



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>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTE – ENVIRONNEMENT

THESE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2007-2008

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L’I.N.P.L.

Spécialité : Bioingénierie cellulaire et tissulaire

Présentée et soutenue publiquement

Par

Lei ZHANG

**Utilisation de Cellules Souches Mésenchymateuses Médullaires
en Bioingénierie Tissulaire du Ligament**

**Etude de différents effets de la co-culture sans contact avec des fibroblastes
ligamentaires et de l’étirement uniaxial sur les CSMM**

le 24 janvier 2008

Directeur de thèse : Professeur X. WANG

Co-directeur de thèse : Professeur H.Q. CHEN

Membres du Jury

J.-F. STOLTZ	Professeur (Président)	UHP-Nancy 1
R. SANTUS	Professeur (rapporteur)	MNHN, Paris
J.P. OU-YANG	Professeur (rapporteur)	Université de WuHan, Chine
X. WANG	Professeur (examineur)	UHP, Nancy 1
H.Q. CHEN	Professeur (examineur)	Université de SiChuan, Chine
N. TRAN	Maître de conférences	UHP, Nancy 1

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique entre le laboratoire d'Energétique et de Mécanique Théorique et Appliquée, le LEMTA-UMR CNRS 7563 (Equipe d'Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Faculté de Médecine de Nancy) et l'Institut d'Ingénierie Tissulaire, Hua Xi Centre Médical, Université de Sichuan, Chine.

A toute ma famille

A tous mes amis

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens avant tout à adresser mes remerciements les plus chaleureux à tous ceux qui m'ont aidée au cours de sa réalisation.

*Je remercie, tout d'abord, Monsieur le professeur **Xiong WANG**, mon directeur de thèse, qui m'a encadrée et orientée tout au long de ces années de travail. Je le remercie plus spécialement pour les nombreuses discussions, les suggestions précieuses, les encouragements, ainsi que pour la correction de ce manuscrit. Je lui suis très reconnaissante pour sa confiance et son soutien financier et scientifique.*

*Je remercie Monsieur le professeur **Huai Qing CHEN**, mon directeur de thèse en Chine, de l'Institut de Bioingénierie Médicale au Hua Xi Centre Médical de Sichuan Université en Chine, pour m'avoir donné la possibilité de participer à cette collaboration scientifique et de réaliser cette thèse, ainsi que pour sa disponibilité et ses encouragements dès le début de ce travail. Je lui suis très reconnaissante pour sa confiance, ses remarques, et son soutien financier et scientifique dans mes recherches en Chine.*

*Je suis particulièrement sensible à l'honneur que m'a fait Monsieur le professeur **René SANTUS** en acceptant d'évaluer mon travail en tant que président de jury de thèse.*

*J'exprime toute ma gratitude et mon profond respect à Madame le professeur **Jing Ping OU-YANG** pour avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.*

*Je tiens tout particulièrement à manifester ma gratitude à Monsieur le directeur de recherche **C. MOYNE**, directeur du LEMTA, qui m'a fait l'honneur de m'accueillir au sein de son laboratoire et m'a permis de réaliser ce travail.*

*Je tiens à manifester ma gratitude à Monsieur le professeur **J.F. STOLTZ**, responsable de l'équipe d'Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, qui m'a fait l'honneur de m'accueillir au sein de son équipe.*

*Je remercie Monsieur le docteur **Nguyen TRAN**, maître de conférence, pour avoir accepté d'évaluer mon travail. J'ai été touchée par son accueil très chaleureux, par ses précieux conseils tout au long de ce travail, ainsi que par sa patience et ses encouragements.*

*Je tiens à remercier Madame le docteur **Sylvaine MULLER** pour sa disponibilité, son aide, sa gentillesse et ses conseils durant ma thèse.*

*Je tiens à remercier Madame le docteur **Nathalie MONHOVEN** pour son accueil, pour les manipulations de RT-PCR en temps réel et ses conseils éclairés.*

*Je tiens à remercier Monsieur le docteur **Dominique DUMAS**, Ingénieur de Recherche, et Monsieur le docteur **Luc MARCHAL**, Ingénieur d'Etudes, pour leur sympathie, leurs conseils et leur aide concernant, notamment, la microscopie par fluorescence et en transmission.*

*J'exprime ma profonde reconnaissance à **Cédryck VAQUETTE** et **Cyril KAHN**, deux doctorants de l'équipe pour leur aide, leurs encouragements et leur amitié durant ces années.*

*Je remercie vivement M. **Claude WENDLING**, Mme. **Ghislaine CAUCHOIS**, Mme. **Monique GENTILS**, Mme. **Brigitte GUERBER**, Mme. **Frédérique GROUBATCH –JOINEAU**, Mme. **Juliette CHORT** pour leur gentillesse à mon égard, leur aide à l'apprentissage de la langue française et leur soutien constant.*

*Je remercie M. **Cyril KAHN**, Mme. **Elisabeth KAHN**, Mme. **Ghislaine CAUCHOIS** et Mme. **Monique GENTILS** pour la correction de ce manuscrit.*

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

Jing Wei, Yin Ping, Yun, Ke Li, Hua Hua, Céline, Cédric, Karine, Shalarw, Assia, Rania, Marine, Vanessa, Caroline, Halima, , Mariama, Nicolas, Bérengère, Aurélie.

*Enfin, je remercie également tous mes collègues et amis du laboratoire à Chengdu : Mme. **Lang LI**, Mme. **Xiao Jing LIU**, M. **Jiang WU**, M. **Xiao Heng LIU**, Mme. **Jing XIAO**, Mme. **Bin ZHU**...*

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	7
TABLE DES MATIERES	10
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	15
LISTES D'ABREVIATIONS.....	19
TABLES DES ILLUSTRATIONS	25
INTRODUCTION GENERALE	31
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	37
I.1. LES LIGAMENTS ET LES TENDONS.....	39
I.1.1. PHYSIOLOGIE DES LIGAMENTS ET DES TENDONS	39
<i>I.1.1. 1 Structure générale</i>	<i>39</i>
<i>I.1.1. 2 Les fibroblastes.....</i>	<i>42</i>
<i>I.1.1. 3 Caractéristiques de la matrice extracellulaire.....</i>	<i>42</i>
<i>I.1.2. 4 Propriétés mécaniques du ligament et du tendon.....</i>	<i>47</i>
I.1.2. FONCTION DES LIGAMENTS.....	47
I.1.3. PATHOLOGIES DES LIGAMENTS.....	49
I.1.4 STRATEGIES THERAPEUTIQUES ACTUELLES DES LESIONS LIGAMENTAIRES	50
I.2. DEVELOPPEMENT DE LA RECHERCHE EN INGENIERIE TISSULAIRE LIGAMENTAIRE	51
I.2.1. SOURCES CELLULAIRES POTENTIELLES EN INGENIERIE TISSULAIRE DU LIGAMENT	52
<i>I.2.1.1 Fibroblastes</i>	<i>52</i>
<i>I.2.1.2 Cellules Souches Embryonnaires</i>	<i>52</i>
<i>I.2.1.3 Cellules Souches Mésenchymateuses</i>	<i>53</i>
I.2.2. MATRICES DE SUPPORT	54
I.2.3. BIOREACTEURS	56
I.3. CELLULES SOUCHES.....	58

I.3.1. GENERALITES SUR LES CELLULES SOUCHES	58
<i>I.3.1. 1 Définition des cellules souches</i>	58
<i>I.3.1. 2 Cellules souches embryonnaires</i>	58
<i>I.3.1. 3 Cellules souches adultes et leur plasticité</i>	59
I.3.2. CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES MEDULLAIRES	60
<i>I.3.2. 1 L'histoire de la découverte des CSMM</i>	60
<i>I.3.2. 2 Caractère biologique des CSMM</i>	63
<i>I.3.2. 3 Utilisation des CSMM en ingénierie cellulaire et tissulaire</i>	68
I.4. LA REGULATION DES CSMM	69
I.4.1. ROLE DU MICROENVIRONNEMENT SUR LA REGULATION DES CSMM	69
<i>I.4.1. 1 Facteurs biochimiques</i>	69
<i>I.4.1. 2 Facteurs mécaniques</i>	69
I.4.2. MODIFICATION GENETIQUE (TRANSGENESE)	70
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	73
II.1. PRELEVEMENT ET CULTURE CELLULAIRE	75
II.1.1. LES MANIPULATIONS DE BASE EN CULTURE CELLULAIRE	75
<i>II.1.1. 1 Préparation du tampon HBSS</i>	75
<i>II.1.1. 2 Préparation du milieu de culture DMEM complet</i>	75
<i>II.1.1. 3 Préparation du milieu de culture DMEM/F12 complet</i>	75
<i>II.1.1. 4 Subculture cellulaire</i>	76
<i>II.1.1. 5 Congélation</i>	76
<i>II.1.1. 6 Décongélation</i>	77
II.1.2. CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES MEDULLAIRES	77
<i>II.1.2. 1 Prélèvement et mise en culture des CSMM de rat</i>	77
<i>II.1.2. 2 Mise en culture des CSMM humaines</i>	78
II.1.3. MISE EN CULTURE DES FIBROBLASTES LIGAMENTAIRES	78

II.2. MISE EN EVIDENCE DU PHENOTYPE DES CSMM	79
II.2.1. ETUDE DES CSMM EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	79
II.2.1. 1 Préparation des échantillons de microscopie électronique à balayage (MEB).....	79
II.2.1. 2 Préparation des échantillons de microscopie électronique en transmission (MET)	79
II.2.2. MARQUAGE DES CSMM PAR CYTOMETRIE EN FLUX	80
II.2.2. 1 Principe de la cytométrie en flux.....	80
II.2.2. 2 Marquage des CSMM du rat.....	81
II.2.2. 3 Marquage des CSMM humaines	82
II.2.3. DIFFERENCIATION DES CSMM	83
II.2.3. 1 Différenciation des CSMM en Ostéoblastes.....	83
II.2.3. 2 Différenciation des CSMM en Adipocytes.....	84
II.3. CO-CULTURE SANS CONTACT DES CSMM AVEC DES FIBROBLASTES LIGAMENTAIRES	84
II.3.1 PRINCIPE	84
II.3.2 MISE EN CO-CULTURE	85
II.4. ETUDE DE STIMULATIONS MECANQUES SUR LES CSMM.....	86
II.4.1. PREPARATION DES MEMBRANES DE SILICONE	86
II.4.2. ENSEMENCEMENT DE CSMM SUR LES MEMBRANES DE SILICONE	86
II.4.3. APPAREIL D'ETIREMENT	86
II.5. METHODOLOGIE ANALYTIQUE	89
II.5.1. DEFORMATION ET ORIENTATION CELLULAIRE	89
II.5.2. TRANSCRIPTION INVERSE ET REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR) QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	90
II.5.2. 1 Isolation des ARN.....	90
II.5.2. 2 Mesure de la concentration et de la pureté de l'ARN.....	91
II.5.2. 3 Préparation de l'ADNc (RT)	92
II.5.2. 4 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	92

<i>II.5.2. 5 Electrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose</i>	94
II.5.3. RADIOIMMUNOANALYSE (RIA)	95
<i>II.5.3. 1 Principe</i>	95
<i>II.5.3. 2 Préparation des échantillons</i>	96
II.5.4. IMMUNOCYTOCHIMIE (ICC)	97
<i>II.5.4. 1 Principe</i>	97
<i>II.5.4. 2 Préparation des échantillons</i>	98
II.5.5. MICROSCOPIE CONFOCALE A BALAYAGE LASER	99
II.6. ANALYSE STATISTIQUE	99
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	101
III.1. PHENOTYPE DES CSMM	103
III.1.1. ASPECTS MICROSCOPIQUES DES CSMM	103
<i>III.1.1. 1 Observation par microscope optique inversé</i>	103
<i>III.1.1. 2 Observation par microscope électronique à balayage (MEB)</i>	104
<i>III.1.1. 3 Observation par microscope électronique en transmission (MET)</i>	105
III.1.2. ETUDE DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS DES CSMM DE RAT	106
III.1.3. ETUDE DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS DES CSMM HUMAINES	108
III.1.4. DIFFERENCIATION DES CSMM EN OSTEOBLASTES	110
III.1.5. DIFFERENCIATION DES CSMM EN ADIPOCYTES	111
III.1.6. DISCUSSION	111
III.2. CARACTERISATION DES FIBROBLASTES LIGAMENTAIRES	114
III.2.1. ASPECT MICROSCOPIQUE DES FIBROBLASTES LIGAMENTAIRES	114
III.2.2. ETUDE DE PROTEINES DES FIBROBLASTES LIGAMENTAIRES	114
III.3. CO-CULTURE SANS CONTACT DES CSMM AVEC DES FIBROBLASTES LIGAMENTAIRES	115
III.3.1. EXPRESSION DES ARNm DE COLLAGENES DE TYPE I ET III ET DE TENASCINE-C DES CSMM DE P1 A P6 ANALYSEE PAR RT-PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	115

III.3.2. EXPRESSION DES ARNm DE COLLAGENES DE TYPE I ET III ET DE TENASCINE-C DES CSMM APRES CO-CULTURE ANALYSEE PAR RT-PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	116
III.3.3. QUANTITE DE PROTEINES DE COLLAGENE DE TYPE I ET DE TYPE III MESUREE PAR RADIOIMMUNOANALYSE.....	118
III.3.4. DISCUSSION.....	119
<i>III.3.4. 1 RT-PCR quantitative en temps réel.....</i>	<i>119</i>
<i>III.3.4. 2 L'effet de la co-culture sur les CSMM de rat.....</i>	<i>121</i>
III.4. STIMULATION MECANIQUE SUR DES CSMM DE RAT	123
III.4.1. DEFORMATION ET ORIENTATION DES CSMM APRES STIMULATION MECANIQUE.....	123
<i>III.4.1. 1 Déformation des CSMM après stimulation mécanique</i>	<i>124</i>
<i>III.4.1. 2 Orientation des CSMM après stimulation mécanique</i>	<i>126</i>
<i>III.4.1. 3 Discussion sur la déformation et l'orientation cellulaire.....</i>	<i>127</i>
III.4.2. EXPRESSION D'ARNm DES COLLAGENES DE TYPE I ET III ET DE TENASCINE-C ANALYSEE PAR RT-PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	128
III.4.3. QUANTITE DE COLLAGENES I ET III ANALYSEE PAR RADIOIMMUNOANALYSE	130
III.4.4. QUANTITE DE PROTEINES DE COLLAGENES I ET III ANALYSEE PAR IMMUNOCYTOCHIMIE	131
III.4.5. DISCUSSION.....	132
III.4.6. EXPRESSION DE LA F-ACTINE PAR LES CSMM APRES STRETCHING ANALYSEE PAR MICROSCOPIE CONFOCALE	134
<i>III.4.6. 1 Résultats.....</i>	<i>134</i>
<i>III.4.6. 2 Discussion.....</i>	<i>136</i>
CHAPITRE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES	139
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	145
ANNEXE.....	169

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications dans des journaux :

1. **Zhang Lei**, Tran Nguyen, Chen Huai-Qing, Kahn Cyril J.F., Marchal Sophie, Groubatch Frédérique, Wang Xiong. Co-culture with ligament fibroblasts and uniaxial stretching influence the expressions of type I & type III collagens and tenascin-C in rat bone mesenchymal stem cell. *Tissue and Cell Research*. (Sous presse)
2. **Zhang Lei**, Kahn Cyril J.F., Chen Huai-Qing, Tran Nguyen, Wang Xiong. The effect of uniaxial stretching on rat bone mesenchymal stem cell: orientation and expressions of collagen types I & III and tenascin-C. *Cell Biology International*. (Sous presse)
3. **Zhang Lei**, Tran Nguyen, Wang Xiong, Chen Huai-Qing. Cyclic stretching promotes the synthesis of collagen and affects F-actin distribution in rat mesenchymal stem cells. *Bio-medical Materials and Engineering*. (Accepté)
4. **Zhang Lei**, Chen Huai-Qing, Tran Nguyen, Wang Xiong. The effect of uniaxial stretching on expressions of collagens type I and type III in rat bone mesenchymal stem cells [Chinois]. *Space Medicine & medical Engineering*, 2007; 20(5):349-353
5. **Zhang Lei**, Chen Huai-Qing, Wang Xiong, Tran Nguyen. Expressions of type I and III collagens and tenascin-C in rat bone mesenchymal stem cells co-cultured with ligament fibroblasts [Chinois]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2007; 24(4): 846-851
6. **Zhang Lei**, Wang Xiong, Chen Huai-Qing. Experimental study of the differentiation of mesenchymal stem cells after indirect co-culture with ligament fibroblasts. *Journal of Biomedical Engineering*, 2005; 22(3-Suppl.): 143-144
7. **Zhang Lei**, Liu Xiao-Heng, Chen Huai-Qing, Wang Xiong. The research progress on ligament tissue engineering. [Review en chinois] *Journal of Biomedical Engineering*, 2004; 21(4): 674-676

Communications internationales :

1. **Zhang Lei**, Tran Nguyen, Wang Xiong, Huai-Qing Chen. Cyclic stretching promotes the synthesis of collagen and affects F-actin distribution in rat mesenchymal stem cells. 4^{ème} Séminaire en “Bioingénierie et Biothérapies”, Septembre, 2007, à Nancy, France.

2. **Zhang Lei**, Tran Nguyen, Wang Xiong, Chen Huai-Qing. Cyclic stretching and co-culture with fibroblasts promoting the differentiation of rat mesenchymal stem cells to ligament fibroblasts. 5th World Congress of Biomechanics, juillet, 2006, à Munich, Allemagne.

LISTES D'ABREVIATIONS

	Français	English
A		
Ac	Anticorps	Antibody
ADN	Acide désoxyribonucléique	Desoxyribonucleic acid
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire	Complementary desoxyribonucleic acid
ARN	Acide ribonucléique	Ribonucleic acid
B		
BCIP	Bromo chloro indolyl phosphaste	5-Bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt
bFGF	Facteur de croissance basique de fibroblastes	basic Fibroblast growth factor
BMP-2	Métalloprotéinase 2	Bone metalloproteinase 2
BSA	Sérum d'albumine bovin	Bovin serum albumin
C		
CD	Cluster de différenciation	Cluster of differentiation
CSA	Cellules souches adultes	Adult stem cells
CSE	Cellules souches embryonnaires	Embryonic stem cells
CSH	Cellules souches hématopoïétiques	Haematopoietic stem cells
CSMM	Cellules souches mésenchymateuses médullaires	Bone marrow mesenchymal stem cells
D		
3-D	Tridimensionnelle	Three-dimension
DAPI	4, 6-diamidino-2-phenylindole	4 ,6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	Diethyepyrocarbonate	Diethyepyrocarbonate
DMSO	Diméthyl sulfoxyde	Dimethylsulfoxide
E		
EDTA	Acide éthylène dinitrilotétra acétique	Ethylene dinitrilo tetra acetic acid
ELISA	Analyse d'immunosorbant liée avec enzyme	Enzyme linked immunosorbant assay
EC	Cellules endothéliales	Endothelial cells

Liste des abréviations

EGF	Facteur de croissance épiderme	Epidermal growth factor
F		
FACS	Fluorescence de cellules	Fluorescence activated cell sorting
FGF	Facteur de croissance fibroblaste	Fibroblast growth factor
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine	Fluorescence of isothiocyanate
G		
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFP	Protéine à fluorescence verte	Green fluorescent protein
H		
HBSS	Hank's tampon balancé salin	Hank's Balanced Salts Solution
I		
ICC	Immunocytochimie	Immunocytochemic
Ig	Immunoglobuline	Immunoglobulin
IGF	Facteur de croissance insulinique	Insulin like growth factor
IL	Interleukine	Interleukin
IMF	Intensité moyenne de fluorescence	Intensity of average fluorescence
L		
LAC	Ligament acromio-claviculaire	Acromioclavicular ligament
LCA	Ligament croisé antérieur	Anterior cruciate ligament
LCC	Ligament acromio-coracoïdien	Coracoacromial ligament
LCP	Ligament croisé postérieur	Posterior cruciate ligament
LG		Low glucose
LGHI	Ligament gléno-huméral inférieur	Inferior GlenoHumeral Ligament
LGHM	Ligament gléno-huméral moyen	Muperior GlenoHumeral Ligament
LGHS	Ligament gléno-huméral supérieur	Superior GlenoHumeral Ligament
LIF	Facteur d'inhibition de la leucémie	Leukaemia inhibitor factor
M		
MCL	Ligament collatéral médian	Medial collateral ligament
MEB	Microscopie électronique à balayage	Scanning electron microscope
MEC	Matrice extracellulaire	Extracellulaire matrix

MET	Microscopie électronique en transmission	Transmission electron microscope
MMP	Métalloprotéases de la matrice	Matrix metalloproteinase
MPC	Cellule progénitrice mésenchymateuse	Mesenchymal progenitor cell
N		
NBT	Nitro-Blue tétrazolium chlorique	Nitro-Blue tetrazolium chloride
NDGA	Acide nordihydroguaiaretique	Nordihydroguaiaretic acid
P		
PBS	Tampon phosphate salin	Phosphate buffer saline
PET	Téréphtalate de polyéthylène	Polyethylene terephthalate
PG	Protéoglycane	Proteoglycan
PLA	Acide polylactique	Poly lactide acid
PGA	Acide polyglycolique	Polyglycolic acid
PLGA	Acide Poly L-lactique-co-glycolidique	Poly L-lactique-co-glycolide acid
PLLA	Acide Poly L-lactique	Poly L-lactic acid
PMT	Photomultiplicateur	Photomultiplier
R		
RIA	Radioimmunoanalyse	Radioimmunoassay
ROCK	Rho-A kinase dépendante	Rho-A dependant kinase
RER	Réticulum endoplasmique rugueux	Granulate endoplasmic reticulum
RT-PCR	Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne	Reverse transcription and polymerase chain reaction
S		
SCF	Facteur de croissance de cellule souche	Stem cell growth factor
SIS	Sous-muqueuse d'intestin	Small intestinal submucosa
SMC	Myocyte de muscle lisse	Smooth muscle cell
SPARC	Protéine sécrétée, acide, et riche en cystéine	Secreted acid protein and rich in cystein
SVF	Sérum de veau fœtal	Foetal bovine serum
T		
TBE	Tampon de Tris/acide borique/EDTA	Tris/Boric acid/EDTA buffer
TGF-β	Facteur de croissance transformant-β	Transforming growth factor-β

Liste des abréviations

Tm	Température de fusion	Melting temperature
TNC	Ténascine-C	Tenascin-cytotactine
Tsp	Thrombospondine	Thrombospondine
U		
UV	Ultraviolet	Ultraviolet
V		
VEGF	Facteur de croissance d'endothélium vasculaire	Vascular endothelial growth factor

TABLES DES ILLUSTRATIONS

Liste des Figures

Chapitre I

Figure I-1 Schéma de la microstructure de ligament	39
Figure I-2 Coupe longitudinale de ligament et de tendon.....	40
Figure I-3 Synthèse des collagènes par les fibroblastes et organisation supramoléculaire des protéines matricielles dans le compartiment extracellulaire	44
Figure I-4 Structure de la ténascine-C.....	46
Figure I-5 Schéma de la fonction de la ténascine-C dans l'invasion de tumeurs.....	46
Figure I-6 Anatomie du genou	48
Figure I-7 Ligaments de l'épaule	49
Figure I-8 Différenciation des tissus humains à partir d'un blastocyte.....	59
Figure I-9 Différenciation multipotentielle de cellules de moelle osseuse	61
Figure I-10 Plasticité des cellules souches mésenchymateuses médullaires.....	62

Chapitre II

Figure II-1 Exemple de cytogramme en cytométrie en flux	81
Figure II-2 Principe de l'immunomarquage direct.....	81
Figure II-3 Dispositif de co-culture cellulaire sans contact (Transwell).....	85
Figure II-4 Schéma de l'appareil d'étirement	88
Figure II-5 Méthode de calcul de la déformation cellulaire.....	90
Figure II-6 Mesure de l'orientation cellulaire	90
Figure II-7 Schéma de radioimmunoanalyse	96
Figure II-8 Principe de l'immunocytochimie indirecte.....	98

Chapitre III

Figure III-1 Cellules souches mésenchymateuses médullaires du rat.....	104
--	-----

Figure III-2 Cellules souches mésenchymateuses médullaires humaines	104
Figure III-3 Images de MEB des CSMM humaines à passage 4.....	105
Figure III-4 Images de MET de CSMM humaines à passage 4.....	106
Figure III-5 Exemples graphiques de cytométrie en flux de CSMM du rat	107
Figure III-6 Expressions des marqueurs des CSMM du rat de passage 1 à passage 6 analysés par cytométrie en flux	108
Figure III-7 Exemples de graphiques de cytométrie en flux de CSMM humaines à passage 4 .	109
Figure III-8 Expressions des marqueurs par les CSMM humaines analysés par cytométrie en flux (P4, n=3)	109
Figure III-9 Images des pigmentations de von Kossa et d'alizarine après différenciation en ostéoblastes des CSMM humaines.....	110
Figure III-10 Images de pigmentation d'huile rouge O après différenciation en adipocytes des CSMM humaines	111
Figure III-11 Fibroblastes ligamentaires du rat.....	114
Figure III-12 Expressions d'ARNm de collagènes de type I et III et de ténascine-C par les CSMM de passage 1 à passage 6	116
Figure III-13 Expression des ARNm des collagènes I et III des CSMM du rat avec ou sans co-culture (n=7).....	117
Figure III-14 Synthèses de collagènes de type I et de type III des CSMM du rat co-cultivées ou non avec des fibroblastes ligamentaires.....	118
Figure III-15 Courbes standards de 4 gènes utilisées en RT-PCR en temps réel	120
Figure III-16 Courbes de fusion effectuées après PCR en temps réel	121
Figure III-17 Image de l'électrophorèse des productions de PCR en temps réel	121
Figure III-18 Images des CSMM avant et après étirement cyclique uniaxial	124
Figure III-19 Taux d'amincissement cellulaire avant et après étirement cyclique.....	125
Figure III-20 Orientation cellulaire après étirement pendant 3, 6, 12, 24 et 36h et leur contrôle	126
Figure III-21 Quantités d'ARN de collagènes de type I et III et de ténascine-C des CSMM du rat avec ou sans étirement uniaxial	129
Figure III-22 Synthèses de collagènes de type I et III des CSMM de rat avec ou sans étirement uniaxial.....	130
Figure III-23 Images de la pigmentation des collagènes de type I et III des CSMM du rat par ICC	131

Figure III-24 Images par microscopie confocale de F-actine dans les CSMM du rat avec ou sans étirement de 10%, à 1Hz	135
Figure III-25 Densité de fluorescence de F-actine chez les CSMM de rat avec ou sans étirement uniaxial cyclique	135

Annexe

Figure A-1 Schéma de principe de la microscopie à balayage	171
Figure A-2 Schéma de PCR classique.....	176
Figure A-3 Schéma de SYBR GREEN I.....	178
Figure A-4 Schéma de la réaction d'amplification par PCR quantitative en temps réel avec SYBR GREEN I.....	178
Figure A-5 Exemple de courbe sigmoïde et cycle seuil lors d'une PCR en temps réel.....	179
Figure A-6 Exemple de graphique de la gamme étalon et sa corrélation avec les cycles seuils (Ct)	180
Figure A-7 Exemple de courbe de fusion.....	181
Figure A-8 Schéma de principe du microscopie confocale.....	183

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I-1 Comparaison des caractéristiques des ligaments et des tendons	41
Tableau I-2 Certains systèmes de bioréacteurs disponibles dans le commerce	57
Tableau I-3 Marqueurs membranaires et cytoplasmiques de CSMM.....	63
Tableau I-4 Sécrétion des cytokines et facteurs de croissance de CSMM.....	64
Tableau I-5 Autres caractéristiques cyto-biologiques de CSMM	65
Tableau I-6 Caractéristiques des principaux marqueurs de surface permettant d'identifier les CSMM et les cellules hématopoïétiques	66

Chapitre II

Tableau II-1 Densités cellulaires ensemencées en co-culture et leurs contrôles (n=7)	85
Tableau II-2 Séquences d'amorces et conditions pour PCR en temps réel	94

Chapitre III

Tableau III-1 Marqueurs exprimés par les CSMM du rat de passage 1 à passage 6 analysés par cytométrie en flux (n=6)	108
Tableau III-2 Expression des collagènes et ténascine-C par fibroblastes ligamentaires (P4, n=3)	115
Tableau III-3 Expressions d'ARNm de collagènes de type I, de type III et de ténascine-C par CSMM de passage 1 à passage 6 (n=6)	116
Tableau III-4 Taux d'amincissement cellulaire avant et après étirement cyclique.....	125

INTRODUCTION GENERALE

Au sein du corps, les ligaments jouent un rôle important dans le mouvement et la stabilité des articulations. Les accidents et la fatigue chronique sont les principales raisons des ruptures de ligaments. Certains ligaments ont un bon potentiel de guérison, par exemple : les ligaments collatéraux médiaux (MCL) et les ligaments de la cheville. Toutefois, certains ligaments n'ont généralement pas de capacité de guérison par manque d'approvisionnement en sang, comme les ligaments croisés du genou et les ligaments de l'épaule. Ce qui conduit à de graves conséquences sur les propriétés du ligament, mais également sur l'articulation complète.

Il est estimé qu'environ 300 000 cas par an ont besoin d'une réparation chirurgicale aux Etats-Unis. Cependant, il n'y a qu'environ 100 000 reconstructions exécutées chaque année (Bach and Boonos, 2001). Le rétablissement peut prendre souvent plusieurs mois et la fonction n'est restaurée qu'à 60% au maximum (Pennisi, 2002). C'est sans compter les patients qui ont eu un dysfonctionnement sévère à cause du manque de traitement chirurgical. De nombreux sportifs de haut niveau ont été obligés de renoncer à leur carrière à cause d'une rupture ligamentaire.

Le développement de la chirurgie moderne permet de remplacer des ligaments endommagés en utilisant des substituts biologiques. Pour l'instant, quatre types de prothèses ont été évalués dans la reconstruction chirurgicale de ligament : xéno greffe, allo greffe, auto greffe et biomatériau. Néanmoins, la xéno greffe ayant une immunocompatibilité faible mène fréquemment à la dégradation de l'implant et à l'échec de la greffe (Olson et al., 1988). L'allo greffe peut être immunitairement rejetée à long terme. De plus, le manque de donneurs et les risques liés à la transmission de maladies limitent leur utilisation. L'auto greffe, souvent des tendons, qui est utilisée le plus souvent en clinique, lèse les zones de prélèvement et est souvent associée à des douleurs, des atrophies musculaires et des tendinites (Weitzel et al., 2002). Les substituts synthétiques (biomatériau) n'ont pas de bioactivité, il apparaît donc une inflammation sans infection après l'opération et une fatigue du matériau à long terme due à une dégradation (Ge et al., 2005).

Ces inconvénients nous entraînent à chercher de nouvelles méthodes thérapeutiques dès que possible. L'avènement de la bioingénierie cellulaire et tissulaire fournit une nouvelle possibilité de surmonter ces problèmes actuels, sans contre partie, en construisant des biotissus *in vitro* (Heineken FC, 1991).

La bioingénierie cellulaire et tissulaire est une discipline qui applique les théories et les techniques de la biologie, la biochimie, la science des matériaux, la biomécanique etc...afin de remplacer et/ou de reconstituer des tissus ou organes détruits ou endommagés.

La recherche sur l'ingénierie tissulaire du ligament a déjà commencé depuis une trentaine d'années. A ce stade, toutefois, personne ne peut prédire par quelle approche un ligament en bioingénierie pourra être reconstruit en possédant une qualité presque aussi bonne qu'un ligament natif. Il est certain que la réussite dans la construction d'un biotissu ligamentaire améliorera la vie des patients et diminuera le coût des traitements.

Du point de vue de la bionique, un ligament artificiel idéal doit non seulement être biocompatible et bioactif, posséder une microstructure tridimensionnelle semblable à celle d'un ligament natif et une bonne qualité mécanique, mais surtout avoir également la capacité d'auto-régénération.

Dans un ligament, les cellules forment un réseau comparable à une toile d'araignée entre elles et aussi avec les faisceaux de collagènes. Ce réseau formé par des ponts moléculaires et des liens croisés entre les faisceaux de collagènes renforce les faisceaux de collagènes et limite leur déformation quand le ligament est sous contrainte.

Les cellules sont donc très importantes dans la mise en oeuvre de la construction d'un biotissu ayant de bonnes propriétés tant mécaniques que biologiques et d'activation des gènes spécifiques pour construire un biotissu ligamentaire. Mais, comment choisir une source de cellules? Quel micro-environnement est le plus propice pour les cellulesensemencées? Ce sont encore des questions ouvertes.

La découverte de l'existence des cellules souches autologues à grande plasticité (capacité de donner naissance à une large contingence cellulaire) contenues dans la moelle osseuse a permis d'esquisser un nouveau cadre pour choisir une source de cellule pour l'ingénierie tissulaire de ligament.

Grâce à la connaissance approfondie et à la maîtrise de la culture cellulaire, il est alors possible de faire évoluer ces cellules souches vers un certain type cellulaire et d'accroître leur nombre en vue d'une application clinique. La construction de biotissus à partir de ces cellules constitue une étape indispensable.

L'objectif de notre étude est d'essayer de différencier des CSMM (cellules souches mésenchymateuses médullaires) en fibroblastes ligamentaires par co-culture avec des fibroblastes ligamentaires et par application d'étirements uniaxiaux. Enfin, les ARN et les protéines de collagènes I et III ainsi que la ténascine-C ont été analysées pour valider l'utilisation de ces cellules en ingénierie tissulaire de ligament comme source cellulaire.

Dans le cadre de ce mémoire de thèse :

Premièrement, nous avons effectué l'identification et la caractérisation phénotypique des CSMM humaines et du rat. Cette sélection cellulaire repose sur trois étapes. Les cellules cultivées ont été identifiées morphologiquement par MEB et MET, puis par des marqueurs phénotypiques (CD44, CD90, CD45 et CD34 pour les CSMM du rat et CD44, CD34, CD45, pour les CSMM humaines) à l'aide de la cytométrie en flux, ainsi que par la différenciation en ostéoblastes et en adipocytes.

Deuxièmement, nous avons analysé les changements de marqueurs phénotypiques en fonction du temps, ainsi que l'expression des ARNm de collagènes I et III et de ténascine-C par les CSMM de passage 1 à passage 6 à l'aide de RT-PCR quantitative en temps réel.

Troisièmement, nous avons co-cultivé les CSMM avec des fibroblastes ligamentaires sans contact pendant 3, 6 et 12 jours pour étudier les interactions cellule-cellule. Puis, les ARNm de collagènes I et III et de ténascine-C ont été détectés par RT-PCR quantitative en temps réel. De même, la quantité de protéines de collagènes I et III des CSMM a été détectée par radioimmunoanalyse.

Quatrièmement, nous avons appliqué un étirement cyclique de 10%, à 1Hz sur des CSMM. Après les étirements, la longueur, la largeur et l'orientation des cellules ont été mesurées. De même, les ARNm de collagènes I et III et de ténascine-C ont également été quantifiés par RT-PCR quantitative en temps réel, et les quantités des collagènes I et III des CSMM après étirement ont été mesurées par radioimmunoanalyse et immunocytochimie.

CHAPITRE I :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. LES LIGAMENTS ET LES TENDONS

I.1.1. Physiologie des ligaments et des tendons

I.1.1. 1 Structure générale

Les ligaments comme les tendons sont des tissus conjonctifs denses et très peu vascularisés. Ils sont composés de faisceaux de fibres de collagènes qui sont orientés parallèlement afin de maintenir la stabilité du système musculo-squelettique. Les fibres de collagènes prennent une forme tridimensionnelle qui leur permettent de supporter les contraintes mécaniques du ligament ou du tendon dont la figure I-1 présente l'ultrastructure hiérarchisée (Figure I-1).

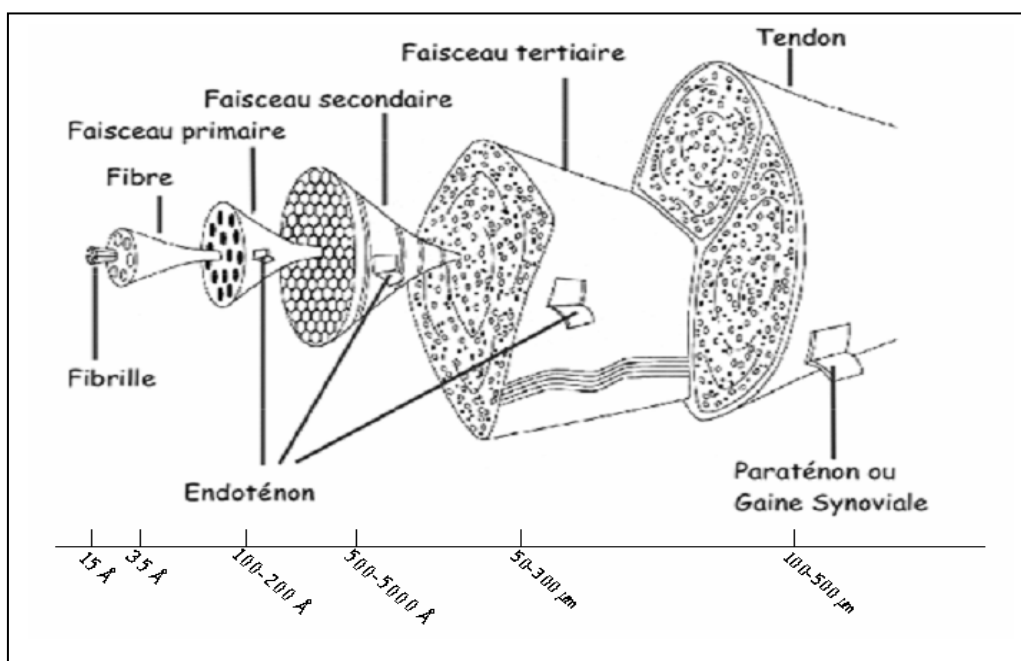


Figure I-1 Schéma de la microstructure de ligament

Les ligaments et les tendons sont composés de faisceaux de fibres de collagènes qui sont orientés parallèlement afin de maintenir la stabilité du système musculo-squelettique. Les fibres de collagènes prennent une forme tridimensionnelle. L'ultrastructure hiérarchisée est présentée ici. (J.Kastelic. *Connective Tissue Research*. 1978, Vol.6, 11-23.)

Les cellules majoritaires dans les ligaments et les tendons sont les fibroblastes qui évoluent sur les faisceaux de collagènes. Comme tous les tissus conjonctifs du corps, ils comprennent relativement moins de cellules (environ 20% du volume total) et une abondante matrice extracellulaire (environ 80% de ce même volume). Les fibroblastes ligamentaires s'alignent en rang entre les faisceaux de fibres de collagènes et s'allongent régulièrement dans la

direction longitudinale des ligaments et tendons (Amiel et al., 1984; Pennisi, 2002; Woo et al., 2006). La matrice extracellulaire des ligaments et des tendons contient environ 70% d'eau et 30% de constituants solides synthétisés et sécrétés par les fibroblastes : les collagènes, une petite quantité d'élastine (protéine élastique), des protéoglycanes et des glycoprotéines. Les ligaments contiennent surtout les collagènes de types I et III avec en plus une faible proportion d'autres collagènes comme les collagènes de types V, XI, XII et XIV. Les collagènes peuvent être sous forme de fibre ou non selon leur type. Le collagène de type I représente environ 90% des collagènes des ligaments, le collagène de type III constitue approximativement 9 à 12% selon la provenance (Amiel et al., 1984; Marumo et al., 2005; Silver et al., 2000; Vunjak-Novakovic et al., 2004). Les ligaments et les tendons sont de nature très similaire au niveau de leur composition en collagène. Pourtant, ils diffèrent quant à leur résistance relative car l'architecture de leurs collagènes est directement liée aux sollicitations mécaniques qu'ils subissent. Dans les ligaments qui subissent des déformations pouvant être multidirectionnelles (Figure I-2A), les fibres sont positionnées dans plusieurs directions : en parallèle, ex : ligament croisé (Nelissen and Hogendoorn, 2001), oblique, ex : les ligament obliques de la main (Bogumill, 2002) ou en spirale, ex : ligament cochléaire (Provenzano and Vanderby, 2006). Dans les tendons qui sont essentiellement soumis à des forces de traction, les fibres de collagènes sont disposées parallèlement et dans la continuité des fibres musculaires (Figure I-2B).

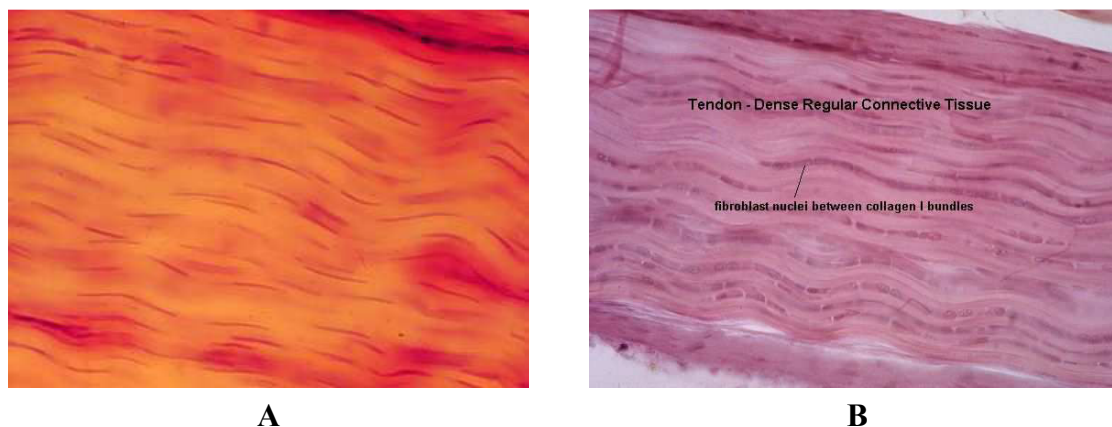


Figure I-2 Coupe longitudinale de ligament et de tendon

A : Ligament ; B : Tendon

Dans les ligaments qui subissent des déformations pouvant être multidirectionnelles, les fibres sont positionnées dans plusieurs directions. Dans les tendons qui sont essentiellement soumis à des forces de traction, les fibres de collagènes sont disposées parallèlement et dans la continuité des fibres musculaires. ([http:// sacs.ucsd.edu](http://sacs.ucsd.edu) 2005)

Les propriétés mécaniques des ligaments et des tendons 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 confère aux ligaments une élasticité légèrement supérieure à celle des tendons (Tableau I-1).

Tableau I-1 Comparaison des caractéristiques des ligaments et des tendons

	Ligament	Tendon
Liaison	• os-os	• os-muscle
Fonction	• stabilité mécanique des articulations • guide des mouvements articulaires • prévention des mouvements extrêmes	• transmission des forces de tension des muscles aux os • permettent une distance optimale entre le ventre musculaire et l'articulation
Structure	• structure hiérarchique • efforts multidirectionnels	• structure hiérarchique • efforts unidirectionnels
Fibre de collagènes	• 85% de la section ($\varnothing \leq 100\text{nm}$)	• 45% de la section ($\varnothing > 100\text{nm}$)
Composition		
Densité cellulaire	• ~20% en volume de ligament	• moins de cellule que le ligament
Types cellulaires	• cellules hétérogènes • noyaux plus gros	• fibroblastes fuselés • noyaux plus petits
Matrice Extracellulaire	• 70% d'eau • 30% de solide	• 60-80% d'eau • 30% de solide
Collagènes	• collagène de type I (70-80%) • collagène de type III (9%-12%)	• 95% de collagène de type I • 5% de collagène de type III
GAGs	• $9,89 \pm 0,56\text{mg/g}$ de tissu sec	• $2,75 \pm 0,20\text{ mg/g}$ de tissu sec
Autres protéines	• élastine <1% • protéoglycanes • glycoprotéines	• 2% d'élastine • 1-5% de protéoglycanes • glycoprotéines <1%
ADN	• contenu plus élevé	• contenu moins élevé
Autres Propriétés	• activité métabolique importante • réticulation réductible entre les fibres de collagènes • distribution bimodale des diamètres de fibres de collagènes • plus de collagène de type III pendant la cicatrisation	• activité métabolique faible • réticulation réductible entre les fibres de collagène • distribution bimodale des diamètres de fibres de collagènes • moins de collagène de type III que pour le ligament

(Amiel et al., 1984; Lin, Cardenas, and Soslowsky, 2004; Silver, Freeman, and Seehra, 2003; Vunjak-Novakovic et al., 2004; Woo et al., 2006)

I.1.1. 2 Les fibroblastes

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, nous pouvons déceler tous les organites cellulaires habituels, et surtout dans les fibroblastes en pleine activité, les organites impliqués dans la synthèse des protéines. Le phénotype des fibroblastes est modulable en fonction de leur degré d'activation (par exemple, transformation en myofibroblaste). Les fibroblastes synthétisent les macromolécules protéiques et polysaccharidiques de la matrice extracellulaire des ligaments et des tendons. Ils sont aussi capables de sécréter de nombreuses autres molécules (cytokines, facteurs de croissance, enzymes...) et jouent un rôle important dans les processus de réparation tissulaire, dans l'entretien des réactions inflammatoires et pour la qualité mécanique.

Dans une section longitudinale, les cellules s'allongent le long des faisceaux de collagènes, tout en interagissant avec eux, mais aussi entre elles, formant ainsi une sorte de toile d'araignée. Ce réseau est formé à l'aide de molécules qui lient les cellules entre elles et avec les faisceaux de collagènes. L'ensemble ainsi formé améliore les qualités mécaniques des ligaments et des tendons. Bien que les collagènes subissent la majeure partie des sollicitations mécaniques, une part non-négligeable est supportée par ce réseau cellulaire. De plus, les cellules soumises aux sollicitations mécaniques participent au changement des propriétés du ligament *via* l'activation de gènes spécifiques. Il est donc nécessaire de fournir de nouvelles cellules ou d'en recruter pour le bio-tissu de substitution afin qu'il acquière les mêmes propriétés fonctionnelles que le tissu originel (Pennisi, 2002).

I.1.1. 3 Caractéristiques de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est constituée de quatre grandes familles de composés, les collagènes, les protéoglycanes, les glycoprotéines et les protéines élastiques. Ces composés peuvent, pour la plupart, s'autoassembler mais également interagir entre eux, ou par l'intermédiaire de récepteurs, avec les cellules. C'est grâce à cette trame de connexions que se réalise la vie cellulaire (adhérence, morphogénèse, apoptose...) et que se forment les caractéristiques tissulaires (solidité, souplesse, transparence) (Fichard, Chanut-Delalande, and Ruggiero, 2003).

Les composants majeurs de la MEC du ligament sont l'eau (65-70% du poids du tissu hydraté), les constituants principaux solides sont le collagène I (70-80% du poids sec) et le collagène III (9%-12% du poids sec). Enfin, les autres collagènes comme ceux de type V, IX, X, XI, XII et XIV, ainsi que les protéoglycannes et le hyaluronate (environ 20% du poids hydraté) ont été détectés dans le ligament (Amiel et al., 1984; Vunjak-Novakovic et al., 2004; Woo et al., 2006).

