



HAL
open science

Mise en place d'un modèle animal de tendinopathie précoce de la coiffe des rotateurs de l'épaule en vue de développer et valider des outils technologiques préventifs et thérapeutiques

Mohamed Attia

► To cite this version:

Mohamed Attia. Mise en place d'un modèle animal de tendinopathie précoce de la coiffe des rotateurs de l'épaule en vue de développer et valider des outils technologiques préventifs et thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2012. Français. NNT : 2012PEST0061 . tel-00903509

HAL Id: tel-00903509

<https://theses.hal.science/tel-00903509>

Submitted on 12 Nov 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS-EST CRETEIL VAL-DE-MARNE
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-EST CRETEIL

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé (SVS)

Spécialité : Les Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Mohamed ATTIA

Soutenue le 12 juin 2012

**Mise en place d'un modèle animal de tendinopathie
précoce de la coiffe des rotateurs de l'épaule en vue de
développer et valider des outils technologiques préventifs
et thérapeutiques**

Thèse dirigée par : Dr Marie-Claude TASSONI et Pr Isabelle MARTELLY

Jury :

Dr Delphine DUPREZ

Dr William HORNEBECK

Pr Xavier CHEVALIER

Pr Pierre PORTERO

Pr Dulce PAPY-GARCIA

Dr Marie-Claude TASSONI

Pr Isabelle MARTELLY

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Laboratoire de croissance cellulaire, réparation et régénération tissulaires (CRRET), EAC
CNRS 7149, en partenariat avec la Société Cogitobio

Contacts

1) Mohamed Attia, PhD

Unité mixte de recherche; CNRS UMR 7215 / INSERM U974 / UPMC UM76 / Association Institut de Myologie (AIM)

Thérapie des maladies du muscle strié; Equipe 5: Myasthénie (Dr Sonia Berrih-Aknin)

Centre hospitalier La-Pitié-Salpêtrière.

Faculté de médecine

105 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

Tel: 01 40 77 81 20

@ : mohamed.attia@upmc.fr

adnen_fr@hotmail.com

2) Marie-Claude Tassoni, PhD

Département Recherches Scientifiques, Centre d'Ostéopathie Atman (C.O.A)

Enseignement Supérieur et Recherche

2575 route des Crêtes - BP 262, 06905 Valbonne, Valbonne-Sophia Antipolis Cedex, France

Tel:

@: mc.tassoni@atman.fr

3) Martelly Isabelle, PU émérite

EAC CNRS 7149 Laboratoire de Croissance cellulaire, Réparation et Régénération Tissulaires

Faculté des sciences et technologies, Université Paris Est Créteil Val-de-Marne

61 Avenue du Générale De Gaulle, 94010 Créteil Cedex, France

Tel :

@ : martelly@u-pec.fr

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au laboratoire CRRET (Croissance cellulaire, régénération et réparation tissulaires), EAC CNRS 7149, de la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université Paris-EST Créteil Val-de-Marne, dirigé par Monsieur le docteur José Courty. Ce travail a été mené sous la direction de madame le professeur Isabelle Martelly et madame le docteur Marie-Claude Tassoni. Qu'elles trouvent à travers ces quelques lignes, le témoignage de ma plus profonde gratitude pour m'avoir encouragé tout au long de cette thèse et pour leur aide apportée à ce travail ainsi qu'à la réalisation de ce mémoire.

Ce travail a été effectué en partenariat avec la société Cogitobio qui l'a également financé. Je tiens à remercier Monsieur Camille Gossard et Monsieur le docteur Paul Le Borgne pour leur soutien et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Ce travail n'aurait probablement pas pu voir le jour sans leurs aides.

Je remercie l'agence nationale de la recherche et de la technologie (ANRT) pour avoir participé au financement de ce travail.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le docteur José Courty de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et d'avoir participé partiellement au financement de ce projet.

Je remercie vivement les membres du jury. Merci à madame le docteur Delphine Duprez et Monsieur le docteur William Hornebeck d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Merci à madame la professeur Dulcé Papy-Garcia, à Monsieur le professeur Pierre Portero et à Monsieur le professeur Xavier Chevalier d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineur. Merci à tous pour votre implication et votre disponibilité.

