Kelly EA, Malter JS, Jarjour NN. Ets-1 regulates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 and tenascin expression in primary bronchial fibroblasts. *J Immunol*, 2004, 172 : 1945-52.
159. Nakatani T, Marui T, Hitora T, Doita M, Nishida K, Kurosaka M. Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor-beta1. *J Orthop Res*, 2002, 20 : 1380-6.
160. Neidlinger-Wilke C, Grood E, Claes L, Brand R. Fibroblast orientation to stretch begins within three hours. *J Orthop Res*, 2002, 20 : 953-6.
161. Neidlinger-Wilke C, Grood ES, Wang JH-C, Brand RA, Claes L. Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: studies of cells grown in cyclically stretched substrates. *J Orthop Res*, 2001, 19 : 286-93.
162. Neidlinger-Wilke C, Wilke HJ, Claes L. Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application. *J Orthop Res*, 1994, 12 : 70-8.
163. Newton PO, Horibe S, Woo SL. Experimental studies on anterior cruciate ligament autografts and allografts. Mechanical studies. In Daniel DM, Akeson WH, O'Connor JJ (eds). *Knee Ligament: Structure, Function, Injury, and Repair*. New York, Raven Press 1990, 389-399.
164. Nimni ME. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials*, 1997, 18 : 1201-25.

Références bibliographiques

165. Nordin M, Lorenz T, and Campello M. Biomechanics of tendons and ligaments. In: Nordin M, and Frankel V.H, eds. Basic biomechanics of the musculoskeletal system. New York : Lippincott Williams & Wilkins, 2001, app. 102-125.
166. Noyes FR, Butler DL, Grood ES, Zernicke RF, Hefzy MS. Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament repairs and reconstructions. J Bone Joint Surg Am, 1984, 66 : 344-52.
167. Ojima Y, Mizuno M, Kuboki Y, Komori T. In vitro effect of platelet-derived growth factor-BB on collagen synthesis and proliferation of human periodontal ligament cells. Oral Dis, 2003, 9 : 144-51.
168. Olson EJ, Kang JD, Fu FH, Georgescu HI, Mason GC, Evans CH. The biochemical and histological effects of artificial ligament wear particles : In vitro and in vivo studies. Am J. Sports Med, 1989, 16 : 558-570.
169. Orend G, Chiquet-Ehrismann R. Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. Exp Cell Res, 2000, 261 : 104-10.
170. Orr FW, Millar-Book W, Singh G. Chemotactic activity of bone and platelet-derived TGF-beta for bone-metastasizing rat Walker 256 carcinosarcoma cells. Invasion Metastasis, 1990, 0 :241-52.
171. Ouyang HW, Goh JC, Mo XM, Teoh SH, Lee EH. The efficacy of bone marrow stromal cell-seeded knitted PLGA fiber scaffold for Achilles tendon repair. Ann N Y Acad Sci, 2002c, 961 : 126-9.
172. Ouyang HW, Goh JC, Thambyah A, Teoh SH, Lee EH. Knitted poly-lactide-co-glycolide scaffold loaded with bone marrow stromal cells in repair and regeneration of rabbit Achilles tendon. Tissue Eng, 2003, 9 : 431-9.
173. Ouyang, H. W., J. C. H. Goh, X. M. Mo, S. H. Teoh, S. W. Chong, and E. H. Lee. Study on cell –material systems for ACL regeneration: ligament cells and mesenchymal stem cells on various biodegradable polymeric films. Mater. Sci. Eng. C Bio, 2002a, S20, 63.
174. Ouyang, H.W., Goh, J.C.H., Mo, X.M., Teoh, S.H., Lee, E.H. Characterization of anterior cruciate ligament cells and bone marrow stromal cells on various biodegradable polymeric films. Materials science and engineering: C, 2002b, 20 : 63-69.
175. Ozaki S, Kaneko S, Podyma-Inoue KA, Yanagishita M, Soma K. Modulation of extracellular matrix synthesis and alkaline phosphatase activity of periodontal ligament cells by mechanical stress. J Periodontal Res, 2005, 40 : 110-7.
176. Papakonstantinou E, Roth M, Tamm M, Eickelberg O, Perruchoud AP, Karakiulakis G. Hypoxia differentially enhances the effects of transforming growth factor-beta isoforms