1. Les collagènes

Les collagènes sont les constituants majeurs des structures de ligament qui servent au maintien du tissu, et qui fournissent la solidité et confèrent la forme tout en permettant la flexibilité et le mouvement. Ce principal élément structural des tissus supporte les efforts dans les tissus mous et fournit une plateforme pour la minéralisation dans les tissus durs qui sont soumis à la compression (Cowin, 2000).

L'ensemble des collagènes est une famille de protéines extracellulaires sécrétées par les fibroblastes et constitué de trois chaînes polypeptidiques comportant au moins un domaine replié en triple hélice de 96 000 daltons et d'environ 1 050 acides aminés dans les zones terminales (Kitamura et al., 1995). Actuellement, il existe 28 types de collagènes très proches les uns des autres qui sont décrits dans la littérature. Les types de collagène ont été numérotés en chiffres romains dans l'ordre de leur découverte, du collagène I jusqu'au collagène XXVIII (Liu et al., 1995; Oryan, 1995). Ces collagènes peuvent s'associer ou pas selon leurs propriétés structurales. Dans les ligaments et tendons, les collagènes de type I et de type III sont les composants prédominants alors que ceux de type V, IX, X, XI, XII et XIV y sont présents en petite quantité (Amiel et al., 1984; Vunjak-Novakovic et al., 2004; Woo et al., 2006; Woo et al., 1999). Certains types de collagènes forment le groupe des collagènes fibrillaires, ainsi désignés pour leur aptitude à s'assembler en agrégats spécifiques formant des fibres à striations périodiques. Ces agrégats aboutissent souvent à l'association de collagènes de type différents, qui peuvent être synthétisés par une même cellule et qui s'assemblent à l'extérieur de la cellule pour former des fibres mixtes, dites alors hétérotypiques (Figure I-3)(Fichard, Chanut-Delalande, and Ruggiero, 2003).

La biosynthèse d'une molécule de procollagène fibrillaire nécessite l'association de trois chaînes par le domaine carboxy-pro-peptidique puis leur enroulement en triple hélice (Figure I-3 étape 1). Le procollagène formé est alors sécrété dans le compartiment extracellulaire où il est converti en une molécule mature : le collagène (Figure I-3 étape 2). Cette étape de maturation est

indispensable pour permettre l'association en fibres : la fibrillogenèse (Figure I-3 étape 3). Les fibroblastes synthétisent aussi d'autres molécules matricielles, comme les protéoglycanes (PG), le SPARC (secreted protein acidic and rich in cystein), la thrombospondine (Tsp), qui, en se liant aux fibres de collagène, participent à la fibrillogenèse.

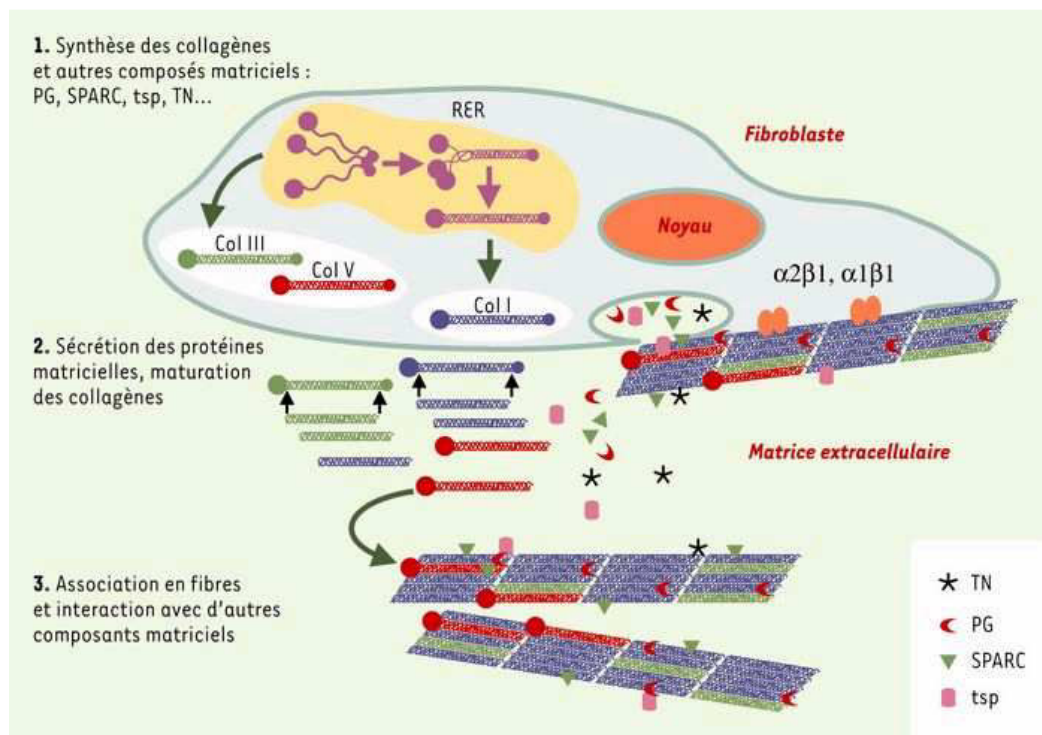


Figure I-3 Synthèse des collagènes par les fibroblastes et organisation supramoléculaire des protéines matricielles dans le compartiment extracellulaire

PG : protéoglycanes ; SPARC : secreted protein acidic and rich in cystein ; Tsp : thrombospondine ; RER : réticulum endoplasmique rugueux ; Col : collagène ; TN : ténascine (Fichard, Chanut-Delalande, and Ruggiero, 2003). La biosynthèse d'une molécule de procollagène fibrillaire nécessite l'association de trois chaînes par le domaine carboxy-pro-peptidique puis leur enroulement en triple hélice (étape 1). Le pro-collagène formé est alors sécrété dans le compartiment extracellulaire où il est converti en une molécule mature : le collagène (étape 2). Cette étape de maturation est indispensable pour permettre l'association en fibres : la fibrillogenèse (étape 3). Les fibroblastes synthétisent aussi d'autres molécules matricielles, comme les protéoglycanes (PG), le SPARC (secreted protein acidic and rich in cystein), la thrombospondine (Tsp), qui, en se liant aux fibres de collagène, participent à la fibrillogenèse.

2. Les ténascines

Les ténascines sont des glycoprotéines multifonctionnelles, qui font partie de la matrice extracellulaire. Elles sont délicatement régulées durant le développement embryonnaire et le modelage des tissus et des organes adultes. Divers types de cellules synthétisent la ténascine-C

dans des conditions différentes. Chez l'adulte, l'expression de la ténascine-C apparaît seulement lors de la constitution de quelques tissus conjonctifs, tels que les os, les tendons, les ligaments ou dans diverses conditions pathologiques comme les tumeurs. Pour l'instant, il est répertorié cinq types de ténascines, les ténascines de type C, R, X, Y et W (Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003; Chiquet-Ehrismann et al., 1991; Chuong and Chen, 1991; Goto and Brunette, 1998).

Il est établi que la ténascine-C est formée d'un hexamère lié par des ponts disulfides dont chaque sous-unité moléculaire a un poids de 210 à 400kDa. Ces sous-unités sont principalement composées d'un domaine N-terminal riche en cystéines permettant l'assemblage en hexamère, et également d'une série de 14,5 structures répétées de type EGF (epidermal growth factors), d'une série de 15 unités identiques ressemblant à la fibronectine III liée à l'extrémité C-terminal similaire aux chaînes β et γ du groupe fibrinogène (GF) (Figure I-4).

L'expression de la ténascine-C est sensible aux stimulations mécaniques (Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003; Fluck, Tunc-Civelek, and Chiquet, 2000; Jarvinen et al., 2003; Mehr et al., 2000; Sarasa-Renedo and Chiquet, 2005). C'est l'une des raisons pour laquelle l'expression de la ténascine-C est continue dans les ligaments, tendons et os. *In vitro*, les cellules peuvent exprimer la ténascine-C après exposition aux facteurs de croissance et aux hormones, comme : le TGF- β (transforming growth factor- β) (Linnala et al., 1995; Yang et al., 1995; Zhao and Young, 1995), le bFGF (basic fibroblast growth factor), l'EGF (epidermal growth factor) (Sakai et al., 1995a; Sakai et al., 1995b) et l'IL (Interleukin) (Makhluf et al., 1996; Pfander et al., 2004).

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la ténascine-C car elle est considérée comme un marqueur phénotypique spécifique des fibroblastes ligamentaires. La fonction précise de la protéine reste encore inconnue. Néanmoins, certaines études ont révélé que la ténascine-C joue le rôle de protéine anti-adhésive (Figure I-5)(Mackie, 1997; Orend et al., 2003). Elle interfère dans l'interaction entre les cellules et la fibronectine et avec d'autres substrats de la matrice extracellulaire en changeant la structure des points focaux d'adhésion du cytosquelette (Orend and Chiquet-Ehrismann, 2000). De plus, la ténascine-C stimule la sécrétion de la métalloprotéase de la matrice (Matrix metalloproteinase, MMPs), améliorant la capacité des cellules tumorales. Des rapports récents ont également suggéré que la ténascine-C est surexprimée pendant l'oncogenèse (Erickson, 1993), l'arthrite (Hasegawa et al., 2004), ainsi que les atteintes de la fibrose du foie (Richter, Franke, and Dargel, 1998) et du poumon (Cho et al., 2004).

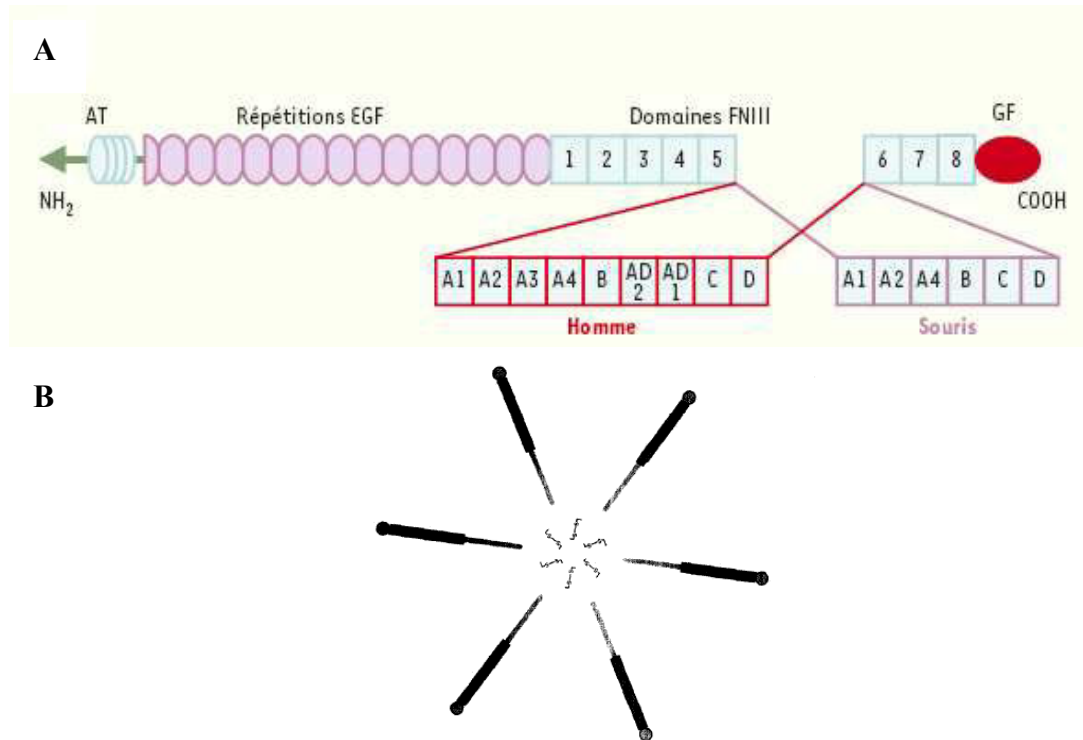


Figure I-4 Structure de la ténascine-C

A : Représentation schématique d'une sous-unité de ténascine-C ; B : Structure hexamérique. La ténascine-C est formée d'un hexamère lié par des ponts disulfides dont chaque sous-unité moléculaire a un poids de 210 à 400kDa.

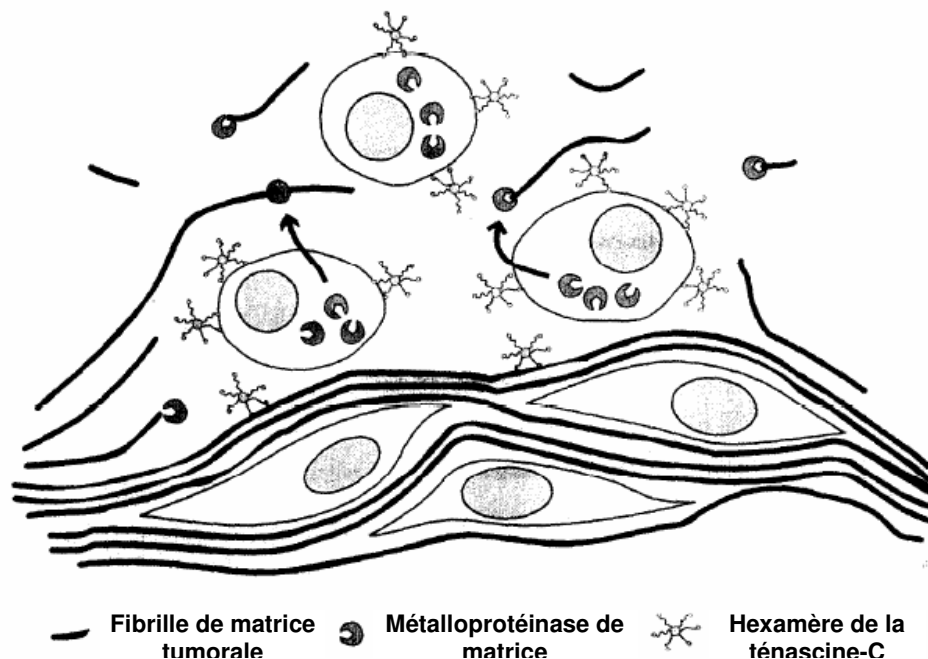


Figure I-5 Schéma de la fonction de la ténascine-C dans l'invasion de tumeurs

Les cellules tumorales sont restreintes par l'adhérence à la fibrille de matrice en l'absence de ténascine-C. Quand les cellules tumorales se lient avec la ténascine-C, elles n'adhèrent plus aux fibrilles du pourtour. Elles peuvent donc envahir les tissus environnants (Mackie, 1997).

I.1.2. 4 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 déformation n'excède pas 4%. Il a été estimé que le ligament subit normalement environ 169N de charge pendant la marche normale et une charge trois fois plus élevée allant de 400N à 500N pendant l'activité athlétique (Bessette and Hunter, 1990). Le LCA est le ligament qui supporte le plus de contraintes mécaniques. Il subit une déformation de 5% à 30° de flexion du genou, 12% à 90° et 16% en flexion totale. Il subit une contrainte cyclique d'environ 300N, allant de 67N en montant un escalier à 630N en course (Duthon et al., 2006; Hollis et al., 1991; Vunjak-Novakovic et al., 2004).

Les expériences sur des animaux prouvent que la résistance à la traction, l'élasticité et le poids total du tendon peuvent augmenter après des séances progressives d'exercices physiques. Certaines études ont montré que les forces mécaniques sont des régulateurs essentiels pour l'homéostasie du ligament et indispensables pour la fonction normale (Carmeliet, Vico, and Bouillon, 2001). Les propriétés mécaniques jouent un rôle important pendant la cicatrisation de ligaments et dans le processus de remodelage des greffes de ligaments (Mackie, 1994). L'influence des stimulations mécaniques sur les greffes pendant le remodelage d'autogreffes dans la reconstruction de ligaments a été examinée en utilisant un modèle congelé *in situ* (Kim et al., 2002; Tohyama and Yasuda, 1998). 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.

I.1.2. Fonction des ligaments

Les ligaments lient 206 os du squelette chez l'Homme, tous différents en forme et en taille, ils assurent trois fonctions essentielles : soutien, mouvement et protection. Les os du squelette sont répartis symétriquement autour d'un axe constitué par la colonne vertébrale. Celle-ci est à la fois stable et mobile grâce au soutien des ligaments. Les ligaments entre les os forment et renforcent des articulations en jouant le rôle de brides qui arriment les mouvements d'articulations. Nous distinguons plusieurs genres d'articulations, par exemple les articulations à charnière comme le coude et les articulations sphériques comme l'épaule ou la hanche. De plus, les ligaments jouent surtout un rôle de protection. Certains ligaments limitent la mobilité des

articulations, ou empêchent certains mouvements. En cas d'accident, lorsqu'une force majeure agit subitement et de manière inattendue sur l'articulation sans que la musculature parvienne à l'absorber, ce sont les ligaments qui limitent les mouvements afin de conserver une structure anatomique.

Parmi les ligaments, ceux du genou subissent plus de force et donc s'abîment plus fréquemment chez l'Homme. Au niveau du genou, il y a plusieurs ligaments, et chacun a une action bien spécifique, dont le LCA qui a une fonction majeure. Non seulement, il stabilise l'articulation, mais il s'oppose aussi à la translation antérieure du tibia par rapport au fémur. En ce qui concerne les rotations, le LCA s'oppose à la rotation interne du tibia par rapport au fémur, du fait de son orientation et de son enroulement autour du ligament croisé postérieur (Figure I-6).

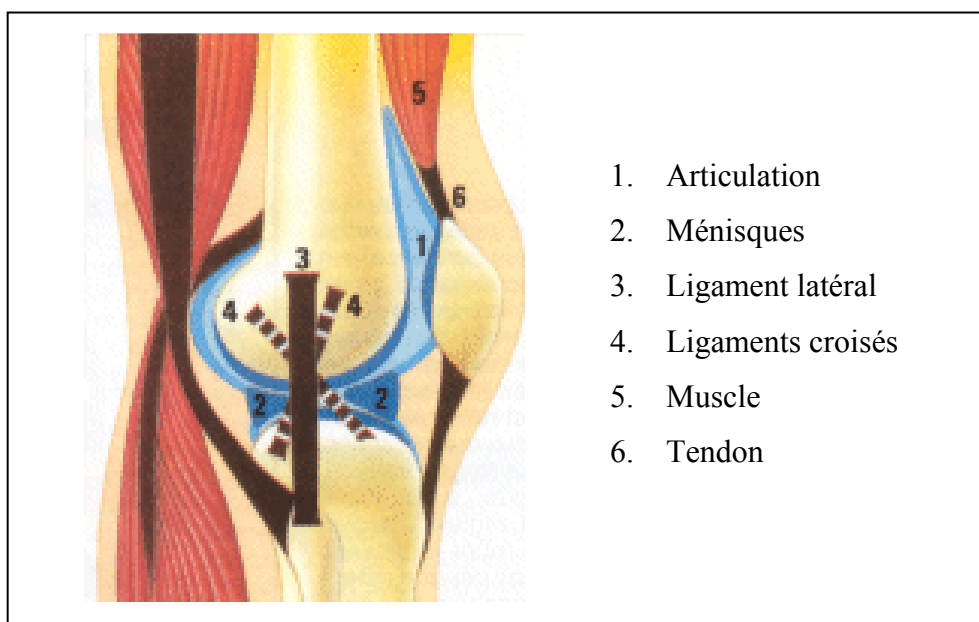
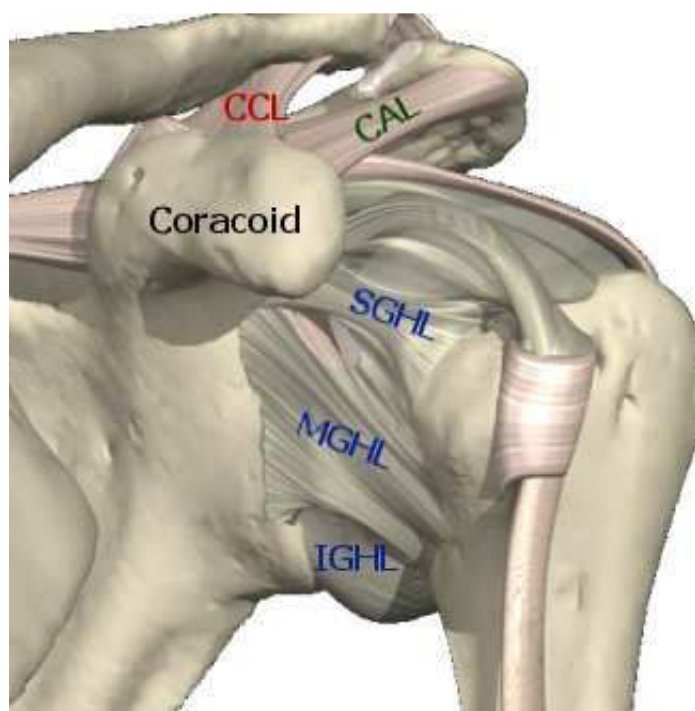


Figure I-6 Anatomie du genou

(<http://shiatsu.shiseikan.free.fr> 2007)

Au niveau du genou, il y a quatre ligaments : le ligament croisé antérieur, le ligament croisé postérieur, les ligaments latéraux, un de chaque côté.



copyright Primal Pictures Ltd

Figure I-7 Ligaments de l'épaule

(<http://www.shoulderdoc.co.uk>, 2007)

CCL : Ligament acromio-coracoïdien (Coracoacromial ligaments); CAL : Ligament acromio-claviculaire (Acromioclavicular ligaments); SGHL : Ligament gléno-huméral supérieur (Superior GlenoHumeral Ligament); MGHL : Ligament gléno-huméral moyen (Muperior GlenoHumeral Ligament); IGHL : Ligament gléno-huméral inférieur (Inferior GlenoHumeral Ligament).

Au niveau de la stabilité fonctionnelle du ligament, l'organisation hélicoïdale des fibres de collagène est essentielle. Pendant la flexion du genou ($\sim 140^\circ$ en flexion-extension), 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 la 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 et al., 2004).

1.1.3. Pathologies des ligaments

Les atteintes les plus courantes des ligaments sont des elongations et des déchirures pouvant aller jusqu'à la rupture. En cas d'accident, lorsqu'une force majeure agit subitement et de manière inattendue sur l'articulation sans que la musculature parvienne à l'absorber, il peut se produire une entorse douloureuse (tension excessive des ligaments), voire une déchirure des

ligaments. Il est à remarquer que la rupture du LCA n'est pas, la plupart du temps, la conséquence des mouvements du genou dans l'axe flexion-extension. En revanche, le genou n'est pas protégé dans les mouvements de rotation et de torsion.

D'autre part, c'est avec l'âge qu'apparaissent fréquemment de douloureux symptômes d'usure (arthrose) et d'inflammation (arthrite) dans les articulations. Les tissus articulaires et péri-articulaires dégénèrent, se durcissent et finalement raidissent définitivement. Le traitement médical vise alors uniquement à atténuer les douleurs, à enrayer l'inflammation et à conserver la mobilité.

Certains ligaments, comme les ligaments croisés et les ligaments autour de l'épaule, ne peuvent pas récupérer spontanément et une reconstruction chirurgicale est souvent exigée. La blessure du ligament croisé médial (MCL) du genou a souvent été utilisée comme un excellent modèle expérimental pour les études de la procédure pathologique de la récupération du ligament car le MCL peut guérir spontanément (Weiss et al., 1991). Le procédé de guérison suite à une déchirure du MCL peut être divisé en trois phases se succédant : la phase d'inflammation, la phase de réparation et la phase de remodelage (Woo et al., 2006). La phase d'inflammation qui commence tout de suite après la blessure et qui dure quelques semaines est marquée par la formation d'un hématome. Elle est suivie par la phase de réparation où les fibroblastes prolifèrent et produisent une matrice de protéoglycanes et de collagènes, en particulier les collagènes I et III. Cette matrice relie ainsi les deux bouts déchirés. Pendant les 6 semaines suivantes, la matrice de collagènes s'organise de mieux en mieux et la prolifération cellulaire commence. Puis, c'est la phase de remodelage qui est marquée par l'alignement de fibres de collagènes et la maturation de la matrice extracellulaire. Cette phase peut durer des années selon les différents ligaments (Frank, Schachar, and Dittrich, 1983).

1.1.4 Stratégies thérapeutiques actuelles des lésions ligamentaires

La lésion ligamentaire nécessite souvent une greffe chirurgicale en raison de la faible potentialité de guérison par manque d'irrigation sanguine et par une instabilité fonctionnelle subséquente. De plus, elle est souvent liée à une atteinte méniscale et à une ostéoarthrite. Il est donc généralement nécessaire de reconstituer une nouvelle structure pour les ligaments lésés. Pour ce faire, le traitement actuel le plus populaire est la reconstruction chirurgicale. Il est estimé qu'environ 300 000 cas par an ont besoin d'une réparation chirurgicale aux Etats-Unis. Le

rétablissement peut prendre plusieurs mois et la fonction n'est restaurée que d'environ 60% au maximum (Pennisi, 2002).

Quatre greffes ont été étudiées pour la réparation ou le remplacement de ligaments endommagés : xélogreffe, allogreffe, autogreffe et prothèse. La xélogreffe ayant une immunocompatibilité faible mène fréquemment à la dégradation de l'implant et à l'échec de la greffe (Olson et al., 1988). L'allogreffe convient au niveau morphologique, elle réussit dans un premier temps, mais à long terme, elle peut être immunitairement rejetée. De plus, le manque de donneurs et les risques liés à la transmission de maladies limitent leur utilisation. L'autogreffe, souvent des tendons, a les meilleurs résultats à long terme et est utilisée le plus souvent en clinique. Mais, les zones de prélèvement se trouvent ainsi lésées : elles sont souvent associées à des douleurs, des atrophies musculaires et des tendinites. En outre, la période de réhabilitation est prolongée (Weitzel et al., 2002). Les prothèses n'ont pas de bioactivité, il apparaît donc une inflammation sans infection après l'opération et une fatigue du matériau à long terme due à une dégradation de ce dernier (Ge et al., 2005).

Ces inconvénients nous entraînent à chercher de nouvelles méthodes thérapeutiques. L'avènement de la Bioingénierie Cellulaire et Tissulaire fournit une nouvelle possibilité thérapeutique en construisant des ligaments artificiels bioactifs *in vitro* (Heineken FC, 1991).

I.2. DEVELOPPEMENT DE LA RECHERCHE EN INGENIERIE TISSULAIRE LIGAMENTAIRE

La recherche sur l'ingénierie tissulaire du ligament a déjà commencé depuis une trentaine d'années. Ces derniers temps, la plupart des chercheurs considèrent qu'un ligament artificiel idéal doit être biocompatible et bioactif pour qu'il y ait moins de risque d'être rejeté par le receveur. Il doit contenir ou pouvoir recruter des cellules qui sont importantes pour conserver les propriétés d'un ligament et assurer la réparation des petites déchirures. Nous avons essayé d'imiter la structure tridimensionnelle du ligament afin de construire un ligament artificiel qui possède une microstructure semblable à celle d'un ligament natif, une bonne qualité mécanique et qui soit biodégradable. Et surtout, il doit avoir la capacité d'auto régénération (Pennisi, 2002).

La régénération ou la reconstitution d'un ligament *in vitro* dépend alors de trois conditions importantes : la source de cellules, la matrice de support et le bioréacteur.

1.2.1. Sources cellulaires potentielles en ingénierie tissulaire du ligament

La source idéale doit fournir des cellules compatibles avec les matériaux, capables de proliférer, de sécréter des matrices extracellulaires de bonne composition et d'induire une réponse immunologique. Plusieurs types de cellules comme : les fibroblastes, les cellules souches mésenchymateuses médullaires (CSMM), les cellules souches embryonnaires (ESC) et les cellules souches de tissu-dérivées possèdent ces qualités (Ge et al., 2005). Cependant, il n'y a pas de comparaison précise entre ces différentes cellules sur leurs caractères et leurs potentiels de substitution. Pourtant, une étude comparant les caractères biologiques, le pouvoir de régénération ainsi que la potentialité d'utilisation en ingénierie tissulaire s'avère nécessaire. Un choix de cellules appropriées pourrait améliorer grandement le caractère fonctionnel et la structure du tissu.

1.2.1.1 Fibroblastes

Il existe toute une famille de fibroblastes dans des tissus comme les ligaments, les tendons, la peau etc... Bien qu'ils soient tous des fibroblastes, leurs caractères varient selon le tissu dans lequel ils sont. Ainsi, par exemple, les fibroblastes de peau et ceux de ligament ne possèdent pas exactement les mêmes caractères. Les fibroblastes de la peau sécrètent moins de collagène de type III (Chen et al., 2004) qui est très important pour le maintien de la fonction du ligament (Vunjak-Novakovic et al., 2004).

Bien que les fibroblastes ligamentaires soient des cellules originelles du ligament, ce sont des cellules différenciées qui prolifèrent plus lentement que les cellules souches (Ge et al., 2005). De plus, leur utilisation est presque impossible : il est, effectivement, difficile de prélever des fibroblastes sur des ligaments blessés, du fait de leur faible quantité et d'une souffrance supplémentaire pour le patient. D'autre part, l'usage de fibroblastes ligamentaires allologues augmente le risque de rejet immunitaire. Ils ne sont donc pas une source idéale de cellules pour l'ingénierie tissulaire du ligament.

1.2.1.2 Cellules Souches Embryonnaires

La potentialité des cellules souches attire donc l'intérêt des chercheurs. Actuellement, les cellules souches que nous connaissons sont : les cellules souches embryonnaires (CSE) et les cellules souches adultes (CSA). Au niveau de la capacité à se différencier, les CSE ont témoigné d'un pouvoir de différenciation totipotent, mais leur usage est actuellement entravé par la

difficulté technique en différenciation induite, l'incertitude de résultat à long terme et les problèmes éthiques. De plus, le risque de rejet immunitaire et l'apparition de tumeur potentielle n'ont toujours pas été résolus. Ceci limite grandement l'usage des CSE pour des greffes (Donovan and Gearhart, 2001; McLaren, 2001).

I.2.1.3 Cellules Souches Mésenchymateuses

Comparées aux CSE, les CSA sont relativement matures et sont plus abondantes, tout en gardant un caractère de différenciation. Un tissu artificiel utilisant des CSA permettrait une thérapie personnalisée et éviterait le rejet immunitaire de greffe. Un tel tissu est alors très intéressant pour une application clinique.

Parmi les CSA, les CSMM qui prolifèrent vite et se différencient en de multiples cellules sont représentatives des CSA et sont les plus prometteuses pour une application clinique en ingénierie tissulaire (Altman et al., 2002b; Barry and Murphy, 2004; Bianco and Gehron Robey, 2000; Locklin et al., 1995; Rogers et al., 1995). Les CSMM peuvent donner naissance aux différents types de cellules matures selon différents processus comparables à la hiérarchie hématopoïétique. Elles peuvent proliférer énormément avant la différenciation cellulaire en une série de tissu mésenchymateux tels que : l'os, le cartilage, le muscle, le tendon et les tissus adipeux. Il est également suggéré qu'elles ont une grande plasticité à se différencier en cellules de certains tissus non-mésenchymateux comme : le foie, le coeur, la peau et les nerfs (Caplan and Bruder, 2001; Prockop, 1997). Elles sécrètent des collagènes, des glycoprotéines, des cytokines et des enzymes. De plus, les CSMM sont présentes en grande quantité dans la moelle osseuse dont le prélèvement n'engendre pas de blessure irréversible. Enfin, le fait d'utiliser des CSMM autologues permet d'éviter un rejet immunitaire. Les recherches ont montré que les CSMM possèdent de meilleurs qualités que les fibroblastes pour construire un biotissu ligamentaire (Butler and Awad, 1999; Donahue et al., 2001; Ge et al., 2005). Les CSMM émigrent dans les ligaments rompus pendant leur cicatrisation (Dye, 1996; Murray and Spector, 2001). Watanabe, et al. (Watanabe et al., 2002) ont injecté des CSMM transgénétiques de protéine à fluorescence verte (Green Fluorescent Protein, GFP) dans des MCL endommagés chez le rat. Après 28 jours, les CSMM injectées ont été détectées, encore vivantes, dans les MCL. D'autre part, la morphologie et le caractère de toutes les CSMM ressemblaient à ceux des fibroblastes ligamentaires. Une autre étude faite par Young et al. (Young et al., 1998) va dans le même sens : ils ont remplacé des tendons d'Achille de lapin par un composite en fils de suture et collagèneensemencé de CSMM autologues. Après 4, 8 et 12 semaines, le collagèneensemencé

de CSMM a subi un réarrangement plus ordonné que les témoins négatifs. Les nouveaux tissus générés étaient significativement plus gros que leurs contrôles (Young et al., 1998). Le travail d'Awad et al. a montré qu'il y a une amélioration des qualités mécaniques comme : le module d'élasticité à la rupture et la densité d'énergie élastique dans les nouveaux tissus (Awad et al., 1999).

En conclusion, les CSMM représentent une plate-forme originale et un potentiel pour la thérapie cellulaire et la bioingénierie ligamentaire. Cependant, la technique de différenciation *in vitro* a encore besoin d'être améliorée (Koc and Lazarus, 2001; Turgeman et al., 2001).

1.2.2. Matrices de support

Une matrice de support en bioingénierie ligamentaire doit être biocompatible avec les receveurs, tout en tenant compte de l'adhérence et de la prolifération cellulaire (Frank and Jackson, 1997). Dans le cas de ligaments soumis à des contraintes mécaniques, les propriétés mécaniques des matrices sont importantes et il faut donc prendre en considération cet aspect dès la conception de la matrice par le choix des matériaux et la forme de la structure. De plus, un matériau idéal doit avoir la capacité de biodégradation. Après le temps nécessaire où les cellules peuvent s'attacher et proliférer, le matériau doit idéalement se dégrader à la même vitesse que la reconstruction du nouveau tissu. Un tel matériau pour l'ingénierie tissulaire de ligament doit non seulement avoir des qualités de biocompatibilité, mais aussi de porosité et de biodégradation, ainsi que les propriétés mécaniques et physiques de ligaments natifs. Les bioprothèses synthétiques de ligaments sont encore loin d'être parfaites.

Dès 1910, Lange et al. ont utilisé des sutures chirurgicales en soie traitées avec de la paraffine pour remplacer les tendons, plusieurs substituts ont été appliqués comme des matériaux non biologiques (Allison, 1913). Deux genres de prothèses ont été étudiées : naturelles et synthétiques.

Les prothèses naturelles ont été testées dans la recherche de prothèse ligamentaire, tels que : le collagène, les polysaccharides, la cellulose etc... La possibilité d'utilisation des matrices extracellulaires naturelles a été explorée. L'utilisation de collagène comme prothèse de ligament et tendon dure déjà depuis des décennies (Dunn et al., 1992; Dunn, 1996; Noth et al., 2005). Le collagène est le support naturel des fibroblastes ligamentaires sur lequel ils s'attachent et migrent. Le collagène régule la différenciation et la morphologie cellulaire par des régulations chimiques et mécaniques. Bhatnagar et al. ont extrait le peptide P-15 du collagène naturel qui a une bonne

affinité avec les fibroblastes. Ils se sont ainsi servis de ce peptide comme coating afin d'améliorer l'adhésion cellulaire de leur matrice de support. Ce coating fournit un environnement proche du physiologique favorisant la prolifération et la sécrétion des fibroblastes (Bhatnagar et al., 1999). Koob *et al.* (Koob et al., 2001) ont extrait d'un buisson, la créosote, l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) et l'ont combiné avec du collagène. La combinaison de collagène-NDGA est compatible avec les tissus de lapin et ne déclenche pas de réaction immunitaire. Ce matériau naturel pourrait être plus avantageux qu'un synthétique. Dejardin et al. (Dejardin et al., 2001) ont appliqué, à des tendons et ligaments de chiens, la sous-muqueuse d'intestin (Small Intestinal Submucosa, SIS) du porc. Ce substitut a été bien accepté par le receveur pendant 6 mois après l'opération. Noth et al. (Noth et al., 2005) ont construit *in vitro* un substitut ressemblant histologiquement à un ligament. En dépit d'une biocompatibilité excellente de la matrice collagénique, les propriétés mécaniques de cette matrice restent insuffisantes pour une application clinique (Altman et al., 2003). La soie du ver à soie a été utilisée comme matériel de suture biomédical pendant des siècles, mais pendant ces 20 dernières années, sa biocompatibilité a été remise en cause. En revanche, les propriétés mécaniques spéciales de ces fibres fournissent un potentiel d'applications dans les réparations cliniques importantes. Altman et al. (Altman et al., 2002a) ont réussi à construire une matrice ligamentaire en soie qui possède des propriétés mécaniques souhaitant, également une structure ressemblant quasiment à un LCA natif, ainsi qu'une biodégradation convenable. Ils ont aussi résolu le problème de biocompatibilité en éliminant la sérécine avec une protéinase et en modifiant la soie avec des facteurs de croissance et des facteurs d'attachement. D'autres soies sont également à l'étude comme celle de l'araignée.

Bien que les matériaux naturels puissent avoir une structure ressemblant à celle de la matrice extracellulaire et une bonne biocompatibilité, la dispersion en terme de qualité et la difficulté de mise en forme représentent un frein à leur utilisation. Afin de surmonter les désavantages des matériaux naturels, des chercheurs ont dirigé leur attention vers les polymères biorésorbables. Ces polymères peuvent être synthétisés en laboratoire et leurs propriétés mécaniques contrôlées. L'utilisation de prothèses synthétiques biorésorbables a été étudiée dès les années 1980, à partir des polymères suivants : l'acide polylactique (polylactide acid, PLA), l'acide glycolique (polyglycolic acid, PGA), le copolymère de PLA et de PGA (Poly L-lactique-co-glycolide acid, PLGA), le polytétrafluoréthylène, le polyester (Lopez-Vazquez et al., 1991), la fibre de carbone (Parsons et al., 1985; Weiss et al., 1985) et le polypropylène.

Les avantages des polymères biorésorbables sont une bonne résistance mécanique, un

module élastique adéquat et une dégradation qui se fait par hydrolyse, elle même pouvant être augmentée par une activité enzymatique *in vivo*. Cependant, après la dégradation, de petites particules sont phagocytées et éliminées à travers le métabolisme sous forme d'eau et de CO₂ sans accumulation de tissus toxiques. De plus, il existe de multiples techniques de mise en forme facilitant la construction de matrices à l'aide de ces matériaux. Les risques de rupture et de détérioration restent malgré tout importants. Les polymères synthétiques, en se dégradant, libèrent des molécules acides qui diminuent leur biocompatibilité et accélèrent la dégradation des propriétés mécaniques (Lera et al., 2005; Yang et al., 2001).

L'idée d'utiliser des matériaux composés de molécules naturelles avec les polymères synthétiques semble attrayante, puisque le même mécanisme de résorption est utilisé pour dégrader ces matériaux sans risque d'accumulation de toxines dans les organes. Alexander et al. ont étudié une prothèse composée de fibres de carbone et de PLA pour la réparation et le remplacement de ligaments (Alexander, Weiss, and Parsons, 1986). Yang et al. ont testé plusieurs composites tels que : du PGA et des cheveux d'Homme, du collagène et du PGA, du PGA, du collagène et des cheveux etc... Ils ont amélioré la biocompatibilité et les propriétés mécaniques du matériau (Yang, Xie, and Li, 2000).

La nouvelle génération de matériaux bioactifs et biorésorbables avec des propriétés multifonctionnelles est en développement (Richardson et al., 2001). Ils sont bioactifs grâce à des agents biochimiques tels que : des facteurs de croissance, des antibiotiques, des molécules chimiothérapeutiques, des hormones etc... (Lee et al., 2000).

1.2.3. Bioréacteurs

Un bioréacteur peut être défini comme un système spécifique pour cultiver des cellules ou des tissus. Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, les bioréacteurs sont employés pour accroître les cellules et cultiver des tissus fonctionnels destinés à la transplantation.

Dans le corps humain, les cellules sont toujours stimulées par des signaux mécaniques, électriques et/ou chimiques qui influencent leur comportement. Les tissus biologiques adaptent leur structure et leur composition aux demandes spécifiques de la physiologie environnante (Portner et al., 2005). Si ces signaux sont insatisfaisants ou inexistantes, le développement du tissu devient désorganisé (Wendt, Jakob, and Martin, 2005).

Donc, pour un usage en ingénierie cellulaire et tissulaire, un bioréacteur doit recréer un environnement biologiquement actif, qui fournit non seulement des substances biochimiques, des facteurs de croissance, des hormones et/ou des nutriments spécifiques, mais permet aussi les stimuli chimiques et physiques afin de maintenir et favoriser la régénération tissulaire.

Des études récentes renforcent l'idée que les sollicitations mécaniques fournies par les bioréacteurs sont essentielles pour satisfaire l'environnement complexe en ingénierie tissulaire *in vitro*. Divers bioréacteurs commerciaux sont disponibles (Tableau I-2). Toutefois, l'applicabilité de ces systèmes en ingénierie du ligament est limitée en raison du manque de spécificité nécessaire pour imiter les conditions adéquates *in vivo*.

A notre connaissance, peu d'équipes travaillent actuellement sur la construction d'un bioréacteur pour l'ingénierie tissulaire de ligament : Altman et al. (Altman et al., 2002c), The et al. (The et al., 2006) ainsi que notre équipe (Kahn et al., 2007). Cette génération de bioréacteurs permet d'appliquer simultanément des cycles de traction-torsion qui sont plus proches des sollicitations physiologiques du LCA.

Tableau I-2 Certains systèmes de bioréacteurs disponibles dans le commerce

Fabricant	Produit	Caractères	Limitations
Synthecon	Rotary Culture Max	Perfusion Chambre de rotation	Besoin d'incubateur Une seule chambre
Synthecon	RCCS	Chambre de rotation	Besoin d'incubateur Une seule chambre
Synthecon	RCCS-4	Quatre chambres de culture rotatifs	Besoin d'incubateur Une seule chambre
FlexCell International	FX-4000T	Tension, 24 puits de culture Contrôlé par vide	Besoin d'incubateur Nombre limité de tissus, géométries et tailles limitées pour la culture
	FX-4000C	Compression 24 puits de culture Contrôlé par une pompe	
FlexCell International	FlexFlow	Cisaillement appliqué par l'écoulement des fluides	Besoin d'incubateur Une seule chambre

(Vunjak-Novakovic et al., 2004)

I.3. CELLULES SOUCHES

I.3.1. Généralités sur les cellules souches

I.3.1. 1 Définition des cellules souches

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées, issues de l'embryon, du fœtus ou de l'adulte. Elles sont caractérisées par leur capacité d'autorenouvellement (multiplication à l'identique), leur différenciation dans certaines conditions (pour engendrer les cellules spécialisées qui constituent différents tissus), et leur prolifération en culture (Potten and Loeffler, 1990).

I.3.1. 2 Cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires sont définies à l'origine par le blastocyte qui est un stade très précoce de développement avant l'implantation utérine. Ces cellules peuvent donner naissance aux trois feuillets embryonnaires : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Ces trois feuillets embryonnaires sont à l'origine de toutes les cellules du corps (Figure I-8).

Il est généralement admis que durant l'évolution du blastocyte au fœtus en passant par l'embryon, les cellules perdent leur caractère totipotent et choisissent une voie de différenciation endo, méso ou ectodermique. Parmi les trois feuillets embryonnaires, l'endoderme est entre autre à l'origine de l'épithélium intestinal, du pancréas et du foie ; le mésoderme est à titre indicatif à l'origine des éléments sanguins, des muscles, des reins, des os et l'ectoderme est quant à lui précurseur de l'épiderme et du système nerveux...

Ces dernières années ont été marquées par de nombreuses publications scientifiques remettant en cause la notion même de filiation cellulaire respectant l'origine embryonnaire, endo-, ecto-, mésodermique. Alors que la recherche de différents types de cellules souches spécifiques de tissus se poursuit, des observations, dès 1998, suggérant que des filiations inattendues peuvent exister entre des tissus adultes distincts ne partageant aucune origine embryonnaire (Bjornson, Lewis, and Appleby, 1999; Clarke et al., 2000; Ferrari et al., 1998; Jackson, Mi, and Goodell, 1999). Par ailleurs, les recherches sur les cellules souches ont montré que des cellules progénitrices, semblables aux cellules souches embryonnaires, persistent dans les tissus adultes et notamment dans la moelle osseuse.

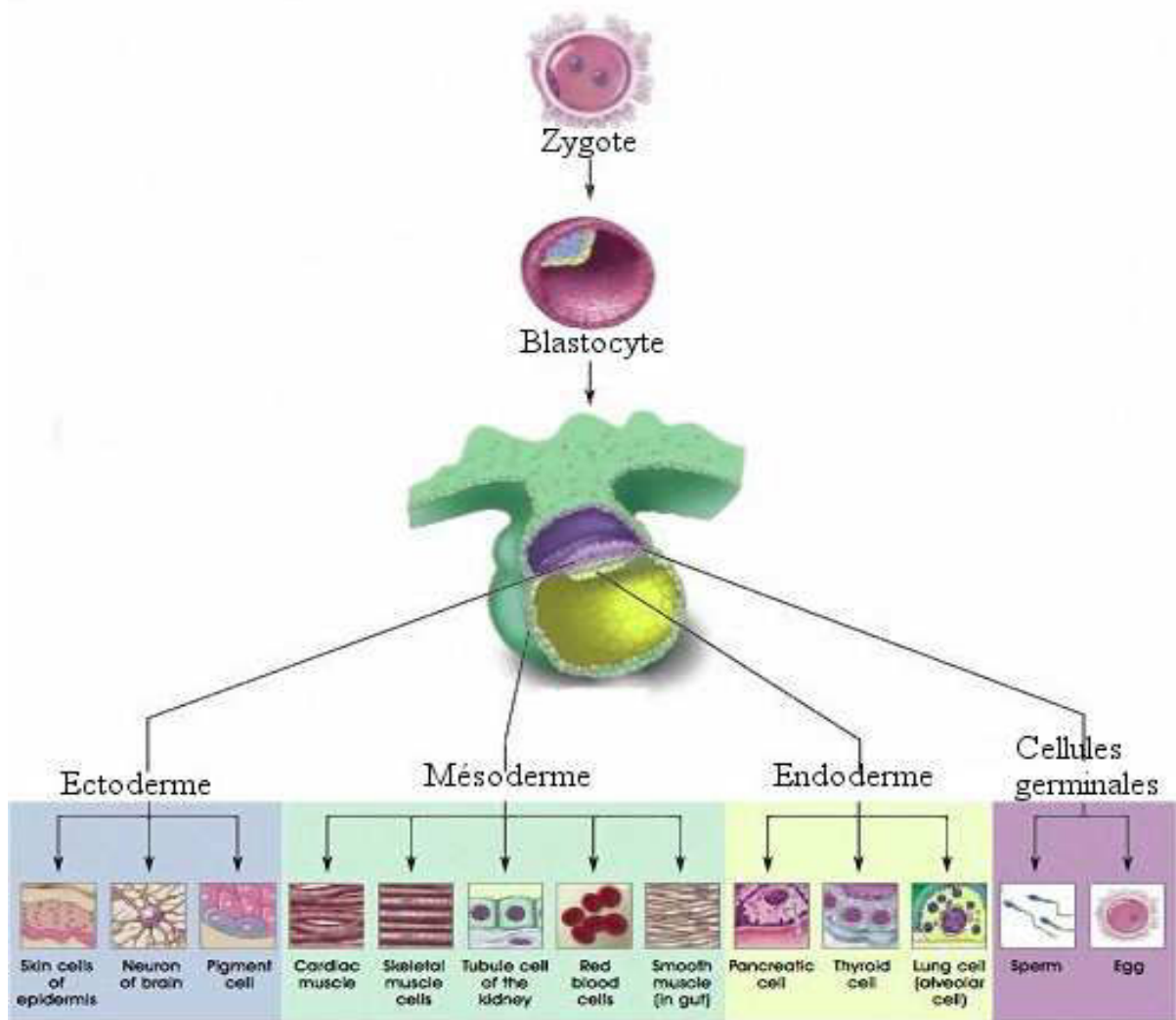


Figure I-8 Différenciation des tissus humains à partir d'un blastocyte

(<http://biosingularity.wordpress.com>, 2007)

I.3.1. 3 Cellules souches adultes et leur plasticité

Chez l'adulte, les cellules souches tissulaires (dites somatiques pour les distinguer des cellules souches germinales) assurent l'homéostasie, c'est-à-dire, le maintien physiologique d'un organe ou d'un tissu, en remplaçant les cellules mortes, que ce soit naturellement ou après lésions, assurant ainsi la pérennité de la fonction de l'organe pendant la vie de l'individu. Elles remplissent cette fonction, d'une part en se multipliant à l'identique (ce qui évite le tarissement du réservoir de cellules souches), d'autre part en se différenciant, acquérant ainsi les caractéristiques du tissu à réparer.