Mes plus sincères remerciements vont à Monsieur le docteur Alexander Scott de l'université British Columbia de Vancouver pour avoir facilité à ce travail de thèse en me fournissant des échantillons de tendon supra-épineux de rat ainsi que des échantillons de tendon patellaire humain. Je le remercie également pour m'avoir apporté son regard et son aide scientifique dans le domaine des tendons et des tendinopathies.

Je remercie Monsieur le docteur Louis J Soslowsky de l'université de Pennsylvanie de Philadelphie pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, en Juin 2009, pour une période de 2 mois. Ceci m'a permis de mettre en place le modèle animal de sur-utilisation au sein du laboratoire CRRET.

Je remercie très chaleureusement Monsieur le docteur Eric Huet, Monsieur le professeur Jean Delbé ainsi que madame le docteur Suzanne Menashi. Leur disponibilité et leurs précieux conseils au quotidien m'ont enrichi scientifiquement et m'ont apporté une aide considérable dans ce travail.

Je remercie très chaleureusement et tout particulièrement Madame Arlette Duchesnay qui m'a énormément aidé tout au long de ma thèse et qui m'a appris plusieurs protocoles expérimentaux. Merci également pour ses larges connaissances en histoire qu'elle a bien voulu partager avec nous. Enfin, merci pour son beau sourire et sa bonne humeur.

Un grand merci à mes collègues du laboratoire CRRET. Merci à Mohamed Amiche, Sophie Besse, Clara Newton, Delphine Villain, Maha Sader, Zoi Diamantopoulo, Eleni Milia, Yamina Hamma-Kourbali, Dominique Renoir, Laure Garrigue-Antar, Sonia Lehri, Mouna Mothéré, Christophe Morin, Patricia Albanése, Thibault Boudierlique, Véronique Barbier-Chassefière, Julia Sepulveda-Diaz, Fernando Siñeriz, Fabien Chevalier et plus spécifiquement à Gilles Carpentier, « THE » spécialiste de l'imagerie et de la microscopie du laboratoire CRRET.

Un merci tout particulier à mes amis que j'ai rencontré au laboratoire CRRET, Camille Jarosz, Benoît Vallée, Damien Destouches, Rania Elhouel, Hanneke Van Zoggel et Minh Bao pour les conseils qu'ils m'ont apporté, pour la bonne humeur et l'ambiance qui m'ont permis de passer quatre années inoubliables. Je garderais de très bon souvenir d'un certain congrès sur une île paradisiaque en Grèce, d'un certain jeu appelé Time's Up et d'un soir de fou rire où j'ai été baptisé « Batman ».

Merci à l'ensemble des membres du laboratoire CRRET que je n'ai pas nommé. Merci à tous pour votre disponibilité et votre aide précieuse.

Je tiens à adresser un gigantesque et affectueux merci à une personne que j'ai connu au cours de cette grande aventure qui est la thèse. Merci à Hakima Fodil d'avoir partagé avec moi un bout de cette expérience en m'ayant supporté, encouragé et soutenu lors des périodes difficiles. Merci également pour son sourire, sa joie de vivre et sa bonne humeur quotidienne.

Enfin, je remercie toute ma famille et plus spécialement mes parents pour leur soutien sans failles tout au long de ces longues et dures années d'études.

A mes parents,

*A mon frère **Sofiene**,*

*A ma sœur **Rim**,*

*A ma sœur **Raoudha**,*

*Et à mon neveu **Youssef** et nièces **Mariem** et **Zainab***

AVANT-PROPOS

Ce projet de thèse a été réalisé dans le cadre d'un financement régi par un Convention Industrielle de Formation par la REcherche (CIFRE). Cette convention a été établie entre l'université Paris-EST Créteil, plus particulièrement le laboratoire CRRET dirigé par le Dr José COURTY, et la société CogitoBio située à Cachan et dirigé par Mr Camille GOSSARD et Dr Pol LE BORGNE.