Références bibliographiques

- on the synthesis and secretion of glycosaminoglycans by human lung fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 301 : 830-7.
177. Park, J. S., J. S. Chu, C. Cheng, F. Chen, D. Chen, S. Li. Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng*. 2004, 88 : 359-68.
178. Petersen W, Varoga D, Zantop T, Hassenpflug J, Mentlein R, Pufe T. Cyclic strain influences the expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and the hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) in tendon fibroblasts. *J Orthop Res*, 2004, 22 : 847-53.
179. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM, Deuel TF. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol*, 1989, 109 : 429-40.
180. Pietenpol JA, Stein RW, Moran E, Yaciuk P, Schlegel R, Lyons RM, Pittelkow MR, Munger K, Howley PM, Moses HL. TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains. *Cell*, 1990, 61 : 777-85.
181. Pioletti DP, Siegrist O, Zambelli PY. Tissue Engineering of Tendons. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, 2004, 1672-1676.
182. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol*, 2001, 19 : 1029-34.
183. Richmond JC, Manseau CJ, Patz R, McConville O. Anterior cruciate reconstruction using a dacron ligament prosthesis. A long-term study. *Am J Sports Med*, 1992, 20 : 24-8.
184. Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittinger M. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften*, 2002, 89 : 338-51.
185. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner electrolyte metab*, 1998, 24 : 111-9.
186. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71 : 1207-10.
187. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, 1986, 46 : 155-69.
188. Sakai T, Yasuda K, Tohyama H, Azuma H, Nagumo A, Majima T, Frank CB. Effects of combined administration of transforming growth factor-beta1 and epidermal growth

Références bibliographiques

- factor on properties of the in situ frozen anterior cruciate ligament in rabbits. *J Orthop Res*, 2002, 20 : 1345-51.
189. Sakata R, Ueno T, Nakamura T, Ueno H, Sata M. Mechanical stretch induces TGF-beta synthesis in hepatic stellate cells. *Eur J Clin Invest*, 2004, 34 : 129-36.
190. Saltzman W.M. Cell interaction with polymers. In: Lanza R.P, Langer R. and Vancanti J. eds. *Principles of Tissue Engineering*, 2nd Ed., San Diego, CA: Academic Press, 2000: pp 221-237.
191. Sanchez-Esteban J, Wang Y, Cicchiello LA, Rubin LP. Cyclic mechanical stretch inhibits cell proliferation and induces apoptosis in fetal rat lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282 : L448-56.
192. Scherping SC Jr, Schmidt CC, Georgescu HI, Kwoh CK, Evans CH, Woo SL. Effect of growth factors on the proliferation of ligament fibroblasts from skeletally mature rabbits. *Connect Tissue Res*, 1997, 36 : 1-8.
193. Schild C, Trueb B. Three members of the connective tissue growth factor family CCN are differentially regulated by mechanical stress. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1691 : 33-40.
194. Schmidt CC, Georgescu HI, Kwoh CK, Blomstrom GL, Engle CP, Larkin LA, Evans CH, Woo SL. Effect of growth factors on the proliferation of fibroblasts from the medial collateral and anterior cruciate ligaments. *J Orthop Res*, 1995, 13 : 184-90.
195. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002, 10 : 62-70.
196. Schultz O, Sittinger M, Haeupl T, Burmester GR. Emerging strategies of bone and joint repair. *Arthritis Res*, 2000, 2 : 433-6.
197. Schwarz ER, Speakman MT, Patterson M, Hale SS, Isner JM, Kedes LH, Kloner RA. Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat--angiogenesis and angioma formation. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 35 : 1323-30.
198. Scott JE. The nomenclature of glycosaminoglycans and proteoglycans. *Glycoconj J*, 1993, 10 : 419-21.
199. Segawa H, Omori G, Koga Y. Long-term results of non-operative treatment of anterior cruciate ligament injury. *Knee*, 2001, 8 : 5-11.
200. Shyy JY, Chien S. Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9 : 707-13.