Il était généralement admis que les cellules souches adultes spécifiques du tissu où elles résident ne sont capables de donner naissance qu'à des cellules propres à ce tissu. Ces six

dernières années, cette notion a été remise en question par de nombreuses publications scientifiques. Il a été aussi montré que les cellules souches de la moelle osseuse possèdent une plasticité très importante (Krause et al., 2001; Pittenger et al., 1999), pouvant donner naissance à des neurones (Brazelton et al., 2000), des hépatocytes (Lagasse et al., 2000), des cellules du pancréas (Hess et al., 2003), des chondrocytes (Uematsu et al., 2005), etc...

Au cours de ces dernières années, les cellules souches ont été découvertes dans les tissus et organes différents tels que : le tissu nerveux (Johansson et al., 1999; McKay, 1997; Rietze et al., 2001), le pancréas (Zulewski et al., 2001), le cœur (Beltrami et al., 2003), l'intestin (Booth, O'Shea, and Potten, 1999), la peau (Toma et al., 2001). Les cellules souches semblent donc avoir une certaine plasticité, mais ces résultats surprenants doivent cependant toujours être analysés avec prudence.

Parmi les différents types de cellules souches isolées chez l'adulte, ce sont les cellules souches mésenchymateuses qui ont fait l'objet du plus grand nombre de travaux scientifiques.

1.3.2. Cellules souches mésenchymateuses médullaires

1.3.2. 1 L'histoire de la découverte des CSMM

En 1968, Friedenstein a rapporté pour la première fois l'existence de CSMM dans la moelle osseuse et les a appelées cellules de l'ancêtre de l'os (Friedenstein et al., 1968). Dans la moelle osseuse dite 'rouge', il y a au moins deux lignées de cellules souches : les cellules hématopoïétiques et les cellules mésenchymateuses (Pittenger et al., 1999). Ces deux lignées ont des destinées très différentes, et sont organisées en une hiérarchie de cellules aux potentiels variés (Figure I-9).

Parmi les différentes cellules du stroma, certaines ont la capacité d'adhérer aux surfaces en condition de culture simple (milieu nutritif standard additionné de 10 à 20% de sérum de veau foetal). Dans ce milieu, les cellules différenciées du microenvironnement médullaire, telles que les ostéoblastes, les adipocytes ou les cellules endothéliales, ne prolifèrent pas et les cultures cellulaires s'enrichissent, au fur et à mesure des passages. De plus, les cellules acquièrent une allure fibroblastique ayant certaines caractéristiques des cellules musculaires lisses (Galmiche et al., 1993). Ce sont des cellules que l'on appelle les CSMM.

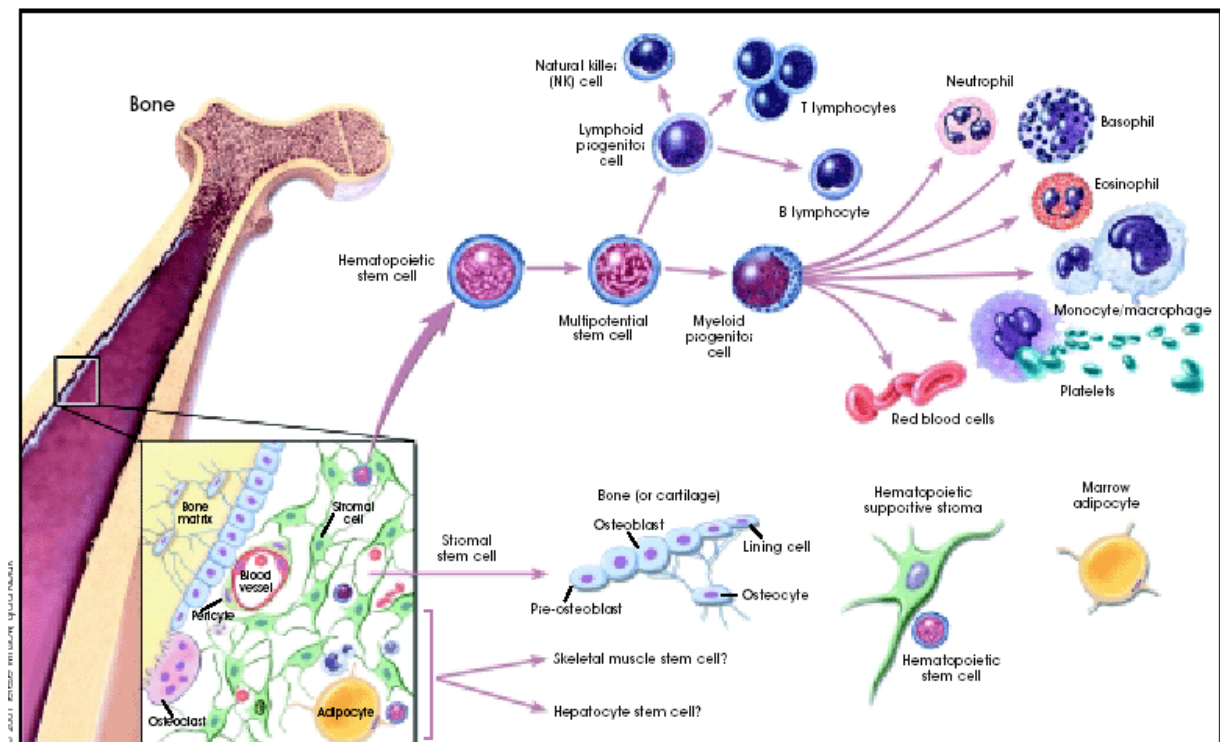


Figure I-9 Différenciation multipotentielle de cellules de moelle osseuse

(© 2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk, Caitlin Duckwall)

Dans la moelle osseuse dite 'rouge', il y a au moins deux lignées de cellules souches : les cellules hématopoïétiques et mésenchymateuses. Ces deux lignées ont des destinées très différentes, et sont organisées en une hiérarchie de cellules aux potentiels variés.

Puis, Owen et Friedenstein (Owen and Friedenstein, 1988), ont déterminé que ces CSMM assurent le maintien de l'hématopoïèse. La cohérence du tissu médullaire est assurée par un stroma nourricier qui constitue la niche écologique des cellules hématopoïétiques, indispensables à la production des cellules sanguines (Dexter et al., 1977; Gartner and Kaplan, 1980). Ces CSMM ont également la possibilité de donner naissance aux différentes lignées telles que les lignées adipocytaires, chondrogéniques et ostéoblastiques (Caplan and Bruder, 2001; Prockop, 1997).

Par la suite, il a été rapporté qu'elles ne représentent que 0,001 à 0,01 % de la population des cellules nucléées de la moelle osseuse (Pittenger et al., 1999), ce qui est beaucoup moins que les cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Cantz et al., 2004). Cependant, elles peuvent être isolées et amplifiées avec efficacité, *in vitro*, avant de se différencier en diverses lignées selon des protocoles de culture bien définis.

Depuis, d'autres travaux, *in vitro* et *in vivo*, ont permis d'étendre ce caractère plastique

des CSMM à la formation d'autres types cellulaires tels que les hépatocytes, les neurones, les cellules endothéliales, les cardiomyocytes, etc... (Cantz et al., 2004; Oswald et al., 2004; Wenisch et al., 2006)(Figure I-10).

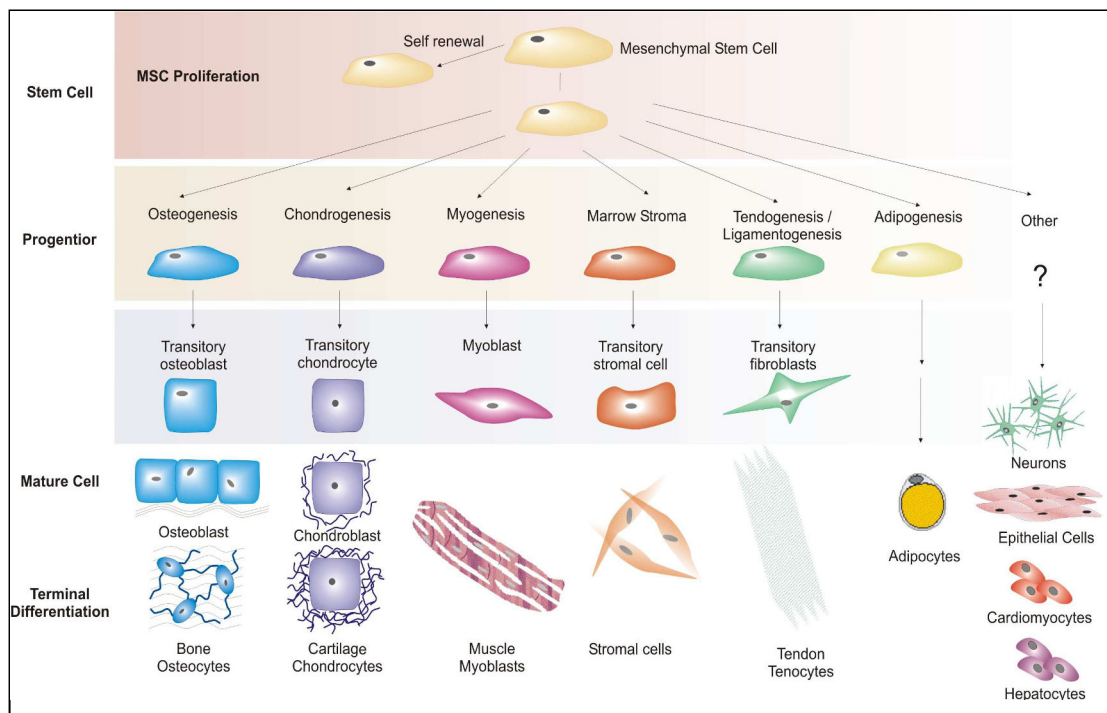


Figure I-10 Plasticité des cellules souches mésenchymateuses médullaires

Les CSMM ont, *in vitro* et *in vivo*, la possibilité de donner naissance aux différentes lignées cellulaires telles que des adipocytes, des chondroblastes, des ostéoblastes, les hépatocytes, les neurones, les cellules endothéliales, les cardiomyocytes, etc... (Caplan and Bruder, 2001)

En plus de leur capacité à favoriser la culture des cellules hématopoïétiques et leur capacité de différenciation, leur rôle thérapeutique potentiel dans le cadre de transplantation de cellules souches a été récemment découvert (Koc and Lazarus, 2001; Turgeman et al., 2001).

Les CSMM représentent une plate-forme originale pour la thérapie cellulaire. Des travaux actuels suggèrent que ces cellules sont génétiquement organisées pour exprimer des protéines nécessaires aux voies de différenciations spécifiques. De plus, les CSMM humaines obtenues à partir de malades atteints d'ostéoporose ont été utilisées en restaurant leur activité ostéogénique par un transgène de BMP-2. Le résultat a montré que les CSMM sont importantes dans la planification future de traitement de thérapie génique pour l'ostéoporose (Egermann et al., 2005).

Des études ont montré que les CSMM injectées dans différents tissus peuvent y rester au moins pendant quelques mois. Ces cellules peuvent être tracées grâce à différentes techniques de marquage cellulaire comme : le marquage à l'aide d'un gène fluorescent (Green fluorescence protein, GFP), à l'aide d'une greffe d'organe chez un receveur d'un sexe opposé, ou utilisant le gène LacZ, etc...(Awad et al., 1999; Young et al., 1998)

I.3.2. 2 Caractère biologique des CSMM

Le caractère « souche » des CSMM s'exprime dans la diversité de leur différenciation cellulaire, dans leur pouvoir de prolifération élevé, et aussi dans leur plasticité.

Cependant, les facteurs ayant une influence sur la plasticité de ces cellules, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, ne sont pas encore tous identifiés.

Les CSMM peuvent être caractérisées et identifiées (Tableaux I-3, I-4 et I-5) par :

1. leur capacité à adhérer sur une surface plastique de culture et leur morphologie fibroblastique (Friedenstein et al., 1968) ;
2. leur pouvoir clonogénique : elles peuvent former des colonies cellulaires dérivées d'une seule cellule. Les colonies peuvent être détectées par l'analyse du CFU-F (colony forming unit fibroblastic, CFU-F) (D'Ippolito et al., 1999; Owen et al., 1987; Quirici et al., 2002) ;
3. leur expression des antigènes membranaires spécifiques, expression variable selon les différentes espèces (Pittenger et al., 1999) ;
4. leur capacité à produire des cytokines, des facteurs de croissance, des molécules adhérentes et des protéines de la matrice extracellulaire (Guo et al., 2000).

Tableau I-3 Marqueurs membranaires et cytoplasmiques de CSMM

Expression Positive	Expression Négative	Références
SH2, SH3, SH4		(Haynesworth, Baber, and Caplan, 1992)
CD51, CD56	CD3, CD15, CD20, CD34, CD45, CD68, CD117	(Sillaber et al., 1999)
CD73		(Barry et al., 2001)
STRO-1		(Dennis et al., 2002)

CD105, HLA-DR, CD10, CD13, CD90, STRO-1	CD14, CD34, CD117, CD133	(Jones et al., 2002)
Sca-1, CD29, CD44, CD81, CD106, NST (Nucleostemin)	CD11b, CD31, CD34, CD45, CD48, CD90, CD117, CD135	(Baddoo et al., 2003)
CD44, CD49e, CD29, Sca-1		(Meirelles Lda and Nardi, 2003)
CD73, STRO-1, CD105,	CD34, CD45, CD144	(Tuli et al., 2003)
CD73, CD49a	CD45, CD14	(Boiret et al., 2005)
PA6		(Wang et al., 2006)
YS08, YS14, YS18		(Yoon et al., 2005)
CD59, CD90 (Thy-1), CD105, HLA-1	CD3, CD4, CD8, CD11b, CD13, CD34, CD31	(Izadpanah et al., 2005)
Vimentine, Ténascine, α -actine musculaire lisse, Ostéocalcine		(Sillaber et al., 1999)

Tableau I-4 Sécrétion des cytokines et facteurs de croissance de CSMM

Expression Positive	Références
G-CSF, SCF, LIF, M-CSF	(Haynesworth, Baber, and Caplan, 1996)
IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIF-R, SCF-R, G-CSFR, TNF-IR, TNF-IIR, TGF- β IR, TGF- β IIR, bFGF-R, PDGF-R, EGF-R,	(Minguell, Erices, and Conget, 2001)
α -L-iduronidase, arylsulfatase-A et B, glucocerebrosidase, adrenoleukodystrophy protein	(Koc et al., 1999)
IL1 α , 6, 7,8,11,12,14 et 15, LIF, SCF, GM-CSF, G-CSF et M-CSF,	(Minguell, Erices, and Conget, 2001)
bone morphogenetic protein receptor type IA (BMPRIA)	(Jones et al., 2002)

Tableau 1-5 Autres caractéristiques cyto-biologiques de CSMM

Type de marqueurs		Références
Molécules adhérentes	Intégrines: $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, Chaînes intégrines: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA-3, L-sélectine, endogline	(Minguell, Erices, and Conget, 2001)
Matrices extracellulaires	Alkaline phosphatase Collagène type I, II, III, IV, V et VI Fibronectine, Laminine Hyaluronan Proteoglycanes	(Vilamitjana-Amedee et al., 1993) (Minguell, Erices, and Conget, 2001)
Marqueurs génétiques	MHC-DR-alpha, MHC-DR-beta, MHC-DR-associated protein CD74, tissue factor pathway inhibitor-2, Neuroserpin, Oct-4, Sox-2, Rex-1	(Ishii et al., 2005) (Izadpanah et al., 2005)

En 1968, Friedenstein et al. (Friedenstein et al., 1968) ont rapporté que la moelle ponctionnée et cultivée à faible dilution formait des colonies de cellules à morphologie fibroblastique.

Les CSMM sont généralement collectées lors d'une ponction de moelle osseuse extraite de la crête iliaque supérieure du bassin chez l'Homme (Digirolamo et al., 1999; Pittenger et al., 1999). Les CSMM peuvent également être collectées dans les compartiments de moelle tibiale et fémorale (Murphy et al., 2002), ainsi que dans la colonne lombaire et le thorax (D'Ippolito et al., 1999). Les cellules mononucléaires sont isolées de la moelle, puis mises en culture pour enfin sélectionner que les CSMM. Comparées aux cellules hématopoïétiques, elles adhèrent sur les surfaces plastiques (Rickard et al., 1996). Les cultures primaires sont habituellement maintenues pendant 12 à 16 jours, pendant lesquels la fraction hématopoïétique non-adhérente de cellules est épuisée.

Morphologiquement, les CSMM sont fusiformes, comme les cellules fibroblastiques. Leur capacité de prolifération *in vitro* est très importante, dépassant celle des cellules hématopoïétiques et, dans certains cas, avec une stabilité étonnante de leurs propriétés (Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997).

Des progrès considérables ont été accomplis vers la caractérisation du profil antigénique des marqueurs de surface des populations de CSMM dérivées de la moelle osseuse. Cependant, un seul marqueur spécifique à ces cellules n'a pas encore été identifié (Gronthos et al., 1994; Minguell, Erices, and Conget, 2001; Pittenger et al., 1999; Tocci and Forte, 2003). Les cellules sont négatives pour les marqueurs hématopoïétiques typiques : CD14, CD34, CD45, CD31, CD133 et positives pour CD90 (Thy1), CD105 (SH2), CD166, CD73 (SH3), STRO1, CD29, CD49a, CD54, CD71, CD106, CD120a, CD55, CD13 et CD44 (Pittenger et al., 1999; Reyes et al., 2001) (Tableau I-6).

Un marquage immunologique de ces cellules peut être réalisé à partir de ces marqueurs lors de différentes études comme la différenciation des CSMM en chondrocytes où certains marqueurs, caractérisant les cellules non différenciées, disparaissent tandis que d'autres apparaissent.

Ainsi, il est possible de distinguer les cellules souches hématopoïétiques des CSMM, de suivre la différenciation des CSMM au cours de la chondrogénèse. Dans notre travail, les molécules de surface CD34, CD45 vont servir à caractériser les cellules souches hématopoïétiques tandis que les molécules de surface membranaire CD44, CD73, CD90, CD105 ou CD166 peuvent servir à suivre la différenciation des CSMM.

Tableau I-6 Caractéristiques des principaux marqueurs de surface permettant d'identifier les CSMM et les cellules hématopoïétiques

Marqueurs de surface	Autres noms	Poids moléculaire (KD)	Distribution	Fonction
CD13	Aminopeptidase N, APN	150-170	Cellules myéloïdes	Métalloprotéinase zinc-liant, traitement antigène, récepteur pour des variétés de virus coronaires
CD14	LPS-R	53-55	mono, mac, cellules Langerhans, granlow	récepteur pour LPS/LBP, reconnaissance de LPS
CD29	Integrin $\beta 1$	130	lymphe, mono, granlow, plaquettes, cellules mastes, fibroblastes, endoth	Récepteur w/ CD49a (VLA-1) pour VCAM-1, MAdCAM-1 et ECM
CD31	PECAM-1	130-140	mono, plaquettes, gran, endoth, sous-ensemble de lymphes	Récepteur CD38, adhérence
CD34		105-120	Précurseurs hématopoïétiques, endoth capillaire, fibroblastes embryonnaires	Marqueur de cellules souches, adhérence, récepteur CD62L

CD44	H-CAM, Pgp-1	80-95	Cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques, sauf les plaquettes, hépatocytes, testicule	Lie l'acide hyaluronique, adhérence
CD45	LCA, T200, B220	180-240	Cellules hématopoïétiques, isoformes multiples de lépissure alternative	Phosphatase de tyrosine, améliore les signaux TCR & BCR
CD49a	VLA-1	210	LCA, T200, B220	integrine $\alpha 1$, adhérence, CD49a/CD29 lient le collagène et le laminine
CD54	ICAM-1	90-110	endoth, mono, lymph (élevé jusqu'à activation)	récepteur pour CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (Mac-1) et rhinovirus
CD55	DAF	60-70	hématopoïétique, endoth	lie C3b, régulation complémentaire
CD71		95	Cellules de prolifération, réticulocytes, précurseur érythroïde	Récepteur de transferrine, régulation du fer
CD73		69	Sous-ensemble B, sous-ensemble T, FDC, épithe	ecto-5'-nucléotidase, régulation de nucléoside, costimulation T, adhérence lymphatique
CD90	Thy-1	25-35	Sous-ensemble CD34+ hématopoïétique, neurones	Sous-ensemble CD34+ hématopoïétique, neurones
CD105	Endogline	95	endoth, sous-ensemble de moëlle osseuse, mac activé	Réponse cellulaire au TGF- $\beta 1$
CD106	VCAM-1	110	Endoth activaté , FDC	Récepteur VLA-4 (CD49d/CD29), adhérence leucocytaire, migration, costimulation
CD120a	TNFR-I	50-60	Cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques	Récepteur pour TNF- α et pour TNF- β
CD133	AC133, prominin-like 1	120	Sous-ensemble de cellules souches hématopoïétiques, épithéliales et endothéliales	
CD166	ALCAM	105	neurones, monoblastes, épithélial, fibroblastes	Ligand: CD6, adhérence

Depuis quelques décennies, les travaux de recherches se sont intensifiés afin de mieux caractériser les CSMM. Cet engouement est dû, en partie, à l'attrait nouveau que représentent les CSMM, comme source cellulaire potentielle de la thérapie cellulaire régénératrice et de multi-organe.

Sur le plan pratique, les avantages de l'utilisation de CSMM sont :

- la facilité de prélèvement ;
- la possibilité de pouvoir utiliser la moelle osseuse propre au patient comme source de cellules thérapeutiques. Une greffe autologue éviterait le recours aux donneurs et éliminerait le risque de rejet ;
- la possibilité de créer des “banques” de cellules souches compatibles, s’il s’avère que les cellules peuvent être amplifiées in vitro au laboratoire ;
- l’espoir de stimuler, directement chez le malade, la migration de ces cellules souches vers le tissu lésé, et d’orienter leur différenciation dans une voie tissulaire spécifique ;
- la facilité de transfert des gènes dans ces cellules en fait également de bons candidats pour la thérapie génique (Brouard et al., 2000).

Au-delà des avantages liés à la facilité de prélèvement, de conditionnement et aux propriétés intrinsèques (multipotentialité et plasticité) des CSMM, l’existence d’une participation de ces cellules au phénomène naturel de lésion-réparation tissulaire a mis en valeur l’intérêt de l’exploration et de l’utilisation de CSMM comme source cellulaire potentielle pour la thérapie cellulaire régénératrice (Watanabe et al., 2002).

I.3.2. 3 Utilisation des CSMM en ingénierie cellulaire et tissulaire

Le nombre des tissus en ingénierie cellulaire et tissulaire augmente régulièrement grâce aux progrès récents en biologie des CSMM et à la détection de la différenciation des cellules souches. Plusieurs études dans une variété de systèmes ont mis en évidence la grande perspective de construire les tissus en bioingénierie à base de CSMM.

Les cellules souches ont servi, dans en premier temps, à reconstruire des tissus mésenchymateux (Bianco and Robey, 2001) et récemment, une vaste gamme de tissus épithéliaux est concernée. Il a été rapporté que les CSMM avaient le potentiel de se différencier en cellules épidermiques, sous certaines conditions, et qu’elles peuvent servir comme source de cellules pour l’ingénierie tissulaire de la peau (Chun-mao et al., 2007; Paunescu et al., 2007). De même, de nombreuses recherches sur l’utilisation des CSMM en ingénierie tissulaire de l’os, du cartilage, du tissu adipeux, du vaisseau, du foie, etc... ont été effectuées récemment (Bianco and Gehron Robey, 2000; Fraser et al., 2004; Hui et al., 2005; Risbud and Shapiro, 2005; Wang, Chen, and Piao, 2005).

I.4. LA REGULATION DES CSMM

I.4.1. Rôle du microenvironnement sur la régulation des CSMM

I.4.1. 1 Facteurs biochimiques

Les facteurs biochimiques sont essentiels pour induire et/ou soutenir les caractères spécifiques des CSMM.

Par exemple, l'oxygène influence considérablement la synthèse de la MEC et le développement de tissus en ingénierie *in vitro* (Obradovic et al., 1999). Pour l'instant, on ne connaît que très légèrement les effets de l'oxygène sur la différenciation des CSMM en fibroblastes ligamentaires. Fermor et al. (Fermor et al., 1998) ont montré qu'une pression d'oxygène de 21% a optimisé la prolifération de fibroblastes de LCA, tandis qu'une pression basse de 10% a amélioré la synthèse de collagène. L'ascorbate-2-phosphate, une molécule dérivée de la vitamine C et dont l'activité est durable, améliore la croissance cellulaire *in vitro*.

Les facteurs de croissance jouent également un rôle important pour induire la différenciation des CSMM. Les facteurs de croissance, tel que l'EGF, le bFGF, l'IGF-II, et le TGF- β ont été identifiés comme influençant la prolifération cellulaire. De plus, l'insuline, le TGF- β et l'IGF-II favorisent l'expression de protéines et la régénération de la MEC dans les tissus conjonctifs (Attisano and Wrana, 2002; Clemmons, 1997; Lo et al., 2003; Marui et al., 1997; Sarasa-Renedo and Chiquet, 2005). De même, le TGF- β combiné avec l'EGF, ainsi que le TGF- β combiné avec l'insuline, stimulent la prolifération des fibroblastes et des CSMM (Jin et al., 2004).

En outre, le sérum contient des stimulateurs puissants qui améliorent la croissance cellulaire et la différenciation *in vitro*. Les acides aminés, les facteurs de croissance, les vitamines, les protéines, les hormones, les lipides, et les minéraux, ainsi que les inhibiteurs de la différenciation cellulaire font partie de ces stimulateurs.

I.4.1. 2 Facteurs mécaniques

Les signaux mécaniques influençant la croissance et le développement de ligaments *in vivo* sont susceptibles de jouer un rôle similaire au cours de la culture *in vitro* et en ingénierie ligamentaire. Les charges mécaniques influent sur le développement de tissus d'au moins deux façons : l'amélioration du transport de masse et la stimulation directe des cellules.

Les stimulations mécaniques améliorent l'expression des collagènes de type I et III, de la fibronectine et de la télescine-C dans la culture de fibroblastes ligamentaires (Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003; Chiquet-Ehrismann et al., 1991; Kim et al., 2002). Les stimulations mécaniques modifient l'environnement extracellulaire tant *in vivo* qu'*in vitro* par action sur la forme des cellules et l'espace interfibrillaire ou par l'écoulement du fluide qui peuvent améliorer le transport de molécules.

Nos connaissances sur les effets des facteurs mécaniques sur la structure et la fonction des ligaments en ingénierie tissulaire pendant la culture sont encore très limitées. Les études sur les facteurs mécaniques en ingénierie des tissus ligamentaires peuvent grandement s'appuyer sur des modèles physiologiques pertinents, par exemple : la torsion et la traction adéquates, la déformation et la fréquence de stimulation. Les études expérimentales sur la mécanotransduction sont encore compliquées à cause des interactions entre les signaux physiques et biochimiques. Il semble que les facteurs mécaniques et les molécules biochimiques régulent en coopération la différenciation des CSMM et la formation de tissu en bioingénierie (Vunjak-Novakovic et al., 2004).

1.4.2. Modification génétique (Transgénèse)

Un autre domaine de recherches avec des applications potentielles dans la cicatrisation du ligament est la thérapie cellulaire. Le concept est que l'implantation des CSMM génétiquement modifiées favorise la réparation des ligaments pendant que ces cellules deviennent des constituants du tissu cicatriciel.

Le transfert de gène est une technique permettant d'introduire du matériel génétique dans des cellules cibles pour modifier leur fonctionnement. Les gènes peuvent être introduits *in vitro* ou *in vivo*. Cette technique pourrait maintenir une forte concentration en facteur de croissance sur le site de réparation par l'expression continue d'un facteur exogène. Kim et al. (Kim et al., 2007) ont transféré plusieurs gènes dans les CSMM humaines et trouvé que seule la transgénèse par adénovirus associés auto-complémentaires (self-complementary adeno-associated viruses, scAAV) conduit à une modification génétique permanente et prometteuse dans les CSMM. Pagnotto et al. ont transféré les gènes de TGF- β et GFP dans les CSMM et ils ont trouvé que la réparation du cartilage par les CSMM transgéniques était grandement améliorée (Pagnotto et al., 2007)

Nous pouvons ainsi envisager que la technique transgénique représente un potentiel pour la modification cellulaire en ingénierie tissulaire de ligament, comme la transgénèse du PDGF et du TGF- β dans les CSMM.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.1. PRELEVEMENT ET CULTURE CELLULAIRE

II.1.1. Les manipulations de base en culture cellulaire

II.1.1. 1 Préparation du tampon HBSS

Le tampon HBSS (Hank's Balanced Salts Solution) est formé des composés suivants : KCl 0,4g/L, NaCl 8,0g/L, KH_2PO_4 0,06g/L, Na_2HPO_4 0,04778g/L, D-glucose 1,0g/L et de rouge de phénol 0,011g/L. Ce tampon sans ion calcium (Ca^{2+}) ni ion magnésium (Mg^{2+}) (Réf.H2387, Sigma, France), est fourni en poudre et se prépare en solution aqueuse de la façon suivante:

- Dissoudre un sachet de poudre de HBSS (9,5g) dans 900mL d'eau distillée à température ambiante (solution A)
- Ajuster le pH à 7,2 en rajoutant environ 0,35g de NaHCO_3 dans la solution A en agitant
- Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 1 litre.

II.1.1. 2 Préparation du milieu de culture DMEM complet

Le milieu de culture DMEM complet est préparé selon la composition ci-dessous :

- Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose (DMEM-LG) (réf. 6046, Sigma, France).
- Sérum de veau fœtal (réf. 10108, GibcoBRL, France) utilisé à 10% (v/v dans le DMEM-LG), décomplémenté à 56°C pendant 30min.
- 2mM de L-glutamine (réf. 25030, GibcoBRL, France)
- 50U/mL de pénicilline / 50µg/mL de streptomycine (réf. 15070, GibcoBRL, France)
- 2,5µg/mL d'amphotéricine B (réf. 15290, GibcoBRL, France)

L'ajout de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, de glutamine et d'antibiotiques au DMEM-LG constitue ce que l'on appelle le « milieu de culture complet ».

II.1.1. 3 Préparation du milieu de culture DMEM/F12 complet

Le milieu de culture DMEM/F12 complet est utilisé pour cultiver les fibroblastes ligamentaires. Il est préparé selon la composition ci-dessous :

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Nut Mix F-12 (réf. 21331, GibcoBRL, France)
- Sérum de veau fœtal (réf. 10108, GibcoBRL, France) utilisé à 10% (v/v dans DMEM-LG), décomplémenté à 56°C pendant 30min
- 4mM de L-glutamine (réf. 25030, GibcoBRL, France)
- 1,5g/L de NaHCO₂
- 50U/mL de pénicilline / 50µg/mL de streptomycine (réf. 15070, GibcoBRL, France)
- 2,5µg/mL d'amphotéricine B (réf. 15290, GibcoBRL, France)
- 1% (v/v dans du DMEM/F12) d'acide aminé non essentiel (réf., 11140, Gibco, France)
- 150µg/mL d'acide ascorbique (réf., A4544, sigma, France)

II.1.1. 4 Subculture cellulaire

La solution de trypsine à 0,25% et d'EDTA à 1% (réf. T 4049, Sigma, France) est utilisée pour détacher les cellules des supports de culture. Lorsque les cellules arrivent à confluence, le tapis cellulaire est lavé avec 5mL de tampon HBSS. Les cellules sont ensuite décollées par un traitement de 5min avec 1mL de mélange trypsine-EDTA pour 25cm² de surface cellulaire à 37°C, 5% de CO₂. L'action de la trypsine est inactivée par addition de 4mL de milieu complet et une numération cellulaire est effectuée à l'aide d'une cellule de Thoma. Les cellules sont comptées 2 fois au microscope optique à l'aide d'une cellule de Thoma et d'un colorant, le bleu de trypan (0,04%, Réf. T8154, Sigma, France). Seules les cellules viables, non colorées, sont comptées et l'estimation du nombre de cellules est la moyenne des comptages.

La suspension cellulaire est alors centrifugée à 300g pendant 5min. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans le milieu de culture afin d'obtenir une concentration de 10⁵cellules/mL. La suspension cellulaire est fractionnée dans des flacons de culture de 25cm².

II.1.1. 5 Congélation

Les cellules décollées sont rincées et centrifugées pendant 5min à 300g, puis le culot est repris dans le milieu de culture DMEM complet afin d'obtenir une concentration de 2.10⁶cellules/mL. Une solution cryoconservatrice composée de 20% de DMSO (Diméthyl

Sulfoxyde, Laboratoires Braun, France, DMSO, référence: 2791102) est ajoutée goutte à goutte à la suspension cellulaire jusqu'à l'obtention de 50% v/v. Le mélange est alors fractionné dans des cryotubes à une densité cellulaire de 10^6 cellules/cryotube. Enfin, les cryotubes sont congelés en les plaçant 30min à 4°C, puis 2h à -20°C, 12h à -80°C, et finalement transférés dans de l'azote liquide à -196°C.

II.1.1. 6 Décongélation

Les cellules cryoconservées à -196°C sont décongelées dans un bain-marie à 37 °C, puis diluées immédiatement dans du milieu de culture DMEM complet. Elles sont ensuite lavées 2 fois dans ce même milieu, 5min à 300g, pour éliminer le DMSO qui est toxique à 37°C.

II.1.2. Cellules souches mésenchymateuses médullaires

II.1.2. 1 Prélèvement et mise en culture des CSMM de rat

La culture des cellules mésenchymateuses a été réalisée d'après la méthode décrite par Chen et al.(Chen et al., 2002a; Chen et al., 2002c; Pittenger et al., 1999). Le prélèvement cellulaire a été réalisé sur de la moelle osseuse provenant de rats Wistar, mâles, âgés de 6 semaines. Les rats ont été anesthésiés à l'éther sous une cloche et sacrifiés par une injection cardiaque létale de KCl à 10%. Les régions du fémur et du tibia ont été stérilisées à l'éthanol à 75°, puis le fémur, le tibia et le genou ont été isolés à l'aide de pinces et de ciseaux stériles. Les surfaces du fémur et du tibia ont été grattées à l'aide d'un scalpel et rincées 2 fois dans une solution de PBS. La tête de fémur et l'extrémité inférieure du tibia ont été sectionnées, puis leurs cavités médullaires ont été rincées avec 5mL de milieu de culture DMEM. Toutes les étapes de prélèvement ont été réalisées en environnement stérile.

Le mélange de moelle osseuse et du milieu de culture DMEM ont été ajouté doucement à 5mL de Percoll ($\rho=1,077$, Réf. 17-1440-02, Amersham Bioscience, France), l'ensemble ont été ensuite centrifugé à 500g pendant 20min. Le liquide à l'interface du Percoll qui contient les cellules nucléées ont été récupéré et dilué avec du milieu de culture DMEM, puis centrifugé à 300g pendant 10min. Le culot a été resuspendu avec du DMEM complet à une concentration de 6.10^5 cellules/mL. Enfin, les cellules ont étéensemencées dans des flacons de culture de 25cm² et incubées dans une étuve à 37°C, et 5% de CO₂. Le milieu a été renouvelé après 5 jours de culture, puis tous les trois jours. Quand le tapis cellulaire était à confluence, la subculture cellulaire a été effectuée.

Les cellules de passage 1 à passage 6 ont été utilisées pour déterminer les phénotypes des CSMM. Et les cellules de passage 4 ont été soit utilisées pour la co-culture avec des fibroblastes ligamentaires, soit pour le stretching uniaxial.

II.1.2. 2 Mise en culture des CSMM humaines

Les études ont été réalisées sur des cultures de CSMM humaines provenant de moelle osseuse humaine de donneurs sains de 20 ans à 60 ans (don anonyme). La moelle osseuse est extraite par ponction de la crête iliaque arrière du bassin.

Après passage à la centrifugeuse de gradient de densité, 2.10^6 cellules nucléées de moelle osseuse ont été mélangées avec 5mL de milieu de culture DMEM complet etensemencées avec une densité de 5.10^4 cellules/cm² et incubées dans une étuve à 37°C, et 5% de CO₂. Cinq jours après, le milieu était renouvelé et changé par la suite tous les trois jours. Les cellules étaient surveillées et sub-cultivées selon le même protocole que pour les CSMM de rat.

Les cellules de passage 4 ont été utilisées pour la détermination des phénotypes des CSMM et/ou le contrôle qualité par la différenciation en ostéoblastes ou en adipocytes.

II.1.3. Mise en culture des fibroblastes ligamentaires

Les fibroblastes ligamentaires provenant de ligaments du genou ont été prélevés sur les mêmes rats que la moelle osseuse. La culture des fibroblastes a été réalisée d'après la méthode décrite par DesRosiers et al. (DesRosiers, Yahia, and Rivard, 1996) et Chen et al. (Chen et al., 2002b; DesRosiers, Yahia, and Rivard, 1996).

Tous les ligaments de genou (ligaments croisés antérieur et postérieur, collatéraux fibulaire et tibial) ont été prélevés à l'aide de pinces et de ciseaux stériles en environnement stérile. Les morceaux de ligaments ont été lavés deux fois dans la solution de HBSS, puis les tissus périligamenteux ont été enlevés en grattant avec un scalpel. Ils ont ensuite été coupés en petits morceaux d'environ 1mm³. Les morceaux de ligaments ont été trypsinés d'abord dans une solution de trypsine à 0,5% (Réf. T3924, Poly Lab, France) pendant 30min, à 37°C, puis transférés dans 5mL de solution de collagénase XI contenant :

- DMEM/F12 complet (noté à II.1.1. 3)
- 400U/mL de collagénase XI (Réf. C9407, Sigma, USA)

Après 2 heures de digestion enzymatique des ligaments à 37°C en agitation, la solution obtenue a été centrifugée à 300g pendant 10min, le culot a été resuspendu avec du milieu de

culture DMEM/F12 complet. Les cellules ont été incubées à 37°C, 5% de CO₂ et le milieu de culture était renouvelé tous les trois jours.

II.2. MISE EN EVIDENCE DU PHENOTYPE DES CSMM

II.2.1. Etude des CSMM en microscopie électronique

II.2.1. 1 Préparation des échantillons de microscopie électronique à balayage (MEB)

Les cellules de passage 4 ensemencées sur des lamelles ont été observées par microscopie électronique à balayage. Les cellules sur les lamelles ont été immergées dans une solution de glutaraldéhyde à 0,25% pendant 10min, puis dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% pendant 10min pour les fixer, ensuite elles ont été desséchées en les passant successivement dans des solutions de concentrations croissantes en éthanol de 30°, 50°, 70°, 80°, 90°, 95° et 100°. Elles ont alors été placées sous vide puis recouvertes d'une couche d'or palladium. Un microscope électronique à balayage (Réf. AMRAY-1000B, USA) a été utilisé pour l'observation des CSMM.

II.2.1. 2 Préparation des échantillons de microscopie électronique en transmission (MET)

Les CSMM de passage 4 à confluence ont été trypsinées et transférées dans un tube de centrifugation, puis centrifugées à 300g pendant 5min, le surnageant a été alors éliminé. Le culot a été resuspendu dans une solution de glutaraldéhyde à 0,25% et incubé pendant 5min, puis centrifugé à 500g pendant 10min. Le surnageant a été enlevé et le culot a été pré-fixé par une solution de glutaraldéhyde à 2,5% pendant 24 heures à 4°C, puis les cellules ont été fixées par une solution à 1% de tétroxyde d'osmium, ensuite desséchées en les passant successivement dans des solutions de concentration croissante en acétone de 30%, 50%, 70%, 90% et 100%. Enfin, les échantillons ont été encapsulés dans de la résine époxy, coupés en lamelle à l'aide d'un microtome et observés au microscope électronique en transmission (Réf. H-600, Hitachi, Japon).

II.2.2. Marquage des CSMM par cytométrie en flux

II.2.2. 1 Principe de la cytométrie en flux

La technique de cytométrie en flux permet l'analyse rapide d'un grand nombre de particules de manière individuelle. Cette technique repose sur la mesure de paramètres physiques (taille, volume, granulosité) et biologiques (mise en évidence de la présence de molécules grâce à un marquage fluorescent) de cellules défilant une à une à grande vitesse devant un faisceau lumineux monochromatique excitateur. Les signaux lumineux émis par les cellules sont recueillis et traités par un système informatique. La technique fondée sur l'immunofluorescence, nous a permis d'analyser qualitativement et quantitativement le phénotype des CSMM.

L'analyse des données qualitatives exprimées en intensité moyenne de fluorescence (IMF) manque de standardisation du fait de la variation dans la préparation de l'échantillon, de l'hétérogénéité des appareils et des réactifs proposés par les fournisseurs. Des variations dans l'exploitation des résultats sont alors remarquées.

Par conséquent, l'exploitation des mesures de fluorescence est limitée à la détermination de cellules "positives" ou "négatives" au sein d'une population cellulaire. Le seuil de positivité est arbitrairement fixé à 10^1 sur l'échelle logarithmique comprenant 4 décades. Les paramètres sont réglés de telle façon que l'auto-fluorescence de la population cellulaire analysée et le contrôle isotypique soient situés inférieurement à la valeur de 10^1 . Il apparaît donc que la positivité de fluorescence d'une population cellulaire est fixée par rapport à l'auto-fluorescence des cellules. Les cellules dans la région M1 représentent donc la population positive pour un marqueur (Figure II-1). Il est à noter que l'auto-fluorescence varie selon chaque type cellulaire. La quantification, en utilisant toujours la même valeur de la tension du photomultiplicateur (PMT) pour l'analyse des cellules, permet d'éviter ces artéfacts de mesure. Dans notre manipulation, le pourcentage de la population positive a été utilisé pour déterminer l'expression du marqueur.

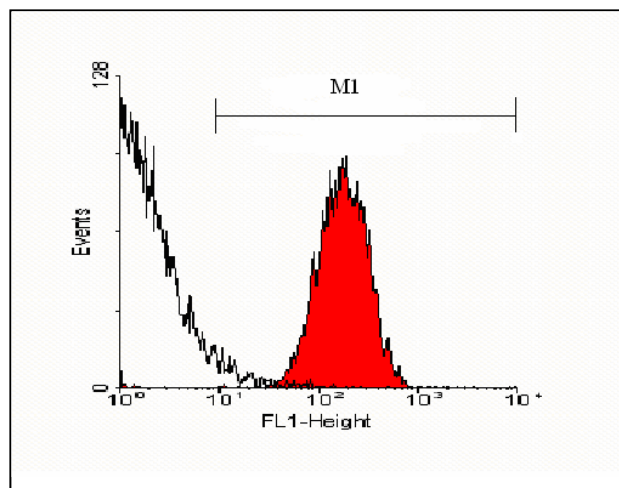


Figure II-1 Exemple de cytogramme en cytométrie en flux

L'ordonnée est le nombre d'événements, et l'abscisse, l'intensité de fluorescence. La population cellulaire dans la zone M1 (zone rouge) est l'ensemble des cellules qui expriment positivement un marqueur, la population cellulaire dans la zone inférieure de M1 (zone blanche) est l'ensemble des cellules exprimant négativement le marqueur.

II.2.2. 2 Marquage des CSMM du rat

L'immuno-fluorescence directe a été utilisée pour le marquage des CSMM. Le principe de cette technique est présenté dans la figure II-2. Un anticorps conjugué avec un fluorophore se lie avec l'antigène spécifique et l'antigène peut ainsi être détecté pour analyser la fluorescence par cytométrie en flux.

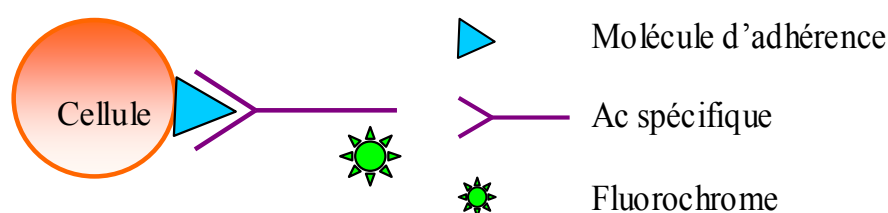


Figure II-2 Principe de l'immunomarquage direct

Un anticorps conjugué avec un fluorophore se lie avec l'antigène spécifique et l'antigène peut ainsi être détecté pour analyser la fluorescence par cytométrie en flux.

Quatre marqueurs phénotypiques mésenchymateux ont été utilisés: CD34, CD45, CD90 et CD44. Les anticorps étaient fluorescents souris anti-rat IgG1, dont la longueur d'onde d'excitation était 488nm, et la longueur d'onde d'émission était 519nm:

- CD34-FITC (Réf. SC-7324, Santa Cruz, USA)

- CD45- FITC (Réf. MR6901, CALTAG, France)
- CD90-FITC (Réf. MR5001, CALTAG, France)
- CD44-FITC MR440030, Antigenix America, France)

L'IgG1-FITC de souris (Réf. CN100111, ANTIGENIX AMERICA, Etats Unis) était utilisé comme contrôle isotypique de FITC. Le phénotype des CSMM avec ces marqueurs est CD34⁻, CD45⁻, CD90⁺ et CD44⁺.

Les CSMM de rat de passage 1 à passage 6 ont été utilisées pour analyser les marqueurs spécifiques de CSMM. Lors de chaque passage, les cellules ont été décollées avec 1mM de solution d'EDTA et réparties à raison de 10⁵cellules/tube. Les cellules étaient lavées avec 2mL de PBS, centrifugées à 500g pendant 10min, le surnageant était prélevé, puis 2μL d'anticorps étaient ajoutés dans 200μL de suspension cellulaire. Les cellules étaient incubées avec l'anticorps pendant 30min à température ambiante à l'abri de la lumière. Les contrôles isotypiques de FITC étaient effectués simultanément. Les cellules étaient lavées avec 2mL de PBS, centrifugées à 500g pendant 10min après incubation. Le culot était repris dans 500μL de PBS, puis les tubes étaient passés au cytomètre en flux (Beckman Dickson, USA). L'analyse a été effectuée avec le logiciel Cellquest (Beckman Dickson, USA).