CogitoBio, créée en 2000, est une société chargée de faciliter le transfert de technologies issues de la recherche fondamentale sur le système musculo-squelettique vers le monde industriel. Leur approche innovante permet d'appréhender et de résoudre des problèmes d'ergonomie de conception de produit et de poste de travail. Leur modèle biomécanique de référence est développé en partenariat avec une structure de recherche clinique OSTEOBIO et une structure de recherche fondamentale MECABIO. Ce modèle permet de comprendre le fonctionnement et les dysfonctionnements articulaires par l'interaction entre biologie et mécanique via la cinématique articulaire.

Le laboratoire CRRET EAC CNRS 7149, fondé en 1991, a pour objectifs généraux de recherches l'étude des mécanismes de régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire et plus spécifiquement les relations entre certains facteurs protéiques (facteurs de croissance, chimiokines, protéases) et des composants matriciels en s'intéressant plus particulièrement aux glycoaminoglycannes (GAG).

Mon travail de recherche, au cours de ces 4 années de thèse, a été réalisé sous la direction du Pr Isabelle MARTELLY et Marie-Claude TASSONI. Après l'obtention de mon diplôme Master de « Biologie Intégrée du Mouvement et du Muscle », j'ai débuté mon doctorat par le sujet de recherche intitulé « Role of MMPs and their inducer (EMMPRIN/CD147) during myogenesis and skeletal muscle repair » ou nous avons montré le rôle d'EMMPRIN/CD147 dans l'amélioration de la régénération musculaire et au cours de la myogenèse. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans « Journal of Cellular Physiology » en 2010 présenté en Annexe N°2. J'ai poursuivi mon activité de recherche sur un autre sujet, les tendinopathies, en collaboration avec la société CogitoBio qui m'a financé pendant 3 ans. Ce travail présenté dans ce manuscrit a donné lieu aux publications (publiées ou en préparation) et communications scientifiques suivantes :

Publications

- **Attia M**, Huet E, Delbé J, Ledoux D, Menashi S, Martelly I. *Extracellular Matrix MetalloProteinases Inducer (EMMPRIN/CD147) as a novel regulator of myogenic cell differentiation*. J Cell Physiol. 2011 Jan.
- **Attia M**, Scott A, Duchesnay A, Carpentier G, Soslowsky LJ, Huynh MB, Van Kuppevelt TH, Gossard C, Courty J, Tassoni MC, Martelly I. *Alterations of overused supraspinatus tendon: A possible role of glycosaminoglycans and HARP/pleiotrophin in early tendon pathology*. J Orthop Res. 2012 Jan.
- **Attia M**, Huet E, Menashi S, Tassoni MC, Martelly I. *Early events of overused supraspinatus tendons involve matrix metalloproteinases and EMMPRIN/CD147 in the absence of inflammation*. Am J Sports Med. 2013 Apr.
- **Attia M**, Scott A, Carpentier G, Lian O, Van Kuppevelt T, Gossard C, Papy-Garcia D, Tassoni MC, Martelly I. *Greater Glycosaminoglycan content in human patellar tendon biopsies is associated with more pain and a lower VISA score*. Br J sports Med. 2013 Oct.

Communications

- 30 Septembre-6 Octobre 2011 = Château de la Brosse-Montceaux, France. Communication poster pendant la formation « Les doctoriales ». 1^{er} prix des poster Science du vivant de l'école doctorale.
- 2-7 Septembre 2011 = Spetses, Grèce. Communication par poster pendant le FEBS Advanced Lecture Course, Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets.
- 19-28 Mai 2011 = Paris, France. Communication oral pendant le 2ème Intensive Program on Proteoglycans and Glycosaminoglycans.
- 8-10 Mars 2010 = Paris, France. Communication par poster pendant le 18ème Annual Meeting of the French Society of the Extracellular Matrix Biology.