Références bibliographiques

201. Silver FH, Freeman JW, Seehra GP. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biomech*, 2003, 36 : 1529-53.
202. Silver FH, Horvath I, Foran DJ. Mechanical implications of the domain structure of fiber-forming collagens: comparison of the molecular and fibrillar flexibilities of the alpha1-chains found in types I-III collagen. *J Theor Biol*, 2002, 216 : 243-54.
203. Skutek M, van Griensven M, Zeichen J, Brauer N, Bosch U. Cyclic mechanical stretching enhances secretion of Interleukin 6 in human tendon fibroblasts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2001a, 9 : 322-6.
204. Skutek M, van Griensven M, Zeichen J, Brauer N, Bosch U. Cyclic mechanical stretching of human patellar tendon fibroblasts: activation of JNK and modulation of apoptosis. *Eur J Appl Physiol*, 2001b, 86 : 48-52.
205. Skutek M, van Griensven M, Zeichen J, Brauer N, Bosch U. Cyclic mechanical stretching modulates secretion pattern of growth factors in human tendon fibroblasts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2003, 11 : 122-9.
206. Spindler KP, Imro AK, Mayes CE, Davidson JM. Patellar tendon and anterior cruciate ligament have different mitogenic responses to platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *J Orthop Res*, 1996, 14 : 542-6.
207. Spindler KP, Murray MM, Detwiler KB, Tarter JT, Dawson JM, Nanney LB, Davidson JM. The biomechanical response to doses of TGF-beta 2 in the healing rabbit medial collateral ligament. *J Orthop Res*, 2003, 21 : 245-9.
208. Stathakos D, Psarras S, Kletsas D. Stimulation of human embryonic lung fibroblasts by TGF-beta and PDGF acting in synergism. The role of cell density. *Cell Biol Int*, 1993, 17 : 55-64.
209. Stein LE. Effects of serum, fibroblast growth factor, and platelet-derived growth factor on explants of rat tail tendon: a morphological study. *Acta Anat (Basel)*, 1985, 123 : 247-52.
210. Stoltz JF, Netter P, Huselstein C, de Isla N, Wei Yang J, Muller S. Chondrocyte mecanobiology. Application in cartilage tissue engineering. *Bull Acad Natl Med*, 2005, 189 : 1803-14.
211. Sudhir K, Hashimura K, Bobik A, Dilley RJ, Jennings GL, Little PJ. Mechanical strain stimulates a mitogenic response in coronary vascular smooth muscle cells via release of basic fibroblast growth factor. *Am J Hypertens*, 2001, 14 : 1128-34.
212. Tabata Y. Nanomaterials of drug delivery systems for tissue regeneration. *Methods Mol Biol*, 2005, 300 : 81-100.

Références bibliographiques

213. Tabata Y. Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue Eng*, 2003, 9 : S5-15.
214. Tabata Y. Tissue regeneration based on tissue engineering technology. *Congenit Anom (Kyoto)*, 2004, 44 : 111-24.
215. Tabata Y. Recent progress in tissue engineering. *Drug Discov Today*, 2001, 6 : 483-487.
216. Takemasa T, Sugimoto K, Yamashita K. Amplitude-dependent stress fiber reorientation in early response to cyclic strain. *Exp Cell Res*, 1997, 230 : 407-10.
217. Tanabe Y, Saito M, Uneno A. Mechanical stretch augments PDGF receptor beta expression and protein tyrosine phosphorylation in pulmonary artery tissue and smooth muscle cells. *Mol. Cell Biochem*, 2000, 215 : 103-113.
218. Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther*, 2001, 8 : 181-9.
219. Terracio L, Tingstrom A, Peters WH 3rd, Borg TK. A potential role for mechanical stimulation in cardiac development. *Ann N Y Acad Sci*, 1990, 588 : 48-60.
220. Thomopoulos S, Harwood F, Silva M, Amiel D, Gelberman R. Effect of Several Growth Factors on Canine Flexor Tendon Fibroblast Proliferation and Collagen Synthesis. *The Journal of Hand Surgery*, 2004, 30 : 441-447.
221. Toyoda T, Matsumoto H, Fujikawa K, Saito S, Inoue K. Tensile load and the metabolism of anterior cruciate ligament cells. *Clin Orthop Relat Res*, 1998, 353 : 247-55.
222. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 26 : 413-9.
223. Valentinis B, Baserga R. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Mol Pathol*, 2001, 54 : 133-7.
224. Van Eijk F, Saris DB, Riesle J, Willems WJ, Van Blitterswijk CA, Verbout AJ, Dhert WJ. Tissue engineering of ligaments: a comparison of bone marrow stromal cells, anterior cruciate ligament, and skin fibroblasts as cell source. *Tissue Eng*, 2004, 10 : 893-903.
225. Van Griensven M, Zeichen J, Skutek M, Barkhausen T, Krettek C, Bosch U. Cyclic mechanical strain induces NO production in human patellar tendon fibroblasts--a possible role for remodelling and pathological transformation. *Exp Toxicol Pathol*, 2003, 54 : 335-8.