II.2.2. 3 Marquage des CSMM humaines

Trois marqueurs phénotypiques mésenchymateux ont été utilisés : CD34, CD45, et CD44. Les anticorps étaient fluorescents souris anti-humain IgG1, dont la longueur d'onde d'excitation était 488nm, et la longueur d'onde d'émission était 519nm:

- CD34-FITC (Réf. SC-7324, Santa Cruz, USA)
- CD45-FITC (Réf. X0964, DAKO, Denmark)
- CD90-FITC (Réf. MAB4073F, CHEMICON, USA)

De même que pour les CSMM de rat, l'IgG1-FITC de souris (Réf. CN100111, ANTIGENIX AMERICA, Etats Unis) a été utilisé comme contrôle isotypique de FITC. Les CSMM humaines de passage 4 étaient trypsinées et fractionnées à raison de 10⁵cellules/tube. Le marquage du phénotype a été réalisé à l'aide du même procédé que pour les cellules de rat précédemment expliqué.

II.2.3. Différenciation des CSMM

Le contrôle qualité des CSMM inclus aussi leur capacité de la différenciation en ostéoblastes ou en adipocytes. La capacité de différenciation des CSMM de passage 4 a été vérifiée en les induisant à se différencier en ostéoblastes et en adipocytes.

II.2.3. 1 Différenciation des CSMM en Ostéoblastes

La différenciation des CSMM en ostéoblastes a été effectuée selon la méthode décrite par Cheng et al. (Cheng et al., 1994). Les CSMM de passage 4 à 90% de confluence étaient trypsinées et subcultivées dans un milieu conditionnel ostéogénique contenant :

- α -MEM complet (Réf. 22561-021, Laboratoires Life Technologie, France)
- 10^{-7} M de dexaméthasone (Réf. D2915, Sigma, USA)
- 50 μ g/mL d'acide ascorbique (Réf. A4544, Sigma, USA)
- 10mM de β -glycérophosphate (Réf. G6501, Sigma, USA)

Le milieu était renouvelé tous les trois jours. Après 11 jours de culture, la 1,25-dihydroxyvitamine D3 (Réf. D1530, Sigma, USA) a été ajoutée dans le milieu conditionnel jusqu'à une concentration finale de 10^{-7} M.

Pour détecter la déposition de calcium, deux méthodes ont été utilisées : la pigmentation de von Kossa (Chiba and Mitani, 2004) et celle d'alizarine (Mori, Tanji, and Wakabayashi, 2000). La pigmentation de von Kossa a été réalisée comme suit : le tapis cellulaire est fixé avec 10% de paraformaldéhyde pendant 30min, puis l'incubées avec 2% de nitrate d'argent pendant 20min dans l'obscurité, ensuite la solution de nitrate d'argent (AgNO_3 , Réf. S7276, Sigma, USA) était enlevée et le tapis cellulaire était mis en présence d'une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$, Réf. S7026, Sigma, USA) à 5% pendant 5min. Le dépôt de calcium était alors pigmenté en noir ou en brun foncé.

Pour pigmenter les cellules avec de l'alizarine, les cellules ont été rincées dans du PBS et fixées avec 95% d'éthanol pendant 15min à température ambiante, puis teintes dans 1% d'alizarine (dissous dans 2% d'éthanol à pH 8,3. Réf. A5533, Sigma, USA) pendant 5min, enfin les cellules étaient rincées avec de l'eau distillée. Le dépôt de calcium était alors pigmenté en rouge.

II.2.3. 2 Différenciation des CSMM en Adipocytes

Pour la différenciation adipogénique des CSMM, la procédure décrite par Tuli *et al.* (Tuli et al., 2003) a été suivie. Les CSMM de passage 4 ont été incubées dans un milieu spécifique de sollicitation contenant :

- α -MEM complet (Réf. 22561-021, Laboratoires Life Technologie, France)
- insuline 5 μ g/mL (Réf. 57595, Sigma, USA)
- 10⁻⁶M dexaméthasone (Réf. D2915, Sigma, USA)
- 10⁻⁴M 1-méthyl-3-isobutylxanthine (Réf. 15879, Sigma, USA)
- 6.10⁻⁷M indométacine (Réf. 17378, Sigma, USA)

Le milieu était renouvelé tous les trois jours. Après 14 jours de culture dans le milieu spécifique, les cellules étaient fixées dans 10% de paraformaldéhyde à 4°C pendant 5min, puis rincées 3 fois avec de l'eau, les cellules étaient alors incubées dans une solution de 3mg/mL d'huile rouge O dissoute dans 60% de cymène (Réf. O0625, Sigma, USA) à 37°C dans une étuve pendant 10min. Enfin, elles étaient rincées avec de l'eau distillée, les gouttelettes de lipide apparaissant en rouge. Les cellules étaient ensuite observées à l'aide d'un microscope optique.

II.3. CO-CULTURE SANS CONTACT DES CSMM AVEC DES FIBROBLASTES LIGAMENTAIRES

II.3.1 Principe

Pour co-cultiver sans contact les CSMM avec les fibroblastes, nous avons utilisé le dispositif Transwell schématisé par la figure II-3. Il est formé d'un double puits : un puits intérieur (Réf. [35]3102, Beckman Dickson, USA) et un puits extérieur. Le fond du puits intérieur est composé d'une membrane semi-perméable en polyéthylène téréphthalate (PET, Becton Dickinson, Oxford, Royaume-Uni), qui permet de créer deux compartiments pouvant servir à l'étude des vecteurs chimiques tels que : la sécrétion d'hormones, de cytokines ou d'autres activités métaboliques. Ce système permet donc de cultiver deux types de cellules sans contact afin de n'étudier que l'effet des substances biochimiques sécrétées par l'une des populations de cellules sur l'autre.

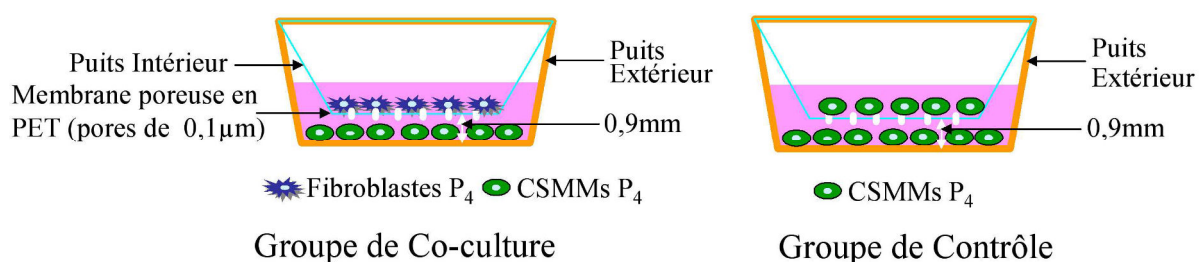


Figure II-3 Dispositif de co-culture cellulaire sans contact (Transwell)

Il est formé d'un double puits : un puits intérieur et un puits extérieur. Le fond du puits intérieur est composé d'une membrane semi-perméable en polyéthylène téréphthalate, qui permet de créer deux compartiments pouvant servir à l'étude des vecteurs chimiques. Ce système permet donc de cultiver deux types de cellules sans contact afin de n'étudier que l'effet des substances biochimiques sécrétées par l'une des populations de cellules sur l'autre.

II.3.2 Mise en co-culture

En vue d'étudier le rôle des fibroblastes ligamentaires sur les CSMM, nous avons choisi une membrane en PET avec des pores de 0,1µm diamètre qui permettent la pénétration des facteurs solubles tout en interdisant la transmigration et la contact direct cellulaire. Les deux types de cellules ont été donc séparés par cette membrane en PET. Les fibroblastes ligamentaires de passage 4 étaient trypsinés, énumérés etensemencés dans les puits intérieurs à 5.10^4 cellules par puits, alors que les CSMM de passage 4 étaient trypsinées et réparties dans les puits extérieurs à des densités de 2.10^5 , 10^5 et 5.10^4 cellules par puits et cultivées respectivement pendant 3, 6 et 12 jours. Les puits étaient complétés avec du milieu de culture DMEM complet afin d'avoir 3mL de milieu dans chaque puits. Le tableau II-1, ci-dessous, fait la synthèse des conditions de co-culture.

Tableau II-1 Densités cellulairesensemencées en co-culture et leurs contrôles (n=7)

	Puits intérieur (cellules/puits)	Puits extérieur (cellules/puits)
Co-culture 3 jours	Fibroblastes 5.10^4	CSMM 2.10^5
Groupe contrôle de 3 jours	CSMM 5.10^4	CSMM 2.10^5
Co-culture 6 jours	Fibroblastes 5.10^4	CSMM 1.10^5
Groupe contrôle de 6 jours	CSMM 5.10^4	CSMM 1.10^5
Co-culture 12 jours	Fibroblastes 5.10^4	CSMM 5.10^4
Groupe contrôle de 12 jours	CSMM 5.10^4	CSMM 5.10^4

II.4. ETUDE DE STIMULATIONS MECANIQUES SUR LES CSMM

II.4.1. Préparation des membranes de silicone

Des membranes de silicone (Réf. SM 03114814, Saginaw Nagel Paper & Box CO, USA) coupées aux dimensions de 45×75×0,25mm ont été utilisées comme substrat cellulaire. Les membranes étaient stérilisées dans l'éthanol à 75° pendant 1 heure, puis rincées avec de l'eau distillée, ensuite contenues dans des boîtes de Pétri et exposées aux UV pendant 20min. Les membranes de silicone étaient recouvertes d'une solution de gélatine (Réf. G-1890, Sigma, USA) à 1% à 37°C pendant 30min, enfin le surplus était aspiré et les membranes étaient rincées à l'aide de PBS.

II.4.2. Ensemencement de CSMM sur les membranes de silicone

Après détachement à l'aide de trypsine, les CSMM de passage 4 étaient resuspendues dans du milieu de culture afin d'obtenir 10⁵cellules/mL. 3mL de cette suspension étaient étalés sur 80% de la surface centrale des membranes de silicone pour l'ensemencement. Après 2h de sédimentation au repos dans un incubateur, la majeure partie des cellules avait adhéré à la membrane de silicone. 7mL de milieu de culture DMEM complet étaient ajoutés et les boîtes de Pétri étaient replacées dans l'incubateur à 37°C durant 24h. Après ce laps de temps, les cellules ensemencées sur les membranes subissaient des étirements cycliques de 10% de déformation à une fréquence de 1Hz pendant 3, 6, 12, 24 et 36 heures.

II.4.3. Appareil d'étirement

L'application d'étirement, a été réalisée grâce à un prototype réalisé au sein de notre laboratoire (par M. Michel MARCHAND) qui permet de soumettre les cellules à des étirements cycliques de 2,5 à 15% à des fréquences variant de 0 à 2Hz (Figure II-4 C).

Deux membranes peuvent être fixées dans le prototype d'étirement dans deux chambres parallèles. Les membranes sont serrées par une pince à chaque extrémité, une des pinces est fixée au bâti tandis que l'autre est reliée à un piston mobile entraîné par un moteur. Les membranes sont recouvertes par 30mL de milieu de culture DMEM complet. L'appareil de stretching était alors placé dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂.

Avant de commencer les expériences d'étirement, nous avons dû valider l'appareil de stretching d'un point de vue mécanique en vérifiant les performances de l'appareil, et également l'homogénéité des déformations sur la membrane de silicone. Pour ce faire, nous avons criblé la membrane de 50 points repères. La membrane a été soumise à deux déformations différentes (10% et 20%). Nous avons ensuite observé les points sous microscope à contraste de phase, puis mesuré leurs tailles selon les axes X, Y et également la diagonale Z à l'aide du logiciel Visilog (Olympus, IMT-2) (Figure II-4 D). Nous avons ensuite calculé les rapports entre les dimensions obtenues au repos et celles obtenues après déformation.

Une zone d'intérêt a ainsi été déterminée sur la membrane de silicone, où la variation de la déformation de chaque point, selon l'axe transverse à l'étirement, ne dépasse pas 5%. Cette zone représente 80% de la surface centrale de la membrane.

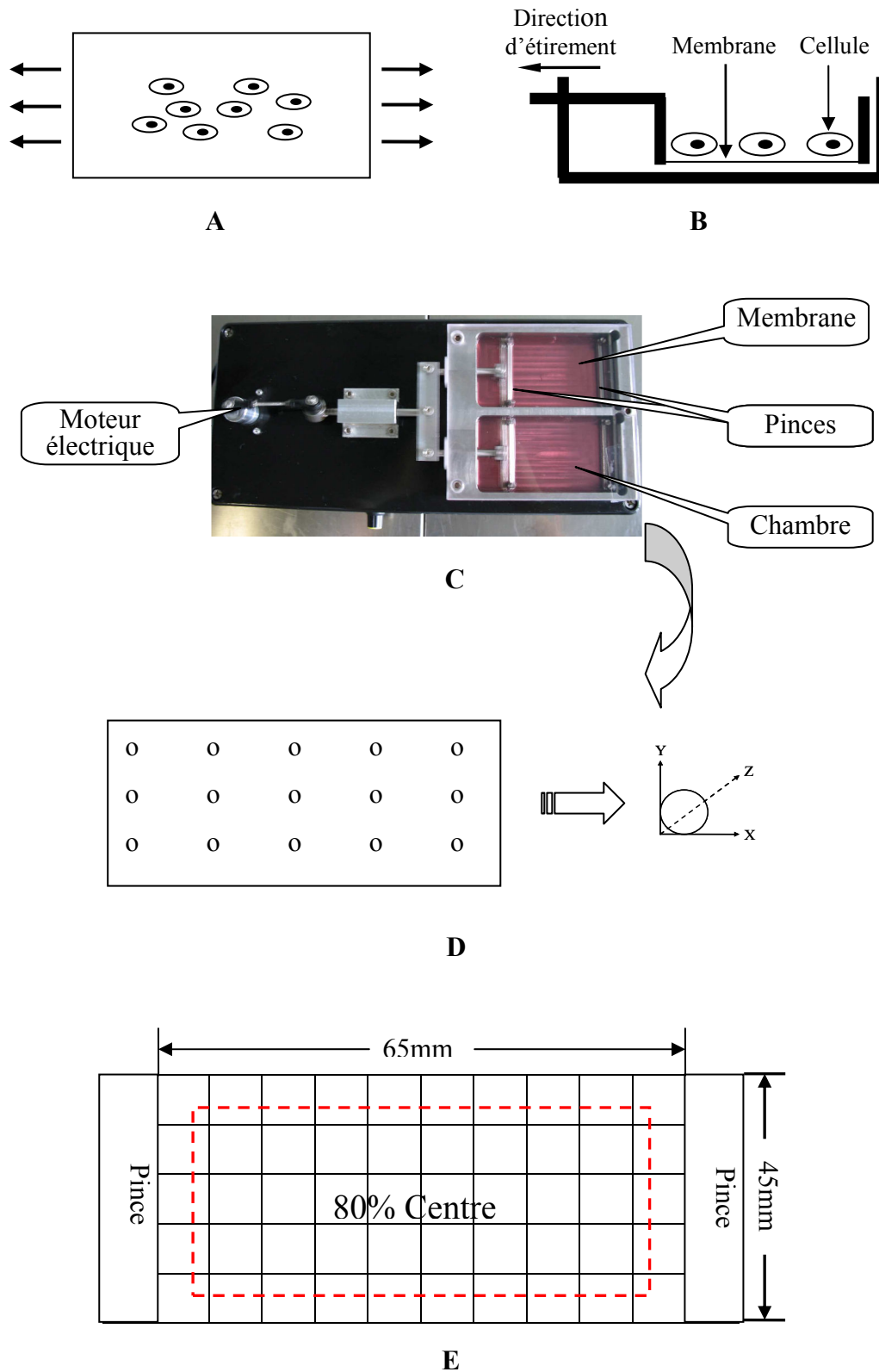


Figure II-4 Schéma de l'appareil d'étirement

A : Vue du dessus ; B : Vue de profil ; C : Appareil d'étirement ; D : Repère sur la membrane de silicone ; E : Zone de déformation homogène.

II.5. METHODOLOGIE ANALYTIQUE

II.5.1. Déformation et orientation cellulaire

L'étude de l'orientation et de la déformation des cellules soumises à un étirement uniaxial cyclique s'est déroulée suivant plusieurs étapes : les CSMM de passage 4 ont été stimulées mécaniquement avec 10% de déformation à 1Hz durée des étirement, puis photographiées pour analyser la déformation et l'orientation des cellules.

Les photos de cellules en culture sur les membranes en silicone après les étirements ainsi que leurs contrôles ont été obtenus à l'aide d'un microscope inversé avec un grossissement de 100 (Olympus, Japon) et une caméra (Motic Images Plus 2.0, Motic China Group Co, China). 9 photos ont été prises à différents endroits de la zone de déformation homogène. Les images obtenues ont été traitées à l'aide d'un programme écrit par notre équipe (M. KAHN) à l'aide du logiciel *MatLab* (version 7.1, MathWorks Inc., USA) et de la Toolbox *Image Processing* (MathWorks Inc., USA).

La détection du contour de la cellule reste semi-automatique, la réalisation d'un seuillage a été nécessaire afin de délimiter le contour des cellules et de supprimer les débris cellulaires en vue d'obtenir des images interprétables. Le programme donne l'orientation angulaire du contour choisi ainsi que sa largeur et sa longueur dans un tableau au format Excel pour l'analyse ultérieure. Un minimum de 100 cellules par membrane a été mesuré.

La déformation cellulaire a été quantifiée par le calcul de l'indice de déformation cellulaire (S : Shape index), qui était défini par la formule de la figure II-5. La moyenne de l'indice de déformation cellulaire de chaque groupe a été calculée afin de comparer avec le contrôle de chaque groupe.

Afin d'analyser l'orientation des cellules, nous avons regroupé les angles par tranches de 10° de 0° à 180°, les pourcentages cellulaires ainsi obtenus dans chaque tranche ont été calculés pour chaque groupe afin de les comparer avec leurs contrôles (Figure II-6).

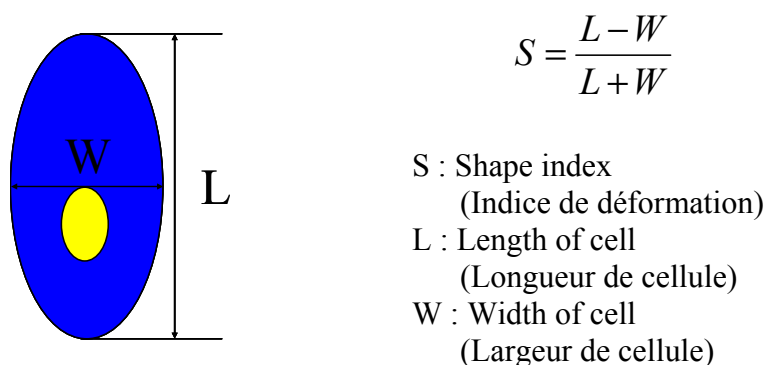


Figure II-5 Méthode de calcul de la déformation cellulaire

La déformation cellulaire a été quantifiée par le calcul de l'indice de déformation cellulaire (S : Shape index). La moyenne de l'indice de déformation cellulaire de chaque groupe a été calculée afin de comparer avec le contrôle de chaque groupe.

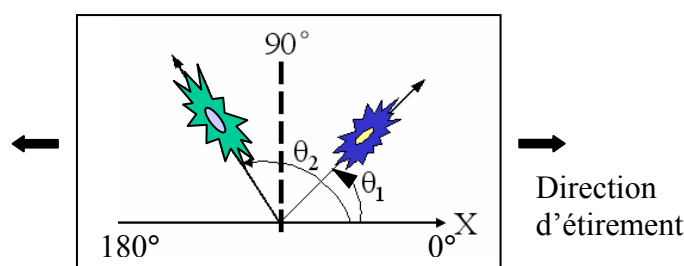


Figure II-6 Mesure de l'orientation cellulaire

Deux cellules sont montrées aux angles θ_1 et θ_2 comme les exemples. Nous avons regroupé les angles par tranches de 10° de 0° à 180°, les pourcentages cellulaires obtenus dans chaque tranche ont été calculés pour chaque groupe afin de les comparer avec leurs contrôles.

II.5.2. Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative en temps réel

II.5.2. 1 Isolation des ARN

Pour appliquer la PCR à l'étude de l'expression des gènes, une étape supplémentaire, précédant l'étape d'amplification, est nécessaire : il s'agit de la conversion des ARNm en ADN, dits ADN complémentaires ou ADNc. Cette étape fait appel à une autre ADN polymérase, la transcriptase inverse ou RT (Reverse Transcriptase).

Les CSMM de passage 1 à passage 6, les fibroblastes ligamentaires à passage 4, et les CSMM en co-culture et leurs contrôles, ainsi que les CSMM sollicitées mécaniquement et leurs

contrôles étaient rincées avec du PBS et traitées à l'aide du réactif Trizol (Réf.15596, Invitrogen, USA) pour extraire les ARN. Les lysats cellulaires ont été homogénéisés avec une pipette. Les échantillons étaient incubés à température ambiante pendant 10min, puis 1mL de lysat a été transféré dans un microtube de 1,5mL et 0,2mL de chloroforme (Réf. C2432, Sigma, France) a ensuite été ajoutés, les tubes étaient vigoureusement secoués pendant 15s et incubés à température ambiante pendant 2min. Ensuite, les échantillons étaient centrifugés à 4°C à 12000g pendant 15min. Après centrifugation le mélange était décomposé en 3 phases :

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

La phase aqueuse contenant l'ARN était transférée dans un nouveau tube de 1,5mL sans nucléase. 0,5mL d'isopropanol (Réf. 278475, Aldrich, France) était ajouté et agité doucement par retournement du tube, les échantillons étaient incubés à température ambiante pendant 10min et centrifugés à 4°C à 12000g pendant 10min. Le surnageant était éliminé, puis 1mL d'éthanol à 75° préparé avec de l'eau traitée par diéthypyrocarbonate (DEPC-H₂O, Réf. 750024, Invitrogen, France) était ajouté, ensuite, les tubes étaient centrifugés à 4°C à 7500g pendant 5min et retournés doucement pour éliminer le surnageant. Le culot était séché à l'air pendant 10min et 50µL de DEPC-H₂O était ajoutés. Enfin, les échantillons étaient incubés à 56°C pendant 10min et plongés tout de suite dans de la glace à 0°C. 5µL de la solution d'ARN étaient prélevés pour mesurer sa concentration et sa pureté par spectrophotométrie. Le reste était subséquemment utilisé pour la RT-PCR ou stocké à -80°C.

II.5.2. 2 Mesure de la concentration et de la pureté de l'ARN

Le rapport des absorbances à 260nm et 280nm (A_{260}/A_{280}) nous renseigne sur la pureté en ARN de la solution. La densité optique à 280nm reflète la quantité de protéines contaminantes présentes dans l'ARN total extrait. Celle à 260nm est spécifique des acides nucléiques. Le rapport A_{260}/A_{280} atteste de la qualité de l'ARN, s'il est compris entre 1,8 et 2,0, la pureté de l'ARN est élevée, s'il est supérieur à 2,2, l'ARN est contaminé par des sels, s'il est inférieur à 1,6, l'ARN est contaminé par des protéines. Pour les autres valeurs du rapport A_{260}/A_{280} , l'ARN est moins pur, mais reste acceptable.

La concentration des ARN était déterminée par la mesure de la densité optique (DO) à 260nm sur un spectrophotomètre (DU 600, Beckman, USA) selon la formule ci-dessous :

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

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

II.5.2. 3 Préparation de l'ADNc (RT)

L'étape de transcription inverse était effectuée à l'aide d'un kit de synthèse d'ADN, iScript cDNA Synthesis Kit (Réf. 170-8891, BioRad, USA). Les mélanges des échantillons étaient préparés dans des tubes de 20 μL sans nucléase (Réf. 223-9473, BioRad, USA) dans de la glace à 0°C avec les proportions ci-dessous :

5x iScript™ Reaction Mix cDNA Synthesis	4 μL
iScript Reverse Transcriptase	1 μL
Nuclease –Free water	4 μL
Échantillon d'ARN	2 μL
DEPC-H ₂ O	9 μL
Volume total	20μL

Les tubes étaient placés dans un thermocycleur MyCycler™ (Réf. 578BR 0159, BioRad, USA) précédé d'une centrifugation éphémère. Les échantillons d'ARN étaient alors transcrits en ADNc par incubations successives : 5min à 25°C, 30 min à 42°C et 5min à 85°C. L'ADNc ainsi obtenu était stocké à -20°C et/ou utilisé lors de la phase d'amplification (PCR).

II.5.2. 4 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'étude quantitative de l'expression des gènes de collagènes de type I et III, et de la ténascine-C (TNC) par les cellules ayant subi différents traitements a été exécutée grâce à un thermocycleur (LightCycler, Roche, Allemagne) et un kit SYBR GREEN I (Réf.12158817, Roche, Allemagne). Le gène de glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été pris comme étalon interne pour normer les résultats. Les conditions de PCR ont été optimisées pour chaque paire d'amorces.

Dans un premier temps, les échantillons étaient préparés dans des capillaires (Réf.11909339, Roche, Allemagne) dans un mélange final de 20µL comme suit :

DEPC-H ₂ O	10,8µL
25mM MgCl ₂	1,2µL
LightCycler DNA Master SYBR Green I	2µL
5µM amorce	2µL
5µM amorce anti-sense	2µL
ADNc	2µL
Volume Total	20µL

Puis, les capillaires étaient centrifugés à 700g pendant 5s et placés dans un carrousel d'échantillons de Lightcycler préparé à 4°C. Le programme sur le thermocycleur se compose d'une étape de dénaturation de l'ADN, d'une hybridation des amorces et d'une élongation. Après l'étape de dénaturation qui dure 8min à 95°C, l'amplification se déroule sur 45 cycles, la température d'hybridation et la durée dépendent de la taille des fragments d'amorce utilisés. Le programme de PCR quantitative en temps réel pour chaque gène est montré dans le tableau II-2. L'étape suivante qui dure 15min à 65°C permet à la polymérase de terminer les amplifications en cours. A la fin, une analyse du profil de la température de fusion (T_m) a été effectuée afin de s'assurer de la pureté du gène amplifié.

Les courbes standards de ces 4 gènes ont été réalisées par dilutions successives des échantillons d'un facteur (collagène I : 10, collagène III : 10, Ténascine-C : 2, GAPDH : 4) selon les caractères des gènes avant l'analyse des échantillons.

Tableau II-2 Séquences d'amorces et conditions pour PCR en temps réel

Gène	Séquence d'amorce	Taille (bp)	Hybridation		Élongation
			T (°C)	Temps (S)	Temps (S)
Collagène I (Waggett et al., 1998)	Sens: 5'-CCCACCCCAGCCGCAAAGAGT-3'	352	51	5	15
	Antisens: 5'-TTGGGTCCCTCGACTCCTACA-3'				
Collagène III (Lavaud et al., 2001)	Sens: 5'-TGCCCACAGCCTTCTACACCT-3'	244	58	5	10
	Anti-sens: 5'-CAGCCATTCTCCCACTCCAG-3'				
Ténascine-C (Shen Jie, 2001)	Sens: 5'-CAGAAGCTGAACCGGAAGTTG-3'	278	55	10	11
	Anti-sens: 5'-GGCTGTTGTTGCTATGGCQCT-3'				
GAPDH (Ando et al., 1995)	Sens: 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'	308	55	10	12
	Anti-sens: 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'				

II.5.2. 5 Electrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose

En milieu basique, les fragments d'ADN ont été chargés négativement. Placés dans un champ électrique, ils vont donc se déplacer de la cathode vers l'anode, mais, leurs charges respectives étant à peu près équivalentes, c'est leur masse moléculaire qui va régler leur vitesse de déplacement dans le gel d'agarose. Plus les fragments sont petits, plus ils vont migrer rapidement vers l'anode.

Dans notre manipulation, 1,2g d'agarose (Réf. A9539, Sigma, USA) ont été dissous dans 60mL de tampon d'électrophorèse TEB 0,5× (Réf.161-0733, BioRad, USA) en chauffant jusqu'à ce que la solution devienne transparente (environ 30min, à 100°C). Puis, la solution était refroidie jusqu'à atteindre la température de 60°C. La solution de gel était alors transférée dans une boîte dans laquelle un peigne était placé. Lorsque le gel était refroidi (environ 30min), le peigne était retiré formant ainsi des puits pour charger les échantillons d'ADN.

Pour préparer les échantillons à charger, nous avons mélangé 8µL de solution d'ADN après PCR dans chaque capillaire avec 2µL de tampon de charge 5× (Réf.161-0767, BioRad, USA) dans les puits du gel d'agarose. Afin d'estimer la taille des fragments, 2µL d'échelle de

taille (DNA Ladder, Réf. 15628-019, Invitrogen, USA) ont été ajoutés dans l'un des puits. La migration s'est effectuée à 100V pendant 90min dans du tampon d'électrophorèse TEB. Puis le gel a été pigmenté en le plongeant dans une solution de bromure d'éthidium à 0,5µg/mL pendant 30min. Les bandes ont alors été observées et photographiées sous UV ($\lambda=365\text{nm}$) (Réf. GS-2000, Bio-Rad, USA).

II.5.3. Radioimmunoanalyse (RIA)

II.5.3. 1 Principe

La radioimmunoanalyse est une méthode rapide et sûre employée pour la détermination de la concentration d'hormones, de protéines spécifiques et de médiateurs dans le sang ou les liquides biologiques en utilisant une méthode combinant l'immunologie anticorps-antigène et la radioactivité gamma. Le principe de la RIA est quasiment le même que celui de la méthode ELISA (Analyse Enzyme-liée d'ImmunoSorbant). Les deux méthodes, RIA et ELISA, utilisent un anticorps qui se fixe sur un antigène cible, la différence entre elles consiste dans le choix de l'anticorps secondaire qui soit est radioactif (RIA), soit contient une enzyme que l'on peut pigmenter. Pour la méthode RIA, l'étiquetage radioactif utilisé est habituellement ^3H ou ^{125}I . L'anticorps de capture non étiqueté est fixé sur la plaque de test, qui se combinera avec la protéine d'intérêt des échantillons encore appelé antigène. Puis, l'anticorps étiqueté radioactivement est ajouté et se lie à l'antigène qui est lié avec l'anticorps de capture. Il faut s'assurer à chaque étape que l'anticorps ne se fixe que sur l'antigène spécifique en saturant les autres liens non-spécifiques. Une gamme étalon est aussi fournie pour calculer la concentration d'échantillons en fonction de l'intensité radioactive, la quantité initiale de la protéine d'intérêt est ainsi obtenue (Figure II-7).

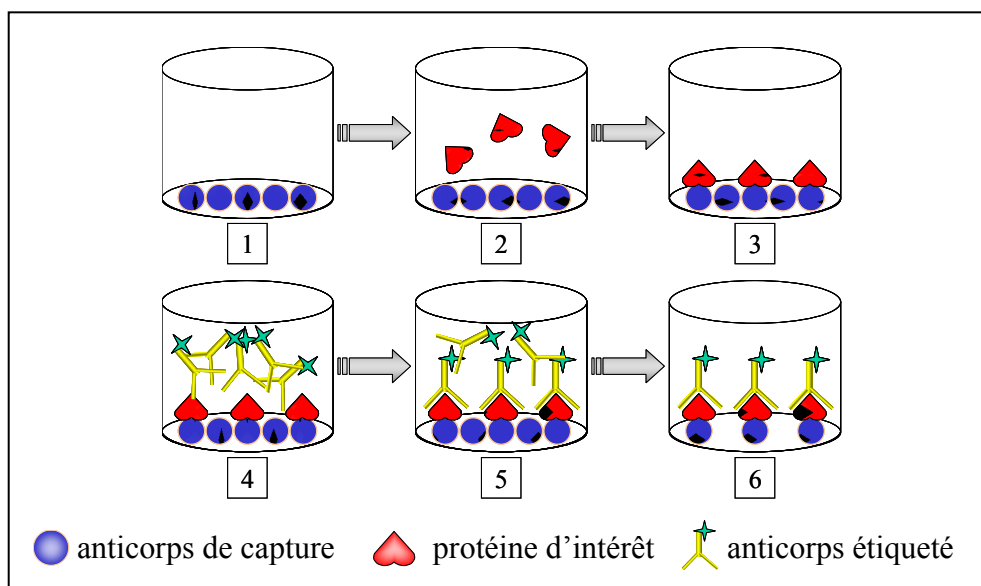


Figure II-7 Schéma de radioimmunoanalyse

1 : Une surface est préparée avec d'un anticorps dit capture ; 2 : L'échantillon contenant l'antigène est appliqué à la plaque ; 3 : La plaque est rincée, de façon à éliminer l'antigène non-lié ; 4 : Les anticorps étiquetés radioactivement sont ajoutés ; 5 : Les anticorps étiquetés spécifiques se lient avec les protéines d'intérêt ; 6 : La plaque est rincée une seconde fois.

II.5.3. 2 Préparation des échantillons

Les échantillons et leurs contrôles ont été rincés deux fois avec du PBS à 4°C. Puis les cellules ont immédiatement été broyées à 4°C dans 1mL de solution de lyse contenu :

- 50mL de Tris-HCl, pH 8,0
- 150mL de NaCl
- 0,1% de Nonidet P-40 (Fluka 56741)
- 0,25% d'inhibiteur de protéinase en tablette (protease inhibitor cocktail tablets Complete Mini, Roche, 1836153, Allemagne).

La concentration de protéines totales dans les échantillons a été mesurée en utilisant un kit de test de protéines (DC protein assay kit II, Réf. 500-0112, BioRad, USA) en suivant les instructions du fabricant et un spectrophotomètre (Ultramark Microplate System 680, Bio Rad, USA) pour détecter la densité optique à 280nm qui reflète la quantité de protéines. Nous avons ainsi réglé la concentration de protéines totales dans chaque échantillon à 100µg/mL.

A la fin, les doses de collagènes type I et type III dans les échantillons ont été analysées à l'aide de deux kits de radioimmunoanalyse : Intact N-terminal propeptide of type I procollagen Radioimmunoassay kit (Réf. 67034, Orion Diagnostica, Finlande) et Intact N-terminal

propeptide of type III procollagen Radioimmunoassay kit (Réf. 68570, Orion Diagnostica, Finlande) ont respectivement été utilisés selon les instructions du fabricant qui se réalisent en plusieurs étapes. Dans un premier temps, les échantillons étaient ajoutés sur des plaques de 96 puits fournies dans le kit et incubés à 37°C pendant 20min. Après un rinçage, l'anticorps de détection étiqueté radioactivement était additionné en présence d'albumine de sérum de boeuf (BSA, Réf. A9647, Sigma, USA) à 1% pour éliminer les liaisons non-spécifiques. Puis, les échantillons étaient incubés pendant 30min à 4°C et lavés afin d'éliminer les anticorps étiquetés radioactivement non liés aux collagènes. Finalement, les plaques étaient analysées à l'aide d'une machine de radioimmunoanalyse (XH-6010A, Xi'An 262 Chang, Chine).

II.5.4. Immunocytochimie (ICC)

II.5.4. 1 Principe

L'immunocytochimie est une technique fondée sur l'immunomarquage direct ou indirect, qui permet à la fois de détecter le nombre des différentes molécules et d'être utilisé comme un traceur cellulaire.

Le principe de cette technique est illustré dans la figure II-8. Le peptide ou la protéine à mettre en évidence va être reconnu par un anticorps spécifique. Cet anticorps peut être directement porteur du marqueur enzymatique, ou bien il est lui-même à son tour reconnu par un anticorps secondaire dirigé contre les anticorps de l'animal qui a servi à produire l'anticorps primaire et qui est dans le même temps conjugué à une enzyme, le plus souvent la peroxydase ou la phosphatase alcaline. La révélation se fait alors à l'aide d'un substrat de l'enzyme. Les enzymes les plus couramment utilisées sont la peroxydase ou la phosphatase alcaline qui sont respectivement combinées avec l'amino-éthyl carbazol ou la diaminobenzidine et le système NBT-BCIP pour pigmenter. En laboratoire, l'immunocytochimie est souvent employée sur des cellules en monocouche fixées et montées sur lame.

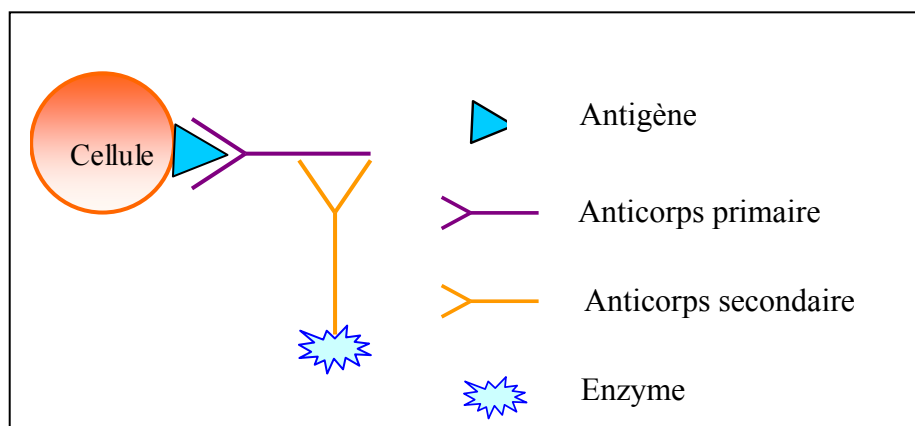


Figure II-8 Principe de l'immunocytochimie indirecte

Des molécules exprimées à la surface cellulaire ou à l'intérieur des cellules peuvent être reconnues par des anticorps (Ac) spécifiques (Ac primaire reconnaissant spécifiquement la molécule étudiée). La reconnaissance des Ac primaires est effectuée en utilisant des Ac secondaires conjugués à une enzyme qui peut être pigmentée.

II.5.4. 2 Préparation des échantillons

Les CSMM sur les membranes ou dans les puits étaient rincées avec du PBS, puis fixées avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 10min, ensuite elles étaient rincées deux fois avec du PBS et, pour perméabiliser les cellules, elles étaient recouvertes par du triton X-100 à 0,1% pendant 2min. Les membranes étaient alors collées sur des lamelles 1×25×75mm (Réf. 48312-002, VWR, Allemagne) à l'aide d'une résine époxy (Réf. 31185, Sigma, USA). Les lamelles étaient alors plongées dans une solution de PBS contenant 1% de BSA pendant 10min, puis elles étaient mises en présence des anticorps primaires, lapin IgG1 anti-collagène type I (dilution à 1:100, Réf. BA0325, Bo Shi De Co, Chine) et lapin anti-collagène type III (dilution à 1:100, Réf. BA0326, Bo Shi De Co, Chine), et à nouveau plongées dans du BSA à 1% à température ambiante pendant 40min. L'anticorps lapin IgG1 était aussi utilisé comme contrôle négatif. Deux nouveaux lavages étaient effectués avant de mettre les échantillons en présence de l'anticorps secondaire, chèvre anti-lapin IgG conjugué avec la peroxydase horseradish (dilution à 1:100, Réf. SA1022, Bo Shi De Co, Chine) pendant 30min à température ambiante. Après un nouveau rinçage avec de l'eau distillée, la pigmentation était effectuée à l'aide d'un kit (DAB kit, Réf. ZL1-9032, Zhong Shan Co., Chine). Les échantillons étaient éclairés avec du xylène et couverts par une lamelle de couverture. Les collagènes ont été ainsi pigmentés en jaune brun. Un microscope optique et une caméra étaient alors utilisés pour observer et photographier les cellules.

II.5.5. Microscopie confocale à balayage laser

Afin d'étudier la relation entre l'adhésion et la disposition des fibres de F-actine, qui est une protéine du cytosquelette, en fonction d'un étirement uniaxial, un double marquage a été effectué selon la méthode décrite ci-dessous.

Le marquage de la F-actine a été réalisé en présence de phalloïdine, une toxine trouvée dans l'amanite phalloïde, conjugué avec l'Alexa 488. Les CSMM sur des membranes de silicone après des étirements cycliques, ainsi que leurs contrôles étaient rincés avec du DMEM sans rouge de phénol (Réf. 11885, Gibco, France) à 37°C, puis fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 1% à 4°C pendant 10min. Ensuite, les membranes étaient rincées avec du PBS et coupées en carré de 1mm². Un double marquage du cytosquelette était alors effectué sur une plaque de 24 puits. Les cellules étaient d'abord perméabilisées avec du Triton X-100 à 0,1% pendant 2min suivi de deux rinçages au PBS. Une incubation avec de la phalloïdine-Alexa 488 ($\lambda_{\text{excitation}}=488\text{nm}$, $\lambda_{\text{émission}}=519\text{nm}$) (Réf. A-12379, Molecular Probes, USA) dilué à 1 :100 dans du PBS avec du triton X-100 à 0,1% pendant 20min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les échantillons étaient ensuite rincés avec du tampon PBS à pH 7,2.

Le marquage des noyaux a été réalisé en présence d'une solution de DAPI ($\lambda_{\text{excitation}}=416\text{nm}$, $\lambda_{\text{émission}}=359\text{nm}$) (Réf., D-3571, Molecular Probes, USA) diluée 200 fois dans du PBS pendant 5min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Enfin, les échantillons ont été ensuite rincés avec du tampon PBS à pH 7,2 et recouverts par de la glycérine à 20% et fixés entre deux lamelles (0,17×24×60mm, HangZhou Medical Supplies, Chine) à l'aide d'une résine époxy. Les images ont été réalisées sous microscope confocal (LSM Microsystem Zeiss, Leica, Allemagne) et traitées à l'aide du logiciel Image-pro plus 4.5 (Media Cybernetics Inc., USA). Les valeurs moyennes de l'intensité de fluorescence verte ont été mesurées dans chaque échantillon.

II.6. Analyse Statistique

Les données ont été présentées de la façon suivante : moyenne±écart-type. Les différences statistiques entre les groupes d'expériences ont été analysées par la méthode ANOVA. Un test de Student-Fischer a été effectué avec un intervalle de confiance de 95% bilatéral afin de déterminer la significativité statistique.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. PHENOTYPE DES CSMM

Il est essentiel de contrôler le phénotype des cellules selon les protocoles en usage dans les Unités de Thérapie Cellulaire agréées, d'après la législation en vigueur. De nombreux articles ont été consacrés aux cellules souches mésenchymateuses (Bianco and Gehron Robey, 2000; Majumdar et al., 1998; Owen, 1988; Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997). Il est affirmé que la propriété d'adhésion au plastique n'est pas suffisante pour identifier de manière certaine une population de CSMM purifiées et que plusieurs méthodes sont nécessaires dans la tâche de l'identification et le contrôle de qualités (Bianco and Gehron Robey, 2000; Guo et al., 2001; Pittenger et al., 1999). Nous avons donc eu recours à trois méthodes pour analyser le phénotype des CSMM : l'observation morphologique des cellules au MEB et au MET, le suivi de 4 marqueurs spécifiques des CSMM par cytométrie en flux, et la différenciation des CSMM en ostéoblastes et en adipocytes pour vérifier leur état fonctionnel.

III.1.1. Aspects microscopiques des CSMM

III.1.1. 1 Observation par microscope optique inversé

Après prélèvement, les cellules ont été mises en culture. Nous avons observé deux grands groupes de cellules : l'une adhérente sur le fond des boîtes de culture et l'autre formée de cellules rondes et flottantes. Les cellules rondes et flottantes disparaissaient au fur et à mesure des changements du milieu de culture, alors que les cellules adhérentes aux boîtes se multipliaient. Dès le 5^{ème} jour, ces dernières cellules ont été observées au microscope optique, elles ont une forme triangulaire ou fuselée; cette morphologie est semblable à celle des fibroblastes. Au 10^{ème} jour, les cellules ressemblaient à de longues cellules fibroblastiques et commençaient à former des colonies. Environ 14 jours après l'ensemencement initial, les cellules arrivaient complètement à confluence et la première subculture était effectuée (Figure III-1). Leurs qualités d'adhésion et de morphologie étaient conformes à celle des CSMM.

De même, les cellules humaines présentaient une morphologie semblable aux fibroblastes, mais il semble qu'elles étaient plus allongées et qu'elles se multipliaient plus lentement que les CSMM du rat. De plus, elles paraissaient plus organisées soit de façon parallèle, soit de façon tourbillonnante que les cellules du rat. La première confluence des CSMM humaines était souvent observée à 21 jours après le prélèvement (Figure III-2).

Après trois ou quatre subcultures, les cellules devenaient de plus en plus uniformes et ordonnées.

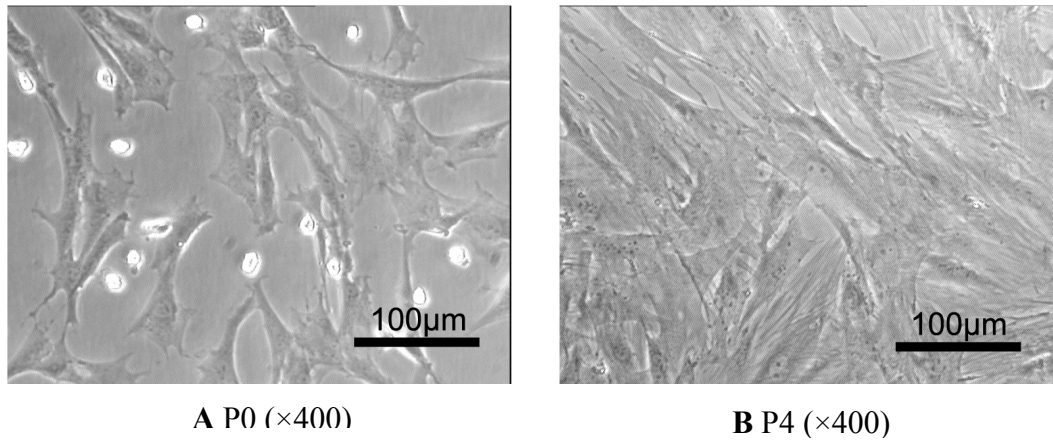


Figure III-1 Cellules souches mésenchymateuses médullaires du rat

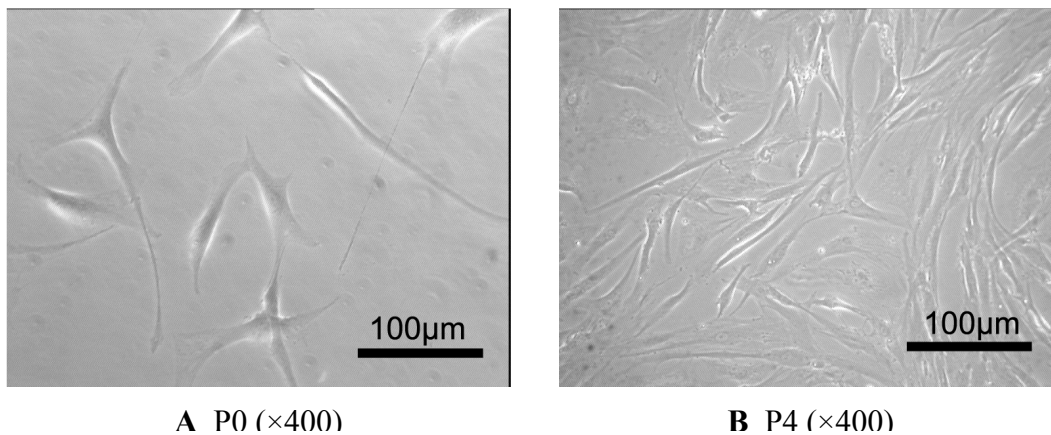


Figure III-2 Cellules souches mésenchymateuses médullaires humaines

III.1.1. 2 Observation par microscope électronique à balayage (MEB)

L'observation de cellules au MEB a montré qu'elles présentaient une morphologie polygonale ou triangulaire de type fibroblastique. Nous avons observé des cellules ayant un certain relief et d'autres plus plates. Les cellules en relief présentaient beaucoup de cils et de lamellipodes, leur bordure étant moins épaisse. De plus, nous avons pu observer des communications de stroma (Figure III-3A). Les cellules plus plates présentaient, quant à elles, peu de cils et de lamellipodes avec des bordures cellulaires épaisses (Figure III-3B).