Les devises Shadok



EN ESSAYANT CONTINUUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
AVANT-PROPOS	6
SOMMAIRE	9
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	13
LISTE DES ABREVIATIONS	17
INTRODUCTION	19
I. Les tendinopathies	20
I.1. Les troubles musculo-squelettiques (TMS) et les tendinopathies : un enjeu majeur de santé publique	20
I.2. La tendinopathie du supra-épineux	24
I.3. Physiopathologie de la tendinopathie du supra-épineux	27
II. Origine embryonnaire du tendon	29
III. Structure et fonction des tendons	30
III.1. Généralités	30
III.2. Structure et composition moléculaire du tendon	31
III.2.1. La structure	31
III.2.2. La vascularisation	32
III.2.3. Les fibroblastes du tendon : les ténocytes.....	33
III.2.4. Les fibres et fibrilles de collagènes.....	35
III.2.4.1. Structure du collagène.....	35
III.2.4.2. La biosynthèse du collagène	38
III.2.4.3. Les collagènes du tendon	40
III.2.4.4. Régulation de la synthèse des collagènes dans le tendon.....	41
III.2.5. Les protéoglycanes (PGs)	42
III.2.5.1. Généralités.....	42
III.2.5.2. Les glycosaminoglycanes (GAGs).....	44
III.2.5.2.1. Généralités	44
III.2.5.2.2. Les sous-familles des GAGs.....	46
III.2.5.2.2.1. L'Héparine (Hp) et les héparanes sulfates (HS)	46
III.2.5.2.2.2. Les chondroïtines sulfates (CS)	47
III.2.5.2.2.3. Les dermatanes sulfates (DS).....	48

III.2.5.2.2.4. L'acide hyaluronique (AH).....	48
III.2.5.2.2.5. Les kératanes sulfates (KS).....	48
III.2.5.2.3. La biosynthèse des GAGs.....	49
III.2.5.2.3.1. La biosynthèse de l'AH, le seul GAG « libre »	49
III.2.5.2.3.2. La biosynthèse des GAGs « à protéoglycane »	49
III.2.5.3. Rôles biologiques et mécaniques des PGs et des GAGs associés au sein du tissu tendineux.....	52
III.2.5.3.1. La décorine	52
III.2.5.3.2. Le biglycane	53
III.2.5.3.3. La fibromoduline	53
III.2.5.3.4. L'aggrécane	54
III.2.5.3.5. Le versicane.....	55
III.2.6. Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et leurs inhibiteurs (TIMPs).....	56
III.2.6.1. Les métalloprotéinases matricielles (MMPs).....	56
III.2.6.1.1. Généralités.....	56
III.2.6.1.2. Classification et structure des MMPs	56
III.2.6.1.3. Régulation des MMPs	59
III.2.6.2. Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases matricielles (TIMPs) ...	64
III.2.6.3. Expression physiologique et pathologique des MMPs et des TIMPs au cours des tendinopathies.....	66
III.2.7. Les facteurs de croissance.....	68
III.2.7.1. Généralités.....	68
III.2.7.2. Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2).....	69
III.2.7.3. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	69
III.2.7.4. Bone Morphogenic Protein (BMP)	70
III.2.7.5. Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP).....	70
III.2.7.6. Transforming Growth Factor β (TGF- β)	70
III.2.7.7. Connective Tissue Growth Factor (CTGF).....	71
III.2.7.8. Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)	72
III.2.7.9. InterLeukin-1 et Interleukin-6 (IL-1 et IL-6)	72
III.2.7.10. Le facteur de croissance Heparin Affin Regulatory Peptide (HARP)	73
III.2.7.10.1. Structure de la protéine.....	73
III.2.7.10.2. Rôles biologiques de la protéine HARP	74
IV. Modèle animal d'induction de la tendinopathie du supra-épineux	75