Références bibliographiques

226. Vats A, Tolley NS, Bishop AE, Polak JM. Embryonic stem cells and tissue engineering: delivering stem cells to the clinic. *J R Soc Med*, 2005, 98 : 346-50.
227. Von den Hoff JW. Effects of mechanical tension on matrix degradation by human periodontal ligament cells cultured in collagen gels. *J Periodontal Res*, 2003, 38 : 449-57.
228. Vunjak-Novakovic G, Altman G, Horan R, Kaplan DL. Tissue engineering of ligaments. *Annu Rev Biomed Eng*, 2004, 6 : 131-56.
229. Walker RG, Willingham AT, Zuker CS. A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science*, 2000, 24, 287 : 2229-34.
230. Wang H, Ip W, Boissy R, Grood ES. Cell orientation response to cyclically deformed substrates: experimental validation of a cell model. *J Biomech*, 1995, 28 : 1543-52.
231. Wang JH. Mechanobiology of tendon. *J Biomech*, 2006, 39 : 1563-82.
232. Wang JH, Goldschmidt-Clermont P, Wille J, Yin FC. Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching. *J Biomech*, 2001, 34 : 1563-72.
233. Wang JH, Grood ES, Florer J, Wenstrup R. Alignment and proliferation of MC3T3-E1 osteoblasts in microgrooved silicone substrata subjected to cyclic stretching. *J Biomech*, 2000a, 33 : 729-35.
234. Wang JH, Jia F, Gilbert TW, Woo SL. Cell orientation determines the alignment of cell-produced collagenous matrix. *J Biomech*, 2003, 36 : 97-102.
235. Wang JH, Li Z, Yang G, Khan M. Repetitively stretched tendon fibroblasts produce inflammatory mediators. *Clin Orthop Relat Res*, 2004, 422 : 243-50.
236. Wang JH, Yang G, Li Z. Controlling cell responses to cyclic mechanical stretching. *Ann Biomed Eng*, 2005, 33 : 337-42.
237. Wang JH. Substrate deformation determines actin cytoskeleton reorganization: A mathematical modeling and experimental study. *J Theor Biol*, 2000b, 202 : 33-41.
238. Watanabe N, Takai S, Morita N, Kawata M, Hirawasa Y. A new method of distinguishing between intrinsic cells in situ and extrinsic cells supplied by autogeneic transplantation employing transgenic rats. *Trans Orthop Res Soc*, 1998, 23 : 1035.
239. Weitzel PP, Richmond JC, Altman GH, Calabro T, Kaplan DL. Future direction of the treatment of ACL ruptures. *Orthop Clin North Am*, 2002, 33 : 653-61.
240. West RV, Harner CD. Graft selection in anterior cruciate ligament reconstruction. *J Am Acad Orthop Surg*, 2005, 13 : 197-207.

Références bibliographiques

241. Woo SL, Gomez MA, Woo YK, Akeson WH. Mechanical properties of tendons and ligaments. II. The relationships of immobilization and exercise on tissue remodeling. *Biorheology*, 1982, 19 : 397-408.
242. Woo SL, Hildebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JH. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop Relat Res*, 1999, S312-23.
243. Woo SL, Ritter MA, Amiel D, Sanders TM, Gomez MA, Kuei SC, Garfin SR, Akeson WH. The biomechanical and biochemical properties of swine tendons--long term effects of exercise on the digital extensors. *Connect Tissue Res*, 1980, 7 : 177-83.
244. Woo SL, Smith DW, Hildebrand KA, Zeminski JA, Johnson LA. Engineering the healing of the rabbit medial collateral ligament. *Med Biol Eng Comput*, 1998, 36 : 359-64.
245. Woo SL, Vogrin TM, Abramowitch SD. Healing and repair of ligament injuries in the knee. *J Am Acad Orthop Surg*, 2000, 8 : 364-72.
246. Woo SL. Mechanical properties of tendons and ligaments. I. Quasi-static and nonlinear viscoelastic properties. *Biorheology*, 1982, 19 : 385-96.
247. Worapamorn W, Haase HR, Li H, Bartold PM. Growth factors and cytokines modulate gene expression of cell-surface proteoglycans in human periodontal ligament cells. *J Cell Physiol*, 2001, 186 : 448-56.
248. Yahia L. Ligaments and ligamentoplasties. Berlin, Heidelberg: Springer, 1997.
249. Yang G, Crawford RC, Wang JH. Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum-free conditions. *J Biomech*, 2004, 37 : 1543-50.
250. Yang S., Leong K.F., DU Z., Chua C.K., The design of scaffolds for use in Tissue Engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue engineering*, 2001, 7 : 679-689.
251. Yannas IV. Tissue and organ regeneration in adults. New York: Springer-Verlag. 2001.
252. Yoshida M, Fujii K. Differences in cellular properties and responses to growth factors between human ACL and MCL cells. *J Orthop Sci*, 1999, 4 : 293-8.
253. Yoshino H, Morita I, Murota SI, Ishikawa I. Mechanical stress induces production of angiogenic regulators in cultured human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res*, 2003, 38 : 405-10.
254. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*, 1998, 16 : 406-13.