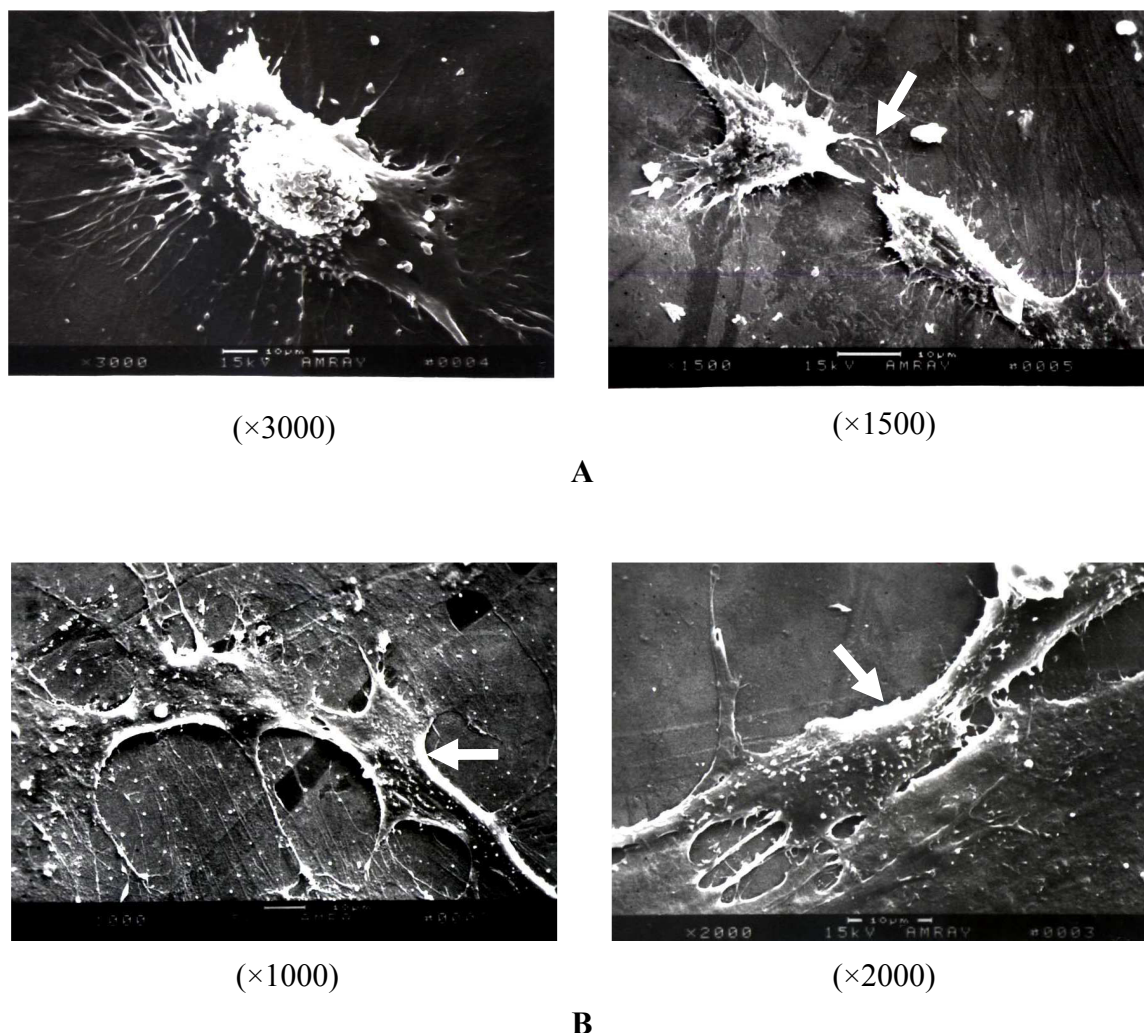


Figure III-3 Images de MEB des CSMM humaines à passage 4

A : Cellules dans la phase G1 ; B : Cellules dans la phase S

Les cellules présentent une morphologie polygonale ou triangulaire de type fibroblastique, ayant un certain relief (A) et d'autres plus plates (B). Les cellules en relief présentent beaucoup de cils et de lamellipodes, leur bordure étant moins épaisse. De plus, les communications de stroma (Voir la flèche de la figure A) peuvent être observées. Les cellules plus plates présentent, quant à elles, peu de cils et de lamellipodes avec des bordures cellulaires épaisses (Voir les flèches de la figure B).

II.1.1. 3 Observation par microscope électronique en transmission (MET)

Les photos de MET indiquent que les cellules présentaient des caractères communs aux cellules souches. En effet, elles avaient de grands noyaux avec des chromosomes abondants, un cytoplasme cellulaire relativement moins développé. Toutefois, nous avons remarqué un plus grand nombre de mitochondries dans le cytoplasme ainsi qu'un réticulum endoplasmique granuleux et un appareil de Golgi plus développé.

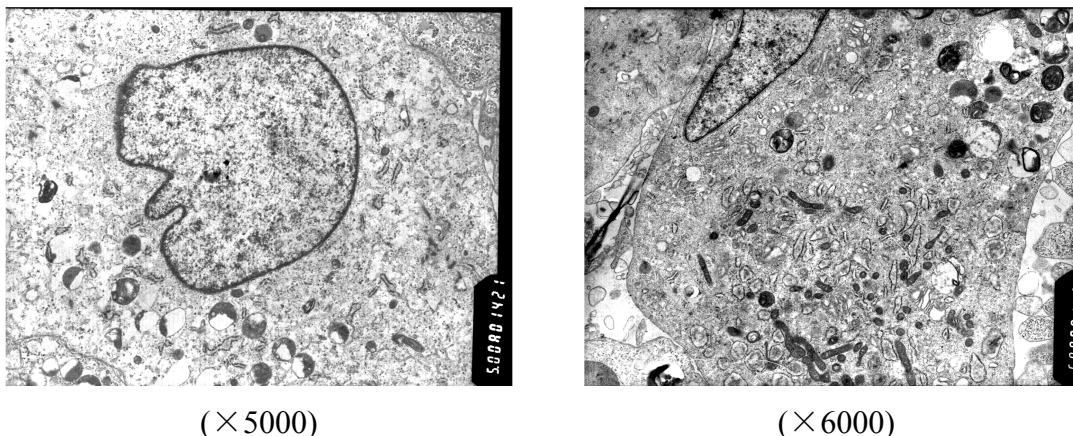


Figure III-4 Images de MET de CSMM humaines à passage 4

Les cellules ont de grands noyaux avec des chromosomes abondants et un cytoplasme cellulaire relativement moins développé. Toutefois, un plus grand nombre de mitochondries dans le cytoplasme a été remarqué ainsi qu'un réticulum endoplasmique granuleux et un appareil de Golgi plus développé.

III.1.2. Etude de l'expression des marqueurs des CSMM de rat

La technique de cytométrie en flux a été utilisée pour déterminer l'expression des marqueurs des CSMM. Les cellules ont été marquées par des anticorps directs fluorescents, souris anti-rat CD90, CD44, CD34 et CD45. Cette technique repose sur la mesure de l'expression de marqueurs de surface caractérisant les CSMM : CD90 et CD44, et par l'absence de marqueurs de surface caractérisant les cellules souches hématopoïétiques : CD34 et CD45.

La figure III-5 montre des exemples graphiques obtenus dans l'analyse cytométrique en flux de CSMM du rat à passage 4. Dans chaque graphique, l'ordonnée est le nombre d'événements et l'abscisse est l'intensité de fluorescence. Le seuil de positivité est arbitrairement fixé à la zone M1, c'est-à-dire que si l'intensité de fluorescence des cellules dépasse le seuil de positivité, ces cellules expriment positivement le marqueur. La figure III-5A est un contrôle négatif qui permet de déterminer le seuil de positivité (M1). Dans les figures III-5B et C (CD90 et CD44), les populations cellulaires se situent dans la zone M1, elles expriment donc positivement CD90 et CD44. Cependant, pour les figures III-5D et E (CD34 et CD45), les populations cellulaires se situent sous le seuil de positivité, elles n'expriment donc pas CD34 et CD45.

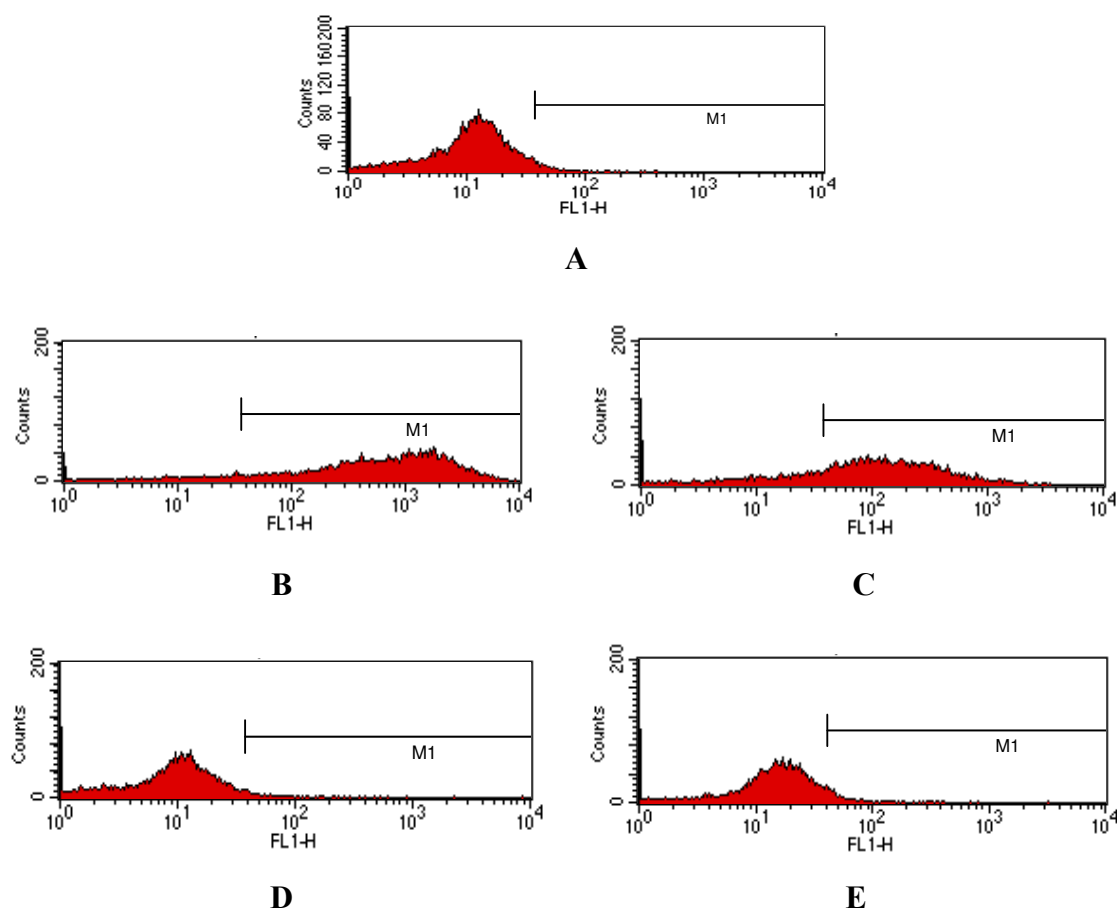


Figure III-5 Exemples graphiques de cytométrie en flux de CSMM du rat (P4)

A : Contrôle Négatif ; B : CD90 ; C : CD44 ; D : CD34 ; E : CD45

La figure III-6 et le tableau III-1 présentent les résultats statistiques (n=6) des expressions des quatre marqueurs obtenus par cytométrie en flux en fonction du temps. Les cellules du rat cultivées ont positivement exprimé CD90 et CD44 et ont négativement exprimé CD34 quel que soit le passage. Par contre, il y a environ 40% des cellules qui exprimaient le marqueur CD45 aux premier et deuxième passages, puis elles l'ont négativement exprimé dès passage 3. L'identification des cellules en fonction du temps montre que le pourcentage des cellules CD44 positif et CD45 négatif ont augmenté dès passage 3. Plus de 80% des cellules que nous avons obtenues exprimaient de façon stable positivement CD90 et CD44, mais négativement CD34 et CD45 dès passage 3. Nous en concluons alors que nos cellules du rat étaient des CSMM avec une pureté satisfaisante dès passage 3.

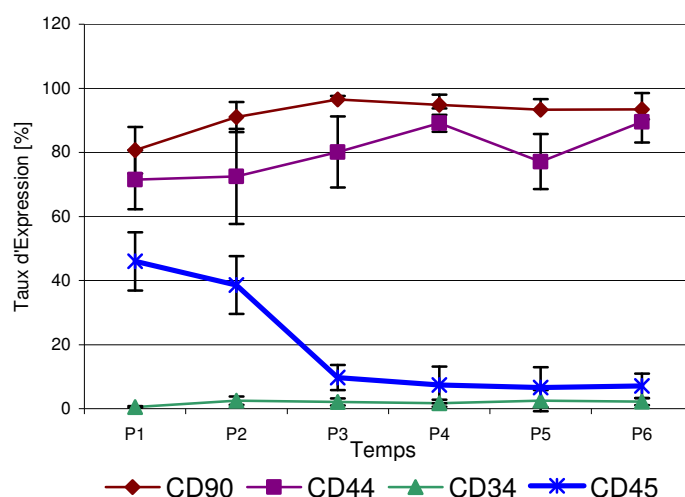


Figure III-6 Expressions des marqueurs des CSMM du rat de passage 1 à passage 6 analysés par cytométrie en flux (n=6)

Les cellules du rat cultivées ont positivement exprimé CD90 et CD44 et ont négativement exprimé CD34 quel que soit le passage. Par contre, il y a environ 40% des cellules qui exprimaient le marqueur CD45 aux premier et deuxième passages, puis elles l'ont négativement exprimé dès passage 3.

Tableau III-1 Marqueurs exprimés par les CSMM du rat de passage 1 à passage 6 analysés par cytométrie en flux (n=6)

Passage (P)	Pourcentage de cellules positives ($\pm ET\%$)			
	CD90	CD44	CD34	CD45
P1	80,7 $\pm$ 7,2	71,4 $\pm$ 9,2	0,5 $\pm$ 0,2	46,0 $\pm$ 9,0
P2	91,0 $\pm$ 4,7	72,5 $\pm$ 14,8	2,5 $\pm$ 1,3	38,6 $\pm$ 9,0
P3	96,5 $\pm$ 1,1	80,1 $\pm$ 11,1	2,1 $\pm$ 1,1	9,7 $\pm$ 3,9
P4	94,9 $\pm$ 3,2	89,1 $\pm$ 2,7	1,7 $\pm$ 1,1	7,4 $\pm$ 5,7
P5	93,5 $\pm$ 5,1	77,1 $\pm$ 8,6	2,5 $\pm$ 1,3	6,7 $\pm$ 6,2
P6	93,5 $\pm$ 5,1	89,6 $\pm$ 6,4	2,2 $\pm$ 1,1	7,1 $\pm$ 3,8

III.1.3. Etude de l'expression des marqueurs des CSMM humaines

Les cellules humaines à passage 4 ont été marquées par des anticorps directs fluorescents, souris anti-humain CD44, CD34 et CD45. La figure III-7 est un exemple de graphiques obtenus lors de l'analyse par cytométrie en flux des cellules humaines à passage 4 : les courbes jaunes sont les courbes des contrôles négatifs, les courbes orange, verte et rose présentent respectivement les expressions de CD44, CD34 et CD45 par les CSMM humaines. Les pourcentages des cellules exprimant positivement CD44, CD34 et CD45 étaient

respectivement $90,7 \pm 2,2\%$, $1,5 \pm 0,1\%$ et $1,3 \pm 0,1\%$ (Figure III-8). Nous en concluons donc que plus de 90% des cellules que nous avons obtenues étaient les CSMM humaines.

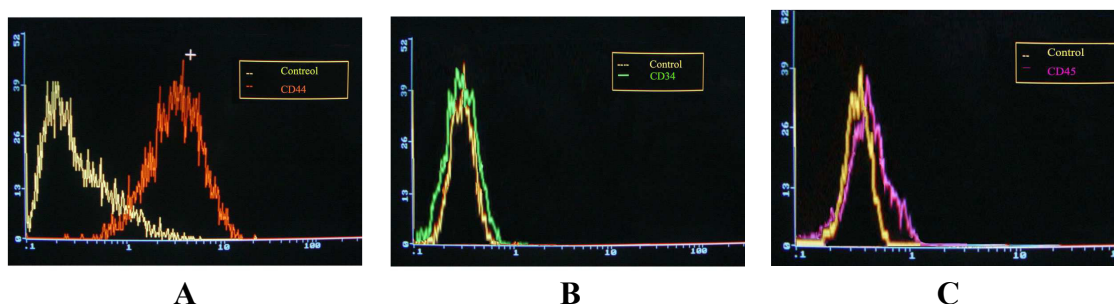


Figure III-7 Exemples de graphiques de cytométrie en flux de CSMM humaines à passage 4

A : CD44; B : CD34; C : CD45

Un exemple de graphiques obtenus dans l'analyse par cytométrie en flux des cellules humaines à passage 4 : les courbes jaunes sont les courbes des contrôles négatifs, les courbes orange, verte et rose présentent respectivement les expressions de CD44, CD34 et CD45 par les CSMM humaines.

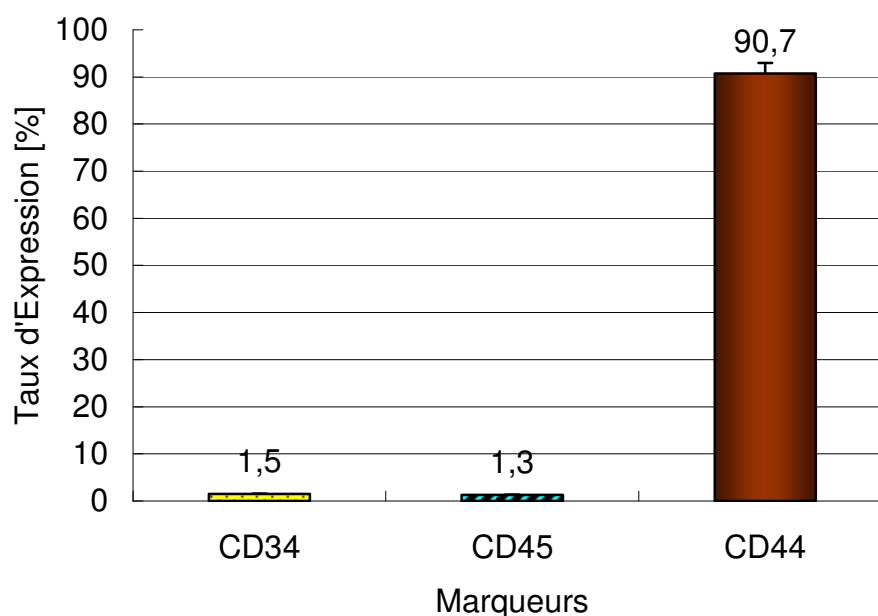


Figure III-8 Expressions des marqueurs par les CSMM humaines analysés par cytométrie en flux (P4, n=3)

Les pourcentages des cellules exprimant positivement CD44, CD34 et CD45 sont respectivement $90,7 \pm 2,2\%$, $1,5 \pm 0,1\%$ et $1,3 \pm 0,1\%$

III.1.4. Différenciation des CSMM en ostéoblastes

Après 14 jours de différenciation des CSMM à passage 4 en ostéoblastes dans un milieu conditionnel (le milieu de culture α -MEM complété par 10^{-7} M de dexaméthasone, 50 μ g/mL d'acide ascorbique et 10mM de β -glycérophosphate), deux méthodes de colorations sélectives, von Kossa et le rouge d'alizarine, ont été appliquées pour mettre en évidence le dépôt de calcium. L'image de la coloration de von Kossa montre que les dépôts calciques apparaissent denses, amorphes ou finement granulaires en noir (Figure III-9A). Par contre, la coloration d'alizarine pigmente les dépôts calciques en rouge. Les images de coloration de rouge d'alizarine sont montrées aux figures III-9B et C, les dépôts calciques colorés en rouge ont été observés au microscope optique. Les plus grands dépôts calciques pouvant atteindre un diamètre de 420nm. Ceci prouve que les CSMM obtenues peuvent bien se différencier en ostéoblastes.

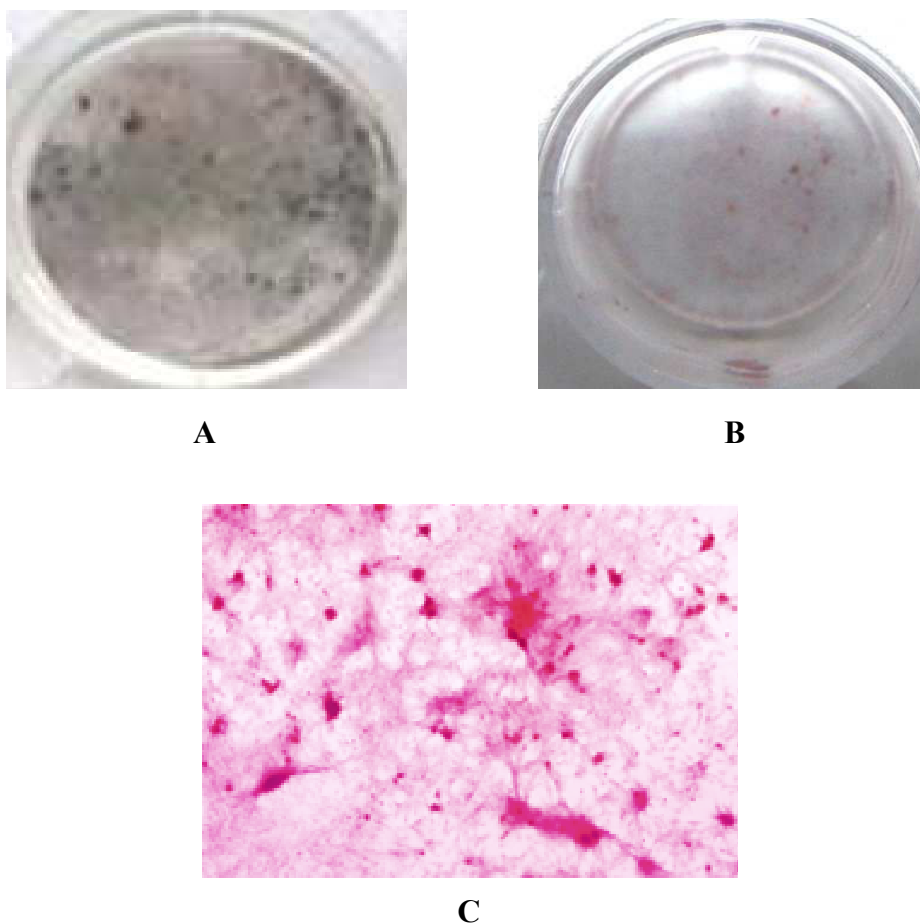


Figure III-9 Images des pigmentations de von Kossa et d'alizarine après différenciation en ostéoblastes des CSMM humaines

A : Pigmentation de von Kossa; B : pigmentation d'alizarine; C : Aspect microscopique avec la pigmentation d'alizarine ($\times 40$).

III.1.5. Différenciation des CSMM en adipocytes

Après 21 jours de différenciation des CSMM en adipocytes dans un milieu spécifique (le milieu de culture α -MEM complété avec 5 μ g/mL d'insuline, 10⁻⁶M dexaméthasone, 10⁻⁴M 1-methyl-3-isobutylxanthine et 6.10⁻⁷M indométacine), les cellules ont changé de forme et sont devenues plus sphériques. L'espace intercellulaire est devenu plus grand et la tendance au détachement cellulaire a été observée pendant la différenciation. Les cellules, dans leur très grande majorité, contenaient une multitude de gouttelettes lipidiques visibles au microscope après coloration par de l'huile rouge O (Figure III-10). La présence de gouttelettes lipidiques témoigne de l'existence de vacuoles lipidiques dans les cellules sous forme de triglycérides. Ces résultats démontrent que les cellules médullaires se sont différenciées en adipocytes.

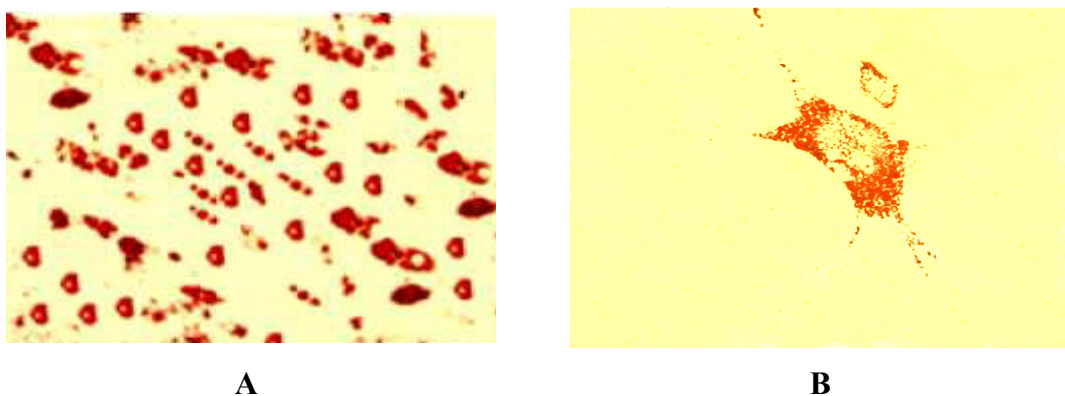


Figure III-10 Images de pigmentation d'huile rouge O après différenciation en adipocytes des CSMM humaines (P4)

A : $\times 100$; B : $\times 400$

III.1.6. Discussion

En 1968, Friedenstein et al. (Friedenstein et al., 1968) fut le premier à découvrir la présence des CSMM dans la moelle osseuse. Depuis, la recherche sur les CSMM a démontré leur capacité à se différencier en de multiples lignées cellulaires telles que les ostéoblastes, les adipocytes, les chondroblastes, les myoblastes, etc... (Ohnishi et al., 2007; Owen, 1988; Short et al., 2003; Sugiki et al., 2007; Zhang et al., 2006). Dernièrement, il a été montré que ces cellules pouvaient également se différencier en hépatocyte (Cantz et al., 2004), en cellule endothéliale (Oswald et al., 2004) et en cellule neuronale (Wenisch et al., 2006).

En la recherche sur les CSMM, les cellules sont généralement issues de la moelle osseuse par aspiration au niveau de la crête iliaque (Digirolamo et al., 1999) mais peut aussi provenir du tibia ou du fémur (Barry, 2003; Miura et al., 2003; Murphy et al., 2002). Malheureusement, les CSMM ne représentent que 0,001 à 0,01% des cellules de la moelle osseuse (Pittenger et al., 1999). Ainsi, il est nécessaire de les isoler et de les enrichir afin d'obtenir des CSMM pures et en grande quantité. Plusieurs techniques sont disponibles comme l'utilisation d'un gradient de densité permettant d'obtenir des densités cellulaires de 10^4 cellules/cm² à 4.10^5 cellules/cm² (Lodie et al., 2002; Pittenger et al., 1999). Une autre technique, la plus utilisée, repose sur la mise en culture de l'ensemble des cellules provenant de la moelle osseuse dans un milieu contenant 10% de sérum (Pittenger et al., 1999). Il est possible aussi de séparer les cellules CD34⁺ et les cellules CD34⁻ par sélection positive immunomagnétique sur un séparateur de cellules où les cellules CD34⁺ sont marquées par micro perle immunomagnétique, puis sélectionnées par un séparateur. Les cellules CD34⁻ sont alors récupérées et cultivées (Van Epps et al., 1994).

Il n'existe pas de méthode parfaite pour identifier le phénotype des CSMM (Boiret et al., 2005; Flores-Figueroa et al., 2005; Jiang et al., 2002). Il est couramment admis que les CSMM peuvent être caractérisées par les trois propriétés suivantes : 1) ces cellules provenant de la moelle osseuse possèdent la puissante capacité à se multiplier et à se renouveler avec une morphologie fibroblastique ; 2) elles expriment positivement au moins un marqueur des marqueurs spécifiques CD6, CD10, CD29, CD44, CD49a, CD73, CD90, CD106, CD166, STRO-1, SH3, SH4, Thy-1, Muc18/CD146, et SB-10. Simultanément, elles n'expriment pas au moins deux marqueurs parmi les marqueurs de cellules hématopoïétiques : CD45, CD34, CD11b etc... 3) elles peuvent se différencier en de nombreuses lignes cellulaires de tissus conjonctifs (Bianco and Gehron Robey, 2000; Guo et al., 2001).

L'étude de Barry F.P. et al. (Barry and Murphy, 2004) a montré que seules les cellules possédant une morphologie fibroblastique et capables d'adhérer au support de culture sont des CSMM. Nous avons donc observé les cellules que nous avons obtenues aux microscopes optique, électronique à balayage et à transmission. Les faits que les cellules présentaient des morphologies polygonale ou triangulaire de type fibroblastique et qu'elles avaient des caractères communs aux cellules souches : de grands noyaux avec des chromosomes abondants, des mitochondries, ainsi qu'un réticulum endoplasmique granuleux et un appareil de Golgi plus développés, montrent que nos cellules ont les caractères morphologiques des CSMM.

Cependant, ces propriétés morphologiques ne sont pas suffisantes pour l'identification des CSMM. Ainsi, nous avons eu recours à l'étude de marqueurs spécifiques.

Généralement, les CSMM cultivées n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques comme CD45, CD34, CD14. Par contre, elles expriment d'autres molécules comme Stro-1, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 (Pittenger et al., 1999), ainsi qu'un certain nombre de cytokines importantes pour la régénération tissulaire comme l'IL-6, LIF, SCF et VEGF (Sensebe et al., 1997a; Sensebe et al., 1997b). Néanmoins, certains de ces marqueurs sont également exprimés par d'autres types cellulaires, comme le CD105 exprimé à la surface des cellules endothéliales (Wilkins and Jones, 1995). Donc, l'association d'au moins trois des marqueurs ci-dessus (deux marqueurs négatifs, un marqueur positif) est nécessaire pour identifier des CSMM (Alsalameh et al., 2004). C'est pourquoi une méthode fondée sur l'analyse de marqueurs spécifiques des CSMM ou des cellules hématopoïétiques est indispensable. Nos résultats montrent que les cellules cultivées en monocouche possèdent un phénotype CD34⁻, CD45⁻, CD90⁺ et CD44⁺ dès passage 3 et au moins jusqu'à passage 6 pour le rat, et que les cellules humaines possèdent un phénotype CD34⁻, CD45⁻, CD44⁺ à passage 4. Ces caractères montrent que nos cellules cultivées ont le phénotype des CSMM non différenciées. Les résultats de cytométrie en flux en fonction du temps montrent qu'à partir de passage 3, les caractères mésenchymateux sont stables et homogènes.

Par ailleurs, environ 40% des cellules de rat à passage 1 et à passage 2 ont exprimé CD45⁺ qui, théoriquement, ne doit pas être exprimé par les CSMM, mais par les cellules hématopoïétiques (Virts et al., 1997). Ce phénomène a disparu dès passage 3, nous avons donc considéré que les cellules avant passage 3 ne sont pas encore assez pures et que les cellules de passage 3 à passage 6 sont la meilleure source de CSMM. Il apparaît ainsi qu'une subculture sélective suivant la centrifugation par gradient de densité est nécessaire pour purifier les CSMM.

Afin de confirmer que les cellules obtenues sont des CSMM, nous avons vérifié qu'elles pouvaient bien se différencier en de multiples cellules de tissus conjonctifs différents. Ainsi, nous avons choisi de les différencier en ostéoblastes et en adipocytes, comme le montre nos résultats de pigmentations de von Kossa et d'alizarine (ostéoblastes) et d'huile rouge O (adipocytes).

L'ensemble des résultats de morphologie, de marquages spécifiques et de différenciations des cellules médullaires confirment que les cellules que nous avons obtenues à partir de la

moelle osseuse sont bien des CSMM avec une pureté importante. Nous en concluons que notre méthode de prélèvement des CSMM est valable.

Enfin, les deux morphologies de nos cellules observées au MEB correspondent à deux phases différentes du cycle cellulaire. Ainsi, les cellules, à bordure cellulaire moins épaisse ou les communications de stroma entre cellules existent, sont des cellules de la première phase du cycle cellulaire (G1) dans laquelle est effectuée une synthèse des protéines permettant la division cellulaire (Figure III-3A). Les autres cellules, plus plates, sont dans la phase S du cycle cellulaire dans laquelle débute la synthèse d'ADN (Figure III-3B). Ces résultats sont en accord avec l'étude de Guo et al. (Guo et al., 2001).

III.2. CARACTERISATION DES FIBROBLASTES LIGAMENTAIRES

III.2.1. Aspect microscopique des fibroblastes ligamentaires

Les cellules provenant des ligaments de genou de rat ont été observées au microscope optique, elles avaient une forme triangulaire ou fuselée et paraissaient homogène. Cette morphologie est celle des fibroblastes (Figure III-11).

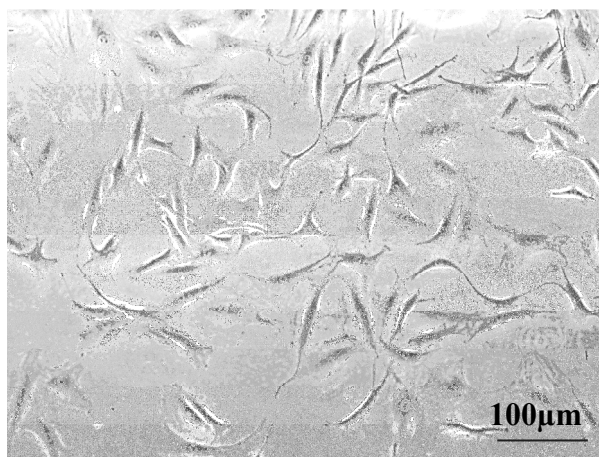


Figure III-11 Fibroblastes ligamentaires du rat (P4, ×100)

III.2.2. Etude de protéines des fibroblastes ligamentaires

L'expression d'ARNm de collagènes de type I, type III et de ténascine-C de fibroblastes à passage 4 a été analysée par RT-PCR quantitative en temps réel. De plus, les quantités de

protéines de collagènes de type I et de type III ont été détectées par radioimmunoanalyse. Les résultats sont présentés dans le tableau III-2. Le fait qu'il n'y ait pas de marqueur spécifique de fibroblastes ligamentaires rend difficile leur identification. Mais une combinaison de présence de différentes molécules comme les collagènes de type I et III, et la ténascine-C, permet de les caractériser. Le rapport de collagène de type III sur celui de type I est notamment important (Altman et al., 2002a; Altman et al., 2002b; Chen et al., 2004; Vunjak-Novakovic et al., 2004), il est de 0,56 pour les fibroblastes ligamentaires humains, alors qu'il n'est que d'environ 0,2 pour les fibroblastes de peau (Chen et al., 2004). Nos résultats ont montré que le taux d'ARNm de collagène de type III sur celui de type I dans nos cellules provenant de ligaments de rat est de $0,58 \pm 0,11$ par RT-PCR et de $0,54 \pm 0,04$ par radioimmunoanalyse. Nous en concluons donc que les cellules obtenues des ligaments de genou de rat sont des fibroblastes ligamentaires.

Tableau III-2 Expression des collagènes et ténascine-C par fibroblastes ligamentaires (P4, n=3)

	Collagène I	Collagène III	Taux de III/I	Ténascine-C
ARNm (par rapport à GAPDH)	$0,74 \pm 0,32$	$0,42 \pm 0,19$	$0,58 \pm 0,11$	$0,08 \pm 0,02$
Protéine (ng/ μ g de protéine totale)	$9,04 \pm 0,97$	$4,88 \pm 0,20$	$0,54 \pm 0,04$	

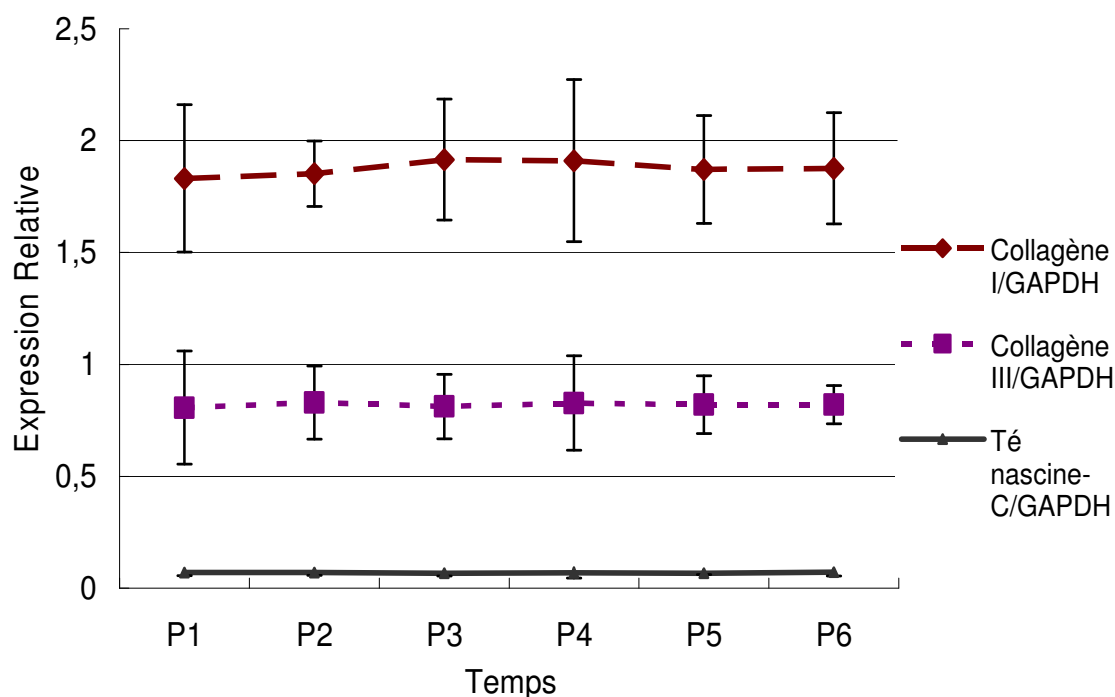
III.3. CO-CULTURE SANS CONTACT DES CSMM AVEC DES FIBROBLASTES LIGAMENTAIRES

III.3.1. Expression des ARNm de collagènes de type I et III et de ténascine-C des CSMM de P1 à P6 analysée par RT-PCR quantitative en temps réel

L'expression des ARNm de collagènes de type I et III et de ténascine-C des CSMM a été suivie de passage 1 à passage 6 par RT-PCR quantitative en temps réel. L'étude statistique montre que la quantité exprimée de chacun de ces trois gènes par les CSMM était stable pour tous les passages (Tableau III-3 et Figure III-12). Nous pouvons alors conclure que les CSMM (P4) que nous avons utilisées pour la co-culture expriment les collagènes de type I et III et la ténascine-C de façon constante.

Tableau III-3 Expressions d'ARNm de collagènes de type I, de type III et de ténascine-C par CSMM de passage 1 à passage 6 (n=6)

Passage	Collagène I/GAPDH	Collagène III/GAPDH	TNC/GAPDH	Collagène III/I
P1	1,80±0,34	0,81±0,25	0,070±0,01	0,43±0,09
P2	1,85±0,15	0,83±0,16	0,070±0,01	0,45±0,06
P3	1,92±0,27	0,81±0,14	0,067±0,01	0,42±0,04
P4	1,91±0,36	0,83±0,21	0,068±0,02	0,43±0,08
P5	1,87±0,24	0,82±0,13	0,067±0,01	0,44±0,05
P6	1,88±0,25	0,82±0,09	0,070±0,02	0,44±0,05

**Figure III-12 Expressions d'ARNm de collagènes de type I et III et de ténascine-C par les CSMM de passage 1 à passage 6 (n=6)**

III.3.2. Expression des ARNm de collagènes de type I et III et de ténascine-C des CSMM après co-culture analysée par RT-PCR quantitative en temps réel

Après co-culture de CSMM de passage 4 avec des fibroblastes ligamentaires, les quantités d'ARNm de collagènes de type I et III et de ténascine-C ont été déterminées par RT-PCR. Cette analyse a prouvé que la co-culture avec des fibroblastes favorise les transcriptions de collagènes de type I et III et de ténascine-C chez les CSMM. Comme la figure III-13 le montre, nous n'avons observé aucune augmentation significative des expressions d'ARNm dans le

groupe de cellules co-cultivées pendant trois jours. Cependant, dans le groupe de cellules co-cultivées pendant six jours, les expressions des ARNm de collagènes de type I et III ont augmenté ($p<0,05$) : elles sont respectivement de 2,0 et de 2,2 fois plus élevées que celles des groupes de contrôles. De même, le groupe des cellules co-cultivées jusqu'à 12 jours a eu une expression d'ARNm des collagènes de type I et III de 2,1 et 2,4 fois plus élevée par rapport à leurs groupes de contrôles. De plus, le rapport du collagène III sur le collagène I a augmenté dès J-6. Enfin, l'expression des ARNm de ténascine-C n'a doublé qu'après 12 jours de co-culture. En conclusion, comparé aux groupes de contrôle, le rapport des ARNm de collagène III/I exprimé à J-6 ($p<0,05$) et de l'ARNm de ténascine-C à J-12 a augmenté significativement dans les CSMM en co-culture (Figure III-13).

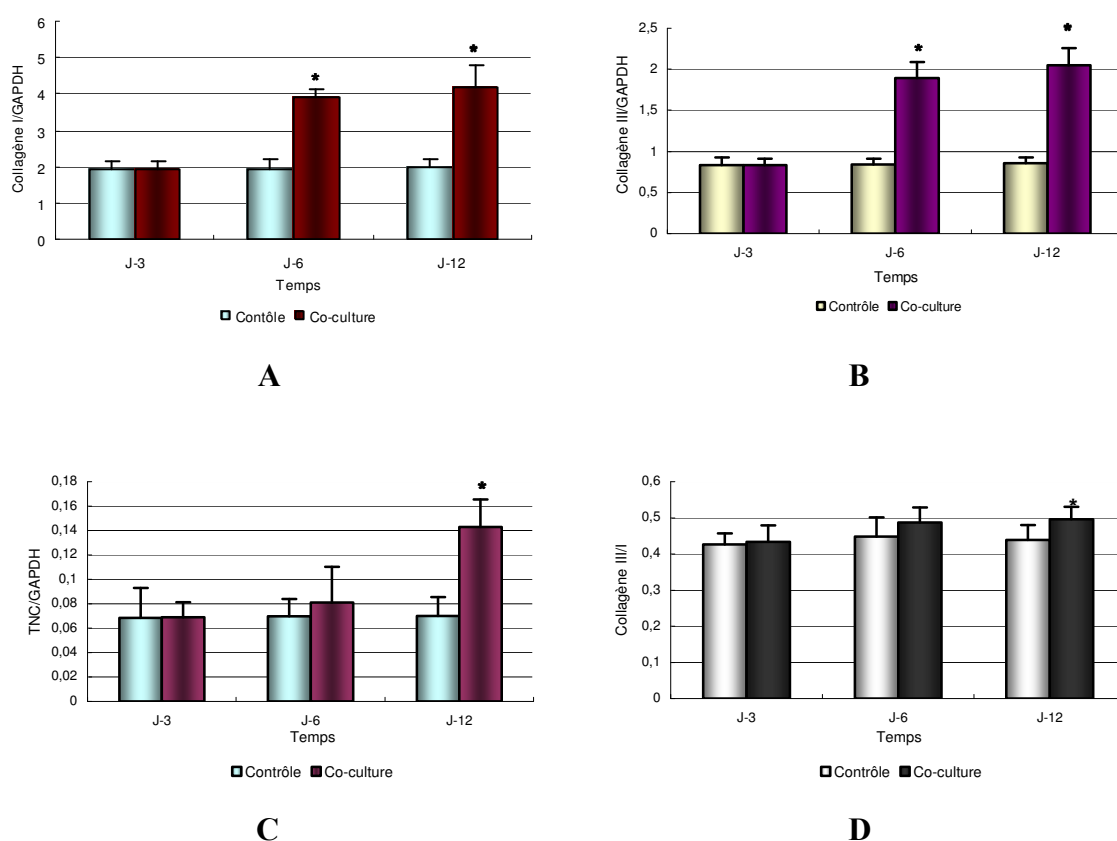


Figure III-13 Expression des ARNm des collagènes I et III des CSMM du rat avec ou sans co-culture (n=7)

A: Expression d'ARNm de collagène de type I des CSMM de rat avec ou sans co-culture; B: Expression d'ARNm de collagène de type III des CSMM de rat avec ou sans co-culture; C: Expression d'ARNm de ténascine-C des CSMM de rat avec ou sans co-culture; D: Taux de collagène de type III/I des CSMM de rat avec ou sans co-culture.

* Différence statistique par rapport au groupe de contrôle ($p<0,05$)

III.3.3. Quantité de protéines de collagène de type I et de type III mesurée par radioimmunoanalyse

Les quantités de collagènes I et III dans chaque échantillon ont été mesurées par radioimmunoanalyse et exprimées par le rapport de collagène (en ng) sur la quantité de protéine totale (en µg). Nos résultats montrent que les quantités de collagène de type I et de type III ont respectivement été $13,6 \pm 1,3 \text{ ng}/\mu\text{g}$ de protéine totale et $5,9 \pm 0,5 \text{ ng}/\mu\text{g}$ de protéine totale dans les CSMM co-cultivées avec des fibroblastes ligamentaires pendant 12 jours. En revanche, celles des CSMM sans co-culture ont respectivement été $12,4 \pm 0,8 \text{ ng}/\mu\text{g}$ de protéine totale et $5,0 \pm 0,4 \text{ ng}/\mu\text{g}$ de protéine totale. Les expressions des collagènes de type I et de type III ont augmenté significativement après 12 jours de co-culture (Figure III-14). De plus, le rapport du collagène III/I était de $0,43 \pm 0,02$ dans les CSMM co-cultivées avec des fibroblastes ligamentaires pendant 12 jours, et était légèrement plus faible pour les CSMM sans co-culture ($0,40 \pm 0,02$).