IV.1. Pertinence et développement du modèle-rat de sur-utilisation	75
IV. 2. Les acquis dans le modèle de sur-utilisation chez le rat.....	78
OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	80
MATERIELS ET METHODES	86
I. Liste des matériels et réactifs	87
II. Liste des anticorps utilisés	89
III. Modèle animal d'induction de la tendinopathie du supra-épineux ; le modèle de sur-utilisation.....	89
IV. Prélèvement des tendons supra-épineux (tSE).....	91
V. Etude des glycosaminoglycanes (GAGs) totaux et spécifiques (Figure 28).....	91
V.1. Extraction des GAGs totaux	91
V.2. Quantification des GAGs totaux au bleu 1,9-diméthylméthylène (DMMB)	92
V.3. Quantification des GAGs spécifiques au bleu 1,9-diméthylméthylène (DMMB) ...	93
V.4. Histochimie des GAGs totaux par la technique de complexation au DMMB.....	94
V.5. Immunomarquage des GAGs spécifiques	95
V.6. Evaluation des propriétés biologiques des GAGs	96
V.6.1 ELISA compétitif.....	96
V.6.2. Analyse des disaccharides d'HS et de CS par la méthode de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....	98
VI. Evaluation de la masse hydrique des tSE.....	98
VII. Immunomarquage des PGs.....	99
VIII. Analyse des transcrits de la MEC du tendon supra-épineux	99
VIII.1. Extraction des ARNm.....	99
VIII.2. RT-PCR semi-quantitative ; Transcription inverse-réaction en poly-chaîne	100
IX. Analyse de la composition protéique des tendons	101
IX.1. Extraction des protéines totales.....	101
IX.2. Western blot	101
IX.3. Mise en évidence de l'expression et de l'activité des protéinases et de leurs inhibiteurs par la technique de zymographie.....	102
IX.3.1. Principe	102
IX.3.2. Zymographie en gel de gélatine.....	103
IX.3.3. Zymographie inverse en gel de gélatine	104
IX.3.4. Zymographie in situ sur une coupe histologique.....	104
IX.4. Membrane anticorps d'un panel de cytokines inflammatoires	105

X. Analyses statistiques.....	105
RESULTATS.....	106
1 ^{ère} partie : Caractérisation de l'évolution du profil matriciel du tendon supra-épineux au cours de la sur-utilisation et implication possible des GAGs et du facteur de croissance HARP/Pleiotrophine dans cette évolution.....	108
I. Article 1.....	110
II. Résultats complémentaires.....	122
II.1. Localisation du collagène de type III du tSE au cours des phases précoces de sur-utilisation.....	122
II.2. Evolution du facteur de croissance TGF β -1 au cours des au cours des phases précoces de sur-utilisation.....	124
II.3. Evolution du marqueur tendineux, la ténomoduline, au cours des phases précoces de sur-utilisation.....	126
II.4. Régulation de la masse hydrique au cours du processus de sur-utilisation.....	128
II.5. Evolution de la composition en disaccharides des GAGS au cours des phases précoces de la sur-utilisation dans les tSE.....	130
2 ^{ème} partie : Evolution de l'expression et/ou de l'activité des MMPs dans le tSE au cours des phases précoces de sur-utilisation : Rôle de la MMP-2 (Gélatinase-A)	132
Article 2.....	134
3 ^{ème} partie : Transposition des changements matriciels observée au cours de la tendinopathie du modèle animal de rat à la tendinopathie patellaire diagnostiquée chez l'Homme : Etude histologique des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes	146
I. Les GAGs totaux sulfatés dans la tendinopathie patellaire humaine	147
II. Les GAGs spécifiques (DS et CS) et les PGs (décorine, versicane et aggrecane) dans la tendinopathie patellaire humaine	148
III. Corrélation des GAGs totaux sulfatés au degré d'avancement de la tendinopathie patellaire humaine.....	151
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	154
RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE.....	175
ANNEXES	213
Annexe 1 : Questions d'évaluation du VISA Score.....	214
Annexe 2 : Article Master 2.....	218