Références bibliographiques

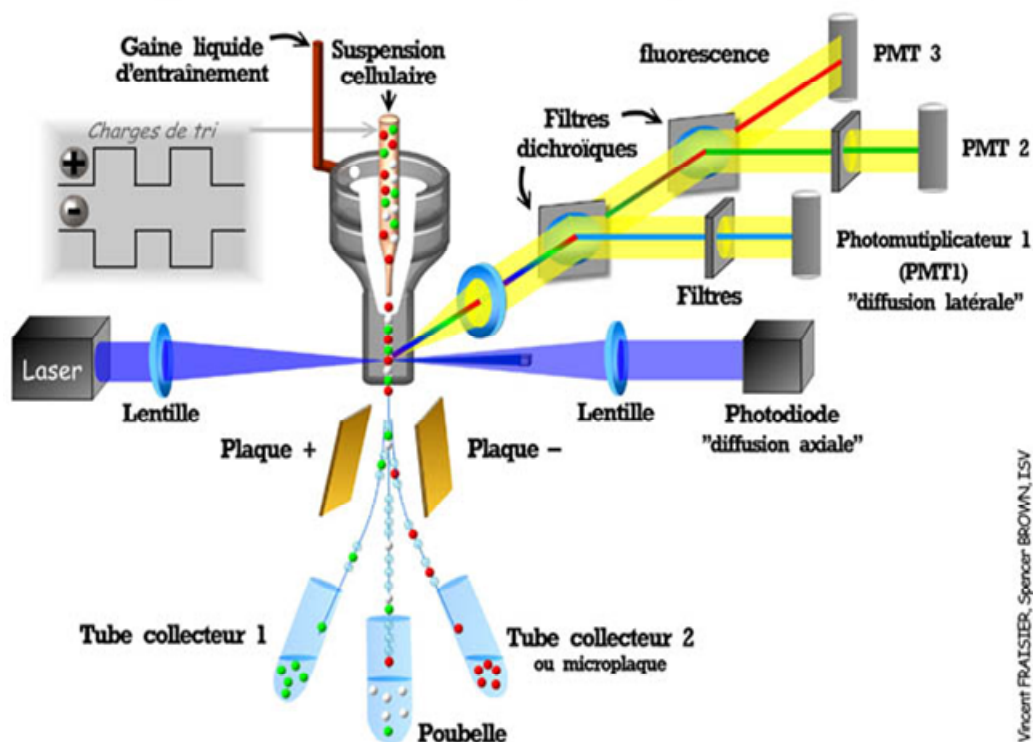
255. Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA, Mueller R, Griffith LG. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. *Tissue Eng*, 2001, 7 : 557-72.
256. Zhang R, Ma PX. Porous poly (L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. *J Biomed Mater Res*, 1999, 45 : 285-93.

	ANNEXES	
--	----------------	--

Annexe 1

Cytométrie en flux - Principe

Cette technique repose sur la mesure de paramètres physiques (taille, volume, granulosité) et biologiques (marquage de molécules par immunofluorescence) de cellules. Le principe de la cytométrie en flux consiste à analyser, en un temps très court et sur une grande quantité de cellules, plusieurs paramètres mesurés de manière semi-quantitative sur chaque cellule. Pour cela, les cellules défilent une à une à très grande vitesse dans une veine liquide devant un rayon laser (figure ci-dessous). La caractérisation des cellules est réalisée à l'aide d'un appareil qui comprend une source lumineuse (LASER), une chambre de prélèvement et un système optique précédant des photomultiplicateurs qui convertissent des signaux lumineux en impulsions électriques analogues digitalisées, analysées et mémorisées par un ordinateur. Les cellules étudiées sont propulsées dans un flux de liquide appelé « liquide de gaine ». Elles sont alors entraînées une à une dans une cellule de lecture (cuvette) où elles passent dans le faisceau lumineux émis par la source.