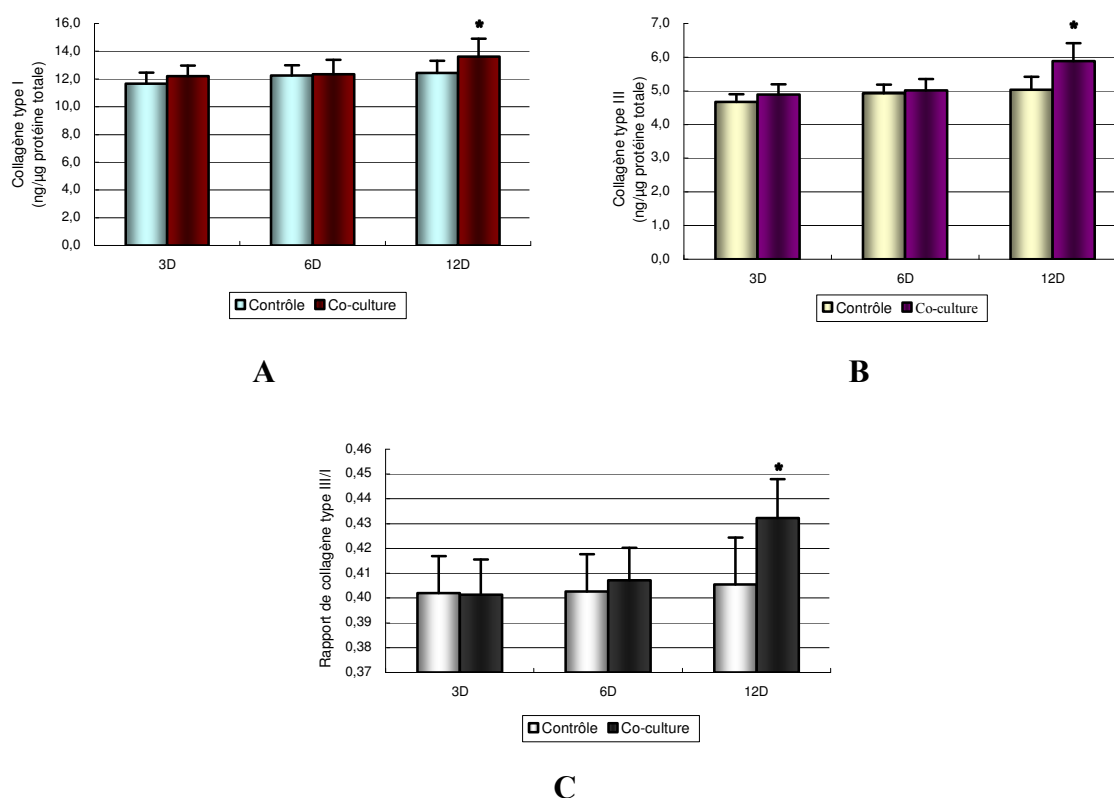


Figure III-14 Synthèses de collagènes de type I et de type III des CSMM du rat co-cultivées ou non avec des fibroblastes ligamentaires (n=6)

A : Synthèse de collagène I des CSMM avec ou sans co-culture; B : Synthèse de collagène III des CSMM avec ou sans co-culture; C : Taux de collagène III/I dans les CSMM de rat avec ou sans co-culture.

* Différence statistique par rapport au groupe de contrôle ($p < 0,05$)

III.3.4. Discussion

III.3.4. 1 RT-PCR quantitative en temps réel

Les courbes standards des 4 gènes suivants : collagènes de type I et III, ténascine-C et GAPDH, ont été réalisées par dilution des échantillons d'un facteur selon les caractères des gènes avant l'analyse des échantillons. Les coefficients de corrélation de ces quatre courbes standards sont respectivement $r = -0,98$ pour le collagène de type I, $r = -1,00$ pour celui de type III, $r = -0,97$ pour la ténascine-C et $r = -0,98$ pour la GAPDH, ce dernier gène étant pris pour étalon interne afin de normer les résultats (Figure III-15). Il y a une très forte corrélation entre les valeurs Ct et le nombre de brins initialement présents dans l'échantillon.

Après la PCR, une courbe de fusion a été effectuée afin de s'assurer de la pureté des copies d'ADN. Les courbes de fusion obtenues n'ont présenté qu'un seul pic comme le montre la Figure III-16. Cela nous assure que les produits que nous avons obtenus par la PCR en temps réel sont purs et le nombre de brins initiaux calculé est fiable. Nous avons pu ainsi également mesurer la température de fusion (T_m) de chaque fragment d'ADN, qui est respectivement 83,7°C, 80,8°C, 84,9°C, et 89,2°C pour les collagènes I et III, la ténascine-C et la GAPDH.

D'autre part, les images de l'électrophorèse des productions de PCR en temps réel sur gel d'agarose à 2% ont montré que les tailles des brins des productions de PCR sont respectivement 352bp, 244bp, 278bp et 308bp pour les collagènes I et III, la ténascine-C et la GAPDH (Figure III-17), qui sont bien le nombre de paires de bases connu pour ces fragments (Ando et al., 1995; Lavaud et al., 2001; Shen Jie, 2001; Waggett et al., 1998).

Les résultats des courbes de fusion et d'électrophorèse témoignent que les brins obtenus dans chaque capillaire de PCR sont purs et que les résultats de PCR sont fiables.

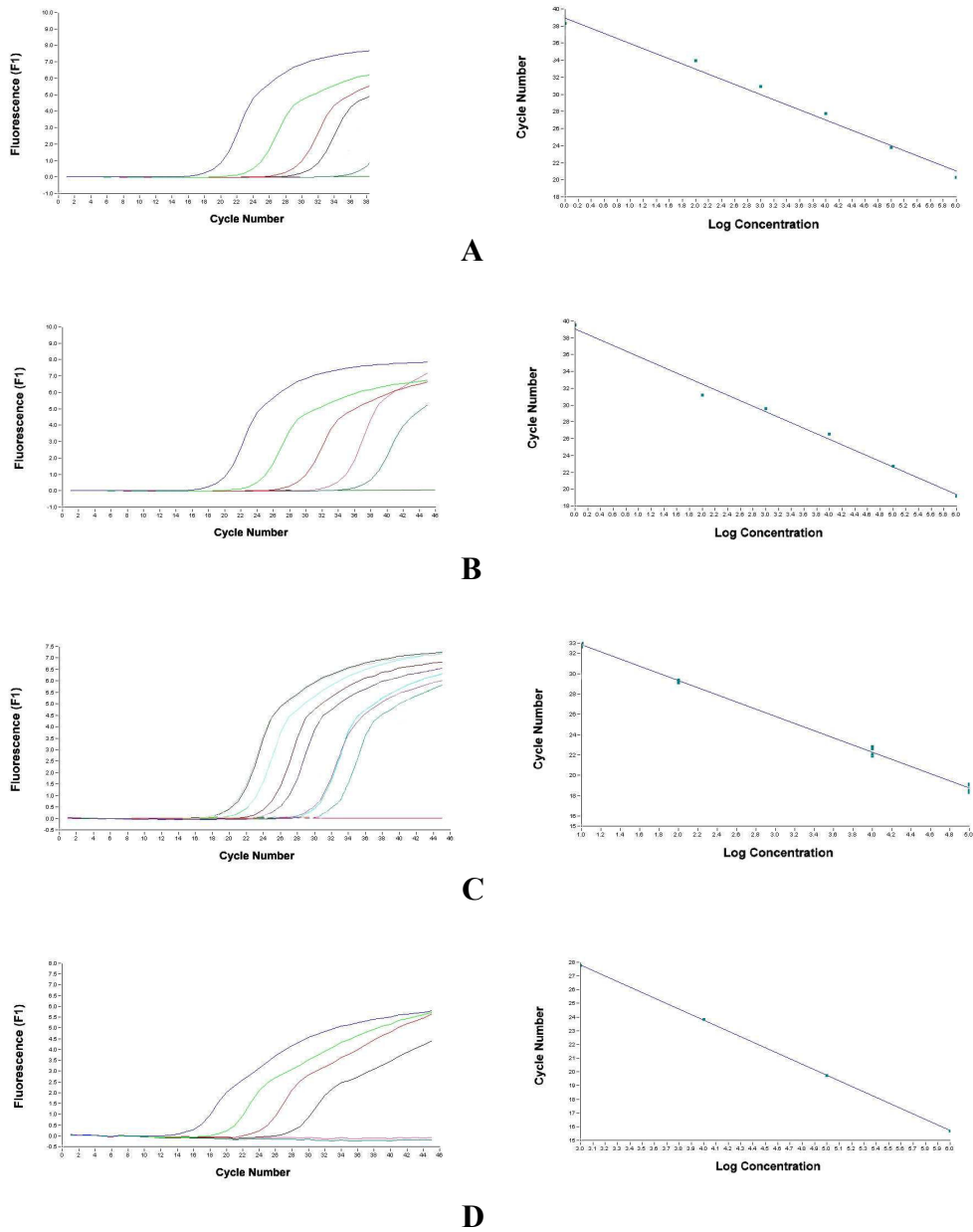


Figure III-15 Courbes standards de 4 gènes utilisées en RT-PCR en temps réel

A : Collagène de type I; B : Collagène de type III; C : Ténascine-C; D : GAPDH

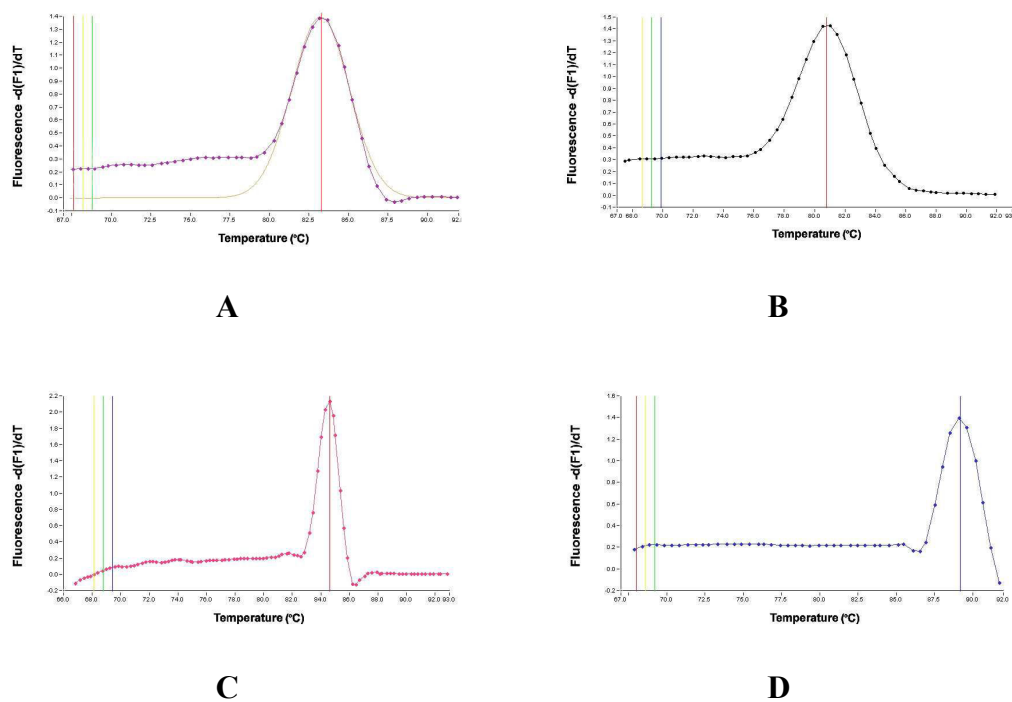


Figure III-16 Courbes de fusion effectuées après PCR en temps réel

A : Collagène de type I; B : Collagène de type III; C : Ténascine-C; D : GAPDH

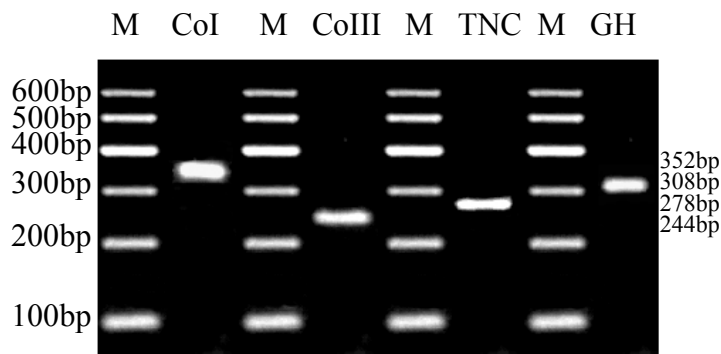


Figure III-17 Image de l'électrophorèse des productions de PCR en temps réel

(M : marqueur ; CoI : collagène I ; CoIII : collagène III ; TNC : ténascine-C ; GH : GAPDH)

III.3.4. 2 L'effet de la co-culture sur les CSMM de rat

Il est établi que les facteurs biochimiques dans les microenvironnements comme les facteurs de croissance, les hormones et d'autres molécules coordonnatrices sont exigés pour l'induction sélective de différenciation des CSMM en lignées cellulaires spécifiques. Le nombre

d'études sur la co-culture des CSMM a augmenté ces dernières années, il en ressort que la co-culture des CSMM avec des cellules différenciées est une stratégie convenable en recherche sur la communication cellulaire (Ball, Shuttleworth, and Kielty, 2004; Lee et al., 2007; Yoon et al., 2005). Ball et al. (Ball, Shuttleworth, and Kielty, 2004) ont montré que les CSMM ont présenté certains caractères de myocyte de muscle lisse (SMC) vasculaire après une co-culture avec des cellules endothéliales vasculaires (EC). De plus, la co-culture des CSMM avec des cardiomyocytes a induit les changements phénotypiques des CSMM, qui provenaient autant de la différenciation des CSMM que de la fusion cellulaire (Yoon et al., 2005). Ces données suggèrent que les facteurs de croissance solubles sécrétés par les cellules différenciées pourraient influencer la différenciation des CSMM. Lee et al. (Lee et al., 2007) ont trouvé que la co-culture sans contact avec des fibroblastes ligamentaires jouait un rôle crucial dans la différenciation inductive des CSMM en fibroblastes ligamentaires.

Cependant, Li et al (Li et al., 2006) considéraient qu'un contact direct entre cellules jouait un rôle crucial dans la différenciation cellulaire et que la co-culture indirecte n'avait presque pas d'effet sur la différenciation de cellule souche. Néanmoins, nos résultats des co-cultures de CSMM avec des fibroblastes ligamentaires ont montré, que les CSMM du rat après la co-culture ont présenté des analogies avec les fibroblastes ligamentaires. Elles ont augmenté leur expression d'ARNm de collagène de type I et de type III dès 6 jours de co-culture. De plus, les synthèses de ces deux collagènes ont augmenté dans les lysats de CSMM co-cultivées avec des fibroblastes ligamentaires pendant 12 jours. De même, l'expression d'ARNm de ténascine-C des CSMM a également augmenté après 12 jours de co-culture. Ces résultats révèlent que les facteurs de croissance, les cytokines et les signaux de régulation délivrés par les fibroblastes ligamentaires durant la co-culture indirecte ont influencé les cellules adjacentes bien qu'il soit encore difficile de considérer que la co-culture indirecte puisse différencier ou changer complètement les fonctions des CSMM.

L'équipe de Lee et al. (Lee et al., 2007) a co-cultivé des CSMM humaines avec des fibroblastes de LCA pendant 5 jours. Ils n'ont pas remarqué de changement des quantités d'ARNm après co-culture. La différence entre leur résultat et les nôtres pourrait provenir de la durée différente de co-culture ainsi que la provenance cellulaire (CSMM humaines). De plus, la proportion de l'expression de collagène de type III sur celui de type I n'a pas été mentionnée dans leur résultat.

Des études précédentes ont montré qu'un des caractères principaux des fibroblastes ligamentaires est le rapport élevé du collagène III sur le collagène I. Les fibres de collagènes,

ainsi que leurs proportions relatives, jouent un rôle important dans la régulation de la structure et de la fonction ligamentaire. De plus, les types de fibres de collagènes, ainsi que leurs proportions sont variables d'un type de ligament à un autre (Amiel et al., 1984; Chen et al., 2004). Les collagènes de type I et III sont deux des composants essentiels des ligaments. Le collagène III est relativement plus présent dans les ligaments comparé aux autres tissus ; et la proportion de collagène de type III/I est différente selon l'origine du ligament (Awad et al., 1999). La fonction majeure du collagène de type III est d'augmenter l'élasticité du tissu. Le ligament a besoin d'être plus élastique et résistant en traction longitudinale. Le rapport de collagène III/I dans les fibroblastes ligamentaires est d'environ 0,55, tandis que celui des fibroblastes épidermiques est seulement d'environ 0,25 d'après Si *et al.* (Si et al., 2002). Nous avons constaté lors de nos expériences que ce rapport d'ARNm exprimé a augmenté dans les CSMM dès 6 jours de co-culture. De même, le rapport de ces deux protéines s'est accru dans les CSMM dès 12 jours de co-culture, c'est-à-dire, la synthèse de collagène de type III a augmenté plus vite que celle de collagène I dans les CSMM co-cultivées avec des fibroblastes ligamentaires.

D'ailleurs, il a été constaté que les CSMM peuvent perdre certaines fonctions après une culture à long terme *in vitro* (Verfaillie, 2002; Yeon Lim et al., 2006). Nous avons donc analysé l'expression des ARN des collagènes I et III et de ténascine-C des CSMM de passage 1 à passage 6 par RT-PCR en temps réel. Nos résultats ont montré que les trois gènes ont été exprimés stablement chez les CSMM de passage 1 à passage 6. Nous en avons alors conclu que les CSMM que nous avons obtenues et utilisées pour la co-culture ne s'étaient pas encore différenciées en fibroblastes avant au moins passage 6.

Il en résulte que la co-culture avec des fibroblastes ligamentaires favorise la synthèse des collagènes I et III ainsi que la ténascine-C chez les CSMM de rat.

III.4. STIMULATION MECANIQUE SUR DES CSMM DE RAT

III.4.1. Déformation et orientation des CSMM après stimulation mécanique

Les images des CSMM avant et après déformation uniaxiale sont présentées à la Figure III-18. Après étirement, les cellules présentaient une orientation privilégiée différente de la direction d'étirement.

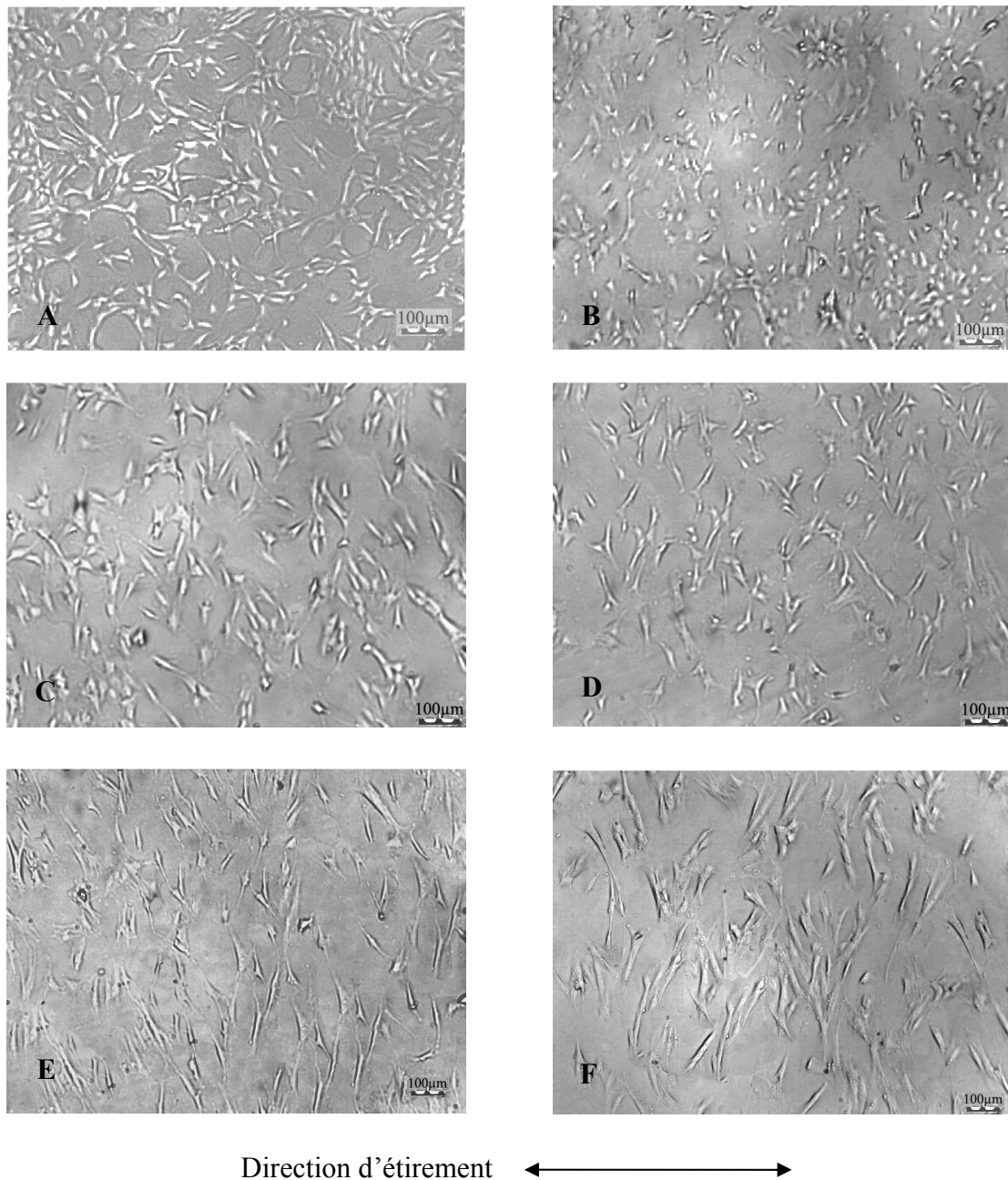


Figure III-18 Images des CSMM avant et après étirement cyclique uniaxial (10%, 1Hz) ($\times 100$)

A : Contrôle statique des CSMM cultivées sur membrane de silicone ; B-F : Stretching pendant 3, 6, 12, 24 et 36h.

III.4.1. 1 Déformation des CSMM après stimulation mécanique

Les images des cellules des groupes d'étirement et leurs groupes de contrôles ont été traitées à l'aide d'un programme écrit par notre équipe (M. Cyril KAHN) à partir du logiciel MathLab et de son complément Image Toolbox (version 7.1, MathWorks Inc., USA). Les

indices de déformation des CSMM après étirement et ceux de leurs contrôles, ainsi que leurs écarts par rapport aux contrôles sont montrés au tableau III-4. L'indice de déformation cellulaire est élevé dès 3h d'étirement cyclique (10%, 1Hz) par rapport à leurs contrôles, ce qui signifie que les cellules se sont allongées dès 3h d'étirement. Cet allongement augmentait encore entre 6h et 12h, puis s'est stabilisé après 12h d'étirement cyclique (Figure III-19).

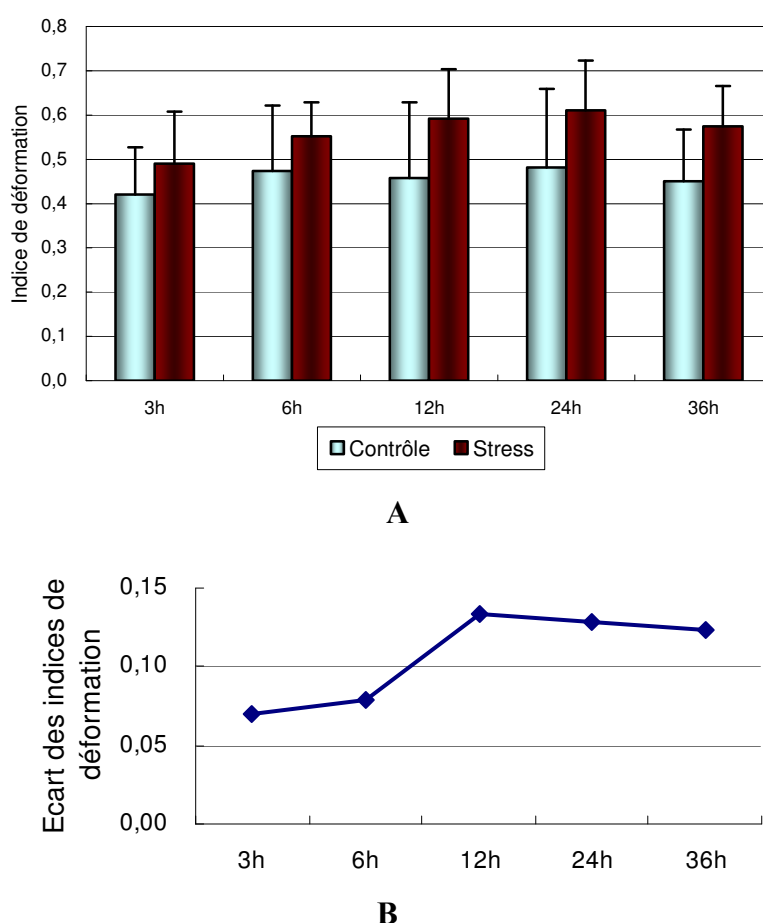


Figure III-19 Taux d'amincissement cellulaire avant et après étirement cyclique (10%, 1Hz, n=100)

A : Indice de déformation cellulaire ; B : Ecart des indices de déformation entre les CSMM et leurs contrôles.

Tableau III-4 Taux d'amincissement cellulaire avant et après étirement cyclique (n=100)

	3h		6h		12h		24h		36h	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
Moyenne	0,42	0,49	0,47	0,55	0,46	0,59	0,48	0,61	0,50	0,57
±écart type	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1	±0,1
S-C	0,07		0,08		0,13		0,13		0,12	

C : groupe de contrôle ;

S : groupe de stimulation mécanique ;

S-C : Ecart des indices de déformation entre les cellules et leurs contrôles après étirement

III.4.1. 2 Orientation des CSMM après stimulation mécanique

La Figure III-20 montre une répartition caractéristique des CSMM selon différentes orientations angulaires avec ou sans stimulation mécanique pendant 3, 6, 12, 24 et 36h. Nous avons constaté que les cellules de contrôle s'orientaient de façon aléatoire dans toutes les directions. En revanche, celles soumises à l'étirement mécanique uniaxial ont présenté une orientation préférentielle de 40° à 70° et de 110° à 140° dès 3h de stimulation. De plus, nous avons observé deux orientations préférentielles symétriques par rapport à 90°. Dès 12h d'étirement, 60% des cellules alignées avaient un angle compris entre 60°-80° et 100°-120°, ces valeurs restant stables après 36h d'étirement (Figure III-20).

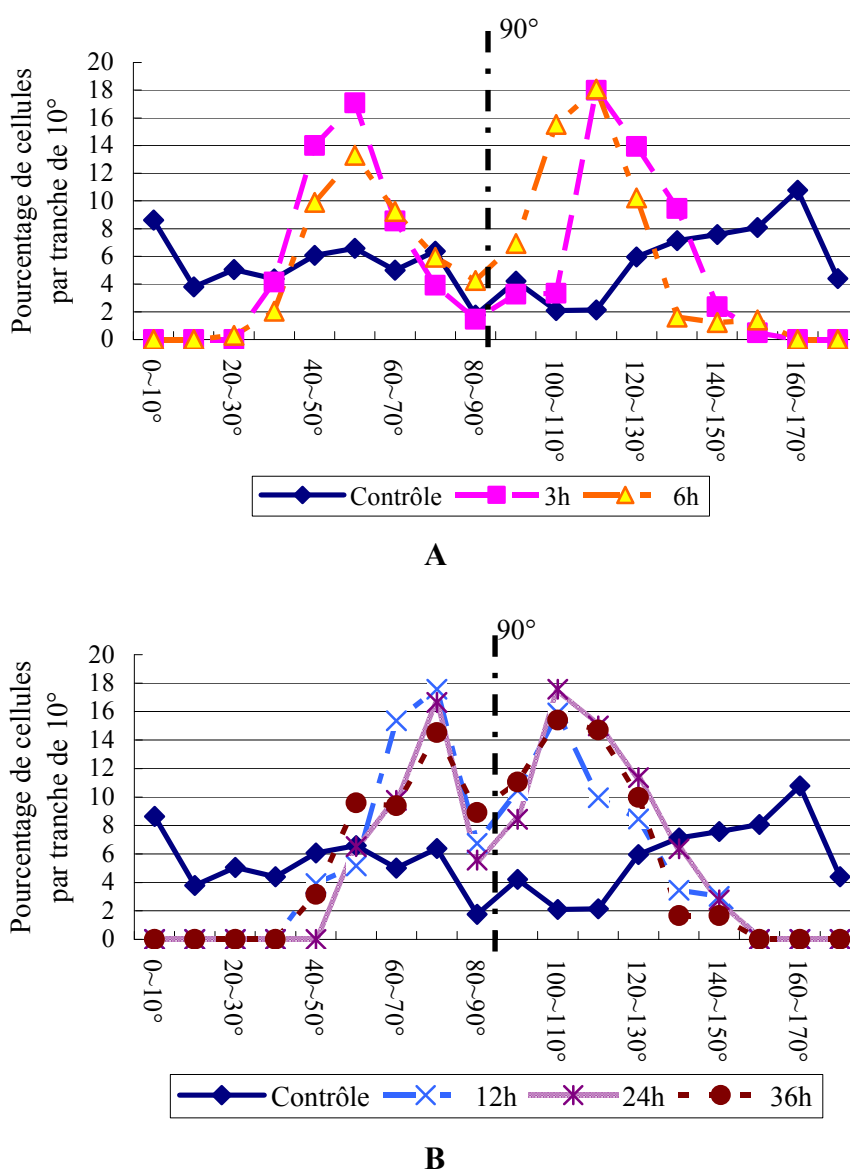


Figure III-20 Orientation cellulaire après étirement pendant 3, 6, 12, 24 et 36h et leur contrôle (n≥100)

A : Groupes des étirements de 3 et 6h ; B : Groupes des étirements de 12, 24 et 36h.

III.4.1. 3 Discussion sur la déformation et l'orientation cellulaire

Plusieurs études ont rapporté que la population cellulaire s'éloigne de la direction d'étirement uniaxial cyclique selon deux directions préférentielles symétriques par rapport à l'axe de 90° (Neidlinger-Wilke et al., 2001; Wang et al., 1995; Yamada, Takemasa, and Yamaguchi, 2000). Wang *et al.* (1995) a proposé un modèle stochastique pour minimiser la déformation qu'elle subit. Ils ont aussi trouvé que la direction préférentielle d'orientation des mélanocytes était d'environ 60° (correspondant à 60° et 120° pour nous) après une déformation uniaxiale à 1Hz, sur une membrane de silicone. Cet angle dépend du type de cellule, de la façon d'appliquer la déformation et de la valeur du coefficient de Poisson du substrat (pour la membrane en silicone, $\nu = 0,38$) (Wang et al., 1995). Le coefficient de Poisson est une constante des matériaux élastiques qui représentent le comportement du matériau dans deux directions orthogonales par la relation suivante :

$$\nu = - \frac{\epsilon_{transversal}}{\epsilon_{axial}}$$

Ce coefficient est compris entre 0 et 0,5 pour les matériaux courants, le matériau étant incompressible quand $\nu = 0,5$. Notre membrane de silicone a le même coefficient de Poisson que celle utilisée par Wang *et al.* (mesuré dans notre laboratoire). Donc, l'étirement uniaxial cyclique de 10% sur la membrane a induit une compression de 3,8% dans la direction transversale. Les CSMM ont répondu à cette stimulation mécanique en réorganisant leur orientation vers l'angle de 60° (ou 120°) dès 3h de stretching, mais évoluant entre 70° et 80° (ou entre 100° et 110°) dès 12h de stimulation. Nous avons ainsi conclu que 70° est la direction préférentielle pour les CSMM soumises à un étirement uniaxial cyclique de 10%, à 1Hz. La différence entre ce résultat et celui de Wang pourrait résulter du type de cellules utilisées. En effet, nous avons stimulé des CSMM dans notre expérience, alors que Wang *et al.* l'ont fait avec des mélanocytes. Les cellules différentes possèdent des qualités mécaniques différentes. De plus, il y a même des différences entre les cellules de même provenance.

D'autre part, la déformation cellulaire et la réorientation se sont stabilisées après 12h d'étirement et jusqu'à 36h. Nous considérons donc que la déformation et la réorientation peuvent être deux changements cellulaires associés : les cellules changent leur orientation pour diminuer la déformation subie, et elles essaient en même temps de garder leur forme originelle jusqu'à l'équilibre. Dans notre expérience, le temps pour établir un nouvel équilibre était de 12 heures.

III.4.2. Expression d'ARNm des collagènes de type I et III et de ténascine-C analysée par RT-PCR quantitative en temps réel

Les quantités d'ARN des collagènes de type I et III et de ténascine-C des CSMM après étirement uniaxial cyclique pendant 3, 6, 12, 24 et 36h, ainsi que ceux des CSMM sans sollicitation mécanique ont été déterminées par RT-PCR quantitative en temps réel. Une augmentation de ces ARN a été constatée après la stimulation mécanique. L'expression d'ARN des collagènes I et III s'est accrue après 12h d'étirement uniaxial par rapport aux groupes de contrôles statiques (Figure III-21A et B). De plus, la stimulation mécanique a significativement augmenté le rapport d'ARN de collagène III/I dès 12h par rapport aux groupes de contrôles. Ces rapports étaient respectivement de $0,45 \pm 0,05$ pour le groupe de contrôle, de $0,53 \pm 0,06$ pour le groupe de 12h, de $0,55 \pm 0,08$ pour le groupe de 24h et de $0,56 \pm 0,06$ pour le groupe de 36h d'étirement (Figure III-21D). En outre, les rapports d'ARN de collagène de type I dans les cellules stimulées mécaniquement sur ceux des cellules statiques étaient respectivement 2,87, 3,13 et 3,23 pour 12h, 24h et 36h d'étirement. Par contre, ce rapport était plus important pour le collagène de type III qui valait respectivement 3,41, 3,98 et 4,10 pour les différents groupes (Figure III-21E).

Nous avons également observé que l'expression d'ARN de ténascine-C des CSMM n'a augmenté significativement qu'après 24h de stimulation mécanique en comparaison avec les groupes de contrôles (Figure III-21C). Les proportions d'expression d'ARN entre les groupes de cellules stimulées pendant 24h et 36h sur leurs groupes de contrôles étaient respectivement $2,65 \pm 0,03$ et $2,89 \pm 0,04$.

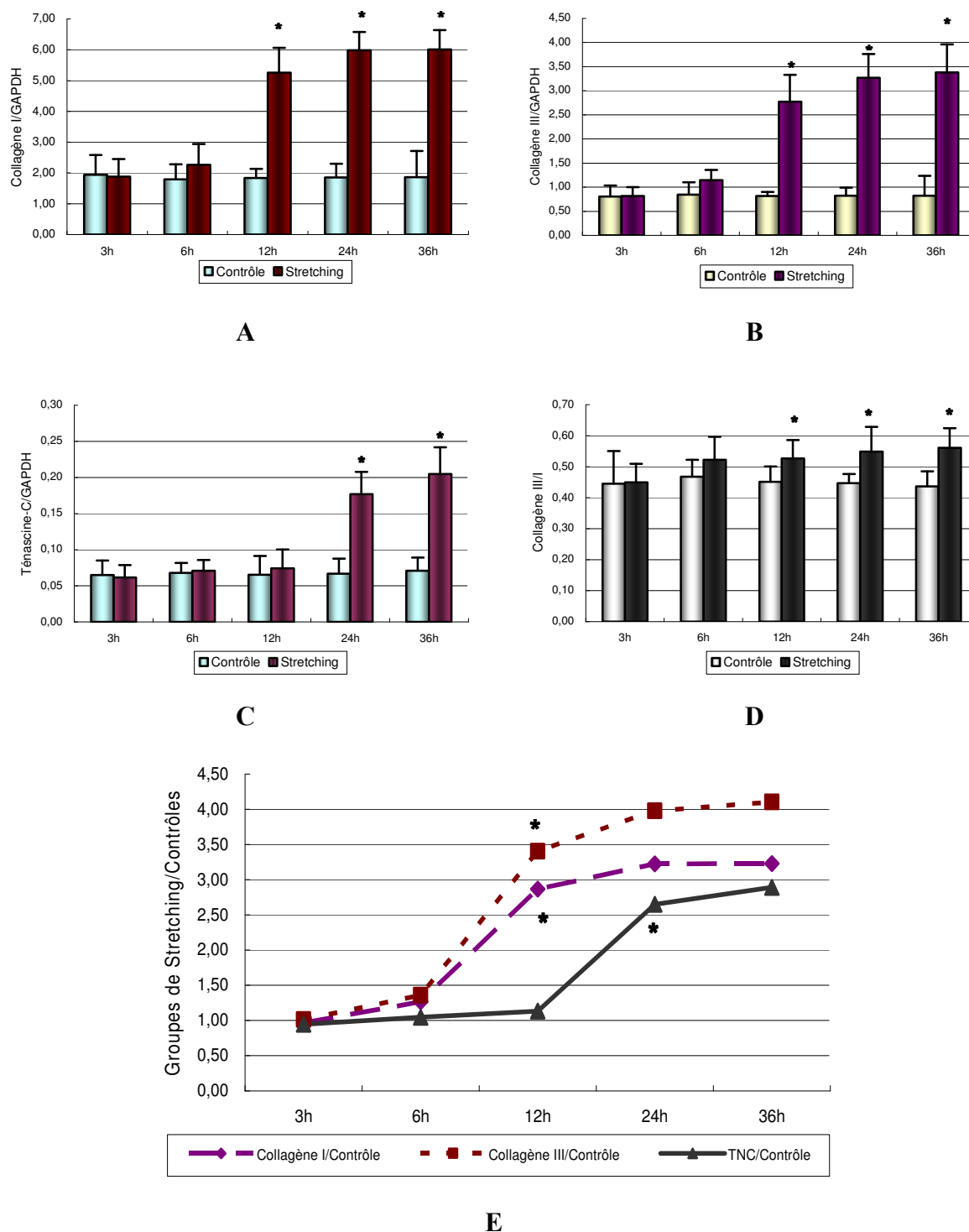


Figure III-21 Quantités d'ARN de collagènes de type I et III et de ténascine-C des CSMM du rat avec ou sans étirement uniaxial (10%, 1Hz, n = 7)

A : Expression d'ARN de collagène de type I ; B : Expression d'ARN de collagène de type III ; C : Expression d'ARN de ténascine-C ; D : Rapport d'expression d'ARN de collagène de type III/I avec ou sans étirement ; E : Rapports d'expressions d'ARN des collagènes de type I et III et de ténascine-C (TNC) des groupes stimulés sur leurs groupes de contrôles.

* Différence statistique par rapport au groupe de contrôle ($p < 0,05$)

III.4.3. Quantité de collagènes I et III analysée par radioimmunoanalyse

La synthèse de protéines des collagènes I et III des CSMM, après étirement uniaxial cyclique, a été déterminée par radioimmunoanalyse. Ces résultats ont révélé que l'expression des collagènes n'a augmenté significativement qu'après 24h d'étirement (Figure III-22A et B). Le rapport des collagènes III/I s'est aussi accru dès 24h de stimulation. La différence entre les cellules stimulées et leurs groupes de contrôles était statistiquement significative ($p < 0,05$) (Figure III-22C).

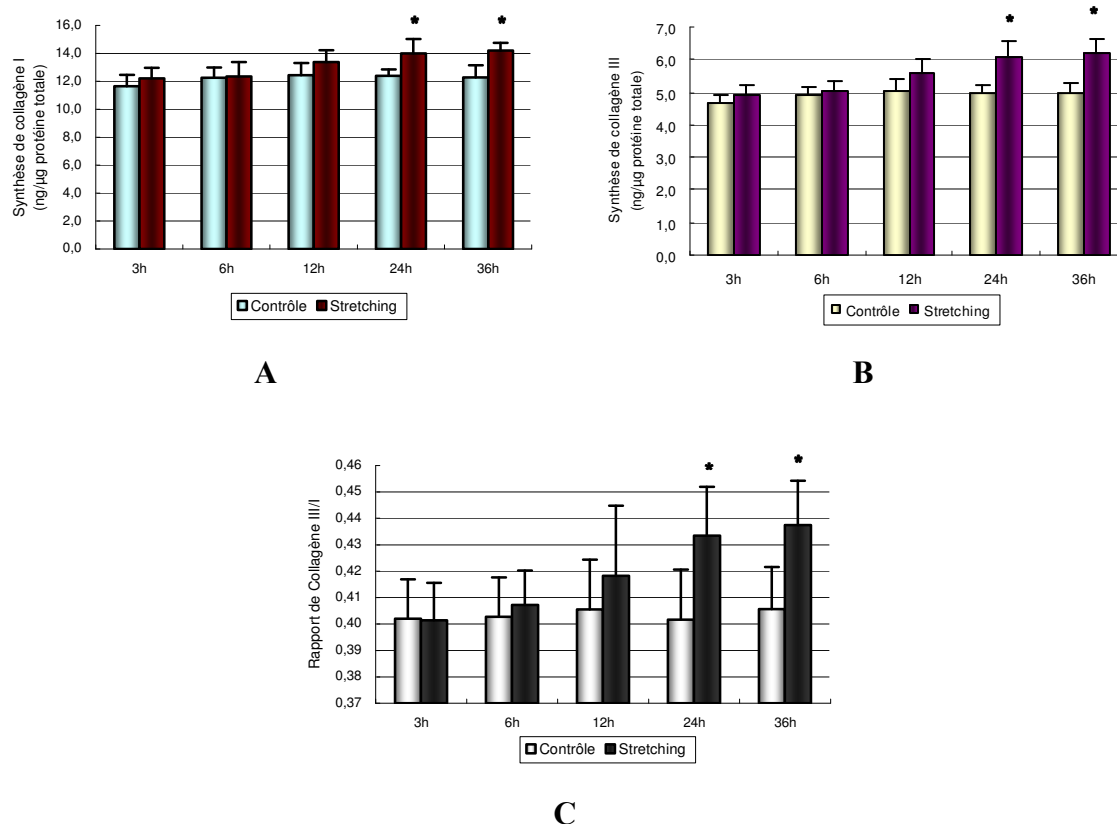


Figure III-22 Synthèses de collagènes de type I et III des CSMM de rat avec ou sans étirement uniaxial (10%, 1Hz, n=6)

A : Synthèse de collagène de type I ; B : Synthèse de collagène de type III ; C : Rapport des synthèses de collagène III/I.

* Différence statistique par rapport au groupe de contrôle ($p < 0,05$)

III.4.4. Quantité de protéines de collagènes I et III analysée par immunocytochimie

La synthèse des collagènes I et III dans les CSMM soumises à l'étirement uniaxial cyclique pendant 24h, ainsi que celles de leurs groupes de contrôles ont été analysées par immunocytochimie. Des images des cellules ont, ensuite, été prises par microscopie optique. Les photos ont montré que l'étirement uniaxial cyclique a favorisé la synthèse de collagènes de type I et III des CSMM. La pigmentation dans le cytoplasme des cellules de contrôles était légèrement jaune (pigmentation des collagènes) (Figure III-23 A et C). En revanche, la pigmentation des deux groupes stimulés mécaniquement pendant 24h était plus intense et foncée, ce qui témoigne d'une quantité plus importante des collagènes I et III par rapport aux groupes de contrôle (Figure III-23 B et D).

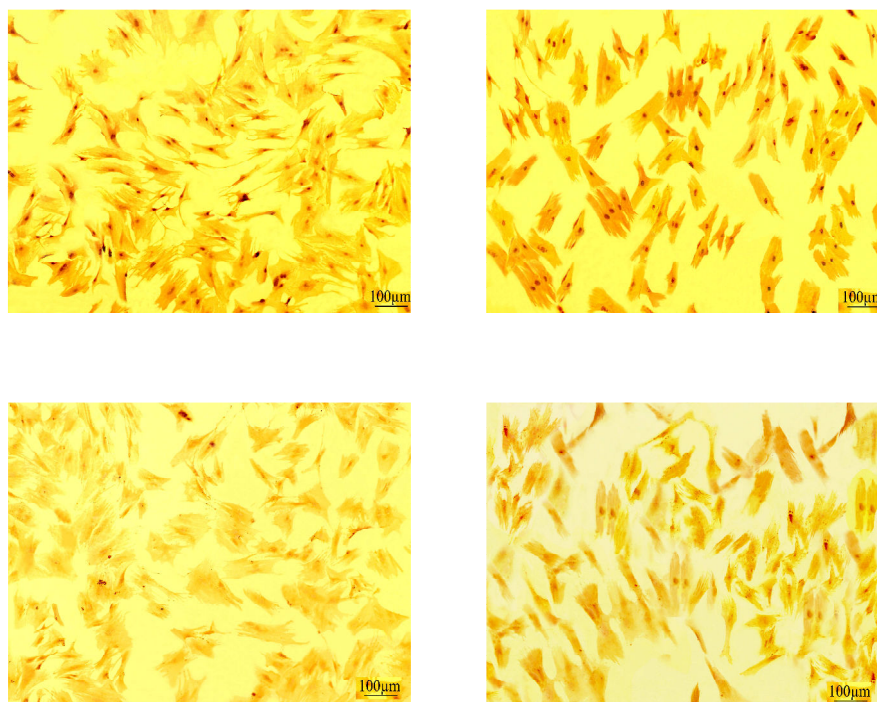


Figure III-23 Images de la pigmentation des collagènes de type I et III des CSMM du rat par ICC (× 100)

A : Collagène de type I dans le groupe de contrôle ; B : Collagène de type I après 24h d'étirement ;
C : Collagène de type III dans le groupe de contrôle ; D : Collagène de type I après 24h d'étirement.