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures

- Figure 1. Les différentes structures articulaires touchées par les TMS (*CNAMTS, Octobre 2011*)
- Figure 2. Pourcentage des personnes susceptibles de développer des TMS selon le sexe, l'âge et les secteurs d'activité (*DARES DRT, 2003*).
- Figure 3. Brochure de la campagne nationale d'information et de prévention des TMS (*Ministère du travail, de l'emploi et de la santé, Mai 2009*).
- Figure 4. Anatomie osseuse, musculaire et tendineuse de la coiffe des rotateurs de l'épaule.
- Figure 5. Action du deltoïde par rapport à l'articulation scapulo-humérale.
- Figure 6. Illustration du conflit sous-acromial affectant le tendon supra-épineux.
- Figure 7. Illustration schématique de l'évolution de la tendinopathie du supra-épineux selon Neer (Neer 2005).
- Figure 8. Illustration des étapes et des régulateurs importants de la formation du tissu tendineux au cours du développement. Scx=scléroxaxis, en vert les cellules progénitrices du tendons, en blanc les cellules progénitrices provenant du muscle et de l'os. (Schweitzer *et al.* 2010).
- Figure 9. Représentation schématique de la structure hiérarchisée du tendon (Wang 2006).
- Figure 10. Représentation schématique de la vascularisation du tendon. 1 : artère et veine. 2 : artérioles entre les faisceaux de fibres primaires de collagène.
- Figure 11. Image en microscopie électronique d'une coupe longitudinale d'un ténocyte. N : nucléole, Co : collagène, R : réticulum endoplasmique (Kraushaar et Nirschl 1999).
- Figure 12. Image en microscopie électronique d'une coupe transversale d'un ténocyte (Kraushaar et Nirschl 1999).
- Figure 13. Structure détaillée d'une fibrille de collagène de type I (*O'Brien M. Tendon injuries : basic science and clinical medicine. Edition Springer, page 10, 2005*)
- Figure 14. Représentation des étapes de production des collagènes (*O'Brien M. Tendon injuries : basic science and clinical medicine. Edition Springer, page 10, 2005*)
- Figure 15. Schéma illustrant l'influence potentielle de nombreux facteurs sur le contenu en collagène du tissu tendineux (Kjaer 2004).
- Figure 16. Représentation schématique de divers PGs et leurs chaînes de GAGs associés (Ruoslahti 1989).

- Figure 17. Représentation des différents types de chondroïtines sulfates et de leur position de sulfatation
- Figure 18. Biosynthèse des chaînes oligosaccharidiques d'HS, de CS et de DS (Sasisekharan *et al.* 2006).
- Figure 19. Structure des différentes familles des MMPs.
- Figure 20. Les différents systèmes de régulation des MMPs (Page-McCaw *et al.* 2007).
- Figure 21. Le système d'activation de certaines MMPs par les MMPs elles-mêmes (Dollery et Libby 2006).
- Figure 22. Système d'activation de la MMP-2 par l'intermédiaire de MT1-MMP et de TIMP-2 (Dollery et Libby 2006).
- Figure 23. Expression et action des TIMPs au sein de l'environnement péricellulaire (Baker *et al.* 2002).
- Figure 24. Représentation schématique de la structure secondaire de HARP (Raulo *et al.* 2006). Les feuillets beta avec les motifs TSR-1 sont en bleu, les régions N- et C- terminaux ainsi que les acides aminés de liaison sont en rouge et les ponts disulfures sont en jaune.
- Figure 25. Comparaison anatomique de l'articulation de l'épaule entre l'Homme et le rat (Soslowsky *et al.* 1996).
- Figure 26. Mécanisme lésionnel ou adaptatif au cours de la tendinopathie du supra-épineux. D'après (Cawston *et al.* 1996).
- Figure 27. Protocole de sur-utilisation du tSE chez le modèle animal rat.
- Figure 28. Méthode d'extraction et de quantification biochimiques des GAGs totaux et spécifiques.
- Figure 29. Méthode d'immunomarquage des GAGs spécifiques avec des anticorps « phage display single chain ».
- Figure 30. Technique d'ELISA compétitif entre HARP/FGF-2 et les extraits de GAGs totaux naturels par rapport à l'héparine.
- Figure 31. Immunomarquage du collagène de type III dans les tSE contrôles (C) et entraînés (R) au cours du processus de sur-utilisation. Les coupes transversales ont été réalisées au niveau de la région centrale du tendon. Les résultats sont représentatifs de 3 tendons de 3 rats différents pour chaque temps. Echelle = 20 μ m.
- Figure 32. Expression du TGF β -1 total dans les tSE contrôles (C) et entraînés (R) au cours du processus de sur-utilisation. Les résultats sont représentatifs de 6 tendons de 3 rats différents pour chaque temps. $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), et $p < 0.05$ (*). 50 μ g de protéines totales ont été

soumis à un test ELISA. Afin de quantifier le TGFβ-1 total, les échantillons ont été activés préalablement en les incubant 10 min dans du 1 N HCl.

Figure 33. Evolution du niveau d'expression des transcrits de la ténomoduline dans les tSE contrôles (C) et entraînés (R) au cours du processus de sur-utilisation. Les résultats sont représentatifs de 6 tendons de 3 rats différents pour chaque temps. $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), et $p < 0.05$ (*).