Représentation schématique d'un cytomètre en flux

Une analyse simultanée de la lumière diffractée à 90° (FSC (forward scatter detector)) et aux petits angles (SSC (side scatter detector)) fournit des données sur la taille et la structure des éléments étudiés. La mesure aux petits angles est principalement influencée par la taille des cellules, tandis que la détection à 90° reflète plutôt la structure et la granulosité des cellules.

Annexe 2

Cell Suspension Data Collection

4 PMT COULTER EPICS Profile I (with power pak upgrade) or Profile II Flow Cytometer (or equivalent)

CAUTION: If the laser on the flow cytometer is misaligned or the gates are improperly set, results may be erroneous.

NOTE: For 3 PMT COULTER EPICS Profile I flow cytometer (or equivalent), FL2 is used instead of FL3. There is no FL3P for doublet discrimination (Bitmap 2); and H2 is the analysis histogram.

1. After the flow cytometer is aligned, process samples as described under Specimen Preparation and Specimen Processing on Workstation. Prepare a COULTER DNA-Prep Reference tube for calibration of each batch of samples.
2. Run the COULTER DNA-Prep Reference using the DNA-Prep Test Protocol (page 4) at a flow rate of 40-80 rate meter events per second. Make certain H3 is bitmapped on both Bitmap 1 and Bitmap 2 (refer to Histogram Setup, page 4).

NOTE: If scatter is not evident after adjusting FS and LSS, increase the red HV until scatter appears. (The increase in red HV will move red events beyond discriminator trigger level.) Also, increase red HV if the Reference population is not distinct.

3. Adjust the FS gain and side scatter PMT high voltage (to obtain the scatter population in H1 (Figure 3)). Place Bitmap 1 around the Reference population in H1. (Draw a large enough Bitmap 1 to allow collection of the entire population of interest. See Figure 4.)
4. Adjust the PMT voltage of red (FL3) and peak red (FL3P) to place H2 events along the 45° angle.
5. Draw Bitmap 2 of H2 at a 45° angle to include the Reference population and extend to corners to exclude any doublets (approximately same FL3P but increased FL3 represents doublets) (see H2). Press Restart.
6. Adjust the red HV while monitoring H3 to set the mean channel (MC) of the Reference peak at 100 ± 2 on H3.
7. Restart the run after 60 seconds to obtain optimal resolution and HPCV. Verify that the Reference peak remains at MC 100 ± 2 . If necessary, adjust FL3 HV and restart to verify the MC of the Reference peak.

IMPORTANT: All subsequent samples should also be restarted after 60 seconds.

8. Collect 5000 events and record MC and HPCV of the Reference peak.
9. Run the whole blood control (normal whole blood) sample.
10. Run the cell suspension sample. Do not adjust the red high voltage (FL3 HV). Adjust FS and/or LSS, if necessary. Adjust Bitmaps 1 and 2 if needed. Draw Bitmap 1 to exclude debris, but include all cells of interest. Restart after 60 seconds. Collect at least 10,000 events (counter stop set on Histogram 3) at a rate of 40-80 rate meter events/second (rate meter set on Histogram 3) and analyze data in H3 (Figure 4).

Cell Suspension Data Analysis

CAUTION: If DNA analysis software has 'Aggregation' or 'Clumping' background noise correction feature, DO NOT USE if doublet discrimination gating (Bitmap 2 of H2, (FL3P vs FL3) for Profile II instrument or equivalent) was used during sample data collection.

1. Determine mean channels and %FPCV (full peak CV) for diploid and aneuploid Go/G1 peaks directly from the flow

cytometer printout. (Choose EXTENDED PRINT option to obtain %FPCV printout from Profile software version 2.2.)

2. An estimate of proliferation can be obtained by drawing cursors to include S phase and G2M regions. DNA analysis software may be used to obtain S phase % and G2M % values.
3. Analyze H3 (or H2 for 3 PMT instruments) for diploid and aneuploid peaks.
4. Determine the DNA index (DI) for each sample Go/G1 peak as follows:

$$\text{DNA Index (DI)} = \frac{\text{Mean channel of G0/G1 peak of sample}}{\text{Mean channel of diploid G0/G1 peak of normal control sample}}$$