III.4.5. Discussion

La stimulation mécanique est, de plus en plus, reconnue pour jouer un rôle important dans la modulation de fonction cellulaire, y compris la croissance, l'orientation, la synthèse de protéine, l'expression de gène, la différenciation, *etc...* (Altman et al., 2002b; Chiba and Mitani, 2004; Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2004; Kim et al., 2002; McAdams et al., 2006; Neidlinger-Wilke et al., 2001; Sarasa-Renedo and Chiquet, 2005). Des expériences ont également été rapportées sur la différenciation des CSMM par stimulation mécanique (Fink et al., 2000; Park et al., 2004; Qi et al., 2005; Sumanasinghe, Bernacki, and Lobo, 2006). Nos résultats de RT-PCR quantitative en temps réel ont montré que les quantités d'ARN de collagènes de type I et III ont plus que doublé après 12h d'étirement uniaxial cyclique et plus que triplé après 24h d'étirement. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de la synthèse de ces protéines déterminées par radioimmunoanalyse et par immunocytochimie (ICC). Ces deux dernières études ont également révélé que la synthèse des protéines de collagènes de type I et III dans le lysat cellulaire a augmenté après 24h d'étirement. Ce résultat est cohérent avec les études précédentes sur les fibroblastes ligamentaires et les ténocytes soumis à un étirement uniaxial cyclique (Cilli et al., 2004; Kim et al., 2002; Young et al., 1998). De plus, nous avons constaté que l'accroissement d'ARN de collagènes de type I et III dépend du temps de stimulation. Une publication récente (Lee et al., 2007) a montré des résultats comparables aux nôtres : ils ont observé que les expressions d'ARN de collagène I et III et de ténascine-C chez les CSMM avaient significativement augmenté après un étirement cyclique de 10%, à 1Hz pendant 2 jours. Cependant, le rapport d'expression de collagène III/I n'a pas été discuté dans l'étude ci-dessus. Nous avons remarqué que ce rapport d'ARN a augmenté dès 12h de stimulation mécanique, alors que celui des protéines n'a augmenté qu'après 24h. Les études précédentes ont prouvé que les changements de la synthèse des protéines de collagènes sont principalement caractérisés par le changement de leur rapport. Leur synthèses relatives jouent un rôle prépondérant dans la structure de fibre de collagènes et dans la fonction des différents tissus (Amiel et al., 1984; Chen et al., 2004; Si et al., 2002). Les collagènes de type I et III sont les principaux composants des ligaments où le collagène de type III est plus abondant que dans les autres tissus et le rapport des collagènes III/I varie selon la provenance du ligament (Amiel et al., 1984). La fonction majeure du collagène de type III est la régulation de l'élasticité du tissu, garantissant une bonne élasticité et une résistance à la traction. Chez l'humain, le rapport des collagènes III/I pour les fibroblastes ligamentaires est généralement d'environ $0,55 \pm 0,06$, tandis que pour les fibroblastes épidermiques, il n'est seulement que d'environ $0,26 \pm 0,15$ (Chen et al., 2004). Nos expériences

ont montré que la synthèse du collagène de type III était plus élevée que celle du collagène de type I chez les CSMM après étirement cyclique et que le rapport d'ARN de collagènes III/I était respectivement de $0,53 \pm 0,06$, $0,55 \pm 0,08$ et $0,56 \pm 0,06$ pour les groupes de 12h, 24h et 36h. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Chen *et al.* Ils coïncident également avec l'étude sur les fibroblastes ligamentaires du genou que nous avons réalisée sur des rats : ce rapport était respectivement $0,58 \pm 0,11$ et $0,54 \pm 0,04$ pour les ARN et les protéines.

En outre, nous rappelons aussi que le rapport de collagène III/I était plus élevé chez les CSMM sans étirement cyclique ($0,45 \pm 0,05$) que celui des fibroblastes épidermiques ($0,26 \pm 0,15$). Sur ce point, nous supposons que les CSMM sont multipotentes et donc considérées comme des cellules immatures. Les tissus ou les cellules immatures sont connus pour contenir relativement plus de collagène de type III que les autres.

La ténascine-C est une glycoprotéine multifonctionnelle qui fait partie de la matrice extracellulaire (ECM). Elle est régulée précisément pendant le développement embryonnaire ainsi que le remodelage des tissus adultes (Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2004). La ténascine-C augmente chez les fibroblastes après stimulations mécaniques et sa quantité est pilotée par une kinase (RhoA dependant Kinase, ROCK) elle-même régulée par une protéine : la RhoA. Cette kinase intervient dans des voies de transduction de signaux des cellules *in vivo* et *in vitro* (Jarvinen et al., 1999; Sarasa-Renedo and Chiquet, 2005). Nous avons trouvé que l'expression d'ARN de ténascine-C dans les CSMM était accrue par l'étirement uniaxial cyclique en adéquation avec les études précédentes. En revanche, nous avons constaté que l'ARN des collagènes n'a pas augmenté simultanément avec l'augmentation d'ARN de ténascine-C. Kim *et al.* ont précédemment estimé que l'expression des collagènes de type I et III est régulée par la TGF- β 1 (Kim et al., 2002). Nous pensons donc que l'écart temporel entre le changement de l'expression d'ARN des collagènes I et III et celui de la ténascine-C est peut-être dû aux voies différentes de transduction de ces deux types de protéines.

Bien qu'aucun marqueur spécifique ne puisse identifier les fibroblastes ligamentaires des autres fibroblastes (Vunjak-Novakovic et al., 2004), la ténascine-C et les collagènes I et III sont généralement utilisés pour décrire le caractère des fibroblastes ligamentaires (Altman et al., 2002a; Altman et al., 2002b; Vunjak-Novakovic et al., 2004). Dans l'étude présente, l'expression d'ARN de ces protéines dans les CSMM était significativement accrue par l'étirement uniaxial cyclique. Ceci indique que les CSMM stimulées mécaniquement montrent un phénotype similaire à celui des fibroblastes ligamentaires après une stimulation mécanique et qu'elles ont le potentiel d'être utilisées comme source cellulaire pour l'ingénierie tissulaire de ligaments.

III.4.6. Expression de la F-actine par les CSMM après stretching analysée par microscopie confocale

III.4.6. 1 Résultats

Les CSMM après stretching pendant 3h, 6h, 12h, 24h et 36h, ainsi que leurs contrôles statiques ont été fixés et incubés avec de la phalloïdine-Alexa 488 et du 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:200). Puis, elles ont été observées et photographiées à l'aide d'un microscope confocal. Les images de microscopie confocale ont montré que l'ADN nucléaire des cellules a été homogènement pigmenté en bleu par le DAPI et que les cellules présentaient une morphologie fibroblastique, tandis que les filaments de F-actine dans le cytoplasme des CSMM ont été pigmentés en vert par la phalloïdine-Alexa 488. Nous avons constaté que les faisceaux de F-actine avaient un arrangement parallèle qui était plus épais dans les cellules de contrôle que dans les cellules stimulées mécaniquement. La quantité de F-actine a diminué au cours du temps de stimulation dans les CSMM, c'est-à-dire, que plus les CSMM ont subi un étirement uniaxial mécanique, moins la fluorescence verte était présente dans le cytoplasme. Ces faisceaux de F-actine étaient devenus de plus en plus minces avec la durée d'étirement (Figure III-24). Le logiciel Image Plus a été utilisé pour mesurer statistiquement la densité de F-actine dans les CSMM de tous les groupes de cellules avec ou sans étirement. Il y avait une différence significative entre le groupe de contrôle et les groupes stimulés mécaniquement dès 3h de stretching. Une différence encore plus importante était constatée dès 12h de stimulation (Figure III-25).

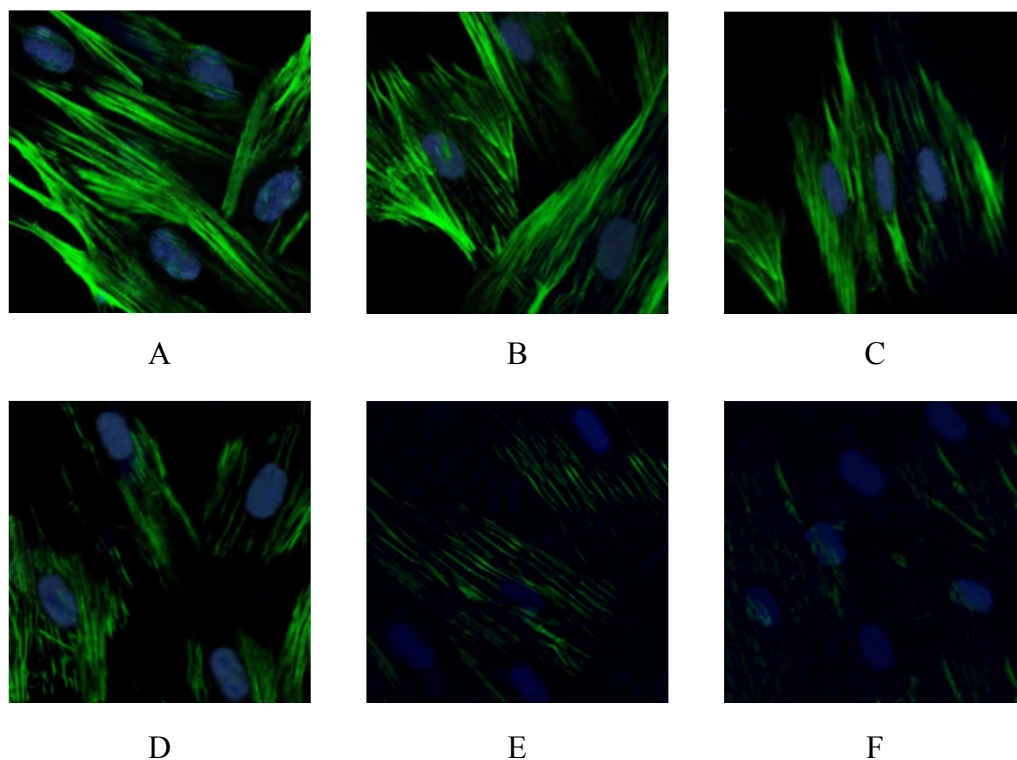


Figure III-24 Images par microscopie confocale de F-actine dans les CSMM du rat avec ou sans étirement de 10%, à 1Hz ($\times 600$)

A : Contrôle statique; B, C, D, E et F : CSMM stimulées pendant respectivement 3h, 6h, 12h, 24h et 36h. F-actine en vert et noyaux en bleu.

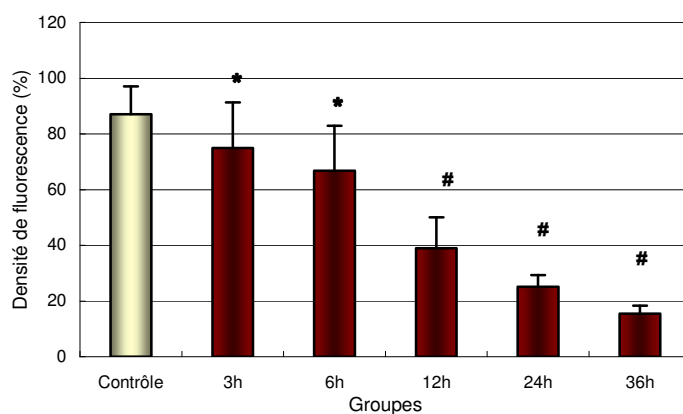


Figure III-25 Densité de fluorescence de F-actine chez les CSMM de rat avec ou sans étirement uniaxial cyclique (n=6)

* Différence statistique par rapport au groupe de contrôle ($p < 0,05$)

Différence statistique par rapport au groupe de contrôle ($p < 0,01$)

III.4.6. 2 Discussion

La sollicitation mécanique par étirement cyclique suscite l'activation de « mechanosensors » qui transmet des messages à l'intérieur des cellules *via* des interactions complexes de protéines de la membrane cytoplasmique, le réseau du cytosquelette, et plusieurs cascades de signaux intracellulaires. Le rôle de la F-actine du cytosquelette dans les voies de transduction de signaux dans les cellules a été beaucoup étudié (Helmke, 2005; Pedersen, Mills, and Hoffmann, 1999; Qi et al., 2005; Van Citters et al., 2006). Cependant, plusieurs points restent toujours inconnus, y compris la fonction de la F-actine dans la différenciation cellulaire et le mécanisme par lequel les cellules commencent leurs changements fonctionnels et leur différenciation. Nous avons donc voulu déterminer les effets de l'étirement uniaxial cyclique sur la distribution de la F-actine pour que nous puissions mieux comprendre les mécanismes du changement de la fonction cellulaire.

La F-actine est l'une des principales protéines du cytosquelette, qui est importante pour l'architecture et les mouvements cellulaires. Elle interagit avec les intégrines, la matrice extracellulaire et des protéines de la voie de transduction de signaux. Elle joue également un rôle crucial dans la voie de transduction de signaux dans les cellules. Nos résultats ont montré que la F-actine a diminué après un étirement uniaxial cyclique de 10%, à 1Hz et ses filaments se sont simultanément réarrangés, des résultats similaires avaient été rapportés par Qi *et al.* (Qi et al., 2005). Une contrainte de cisaillement unidirectionnel peut aussi réorganiser le réseau de fibres de F-actine dans les cellules endothéliales (Sato et al., 1990). Nous savons déjà qu'il existe dans le cytoplasme deux formes d'actine : F-actine (la forme assemblée) et G-actine (la forme désassemblée). Les cellules réagissent aux stimulations mécaniques externes en modulant le désassemblage et l'assemblage d'actine dans le cytosquelette. Ce dernier est donc transformé en ajustant l'équilibre entre la concentration de F-actine et celle de G-actine (Van Citters et al., 2006). La polymérisation des monomères de G-actine peut être bloquée en utilisant la thymosine B : une protéine qui concurrence la combinaison avec l'actine afin d'inhiber l'assemblage de sous unités d'actine (Yarmola and Bubb, 2004; Yarmola et al., 2000). Bien que le mécanisme précis par lequel le changement d'actine influence l'expression de gènes et la synthèse de protéines dans les cellules reste incertain, la régulation de l'expression de gènes et de la synthèse de protéines semble être modulée au moins en partie par les changements associés au cytosquelette (Maniotis, Chen, and Ingber, 1997; Wang, Butler, and Ingber, 1993). Nous pensons donc que la diminution de fluorescence après étirement uniaxial cyclique pourrait être une diminution de la concentration de la F-actine et en même temps, une augmentation de la

concentration de la G-actine. En effet, lorsque les cellules subissent une stimulation mécanique, elles ont besoin d'une structure plus convenable à la migration et à la déformation afin de s'adapter à l'environnement mécanique. Par conséquent, la transformation de F-actine en G-actine (avec laquelle la phalloïdine ne se combine pas)(Helmke, 2005) peut favoriser la migration, la déformation et le changement fonctionnel des cellules. Cependant, plus de recherches sont nécessaires en tenant compte de ces résultats et des voies de mécanotransduction.

CHAPITRE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La bioingénierie cellulaire et tissulaire avec des CSMM ou d'autres types cellulaires s'inscrit dans un contexte particulièrement sensible. Le formidable engouement scientifique accompagnant l'émergence de cette stratégie thérapeutique novatrice apporte une nouvelle espérance thérapeutique.

Les CSMM sont des cellules multipotentes qui peuvent se différencier, entre autres, en cellules osseuses, cartilagineuses, adipeuses, musculaires ou stromales. L'utilisation des CSMM pour la construction de biotissus ligamentaires apporte l'espoir pour une nouvelle méthode thérapeutique.

Au cours de ce travail, la réalisation de la co-culture des CSMM avec des fibroblastes ligamentaires ou l'application de stimulation mécanique nous ont permis d'étudier les effets des interactions cellule-cellule et de l'environnement mécanique sur les CSMM.

Nous avons, dans un premier temps, effectué l'identification et la caractérisation phénotypique des CSMM humaines et du rat. En effet, la moelle osseuse contient non seulement les CSMM mais aussi des cellules hématopoïétiques. Il est donc indispensable de s'assurer que les cellules étudiées soient bien des CSMM.

Cette sélection cellulaire repose tout d'abord sur une centrifugation par gradient à l'aide de Percoll. Puis, les cellules ont été purifiées au cours des différents passages. Elles ont ensuite été identifiées morphologiquement par MEB et MET, et par des marqueurs phénotypiques (CD44, CD90, CD45 et CD34 pour les CSMM du rat et CD44, CD34, CD45, pour les CSMM humaines) à l'aide de la cytométrie en flux, ainsi que par la différenciation en ostéoblastes et en adipocytes.

L'observation morphologique a montré que les CSMM avaient une forme caractéristique de cellules souches. Les résultats de cytométrie en flux ont montré que les CSMM du rat exprimaient positivement CD44 et CD90 et n'exprimaient pas CD45 et CD34 dès le passage 3, de la même manière, les CSMM humaines avaient un phénotype de CD44 +, CD34 - et CD45 -. De plus, les CSMM obtenues pouvaient être différenciées en ostéoblastes et adipocytes en présence du milieu de culture conditionnel associé.

Nous avons donc conclu que nos cellules de passage 3 à passage 6, issues de la moelle osseuse humaine et du rat et cultivées en monocouche, sont des cellules souches mésenchymateuses indifférenciées.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé l'expression des ARNm de collagènes I et III et de ténascine-C par les CSMM de passage 1 à passage 6 et par les fibroblastes ligamentaires de passage 4 à l'aide de RT-PCR quantitative en temps réel. Nos résultats ont montré que les ARNm de collagènes I et III et de ténascine-C ont été exprimées de façon stable par les CSMM de passage 1 à passage 6.

Dans un troisième temps, nous avons co-cultivé les CSMM avec des fibroblastes ligamentaires sans contact pendant 3, 6 et 12 jours pour observer les effets des interactions cellule-cellule. Puis, les ARNm de collagènes I et III et de ténascine-C ont été détectés par RT-PCR quantitative en temps réel. De même, la quantité de protéines de collagènes I et III des CSMM a été détectée par radioimmunoanalyse. Nous avons marqué que, comparées avec leurs contrôles, les CSMM co-cultivées avec les fibroblastes ligamentaires ont eu une augmentation de l'expression des ARNm des collagènes I et III, ainsi que du taux de collagène III/I après 6 jours et 12 jours de co-culture. De même, il y a eu une augmentation de l'expression de l'ARNm de ténascine-C après 12 jours. Les quantités de collagènes I et III, mesurées par l'immunoanalyse, se sont accrues dès 12 jours, et le rapport de collagène III/I s'est rapproché de celui des fibroblastes ligamentaires.

Les résultats suggèrent que la co-culture des CSMM avec des fibroblastes ligamentaires sans contact favorise la sécrétion protéique des collagènes I et III et de la ténascine-C chez les CSMM.

Nous avons, dans un quatrième temps, appliqué un étirement uniaxial cyclique de 10% de déformation à 1Hz sur des CSMM. Après l'étirement, la longueur, la largeur et l'orientation cellulaire de ces CSMM ont été mesurées. De même, les ARNm de collagènes I et III et de ténascine-C ont également été quantifiés par RT-PCR quantitative en temps réel, ainsi que les quantités de collagènes I et III des CSMM ont été mesurées par radioimmunoanalyse et immunocytochimie.

Les résultats ont montré qu'après les étirements cycliques uniaxiaux, les cellules se sont allongées et réorientées. L'étirement a également régulé l'expression des ARNm de collagènes I et III et de ténascine-C, ainsi que la quantité des protéines associées. L'expression des ARNm de collagènes I et III a augmenté après 12 heures d'étirement par rapport au groupe de contrôle. Par contre, l'accroissement significatif des quantités de protéines n'a été observé qu'après 24 heures d'étirement, tout comme l'expression de l'ARNm de ténascine-C.

Nous avons donc conclu que l'étirement mécanique promeut la sécrétion de collagènes I et III et de ténascine-C des CSMM à des taux proches de ceux des fibroblastes ligamentaires.

Enfin, la microscopie confocale a été appliquée pour observer les changements du cytosquelette. Nous avons constaté que les faisceaux de F-actine avaient un arrangement parallèle qui était plus épais dans les cellules de contrôles que ceux des cellules stimulées mécaniquement. La quantité de F-actine a diminué au cours du temps de la stimulation des CSMM. Ces faisceaux de F-actine étaient devenus de plus en plus minces avec la durée d'étirement.

La stimulation mécanique peut modifier l'orientation cellulaire ainsi que le cytosquelette des CSMM.

L'ensemble de ce travail a permis d'identifier deux modèles de stimulation, chimique et mécanique, en culture pour rapprocher les caractères des CSMM de ceux des fibroblastes ligamentaires. En conséquence, ce travail met en lumière que les CSMM partagent des caractères analogues à ceux des fibroblastes ligamentaires après co-culture et étirement. Elles ont le potentiel d'être utilisées comme une source de cellules substitutives des fibroblastes au sein des biotissus ligamentaires.

Par ailleurs, ce travail donne lieu à plusieurs travaux complémentaires permettant :

Premièrement, d'optimiser la durée de co-culture avec des fibroblastes et la proportion de CSMM par rapport aux fibroblastes ;

Deuxièmement, de chercher la fréquence et la déformation optimales et de cultiver les CSMM sur un scaffold tridimensionnel en appliquant la stimulation de traction et de torsion pour imiter la stimulation mécanique physiologique ;

Troisièmement, de stimuler les CSMM par la co-culture avec des fibroblastes et par l'étirement mécanique simultané pour observer les effets combinants de la stimulation biochimique et mécanique.

Enfin, des études plus détaillées sur les récepteurs cellulaires impliqués dans la voie de transduction de signaux mécaniques et sur les facteurs régulateurs libérés par les fibroblastes ligamentaires seront nécessaires afin de mettre en évidence le mécanisme de la différenciation de cellules souches et de débattre précisément de la possibilité d'utiliser des CSMM dans la

réparation et la régénération du ligament à l'avenir et plus généralement dans des applications cliniques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alexander, H., Weiss, A. B., and Parsons, J. R. (1986). Ligament and tendon repair with an absorbable polymer-coated carbon fiber stent. *Bull Hosp Jt Dis Orthop Inst* 46(2), 155-73.
- Allison, N. (1913). The results obtained by implantation of silk tendons in the residual paralysis of poliomyelitis. *J Bone Joint Surg Am* S2-10, 519-527.
- Alsalameh, S., Amin, R., Gemba, T., and Lotz, M. (2004). Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 50(5), 1522-32.
- Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., and Kaplan, D. L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24(3), 401-16.
- Altman, G. H., Horan, R. L., Lu, H. H., Moreau, J., Martin, I., Richmond, J. C., and Kaplan, D. L. (2002a). Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials* 23(20), 4131-41.
- Altman, G. H., Horan, R. L., Martin, I., Farhadi, J., Stark, P. R., Volloch, V., Richmond, J. C., Vunjak-Novakovic, G., and Kaplan, D. L. (2002b). Cell differentiation by mechanical stress. *Faseb J* 16(2), 270-2.
- Altman, G. H., Lu, H. H., Horan, R. L., Calabro, T., Ryder, D., Kaplan, D. L., Stark, P., Martin, I., Richmond, J. C., and Vunjak-Novakovic, G. (2002c). Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering. *J Biomech Eng* 124(6), 742-9.
- Amiel, D., Frank, C., Harwood, F., Fronek, J., and Akeson, W. (1984). Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J Orthop Res* 1(3), 257-65.
- Ando, T., Okuda, S., Tamaki, K., Yoshitomi, K., and Fujishima, M. (1995). Localization of transforming growth factor-beta and latent transforming growth factor-beta binding protein in rat kidney. *Kidney Int* 47(3), 733-9.
- Attisano, L., and Wrana, J. L. (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296(5573), 1646-7.
- Awad, H. A., Butler, D. L., Boivin, G. P., Smith, F. N., Malaviya, P., Huibregtse, B., and Caplan, A. I. (1999). Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 5(3), 267-77.
- Bach, B. R., Jr., and Boonos, C. L. (2001). Anterior cruciate ligament reconstruction. *Aorn J* 74(2), 152-64; quiz 166-71, 173-4.

- Baddoo, M., Hill, K., Wilkinson, R., Gaupp, D., Hughes, C., Kopen, G. C., and Phinney, D. G. (2003). Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 89(6), 1235-49.
- Ball, S. G., Shuttleworth, A. C., and Kielty, C. M. (2004). Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate. *Int J Biochem Cell Biol* 36(4), 714-27.
- Barry, F., Boynton, R., Murphy, M., Haynesworth, S., and Zaia, J. (2001). The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289(2), 519-24.
- Barry, F. P. (2003). Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69(3), 250-6.
- Barry, F. P., and Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36(4), 568-84.
- Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., and Anversa, P. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114(6), 763-76.
- Bessette, G. C., and Hunter, R. E. (1990). The anterior cruciate ligament. *Orthopedics* 13(5), 551-62.
- Bhatnagar, R. S., Qian, J. J., Wedrychowska, A., Sadeghi, M., Wu, Y. M., and Smith, N. (1999). Design of biomimetic habitats for tissue engineering with P-15, a synthetic peptide analogue of collagen. *Tissue Eng* 5(1), 53-65.
- Bianco, P., and Gheron Robey, P. (2000). Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 105(12), 1663-8.
- Bianco, P., and Robey, P. G. (2001). Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414(6859), 118-21.
- Bjornson, A. P., Lewis, J. C., and Appleby, E. C. (1999). Mammary neoplasia in a binturong (*Arctictis binturong*). *Vet Rec* 144(15), 421-2.
- Bogumill, G. P. (2002). Functional anatomy of the flexor tendon system of the hand. *Hand Surg* 7(1), 33-46.

- Boiret, N., Rapatel, C., Veyrat-Masson, R., Guillouard, L., Guerin, J. J., Pigeon, P., Descamps, S., Boisgard, S., and Berger, M. G. (2005). Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. *Exp Hematol* 33(2), 219-25.
- Booth, C., O'Shea, J. A., and Potten, C. S. (1999). Maintenance of functional stem cells in isolated and cultured adult intestinal epithelium. *Exp Cell Res* 249(2), 359-66.
- Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I., and Blau, H. M. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290(5497), 1775-9.
- Brouard, N., Chapel, A., Thierry, D., Charbord, P., and Peault, B. (2000). Transplantation of gene-modified human bone marrow stromal cells into mouse-human bone chimeras. *J Hematother Stem Cell Res* 9(2), 175-81.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25(2), 169-93.
- Butler, D. L., and Awad, H. A. (1999). Perspectives on cell and collagen composites for tendon repair. *Clin Orthop Relat Res* (367 Suppl), S324-32.
- Cantz, T., Sharma, A. D., Jochheim-Richter, A., Arseniev, L., Klein, C., Manns, M. P., and Ott, M. (2004). Reevaluation of bone marrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. *Cell Transplant* 13(6), 659-66.
- Caplan, A. I., and Bruder, S. P. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 7(6), 259-64.
- Carmeliet, G., Vico, L., and Bouillon, R. (2001). Space flight: a challenge for normal bone homeostasis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 11(1-3), 131-44.
- Chen, H., Han, J., Li, L., Lu, J., Zhang, W., and Chen, R. (2002a). [Osteocalcin and type I collagen mRNA expression of rat marrow stromal cells under induction condition]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 33(2), 200-3.
- Chen, H., Tang, Y., Li, S., Shen, Y., Liu, X., and Zhong, C. (2002b). Biologic characteristics of fibroblast cells cultured from the knee ligaments. *Chin J Traumatol* 5(2), 92-6.
- Chen, H. Q., Han, J., Li, L., and al., e. (2002c). Osteocalcin and type I collagen mRNA expression of rat marrow stromal cells under induction condition. *Journal of West China University of Medical Sciences* 33(2), 200-204.

- Chen, Y., DeSautel, M., Anderson, A., Badlani, G., and Kushner, L. (2004). Collagen synthesis is not altered in women with stress urinary incontinence. *Neurourol Urodyn* 23(4), 367-73.
- Cheng, S. L., Yang, J. W., Rifas, L., Zhang, S. F., and Avioli, L. V. (1994). Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134(1), 277-86.
- Chiba, M., and Mitani, H. (2004). Cytoskeletal changes and the system of regulation of alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament cells induced by mechanical stress. *Cell Biochem Funct* 22(4), 249-56.
- Chiquet-Ehrismann, R., and Chiquet, M. (2003). Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol* 200(4), 488-99.
- Chiquet-Ehrismann, R., Matsuoka, Y., Hofer, U., Spring, J., Bernasconi, C., and Chiquet, M. (1991). Tenascin variants: differential binding to fibronectin and distinct distribution in cell cultures and tissues. *Cell Regul* 2(11), 927-38.
- Chiquet-Ehrismann, R., and Tucker, R. P. (2004). Connective tissues: signalling by tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 36(6), 1085-9.
- Cho, H. Y., Reddy, S. P., Yamamoto, M., and Kleeberger, S. R. (2004). The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis. *Faseb J* 18(11), 1258-60.
- Chun-mao, H., Su-yi, W., Ping-ping, L., and Hang-hui, C. (2007). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into epidermal-like cells in vitro. *Differentiation* 75(4), 292-8.
- Chuong, C. M., and Chen, H. M. (1991). Enhanced expression of neural cell adhesion molecules and tenascin (cytotactin) during wound healing. *Am J Pathol* 138(2), 427-40.
- Cilli, F., Khan, M., Fu, F., and Wang, J. H. (2004). Prostaglandin E2 affects proliferation and collagen synthesis by human patellar tendon fibroblasts. *Clin J Sport Med* 14(4), 232-6.
- Clarke, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U., and Frisen, J. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288(5471), 1660-3.
- Clemmons, D. R. (1997). Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev* 8(1), 45-62.
- Cowin, S. C. (2000). How is a tissue built? *J Biomech Eng* 122(6), 553-69.

- Dejardin, L. M., Arnoczky, S. P., Ewers, B. J., Haut, R. C., and Clarke, R. B. (2001). Tissue-engineered rotator cuff tendon using porcine small intestine submucosa. Histologic and mechanical evaluation in dogs. *Am J Sports Med* 29(2), 175-84.
- Dennis, J. E., Carbillet, J. P., Caplan, A. I., and Charbord, P. (2002). The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* 170(2-3), 73-82.
- DesRosiers, E. A., Yahia, L., and Rivard, C. H. (1996). Proliferative and matrix synthesis response of canine anterior cruciate ligament fibroblasts submitted to combined growth factors. *J Orthop Res* 14(2), 200-8.
- Dexter, T. M., Wright, E. G., Krizsa, F., and Lajtha, L. G. (1977). Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. *Biomedicine* 27(9-10), 344-9.
- Digirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R., and Prockop, D. J. (1999). Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 107(2), 275-81.
- D'Ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C., Roos, B. A., and Howard, G. A. (1999). Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 14(7), 1115-22.
- Donahue, T. L., Gregersen, C., Hull, M. L., and Howell, S. M. (2001). Comparison of viscoelastic, structural, and material properties of double-looped anterior cruciate ligament grafts made from bovine digital extensor and human hamstring tendons. *J Biomech Eng* 123(2), 162-9.
- Donovan, P. J., and Gearhart, J. (2001). The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 414(6859), 92-7.
- Dunn, M. G., Tria, A. J., Kato, Y. P., Bechler, J. R., Ochner, R. S., Zawadsky, J. P., and Silver, F. H. (1992). Anterior cruciate ligament reconstruction using a composite collagenous prosthesis. A biomechanical and histologic study in rabbits. *Am J Sports Med* 20(5), 507-15.
- Dunn, R. (1996). Productivity standards: a survey of HIM professionals, Part II. *J Ahima* 67(6), 61-3.
- Duthon, V. B., Barea, C., Abrassart, S., Fasel, J. H., Fritschy, D., and Menetrey, J. (2006). Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 14(3), 204-13.

- Dye, S. F. (1996). The future of anterior cruciate ligament restoration. *Clin Orthop Relat Res* (325), 130-9.
- Egermann, M., Schneider, E., Evans, C. H., and Baltzer, A. W. (2005). The potential of gene therapy for fracture healing in osteoporosis. *Osteoporos Int* 16 Suppl 2, S120-8.
- Erickson, H. P. (1993). Gene knockouts of c-src, transforming growth factor beta 1, and tenascin suggest superfluous, nonfunctional expression of proteins. *J Cell Biol* 120(5), 1079-81.
- Fermor, B., Urban, J., Murray, D., Pocock, A., Lim, E., Francis, M., and Gage, J. (1998). Proliferation and collagen synthesis of human anterior cruciate ligament cells in vitro: effects of ascorbate-2-phosphate, dexamethasone and oxygen tension. *Cell Biol Int* 22(9-10), 635-40.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279(5356), 1528-30.
- Fichard, A., Chanut-Delalande, H., and Ruggiero, F. (2003). Le syndrome d'Ehlers-Danlos: l'architecture matricielle en question. *MEDECINE/SCIENCES* 19(4), 443-452.
- Fink, C., Ergun, S., Kralisch, D., Remmers, U., Weil, J., and Eschenhagen, T. (2000). Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *Faseb J* 14(5), 669-79.
- Flores-Figueroa, E., Arana-Trejo, R. M., Gutierrez-Espindola, G., Perez-Cabrera, A., and Mayani, H. (2005). Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk Res* 29(2), 215-24.
- Fluck, M., Tunc-Civelek, V., and Chiquet, M. (2000). Rapid and reciprocal regulation of tenascin-C and tenascin-Y expression by loading of skeletal muscle. *J Cell Sci* 113 (Pt 20), 3583-91.
- Frank, C., Schachar, N., and Dittrich, D. (1983). Natural history of healing in the repaired medial collateral ligament. *J Orthop Res* 1(2), 179-88.
- Frank, C. B., and Jackson, D. W. (1997). The science of reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am* 79(10), 1556-76.
- Fraser, J. K., Schreiber, R. E., Zuk, P. A., and Hedrick, M. H. (2004). Adult stem cell therapy for the heart. *Int J Biochem Cell Biol* 36(4), 658-66.

- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., and Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6(2), 230-47.
- Galmiche, M. C., Koteliansky, V. E., Briere, J., Herve, P., and Charbord, P. (1993). Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 82(1), 66-76.
- Gartner, S., and Kaplan, H. S. (1980). Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(8), 4756-9.
- Ge, Z., Goh, J. C., and Lee, E. H. (2005). Selection of cell source for ligament tissue engineering. *Cell Transplant* 14(8), 573-83.
- Goto, T., and Brunette, D. M. (1998). Surface topography and serum concentration affect the appearance of tenascin in human gingival fibroblasts in vitro. *Exp Cell Res* 244(2), 474-80.
- Gronthos, S., Graves, S. E., Ohta, S., and Simmons, P. J. (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84(12), 4164-73.
- Guo, Z., Tang, P., Liu, X., Yang, J., Li, X., Chen, X., and Mao, N. (2000). Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow Support Hematopoiesis in Vitro. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 8(2), 93-96.
- Guo, Z., Yang, J., Liu, X., Li, X., Hou, C., Tang, P. H., and Mao, N. (2001). Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Chin Med J (Engl)* 114(9), 950-3.
- Hasegawa, M., Hirata, H., Sudo, A., Kato, K., Kawase, D., Kinoshita, N., Yoshida, T., and Uchida, A. (2004). Tenascin-C concentration in synovial fluid correlates with radiographic progression of knee osteoarthritis. *J Rheumatol* 31(10), 2021-6.
- Haynesworth, S. E., Baber, M. A., and Caplan, A. I. (1992). Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 13(1), 69-80.
- Haynesworth, S. E., Baber, M. A., and Caplan, A. I. (1996). Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 166(3), 585-92.
- Heineken FC, S. R. (1991). Tissue engineering. A brief overview. Selected papers from the UCLA Symposium of Tissue Engineering. Keystone, Colorado, April 6-12, 1990. *J Biomech Eng* 113(2), 111-207.

- Helmke, B. P. (2005). Molecular control of cytoskeletal mechanics by hemodynamic forces. *Physiology (Bethesda)* 20, 43-53.
- Hess, D., Li, L., Martin, M., Sakano, S., Hill, D., Strutt, B., Thyssen, S., Gray, D. A., and Bhatia, M. (2003). Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 21(7), 763-70.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10(4), 413-7.
- Hollis, J. M., Takai, S., Adams, D. J., Horibe, S., and Woo, S. L. (1991). The effects of knee motion and external loading on the length of the anterior cruciate ligament (ACL): a kinematic study. *J Biomech Eng* 113(2), 208-14.
- Hui, J. H., Ouyang, H. W., Hutmacher, D. W., Goh, J. C., and Lee, E. H. (2005). Mesenchymal stem cells in musculoskeletal tissue engineering: a review of recent advances in National University of Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 34(2), 206-12.
- Ishii, M., Koike, C., Igarashi, A., Yamanaka, K., Pan, H., Higashi, Y., Kawaguchi, H., Sugiyama, M., Kamata, N., Iwata, T., Matsubara, T., Nakamura, K., Kurihara, H., Tsuji, K., and Kato, Y. (2005). Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 332(1), 297-303.
- Izadpanah, R., Joswig, T., Tsien, F., Dufour, J., Kirijan, J. C., and Bunnell, B. A. (2005). Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques. *Stem Cells Dev* 14(4), 440-51.
- Jackson, K. A., Mi, T., and Goodell, M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25), 14482-6.
- Jarvinen, T. A., Jozsa, L., Kannus, P., Jarvinen, T. L., Hurme, T., Kvist, M., Peltö-Huikko, M., Kalimo, H., and Jarvinen, M. (2003). Mechanical loading regulates the expression of tenascin-C in the myotendinous junction and tendon but does not induce de novo synthesis in the skeletal muscle. *J Cell Sci* 116(Pt 5), 857-66.
- Jarvinen, T. A., Jozsa, L., Kannus, P., Jarvinen, T. L., Kvist, M., Hurme, T., Isola, J., Kalimo, H., and Jarvinen, M. (1999). Mechanical loading regulates tenascin-C expression in the osteotendinous junction. *J Cell Sci* 112 Pt 18, 3157-66.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C.,

- Largaespada, D. A., and Verfaillie, C. M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418(6893), 41-9.
- Jin, H. J., Chen, J., Karageorgiou, V., Altman, G. H., and Kaplan, D. L. (2004). Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats. *Biomaterials* 25(6), 1039-47.
- Johansson, C. B., Svensson, M., Wallstedt, L., Janson, A. M., and Frisen, J. (1999). Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res* 253(2), 733-6.
- Jones, E. A., Kinsey, S. E., English, A., Jones, R. A., Straszynski, L., Meredith, D. M., Markham, A. F., Jack, A., Emery, P., and McGonagle, D. (2002). Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 46(12), 3349-60.
- Kahn, C. J. F., Vaquette, C., Rahouadj, R., and Wang, X. (2007). A novel bioreactor of ligament and tendon for Tissue Engineering. *Bio-medical Materials and Engineering*.
- Kim, S. G., Akaike, T., Sasagawa, T., Atomi, Y., and Kurosawa, H. (2002). Gene expression of type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells. *Cell Struct Funct* 27(3), 139-44.
- Kim, S. J., Lee, W. I., Heo, H., Shin, O., Kwon, Y. K., and Lee, H. (2007). Stable gene expression by self-complementary adeno-associated viruses in human MSCs. *Biochem Biophys Res Commun* 360(3), 573-9.
- Kitamura, Y., Tanigawa, T., Nanba, E., Ueno, E., Fukumoto, S., and Ichihara, K. (1995). Antisense oligonucleotide inhibits the expression of procollagen type III gene in mouse fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 215(3), 849-54.
- Koc, O. N., and Lazarus, H. M. (2001). Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant* 27(3), 235-9.
- Koc, O. N., Peters, C., Aubourg, P., Raghavan, S., Dyhouse, S., DeGasperi, R., Kolodny, E. H., Yoseph, Y. B., Gerson, S. L., Lazarus, H. M., Caplan, A. I., Watkins, P. A., and Krivit, W. (1999). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp Hematol* 27(11), 1675-81.
- Koob, T. J., Willis, T. A., Qiu, Y. S., and Hernandez, D. J. (2001). Biocompatibility of NDGA-polymerized collagen fibers. II. Attachment, proliferation, and migration of tendon fibroblasts in vitro. *J Biomed Mater Res* 56(1), 40-8.

- Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, S. J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105(3), 369-77.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L., and Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6(11), 1229-34.
- Lavaud, S., Poirier, B., Mandet, C., Belair, M. F., Irinopoulou, T., Heudes, D., Bazin, R., Bariety, J., Myara, I., and Chevalier, J. (2001). Inflammation is probably not a prerequisite for renal interstitial fibrosis in normoglycemic obese rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 280(4), F683-94.
- Lee, I. C., Wang, J. H., Lee, Y. T., and Young, T. H. (2007). The differentiation of mesenchymal stem cells by mechanical stress or/and co-culture system. *Biochem Biophys Res Commun* 352(1), 147-52.
- Lee, K. Y., Peters, M. C., Anderson, K. W., and Mooney, D. J. (2000). Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices. *Nature* 408(6815), 998-1000.
- Lera, D., Haddad, A. J., Sandor, G. K. B., and Ashmmakhi, N. (2005). Les materiels d'osteosynthese resorbables bioabsorbable Osteofixation Devices. *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique* 50(6), 723-732.
- Li, H., Yu, B., Zhang, Y., Pan, Z., and Xu, W. (2006). Jagged1 protein enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 341(2), 320-5.
- Lin, T. W., Cardenas, L., and Soslowsky, L. J. (2004). Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech* 37(6), 865-77.
- Linnala, A., Kinnula, V., Laitinen, L. A., Lehto, V. P., and Virtanen, I. (1995). Transforming growth factor-beta regulates the expression of fibronectin and tenascin in BEAS 2B human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13(5), 578-85.
- Liu, S. H., Yang, R. S., al-Shaikh, R., and Lane, J. M. (1995). Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin Orthop Relat Res* (318), 265-78.
- Lo, I. K., Marchuk, L., Hart, D. A., and Frank, C. B. (2003). Messenger ribonucleic acid levels in disrupted human anterior cruciate ligaments. *Clin Orthop Relat Res* (407), 249-58.

- Locklin, R. M., Williamson, M. C., Beresford, J. N., Triffitt, J. T., and Owen, M. E. (1995). In vitro effects of growth factors and dexamethasone on rat marrow stromal cells. *Clin Orthop Relat Res* (313), 27-35.
- Lodie, T. A., Blickarz, C. E., Devarakonda, T. J., He, C., Dash, A. B., Clarke, J., Gleneck, K., Shihabuddin, L., and Tubo, R. (2002). Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng* 8(5), 739-51.
- Lopez-Vazquez, E., Juan, J. A., Vila, E., and Debon, J. (1991). Reconstruction of the anterior cruciate ligament with a Dacron prosthesis. *J Bone Joint Surg Am* 73(9), 1294-300.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., and Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 30(6), 1292-305.
- Mackie, E. J. (1994). Tenascin in connective tissue development and pathogenesis. *Perspect Dev Neurobiol* 2(1), 125-32.
- Mackie, E. J. (1997). Molecules in focus: tenascin-C. *Int J Biochem Cell Biol* 29(10), 1133-7.
- Majumdar, M. K., Thiede, M. A., Mosca, J. D., Moorman, M., and Gerson, S. L. (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 176(1), 57-66.
- Makhlef, H. A., Stepniakowska, J., Hoffman, S., Smith, E., LeRoy, E. C., and Trojanowska, M. (1996). IL-4 upregulates tenascin synthesis in scleroderma and healthy skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 107(6), 856-9.
- Maniotis, A. J., Chen, C. S., and Ingber, D. E. (1997). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(3), 849-54.
- Marui, T., Niyibizi, C., Georgescu, H. I., Cao, M., Kavalkovich, K. W., Levine, R. E., and Woo, S. L. (1997). Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts. *J Orthop Res* 15(1), 18-23.
- Marumo, K., Saito, M., Yamagishi, T., and Fujii, K. (2005). The "ligamentization" process in human anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar and hamstring tendons: a biochemical study. *Am J Sports Med* 33(8), 1166-73.

- McAdams, R. M., Mustafa, S. B., Shenberger, J. S., Dixon, P. S., Henson, B. M., and DiGeronimo, R. J. (2006). Cyclic stretch attenuates effects of hyperoxia on cell proliferation and viability in human alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291(2), L166-74.
- McKay, R. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science* 276(5309), 66-71.
- McLaren, A. (2001). Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature* 414(6859), 129-31.
- Mehr, D., Pardubsky, P. D., Martin, J. A., and Buckwalter, J. A. (2000). Tenascin-C in tendon regions subjected to compression. *J Orthop Res* 18(4), 537-45.
- Meirelles Lda, S., and Nardi, N. B. (2003). Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 123(4), 702-11.
- Minguell, J. J., Erices, A., and Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 226(6), 507-20.
- Miura, K., Nagai, H., Ueno, Y., Goto, T., Mikami, K., Nakane, K., Yoneyama, K., Watanabe, D., Terada, K., Sugiyama, T., Imai, K., Senoo, H., and Watanabe, S. (2003). Epimorphin is involved in differentiation of rat hepatic stem-like cells through cell-cell contact. *Biochem Biophys Res Commun* 311(2), 415-23.
- Mori, F., Tanji, K., and Wakabayashi, K. (2000). Widespread calcium deposits, as detected using the alizarin red S technique, in the nervous system of rats treated with dimethyl mercury. *Neuropathology* 20(3), 210-5.
- Morrison, T. B., Weis, J. J., and Wittwer, C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24(6), 954-8, 960, 962.
- Murphy, J. M., Dixon, K., Beck, S., Fabian, D., Feldman, A., and Barry, F. (2002). Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 46(3), 704-13.
- Murray, M. M., and Spector, M. (2001). The migration of cells from the ruptured human anterior cruciate ligament into collagen-glycosaminoglycan regeneration templates in vitro. *Biomaterials* 22(17), 2393-402.

- Neidlinger-Wilke, C., Grood, E. S., Wang, J.-C., Brand, R. A., and Claes, L. (2001). Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: studies of cells grown in cyclically stretched substrates. *J Orthop Res* 19(2), 286-93.
- Nelissen, R. G., and Hogendoorn, P. C. (2001). Retain or sacrifice the posterior cruciate ligament in total knee arthroplasty? A histopathological study of the cruciate ligament in osteoarthritic and rheumatoid disease. *J Clin Pathol* 54(5), 381-4.
- Noth, U., Schupp, K., Heymer, A., Kall, S., Jakob, F., Schutze, N., Baumann, B., Barthel, T., Eulert, J., and Hendrich, C. (2005). Anterior cruciate ligament constructs fabricated from human mesenchymal stem cells in a collagen type I hydrogel. *Cytotherapy* 7(5), 447-55.
- Obradovic, B., Carrier, R. L., Vunjak-Novakovic, G., and Freed, L. E. (1999). Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage. *Biotechnol Bioeng* 63(2), 197-205.
- Ohnishi, S., Yanagawa, B., Tanaka, K., Miyahara, Y., Obata, H., Kataoka, M., Kodama, M., Ishibashi-Ueda, H., Kangawa, K., Kitamura, S., and Nagaya, N. (2007). Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 42(1), 88-97.
- Olson, E. J., Kang, J. D., Fu, F. H., Georgescu, H. I., Mason, G. C., and Evans, C. H. (1988). The biochemical and histological effects of artificial ligament wear particles: in vitro and in vivo studies. *Am J Sports Med* 16(6), 558-70.
- Orend, G., and Chiquet-Ehrismann, R. (2000). Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. *Exp Cell Res* 261(1), 104-10.
- Orend, G., Huang, W., Olayioye, M. A., Hynes, N. E., and Chiquet-Ehrismann, R. (2003). Tenascin-C blocks cell-cycle progression of anchorage-dependent fibroblasts on fibronectin through inhibition of syndecan-4. *Oncogene* 22(25), 3917-26.
- Oryan, A. (1995). Role of collagen in soft connective tissue wound healing. *Transplant Proc* 27(5), 2759-61.
- Oswald, J., Boxberger, S., Jorgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhauser, M., and Werner, C. (2004). Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22(3), 377-84.
- Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10, 63-76.