Figure 34. Evolution de la masse hydrique dans les tSE contrôles (C) et entraînés (R) au cours du processus de sur-utilisation. Les résultats exprimés en pourcentage par rapport au poids frais sont représentatifs de 3 tendons entiers de 3 rats différents pour chaque temps.

Figure 35. Analyse par HPLC des disaccharides des GAGs spécifiques HS et CS. La digestion des GAGs a été réalisée avec de la chondroïtinase ABC et de l'acide nitreux (Cf. Matériels et Méthodes).

Figure 36. Quantification histologique des GAGs totaux sulfatés dans les tendons patellaires humains contrôles (tP C) et pathologiques (tP P). Echelle = 40 μm.

Figure 37. Immunomarquage des DS et CS dans les tendons patellaires humains contrôles (tP C) et pathologiques (tP P). Echelle = 40 μm.

Figure 38. Immunomarquage de la décorine, du versicane et de l'aggrécane dans les tendons patellaires humains contrôles (tP C) et pathologiques (tP P). Echelle = 40 μm.

Figure 39. Marquage (A), quantification et corrélation (B) histologique des GAGs totaux sulfatés au VISA Score dans les tendons patellaires humains contrôles (tP C) et pathologiques (tP P). Echelle = 40 μm.

Figure 40. Schéma illustrant les liens entre les événements décrits, initiateurs ou annonciateurs d'une tendinopathie tSE au cours des phases précoces. Traits pointillés = lien hypothétique, traits pleins = lien relaté dans la littérature ou déduit de nos résultats.

Tableaux

Tableau 1. Les différents facteurs pouvant être impliqués dans la tendinopathie du supra-épineux (Riley 2004).

Tableau 2. Différence macroscopique et histopathologique entre une tendinose et une tendinite (Khan *et al.* 2002).

Tableau 3. Tableau des différents types de collagènes et leur distribution tissulaire (Gelse *et al.* 2003).

Tableau 4. Composition moléculaire en collagène de la matrice extracellulaire du tendon (Riley 2005).

Tableau 5. Représentation schématique des motifs disaccharidiques répétitifs constituant les différents GAGs. En rouge, les positions possibles de sulfatation ; et en vert, les autres modifications.

Tableau 6. Rôles des enzymes de modifications post-synthétiques des GAGs.

Tableau 7. Propriétés et rôles des PGs présents dans le tendon (Yoon et Halper 2005).

Tableau 8. Classification, nom, localisation chromosomique et substrats spécifiques des MMPs (Visse et Nagase 2003). ND : non définie.

Tableau 9. Etat de l'art des principaux changements histologiques, cellulaires et moléculaires observés utilisant le modèle animal-rat de sur-utilisation du tendon supra-épineux.

Tableau 10. Caractéristiques des anticorps des GAGs spécifiques « phage display single chain » (anti-CS, anti-DS et anti-HS).

Tableau 11. Liste et détails des amorces utilisées pour les réactions d'amplification PCR.

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	Degré Celsius
µm	micromètre
ADN	Acide désoxyribonucléique
AH	Acide hyaluronique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BMP	Bone Morphogenetic Protein
COMP	Cartilage OligoMeric Protein
CS	Chondroïtine Sulfate
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
Da	Dalton
DMMB	Dimethyl methylene blue
DS	Dermatane Sulfate
EGF	Epidermal Growth Factor
EMMPRIN	Extracellular Matrix Metalloproteinases PRotein INducer
FasL	Fas Ligand
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAG	Glycosaminoglycane
GalN	N-acétyle galactosamine
GlcA	Acide glucuronique
GlcN	N-acétyle glucosamine
h	heure
HARP	Heparin Affin Regulatory Peptide
HAS	Hyaluronic Acid Synthase
Hp	Héparine
HS	Héparane Sulfate
HSPG	Heparan Sulfate ProteoGlycan
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IdoA	Acide iduronique
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	InterLeukine
kDa	Kilo Dalton
Km	Kilomètre
KS	Kératane Sulfate
m	masse
MCP	Macrophages Chemoattractant Protein
MEC	Matrice ExtraCellulaire
mg	Milligramme
min	minute
ml	Millilitre
mM	Milli-molaire
MMP	Matrix MetalloProteinase