Figure 3 COULTER DNA-Prep Reference

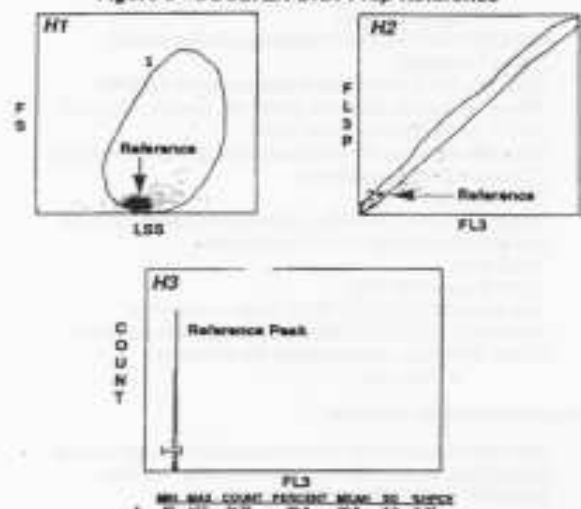
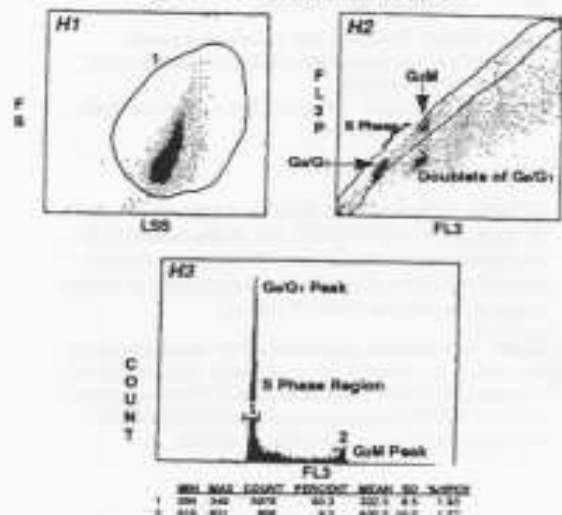


Figure 4 Cell Suspension Sample



Annexe 3

A. Microscopie confocale à balayage laser

La microscopie confocale à balayage laser ou CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope) permet de visualiser des échantillons biologiques en 3D en éliminant la lumière parasite.

Un microscope SP2 Leica dépourvu de filtre dichroïque, d'excitation et d'émission est utilisé afin d'améliorer le taux de transmission du signal d'émission de fluorescence. Cette amélioration passe d'une part par l'utilisation d'un cristal (AOBS) au niveau de l'excitation laser et d'autre part par l'utilisation d'un prisme permettant de décomposer et de sélectionner la longueur d'onde d'émission.

Principe du balayage laser

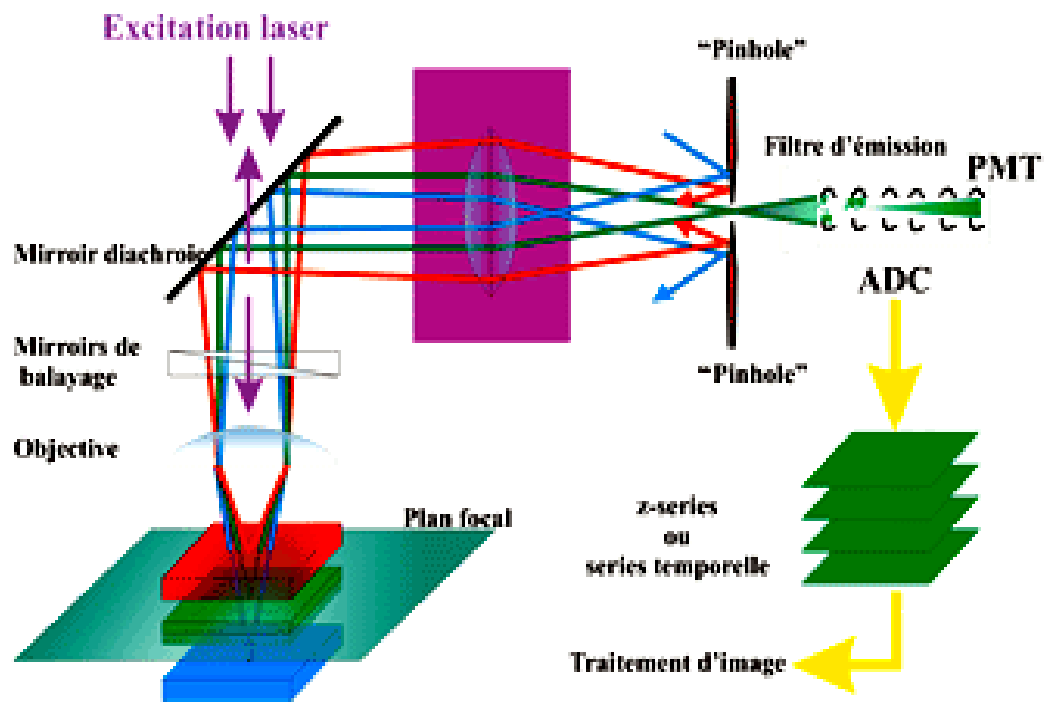
En microscopie optique classique, pour qu'une image soit nette, il faut que l'objet soit dans le plan focal du système optique. Lorsqu'un objet est épais, présente un relief important, ou bien lorsqu'il est incliné par rapport à l'objectif, seule une partie de l'objet est nette dans l'image. Pour résoudre ce problème, on éclaire la surface non plus par un faisceau de lumière blanche, mais par un rayon laser, concentré par une lentille, qui balaie la surface en positionnant un diaphragme devant le détecteur dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif (plans confocaux). De cette manière, seuls les photons provenant du plan focal passent le diaphragme et participent à la formation de l'image d'où le nom «confocal» (synonyme de monofocal).