- Owen, M., and Friedenstein, A. J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 136, 42-60.
- Owen, M. E., Cave, J., and Joyner, C. J. (1987). Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F. *J Cell Sci* 87 (Pt 5), 731-8.
- Pagnotto, M. R., Wang, Z., Karpie, J. C., Ferretti, M., Xiao, X., and Chu, C. R. (2007). Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor-beta1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. *Gene Ther* 14(10), 804-13.
- Park, J. S., Chu, J. S., Cheng, C., Chen, F., Chen, D., and Li, S. (2004). Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng* 88(3), 359-68.
- Parsons, J. R., Bhayani, S., Alexander, H., and Weiss, A. B. (1985). Carbon fiber debris within the synovial joint. A time-dependent mechanical and histologic study. *Clin Orthop Relat Res* (196), 69-76.
- Paunescu, V., Deak, E., Herman, D., Siska, I. R., Tanasie, G., Bunu, C., Anghel, S., Tatu, C. A., Oprea, T. I., Henschler, R., Ruster, B., Bistran, R., and Seifried, E. (2007). In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *J Cell Mol Med* 11(3), 502-8.
- Pedersen, S. F., Mills, J. W., and Hoffmann, E. K. (1999). Role of the F-actin cytoskeleton in the RVD and RVI processes in Ehrlich ascites tumor cells. *Exp Cell Res* 252(1), 63-74.
- Pennisi, E. (2002). Tending tender tendons. *Science* 295(5557), 1011.
- Pfander, D., Heinz, N., Rothe, P., Carl, H. D., and Swoboda, B. (2004). Tenascin and aggrecan expression by articular chondrocytes is influenced by interleukin 1beta: a possible explanation for the changes in matrix synthesis during osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 63(3), 240-4.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411), 143-7.
- Poitras Elyse, H. A. (2002). La PCR en temps reel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* 2(2), 2-11.
- Portner, R., Nagel-Heyer, S., Goepfert, C., Adamietz, P., and Meenen, N. M. (2005). Bioreactor design for tissue engineering. *J Biosci Bioeng* 100(3), 235-45.

- Potten, C. S., and Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110(4), 1001-20.
- Prockop, D. J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276(5309), 71-4.
- Provenzano, P. P., and Vanderby, R., Jr. (2006). Collagen fibril morphology and organization: implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol* 25(2), 71-84.
- Qi, M. C., Hu, J., Zou, S. J., Han, L. C., and Luo, E. (2005). [The changes of cytoskeleton F-actin in rat bone marrow mesenchymal stem cells and calvarial osteoblasts under mechanical strain]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 23(2), 110-2, 121.
- Quirici, N., Soligo, D., Bossolasco, P., Servida, F., Lumini, C., and Deliliers, G. L. (2002). Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 30(7), 783-91.
- Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L., and Verfaillie, C. M. (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98(9), 2615-25.
- Richardson, T. P., Peters, M. C., Ennett, A. B., and Mooney, D. J. (2001). Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 19(11), 1029-34.
- Richter, H. B., Franke, H., and Dargel, R. (1998). Expression of tenascin, fibronectin, and laminin in rat liver fibrogenesis--a comparative immunohistochemical study with two models of liver injury. *Exp Toxicol Pathol* 50(4-6), 315-22.
- Rickard, D. J., Kassem, M., Hefferan, T. E., Sarkar, G., Spelsberg, T. C., and Riggs, B. L. (1996). Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res* 11(3), 312-24.
- Rietze, R. L., Valcanis, H., Brooker, G. F., Thomas, T., Voss, A. K., and Bartlett, P. F. (2001). Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 412(6848), 736-9.
- Risbud, M. V., and Shapiro, I. M. (2005). Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering. *Orthod Craniofac Res* 8(2), 54-9.

- Rogers, J. J., Young, H. E., Adkison, L. R., Lucas, P. A., and Black, A. C., Jr. (1995). Differentiation factors induce expression of muscle, fat, cartilage, and bone in a clone of mouse pluripotent mesenchymal stem cells. *Am Surg* 61(3), 231-6.
- Sakai, T., Kawakatsu, H., Furukawa, Y., and Saito, M. (1995a). Regulation of EGF-induced tenascin-C by steroids in tenascin-C-non-producing human carcinoma cells. *Int J Cancer* 63(5), 720-5.
- Sakai, T., Ohta, M., Furukawa, Y., Saga, Y., Aizawa, S., Kawakatsu, H., and Saito, M. (1995b). Tenascin-C induction by the diffusible factor epidermal growth factor in stromal-epithelial interactions. *J Cell Physiol* 165(1), 18-29.
- Sarasa-Renedo, A., and Chiquet, M. (2005). Mechanical signals regulating extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Scand J Med Sci Sports* 15(4), 223-30.
- Sato, M., Theret, D. P., Wheeler, L. T., Ohshima, N., and Nerem, R. M. (1990). Application of the micropipette technique to the measurement of cultured porcine aortic endothelial cell viscoelastic properties. *J Biomech Eng* 112(3), 263-8.
- Sensebe, L., Deschaseaux, M., Li, J., Herve, P., and Charbord, P. (1997a). The broad spectrum of cytokine gene expression by myoid cells from the human marrow microenvironment. *Stem Cells* 15(2), 133-43.
- Sensebe, L., Mortensen, B. T., Fixe, P., Herve, P., and Charbord, P. (1997b). Cytokines active on granulomonopoiesis: release and consumption by human marrow myoid [corrected] stromal cells. *Br J Haematol* 98(2), 274-82.
- Shen Jie, Z. A. Q., Qin Yu Ming. (2001). Levels of Tenascin mRNA in monocrotaline Induced Pulmonary Hypertension in Rat.[Chinese]. *Clin. J. Contemp. Pediatr. Vol.3*(No.5), 519-521.
- Short, B., Brouard, N., Occhiodoro-Scott, T., Ramakrishnan, A., and Simmons, P. J. (2003). Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res* 34(6), 565-71.
- Si, Z., Bhardwaj, R., Rosch, R., Mertens, P. R., Klosterhalfen, B., and Klinge, U. (2002). Impaired balance of type I and type III procollagen mRNA in cultured fibroblasts of patients with incisional hernia. *Surgery* 131(3), 324-31.
- Sillaber, C., Walchshofer, S., Mosberger, I., Gaiger, A., Simonitsch, I., Chott, A., Lechner, K., and Valent, P. (1999). Immunophenotypic characterization of human bone marrow endosteal cells. *Tissue Antigens* 53(6), 559-68.

- Silver, F. H., Christiansen, D. L., Snowhill, P. B., and Chen, Y. (2000). Role of storage on changes in the mechanical properties of tendon and self-assembled collagen fibers. *Connect Tissue Res* 41(2), 155-64.
- Silver, F. H., Freeman, J. W., and Seehra, G. P. (2003). Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biomech* 36(10), 1529-53.
- Sugiki, T., Uyama, T., Toyoda, M., Morioka, H., Kume, S., Miyado, K., Matsumoto, K., Saito, H., Tsumaki, N., Takahashi, Y., Toyama, Y., and Umezawa, A. (2007). Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem* 100(5), 1240-54.
- Sumanasinghe, R. D., Bernacki, S. H., and Lobo, E. G. (2006). Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen matrices: effect of uniaxial cyclic tensile strain on bone morphogenetic protein (BMP-2) mRNA expression. *Tissue Eng* 12(12), 3459-65.
- The, T. K. H., MOE, K., TOH, S. L., and GOH, J. C. H. (2006). Advanced Bioreactor System for Tendon/Ligament Regeneration. *Papers of Technical Meeting on Medical and Biological Engineering, IEE Japan MBE-06(75-94)*, 47-50.
- Tocci, A., and Forte, L. (2003). Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J* 4(2), 92-6.
- Tohyama, H., and Yasuda, K. (1998). Significance of graft tension in anterior cruciate ligament reconstruction. Basic background and clinical outcome. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 6 Suppl 1, S30-7.
- Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R., and Miller, F. D. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3(9), 778-84.
- Tuli, R., Tuli, S., Nandi, S., Wang, M. L., Alexander, P. G., Haleem-Smith, H., Hozack, W. J., Manner, P. A., Danielson, K. G., and Tuan, R. S. (2003). Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells* 21(6), 681-93.
- Turgeman, G., Pittman, D. D., Muller, R., Kurkalli, B. G., Zhou, S., Pelled, G., Peyser, A., Zilberman, Y., Moutsatsos, I. K., and Gazit, D. (2001). Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. *J Gene Med* 3(3), 240-51.
- Tyagi, S., and Kramer, F. R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 14(3), 303-8.

Uematsu, K., Hattori, K., Ishimoto, Y., Yamauchi, J., Habata, T., Takakura, Y., Ohgushi, H., Fukuchi, T., and Sato, M. (2005). Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. *Biomaterials* 26(20), 4273-9.

Van Citters, K. M., Hoffman, B. D., Massiera, G., and Crocker, J. C. (2006). The role of F-actin and myosin in epithelial cell rheology. *Biophys J* 91(10), 3946-56.

Van Epps, D. E., Bender, J., Lee, W., Schilling, M., Smith, A., Smith, S., Unverzagt, K., Law, P., and Burgess, J. (1994). Harvesting, characterization, and culture of CD34+ cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood Cells* 20(2-3), 411-23.

Verfaillie, C. M. (2002). Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 12(11), 502-8.

Vilamitjana-Amedee, J., Bareille, R., Rouais, F., Caplan, A. I., and Harmand, M. F. (1993). Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A(9), 699-707.

Virts, E., Barritt, D., Siden, E., and Raschke, W. C. (1997). Murine mast cells and monocytes express distinctive sets of CD45 isoforms. *Mol Immunol* 34(16-17), 1191-7.

Vunjak-Novakovic, G., Altman, G., Horan, R., and Kaplan, D. L. (2004). Tissue engineering of ligaments. *Annu Rev Biomed Eng* 6, 131-56.

Waggett, A. D., Ralphs, J. R., Kwan, A. P., Woodnutt, D., and Benjamin, M. (1998). Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol* 16(8), 457-70.

Wang, H., Ip, W., Boissy, R., and Grood, E. S. (1995). Cell orientation response to cyclically deformed substrates: experimental validation of a cell model. *J Biomech* 28(12), 1543-52.

Wang, N., Butler, J. P., and Ingber, D. E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260(5111), 1124-7.

Wang, Q. W., Chen, Z. L., and Piao, Y. J. (2005). Mesenchymal stem cells differentiate into tenocytes by bone morphogenetic protein (BMP) 12 gene transfer. *J Biosci Bioeng* 100(4), 418-22.

Wang, X., Hisha, H., Taketani, S., Adachi, Y., Li, Q., Cui, W., Cui, Y., Wang, J., Song, C., Mizokami, T., Okazaki, S., Fan, T., Fan, H., Lian, Z., Gershwin, M. E., and Ikehara, S. (2006).

- Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. *Stem Cells* 24(3), 482-93.
- Watanabe, N., Woo, S. L., Papageorgiou, C., Celechovsky, C., and Takai, S. (2002). Fate of donor bone marrow cells in medial collateral ligament after simulated autologous transplantation. *Microsc Res Tech* 58(1), 39-44.
- Weiss, A. B., Blazina, M. E., Goldstein, A. R., and Alexander, H. (1985). Ligament replacement with an absorbable copolymer carbon fiber scaffold--early clinical experience. *Clin Orthop Relat Res* (196), 77-85.
- Weiss, J. A., Woo, S. L., Ohland, K. J., Horibe, S., and Newton, P. O. (1991). Evaluation of a new injury model to study medial collateral ligament healing: primary repair versus nonoperative treatment. *J Orthop Res* 9(4), 516-28.
- Weitzel, P. P., Richmond, J. C., Altman, G. H., Calabro, T., and Kaplan, D. L. (2002). Future direction of the treatment of ACL ruptures. *Orthop Clin North Am* 33(4), 653-61.
- Wendt, D., Jakob, M., and Martin, I. (2005). Bioreactor-based engineering of osteochondral grafts: from model systems to tissue manufacturing. *J Biosci Bioeng* 100(5), 489-94.
- Wenisch, S., Trinkaus, K., Hild, A., Hose, D., Heiss, C., Alt, V., Klisch, C., Meissl, H., and Schnettler, R. (2006). Immunochemical, ultrastructural and electrophysiological investigations of bone-derived stem cells in the course of neuronal differentiation. *Bone* 38(6), 911-21.
- Wilkins, B. S., and Jones, D. B. (1995). Vascular networks within the stroma of human long-term bone marrow cultures. *J Pathol* 177(3), 295-301.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., and Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22(1), 130-1, 134-8.
- Woo, S. L., Abramowitch, S. D., Kilger, R., and Liang, R. (2006). Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair. *J Biomech* 39(1), 1-20.
- Woo, S. L., Hildebrand, K., Watanabe, N., Fenwick, J. A., Papageorgiou, C. D., and Wang, J. H. (1999). Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop Relat Res* (367 Suppl), S312-23.
- Yamada, H., Takemasa, T., and Yamaguchi, T. (2000). Theoretical study of intracellular stress fiber orientation under cyclic deformation. *J Biomech* 33(11), 1501-5.

- Yang, C. W., Hattori, M., Vlassara, H., He, C. J., Carome, M. A., Yamato, E., Elliot, S., Striker, G. E., and Striker, L. J. (1995). Overexpression of transforming growth factor-beta 1 mRNA is associated with up-regulation of glomerular tenascin and laminin gene expression in nonobese diabetic mice. *J Am Soc Nephrol* 5(8), 1610-7.
- Yang, S., Leong, K. F., Du, Z., and Chua, C. K. (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 7(6), 679-89.
- Yang, Z., Xie, H., and Li, T. (2000). Tissue engineering of the musculo-skeletal system--basic research and clinical applications. *Hand Surg* 5(1), 49-55.
- Yarmola, E. G., and Bubb, M. R. (2004). Effects of profilin and thymosin beta4 on the critical concentration of actin demonstrated in vitro and in cell extracts with a novel direct assay. *J Biol Chem* 279(32), 33519-27.
- Yarmola, E. G., Somasundaram, T., Boring, T. A., Spector, I., and Bubb, M. R. (2000). Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *J Biol Chem* 275(36), 28120-7.
- Yeon Lim, J., Jeun, S. S., Lee, K. J., Oh, J. H., Kim, S. M., Park, S. I., Jeong, C. H., and Kang, S. G. (2006). Multiple stem cell traits of expanded rat bone marrow stromal cells. *Exp Neurol* 199(2), 416-26.
- Yoon, Y. S., Wecker, A., Heyd, L., Park, J. S., Tkebuchava, T., Kusano, K., Hanley, A., Scadova, H., Qin, G., Cha, D. H., Johnson, K. L., Aikawa, R., Asahara, T., and Losordo, D. W. (2005). Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 115(2), 326-38.
- Young, R. G., Butler, D. L., Weber, W., Caplan, A. I., Gordon, S. L., and Fink, D. J. (1998). Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 16(4), 406-13.
- Zhang, S., Ge, J., Sun, A., Xu, D., Qian, J., Lin, J., Zhao, Y., Hu, H., Li, Y., Wang, K., and Zou, Y. (2006). Comparison of various kinds of bone marrow stem cells for the repair of infarcted myocardium: single clonally purified non-hematopoietic mesenchymal stem cells serve as a superior source. *J Cell Biochem* 99(4), 1132-47.
- Zhao, Y., and Young, S. L. (1995). TGF-beta regulates expression of tenascin alternative-splicing isoforms in fetal rat lung. *Am J Physiol* 268(2 Pt 1), L173-80.

Zulewski, H., Abraham, E. J., Gerlach, M. J., Daniel, P. B., Moritz, W., Muller, B., Vallejo, M., Thomas, M. K., and Habener, J. F. (2001). Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50(3), 521-33.

ANNEXE

Annexe I

Principe de la microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est une technique de microscopie fondée sur le principe des interactions électrons-matière. Un faisceau d'électrons balaie la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Différents détecteurs permettent d'analyser ces particules et de reconstruire une image de la surface.

La figure V-1 montre le schéma de principe d'un MEB : un faisceau fin d'électrons est projeté sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre le faisceau d'électrons et l'échantillon génère des électrons secondaires, de basse énergie qui sont accélérés vers un détecteur d'électrons secondaires qui amplifie le signal. À chaque point d'impact correspond ainsi un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact qui détermine le rendement en électrons secondaires et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée.

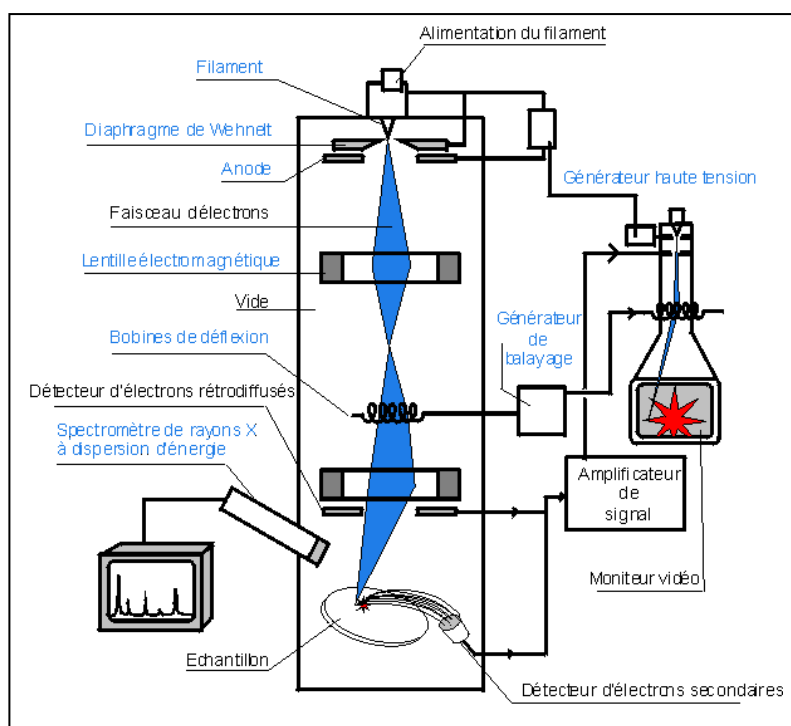


Figure A-1 Schéma de principe de la microscopie à balayage

(<http://materiaux.ecam.fr>, 2007)

Un microscope électronique à balayage est essentiellement composé d'un canon à électrons et d'une colonne électronique dont la fonction est de produire une sonde électronique fine sur l'échantillon, d'une platine porte-objet permettant de déplacer l'échantillon dans les 3 directions et de détecteurs permettant de détecter et d'analyser les rayonnements émis par l'échantillon. En outre, l'appareil doit nécessairement être équipé d'un système de pompe à vide.

Le faisceau électronique fin est produit par un canon à électrons qui joue le rôle de source réduite par des lentilles électroniques qui jouent le même rôle vis-à-vis du faisceau d'électrons que des lentilles conventionnelles, photoniques dans un microscope optique. Des bobines disposées selon les deux axes perpendiculaires à l'axe du faisceau et parcourues par des courants synchronisés permettent de soumettre la sonde à un balayage du même type que celui de la télévision. Les lentilles électroniques, qui sont généralement des lentilles magnétiques et les bobines de balayage forment un ensemble que l'on appelle la colonne électronique.

Dans la pratique, le microscope électronique à balayage est l'un des appareils fondamentaux pour les recherches tribologiques. Elle peut être appliquée à plusieurs domaines comme : la technologie des semi-conducteurs et micro fabrication, la science des matériaux, et la biologie. La vision en relief du MEB se prête bien à l'observation des cellules pour la profondeur de champ nettement plus élevée que celle des microscopes optiques.

Annexe II

Principe de la microscopie électronique en transmission (MET)

Le principe de la microscopie électronique en transmission présente des analogies avec la microscopie optique. Dans un microscope électronique, l'émission thermoélectronique des électrons est produite par chauffage d'un filament de tungstène (2500°C) ou d'un cristal d'hexaborure de lanthane (1500°C), qui donne un faisceau d'électrons plus important et plus cohérent formant la cathode. Les électrons sont ensuite focalisés par le « wehnelt » porté à un potentiel négatif et accélérés vers l'anode par le champ électrique existant entre l'anode et le filament (Ht de 80kV à 1000 kV).

Puis, ce faisceau est focalisé, grâce à un système de 2 lentilles électromagnétiques, ou condenseurs, vers l'échantillon à examiner. Ces lentilles jouent le même rôle que les lentilles classiques en verre des microscopes optiques. Ce sont des bobines électromagnétiques qui produisent un champ magnétique lorsqu'elles sont traversées par un courant électrique, de telle manière que ce courant agisse sur le faisceau d'électrons pour le faire converger ou diverger. L'échantillon en coupe d'épaisseur d'environ 80nm placée sur une grille en cuivre de 3mm de diamètre, puis sur une platine permettant d'orienter la préparation dans différentes directions par rapport au faisceau d'électrons. Une lentille magnétique, appelée objectif, donne une image de l'objet agrandie de 10 à 100 fois. Cette image est de nouveau reprise par une lentille intermédiaire. Enfin, une lentille magnétique, dite de projection, donne une image agrandie de l'image intermédiaire, que l'on observe sur un écran fluorescent (Grandissement maximum du microscope électronique Philips CM12 : $\times 5,3.10^5$). Cet écran peut éventuellement être escamoté, pour permettre aux électrons d'impressionner une plaque photographique. Pour favoriser le déplacement des électrons à l'intérieur du microscope, des pompes à vide maintiennent dans l'appareil un vide assez poussé (environ 10^{-5} mmHg). La microscopie électronique par transmission permet d'observer l'intérieur des cellules, c'est-à-dire, la substructure cellulaire.

Annexe III

Principe de Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative en temps réel

La PCR classique est une technique qui permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures. C'est généralement suffisant pour une utilisation ultérieure. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de répllication d'une matrice double brins d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre. Les amorces définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier. L'avantage consiste à utiliser les produits de chaque étape de synthèse comme matrices pour les étapes suivantes, au lieu de les séparer afin de ne réutiliser que la matrice originale. Ainsi, l'amplification est exponentielle au lieu d'être linéaire.

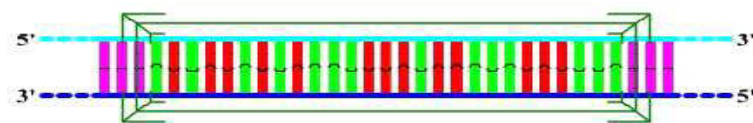
Chaque cycle de PCR est constitué de trois phases différentes à trois températures différentes : la dénaturation, l'hybridation (ou anelage) et l'élongation (ou extension des amorces). Dans la première étape (dénaturation), les liaisons faibles qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN à une température haute (environ 95°C). Dans l'étape d'hybridation, les amorces spécifiques s'hybrident aux deux extrémités 3' de l'ADNc cible sur le principe de l'appariement des bases complémentaires. Le choix de la température d'hybridation résulte d'un compromis entre plusieurs paramètres : elle est fonction de la longueur et de la séquence des amorces. La température d'hybridation est, de toutes façons, inférieure à la température de dénaturation de l'ADN double brins. Pendant l'étape d'élongation, les amorces hybridées à l'ADNc (matrice) servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire (nouvelle copie). La polymérisation se fait par ajout successif des désoxyribonucléotides en large excès. Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante au brin de la matrice. Les brins initiaux sont donc recopiés et chaque brin recopié servira à son tour de matrice pendant les cycles suivants (Figure A-2). L'ADNc cible se reproduit donc de façon exponentielle.

La technique de PCR quantitative en temps réel est fondée sur le même principe que la PCR classique à la différence qu'un agent fluorescent est ajouté dans le procédé. Depuis son invention, cette technologie devient de plus en plus populaire dans différents secteurs d'activités (laboratoire d'analyse médicale, recherche, pharmacologie, etc...). Cette technique est fondée sur

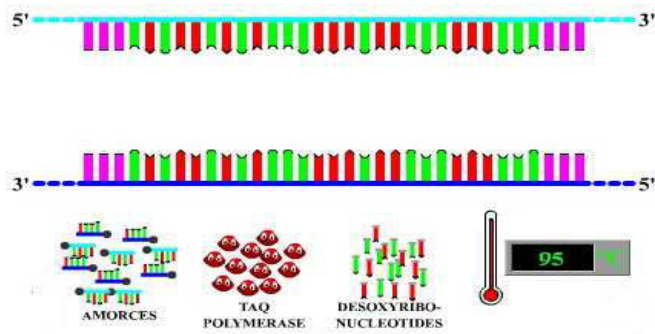
la détection quantitative d'un agent fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplification générée pendant la réaction de PCR.

A comparer avec la technique de PCR conventionnelle, la PCR quantitative en temps réel mesure l'intégralité de la cinétique d'amplification au-dessus d'un bruit de fond. La réaction d'amplification étant exponentielle, les données de fluorescence sont exprimées en logarithme afin d'exploiter facilement les données qui prennent alors une apparence linéaire. Cette partie, alors appelée « segment quantifiable », permet de calculer la quantité d'ADN initiale. La PCR quantitative en temps réel a quatre avantages :

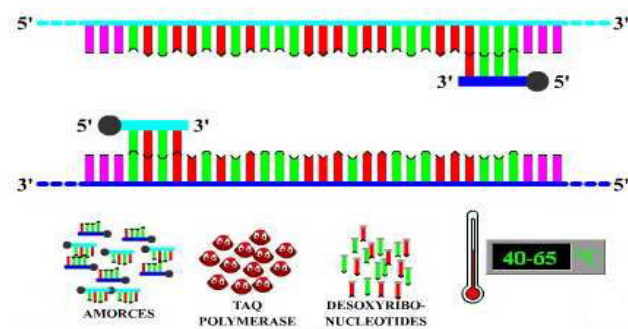
- 1) Quantitatif : la technique permet de connaître la quantité d'ARN exprimée dans l'échantillon. Il existe une relation entre la quantité de séquence cible de départ et la quantité de produit amplifié à n'importe quel cycle.
- 2) Plus sensible : théoriquement, il est possible de détecter un échantillon dès qu'il y a une copie du gène cible.
- 3) Plus fiable : la réaction utilise généralement des systèmes en capillaires fermés et la quantification ne requiert aucune manipulation après amplification, les problèmes de contamination sont ainsi significativement réduits.
- 4) Evaluation en temps réel : la croissance de séquence cible peut être détectée par l'intensité de fluorescence à chaque cycle.



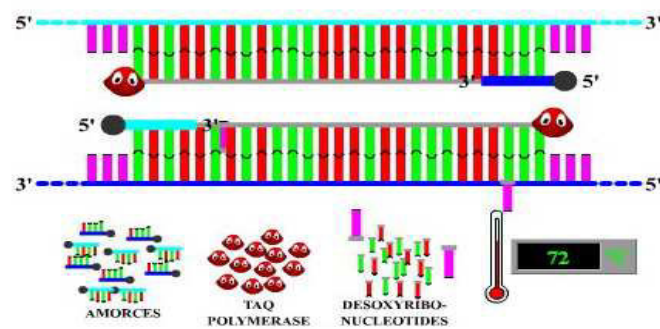
Séquence cible



Dénaturation



Hybridation



Elongation

Figure A-2 Schéma de PCR classique

(<http://www.ens-lyon.fr> 2007)

Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons:

- 1) Les agents fluorescents se liant à l'ADN double brins (ex. SYBR Green I) (Morrison, Weis, and Wittwer, 1998)
- 2) Les sondes fluorescentes.(ex. Hydrolyse de sondes, Hybridation de 2 sondes, Balises moléculaires et Amorce scorpion) (Mackay, Arden, and Nitsche, 2002; Tyagi and Kramer, 1996; Wittwer et al., 1997).

Dans nos expériences, nous avons utilisé la technologie SYBR Green I car elle est économique, elle n'inhibe pas la réaction d'amplification et il n'y a pas d'amorce fluorescente. Une lampe halogène produit, grâce à un filtre, une lumière monochromatique centrée à 485nm qui est transmise optiquement jusqu'à la plaque de PCR. Le fluorophore SYBR Green I, présent dans le mélange réactionnel, est alors excité à cette longueur d'onde et réémet une fluorescence verte à 520nm. Le rayonnement émis est capté par un système de détection vidéo et les images de la plaque sont stockées dans la mémoire de l'ordinateur.

Le SYBR Green I est un composé organique aromatique de formule chimique $C_{32}H_{37}N_4S$ faisant partie des cyanines asymétriques. C'est une molécule pouvant se fixer uniquement sur des acides nucléiques double brins ce qui la rend un très bon fluorophore (Figure A-3). Il a donc permis à la PCR quantitative en temps réel de rapidement devenir une méthode alternative à la PCR conventionnelle couplée à l'électrophorèse utilisant des révélateurs au bromure d'éthidium ou par marquage radioactif pour un grand nombre d'applications dont la détection d'ADN et d'ARN. Il permet également de quantifier les acides nucléiques en solution, tout en n'interférant que peu avec la réaction en chaîne par polymérase. Il est le principal marqueur spécifique de séquence utilisée en PCR en temps réel. Sa très grande sensibilité le rend exploitable en électrophorèse capillaire (détection jusqu'à 80 femtogrammes d'ADN double brins), en cytométrie en flux, pour des puces à ADN et en imagerie par fluorescence. Il sert également à la quantification d'activités enzymatiques (DNases, télomérases) ou pour celle de l'ADN double brins en milieu défavorable par la présence d'inhibiteur de fluorescence.

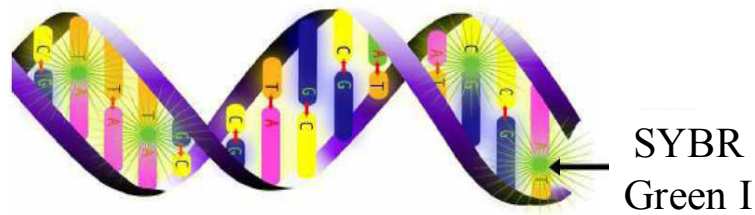


Figure A-3 Schéma de SYBR GREEN I

Lors de la réaction d'amplification par PCR, les doubles brins d'ADN sont séparés durant la dénaturation, le SYBR Green I libre est alors peu fluorescent. A la température d'appariement, quelques molécules se lient aux doubles brins d'ADN nouvellement synthétisés émettant une fluorescence lors de l'excitation. Durant l'étape d'élongation, de plus en plus de molécules se lient aux brins et l'accroissement de la fluorescence peut être suivi en temps réel (Bustin, 2000; Higuchi et al., 1992). Ainsi, l'émission de la fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégrée à l'appareil de PCR en temps réel. Ce système permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifiée durant la réaction (Bustin, 2000)(Figure A-4).

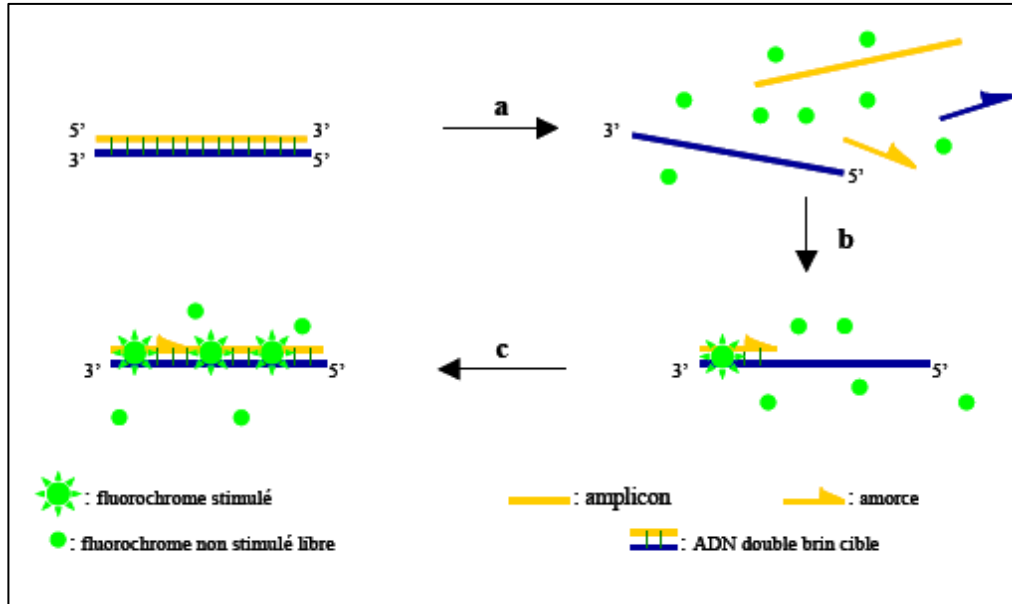


Figure A-4 Schéma de la réaction d'amplification par PCR quantitative en temps réel avec SYBR GREEN I

(a) Les doubles brins d'ADN sont séparés durant la dénaturation, le SYBR Green I libre est peu fluorescent ; (b) à la température d'appariement, quelques molécules se lient aux doubles brins d'ADN nouvellement synthétisés émettant une fluorescence lors de l'excitation ; (c) durant l'étape d'élongation, de plus en plus de molécules se lient aux brins et l'accroissement de la fluorescence peut être suivi en temps réel (Poitras Elyse, 2002).

Après la PCR, le logiciel représente graphiquement l'augmentation de la fluorescence de chaque capillaire au cours des cycles successifs. Le nombre de cycles étant placé en abscisse et le logarithme de l'intensité de la fluorescence en ordonnée, les amplifications suivent une courbe sigmoïde en 3 phases. Pendant la première phase, pouvant durer de 15 à 25 cycles, la fluorescence du capillaire étudié ne se démarque pas du bruit de fond. Puis l'augmentation de la fluorescence passe par une phase exponentielle qui dure environ 5 cycles avant d'atteindre un plateau de saturation par manque de primaire libre, d'agent fluorescent libre, ou de nucléotide libre.

Le « cycle seuil » ou la valeur Ct (« threshold cycle ») est défini comme le point précis dans la réaction où la phase exponentielle d'amplification commence au cours de la PCR. Le cycle seuil correspond donc au cycle au cours duquel la fluorescence d'un échantillon devient significativement différente du bruit de fond. Ce seuil, déterminé par l'opérateur après analyse des profils de fluorescence, permet de comparer les amplifications de tous les échantillons pendant la phase exponentielle (Figure A-5).

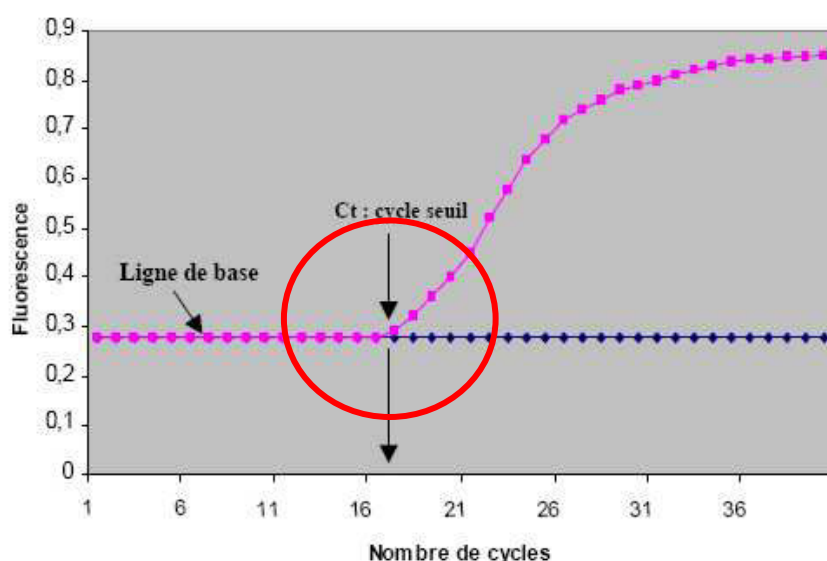


Figure A-5 Exemple de courbe sigmoïde et cycle seuil lors d'une PCR en temps réel

La quantification en passant par une valeur mathématique en nombre de cycles (Ct) permet donc d'obtenir des résultats fiables, mais n'est pas exploitable directement. Afin d'obtenir la quantité d'ADN initiale, il va falloir réaliser de nouvelles transformations mathématiques qui nécessitent de connaître l'efficacité de la PCR. Il existe une relation linéaire entre le nombre de copies d'un gène initialement présent dans le capillaire et le cycle seuil. Cette

dernière est généralement déterminée grâce à une gamme d'étalonnage. La fluorescence des capillaires au cours de la PCR est représentée en fonction du nombre de cycles. Chaque faisceau regroupe 3 courbes correspondant à 3 amplifications réalisées avec la même quantité initiale d'ADN. Le seuil de fluorescence, symbolisé par une ligne horizontale, permet de déterminer le cycle seuil (Ct) de chaque courbe. La gamme étalon est construite en exprimant le cycle seuil de chaque amplification en fonction du logarithme de la quantité initiale d'ADN génomique déposée dans chaque capillaire ($\log(N_0)$). Le coefficient de corrélation et la pente de la courbe de la gamme étalon sont donnés par un logiciel sur le graphique (Figure A-6).

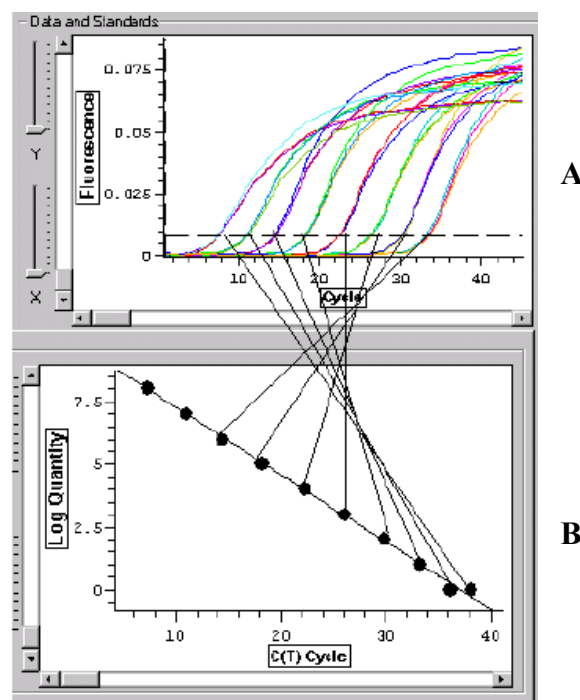


Figure A-6 Exemple de graphique de la gamme étalon et sa corrélation avec les cycles seuils (Ct)

A : Les courbes de fluorescence au cours de la PCR ; B : Une gamme étalon.

Pour mesurer précisément le nombre de copies initiales d'un échantillon (N_0), il est plus facile d'utiliser une représentation linéaire reliant le nombre de cycles à N_0 . Le nombre de molécules accumulées au cycle seuil (Ct) est exprimé par l'équation ci-dessous :

$$N_x = N_0 \cdot (1 + E)^{C_t}$$

N_0 étant le nombre de copies initiales de l'échantillon, N_x le nombre de copies d'ADN de l'échantillon au point Ct, E l'efficacité de la PCR ($E=10^{1/Pente}-1$), et Ct le point précis dans la réaction où la phase exponentielle d'amplification commence.

D'une part, nous pouvons obtenir l'efficacité de la PCR (la valeur de E) sur la gamme étalon, d'autre part, le C_t et le N_x sont automatiquement donnés par le logiciel de traitement des données après les cycles d'amplification. Le nombre de copies initiales (N_0) est alors calculé par l'équation ci-dessus.

Après la PCR, une courbe de fusion (melting curve) est opérée afin de s'assurer de la pureté des copies d'ADN. Elle est obtenue en chauffant les copies d'ADN de 45 à 75°C par palier de 0,1°C en faisant l'acquisition de l'intensité de fluorescence en continu. Si l'échantillon est pur, alors la courbe de fusion présente un pic dont l'abscisse du maximum est la température de fusion (T_m , melting temperature) comme le montre la figure A-7.

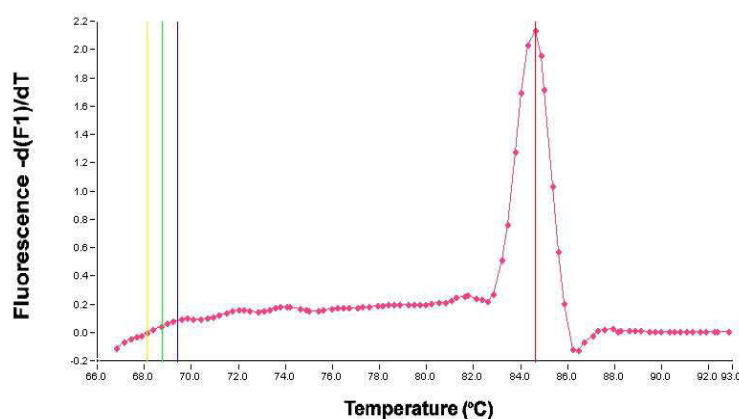


Figure A-7 Exemple de courbe de fusion

Annexe IV

Principe de la Microscopie confocale à balayage laser

La microscopie confocale à balayage laser permet de visualiser des échantillons biologiques en 3D en éliminant la lumière parasite. Un microscope SP2 Leica pourvu de filtres dichroïques, en excitation et en émission, qui sont utilisés afin d'améliorer le taux de transmission du signal de fluorescence. Cette amélioration passe d'une part par l'utilisation d'un cristal 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.

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 par un rayon laser concentré par une lentille au lieu d'un faisceau de lumière blanche, qui balaie point par point la surface en déplaçant un diaphragme. La fréquence de balayage permet d'acquérir le signal de fluorescence le plus rapidement possible sur le détecteur qui est dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif. Seule la lumière d'émission de fluorescence provenant du plan focal est collectée au niveau du PMT (photo-multiplieurs) pour constituer l'image (Figure A-8).

Le balayage par le laser se fait à l'aide de deux miroirs orthogonaux. Les détecteurs utilisés sont des tubes PMT, l'intensité lumineuse est mesurée et numérisée en fonction de la position du laser dans l'échantillon. L'emploi d'une source lumineuse cohérente (laser) ainsi que la taille réduite du champ éclairé permettent d'obtenir une résolution latérale légèrement meilleure (160-180nm) à celle attendue pour un microscope optique conventionnel (200nm) et la profondeur de champ est de l'ordre de 600nm.

Les lasers utilisés le plus fréquemment sont les suivants:

- Argon-ion (458nm, 476nm, 488nm, 514nm)
- Hélium-cadmium (325nm)
- Hélium-néon (543nm, 596nm, 633nm)

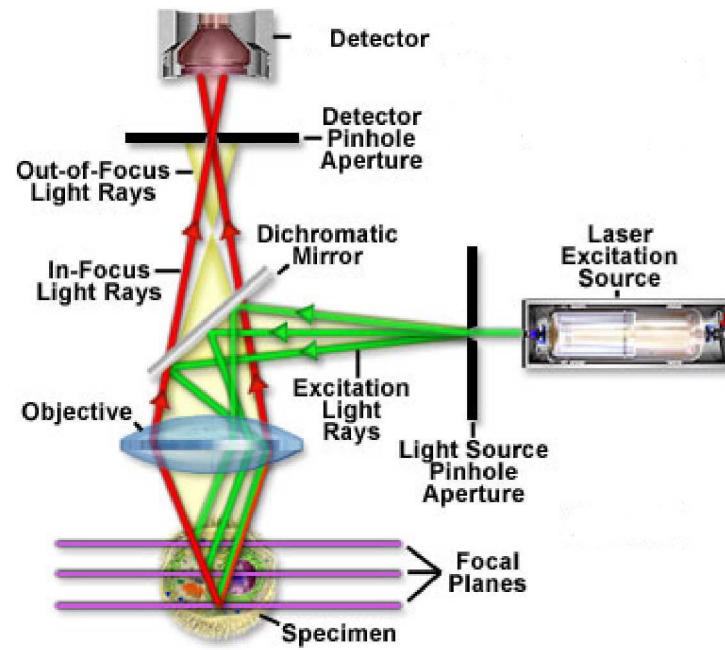


Figure A-8 Schéma de principe du microscopie confocale

(<http://www. www.microscopyu.com>)

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur René SANTUS, Professeur, Laboratoire de Photobiologie, INSERM, Paris

Madame Jinping OU-YANG, Professeur, Faculté de Médecine, Université de Wuhan, Chine

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame ZHANG Lei

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

"Utilisation de cellules souches médullaires en bioingénierie tissulaire du ligament"

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANCEUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

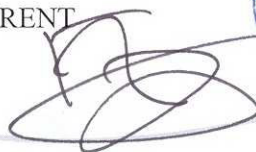
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Bioingénierie - Biomatériaux** »

Fait à Vandoeuvre, le 19 décembre 2007

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



RESUME

UTILISATION DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES MEDULLAIRES EN BIOINGENIERIE TISSULAIRE DU LIGAMENT

Etude de différents effets de la co-culture sans contact avec des fibroblastes ligamentaires et de l'étirement uniaxial sur les CSMM.

Les ligaments jouent un rôle important dans le mouvement et la stabilité des articulations. Les accidents et la fatigue chronique sont les principales raisons des ruptures de ligaments qui n'ont généralement pas de capacité de guérison, ce qui conduit à de graves dysfonctionnements du ligament et des articulations. La construction des ligaments en bioingénierie donne un nouvel espoir thérapeutique. Pour construire un tel tissu, les cellules sont très importantes dans la mise en oeuvre de la construction d'un biotissu ayant de bonnes propriétés tant biologiques que mécaniques. Quelle source cellulaire et quel microenvironnement doivent être utilisés pour la reconstruction des ligaments ?

L'objectif de ce travail était d'étudier la différenciation des cellules souches mésenchymateuses médullaires (CSMM) en fibroblaste. Pour ce faire, d'une part, nous avons co-cultivé des CSMM du rat sans contact avec des fibroblastes ligamentaires, et d'autre part, nous avons stimulé mécaniquement les CSMM. Un suivi des ARNm et des protéines associées caractéristiques des ligaments (collagènes I et III et ténascine-C) a été analysés.

Nos résultats expérimentaux ont montré que la culture des CSMM dans un microenvironnement fibroblastique de ligaments ou l'étirement favorisent les synthèses de collagènes I et III et de ténascine-C dans les proportions proches des ligaments.

L'ensemble de cette étude suggère qu'il est envisageable d'utiliser les CSMM comme source cellulaire, pour une application clinique, en ingénierie tissulaire du ligaments.

Mots clés : ingénierie tissulaire du ligament, ligament, CSMM, fibroblaste, co-culture sans contact, stretching, collagène I, collagène III, ténascine-C

ABSTRACT

USE OF BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELL IN BIOENGINEERING OF LIGAMENTS

A study of effects on BMSC by indirect co-culture with ligament fibroblasts and stretching

Ligaments play an important role in the movement and stability of joints. Accidents and chronic fatigues are the main reasons for ligament lesion which usually is difficult for self healing and leads to serious dysfunction of ligaments and joints. The construction of bioengineering ligaments gives a new way to overcome this problem. Cells are very important in the construction of a biotissue with appropriate biological as well as mechanical properties. Which cellular source and microenvironment should be used for the reconstruction of ligaments?

The objective of this work is to study the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) into fibroblast. We co-cultured indirectly rat BMSC with ligament fibroblasts or stimulated them by mechanical stretching. After that, the expressions of characteristics mRNA and protein of ligaments (collagen I, III and tenascin-C) have been analyzed.

Our experimental results showed that the culture of BMSC in a microenvironment of ligament fibroblast or under stretching favored the syntheses of collagen I, III and tenascin-C in the proportions close to ligaments.

In summary, these studies suggest it is feasible to use BMSC as cellular source for a clinical application in tissue engineering of ligaments.

Key words: bioengineering of ligaments, ligament, BMSC, fibroblast, indirect co-culture, stretching, collagen I, collagen III, tenascin-C