Le balayage par le laser se fait à l'aide de deux miroirs orthogonaux. Les détecteurs utilisés sont des tubes photo-multiplieurs (PMT), l'intensité lumineuse est mesurée et numérisée en fonction de la position du laser dans l'échantillon : on obtient directement des images numériques. L'emploi d'une source lumineuse cohérente (laser) ainsi que la taille réduite du champ éclairé permettent d'obtenir une résolution latérale légèrement meilleure (180-160 nm) à celle attendue pour un microscope optique conventionnel (200 nm). La résolution en Z (profondeur) est de l'ordre de 600 nm en microscopie confocale.

Les lasers utilisés le plus fréquemment sont les suivants :

- Argon- ion (457, 488 et 514 nm)
- Hélium-néon (543 nm)
- Hélium-néon (633 nm)

Le positionnement de l'image dans la profondeur de l'échantillon est généralement obtenue en déplaçant en Z l'objectif à l'aide d'un quartz piézo-électrique par pas successifs de 200 nm.



Principe de la microscopie confocale à balayage laser

B. Microscopie à force atomique (AFM)

Cette technique nous a permis d'observer la topographie des cellules mais également la topographie précise des fibres de collagène après 10 jours de culture sur le verre comme surface de contrôle.

Principe

La Microscopie à Force Atomique (AFM) est fondée sur la mesure des forces d'interaction entre une pointe atomique (cantilever) et les atomes de surface de l'échantillon. Par balayage de la pointe, des images morphologiques tridimensionnelles à très hautes résolutions latérale (x, y) et verticale (z) sont obtenues. La déflexion de la pointe est suivie en positionnant un faisceau laser sur la face supérieure du cantilever, le faisceau est réfléchi sur un miroir puis tombe sur des photorécepteurs qui enregistrent le signal lumineux. Les déplacements x,y,z se font grâce à une céramique piézo-électrique.

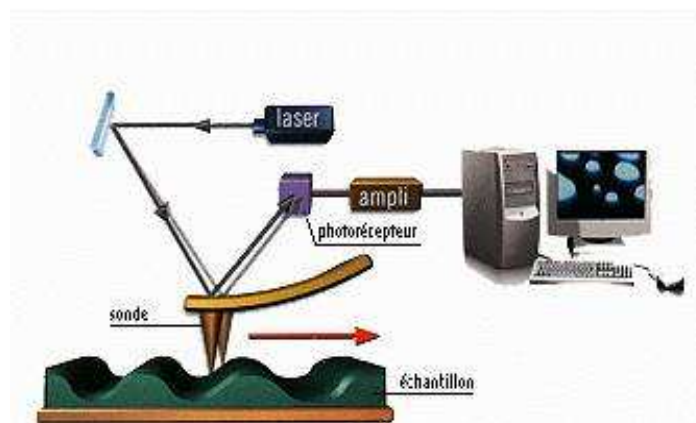


Schéma du principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ooo

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Daniel ISABEY, Professeur, INSERM, Faculté de Médecine, Créteil

Monsieur Pierre SCHAAF, Professeur, Institut Charles Sadron, EECPM, Strasbourg

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame FAWZI MOHAMMED Shalaw épouse GRANCHER

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Influence des facteurs biochimiques et mécaniques *in vitro* sur la prolifération
cellulaire et la synthèse matricielle de fibroblastes. Applications en Ingénierie tissulaire"**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Bioingénierie - Biomatériaux** »

Fait à Vandœuvre, le 20 septembre 2006

Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER



TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55