MT-MMP	Membrane Type Matrix MetalloProteinase
nm	nanomètre
p	poids
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
pg	Pico-gramme
PG	Protéoglycane
RER	Réticulum Endoplasmique Rugueux
rpm	Round per minute
Scx	Scléroxis
TCK	Thymus ChemoKine
TGFb	Transforming Growth Factor b
TIMP	Tissue Inhibitor MetalloProteinase
TMS	Trouble Musculo-Squelettique
tSE	Tendon supra-épineux
v	volume

INTRODUCTION

I. Les tendinopathies

I.1. Les troubles musculo-squelettiques (TMS) et les tendinopathies : un enjeu majeur de santé publique

D'après un expert chargé de mission à l'agence nationale d'amélioration des conditions de travail (ANACT) qui expose ainsi la situation : « *Les TMS doivent être considérés comme une priorité lorsque l'on constate que les salariés sont exposés à des facteurs de risques. Dans ce cadre, il faut **identifier les symptômes au plus tôt** et s'attaquer aux TMS le plus tôt possible avant que les salariés soient victimes de ces maladies. Si ce phénomène n'est pas traité de **façon précoce**, il devient ensuite difficile à enrayer* » (Campagne d'information et de prévention des TMS dans l'entreprise, Ministère du travail, de l'emploi et de la santé. Octobre 2011).

Voilà l'un des enjeux les plus importants de la campagne de prévention des TMS de 2011. En effet, les TMS, dont font partie les tendinopathies, sont les maladies professionnelles les plus répandues en France. Ces TMS représentent 85% des causes de maladies professionnelles reconnues par les régimes de santé. Contrairement aux idées reçues, le monde professionnel et les métiers de manutention ne sont pas les seuls à être concernés par ces TMS, les sportifs de haut niveau et la population des séniors le sont également. Les TMS constituent donc l'une des priorités du Plan Santé Travail (PST) 2005-2014 du ministère du travail, de l'emploi et de la santé.

Directement liés aux conditions de travail, les TMS se traduisent par des douleurs de plus en plus gênantes, voire invalidantes pouvant conduire à une incapacité de travail. C'est la combinaison de facteurs biomécaniques (travail en force, gestes répétitifs, positions pénibles, maniement de charges lourdes, matériel de manutention inapproprié, etc.) associés à une organisation de travail inadaptée, un temps de récupération insuffisant et des situations de stress qui entraîne les TMS. Ils affectent directement les muscles, les nerfs, les os ou encore les tendons de différentes structures articulaires ([Figure 1](#)). Petites ou grandes, l'ensemble des entreprises est concerné par cette problématique, avec des secteurs d'activités plus touchés que d'autres. Par exemple, les femmes y sont moins souvent confrontées que les hommes mais sont loin d'être épargnées. Les jeunes, les apprentis et les intérimaires sont plus particulièrement concernés. Plus des deux tiers des ouvriers développent au moins un TMS, contre un peu plus d'un cadre sur cinq. Telles sont quelques-unes des conclusions tirées de l'enquête DARES DRT SUMER 2003 ([Figure 2](#)).

Au-delà des souffrances pour la personne, les TMS perturbent l'organisation du travail et représentent pour l'entreprise des répercussions économiques non négligeables dues aux

indemnités et aux arrêts de travail, à la baisse de qualité des produits fabriqués, aux difficultés de recrutement et de reclassement des salariés concernés et de recrutement de nouveaux salariés valides. Selon les chiffres de la caisse nationale de l'assurance maladie des travailleurs salariés (CNAMTS), 43241 TMS ont été indemnisés en 2010 par les actifs du régime général de santé qui ont engendré la perte de 9,7 millions de journées de travail et coûté 930 millions d'euros auxquels il faut ajouter la perte de temps, la baisse de la production et la dévalorisation de l'image de l'entreprise. Ces chiffres sont en progression constante depuis 2003. En effet, le nombre de nouveaux cas de TMS indemnisés chaque année augmente, atteignant en 2010 environ 15% (CNAMTS, Octobre 2011).

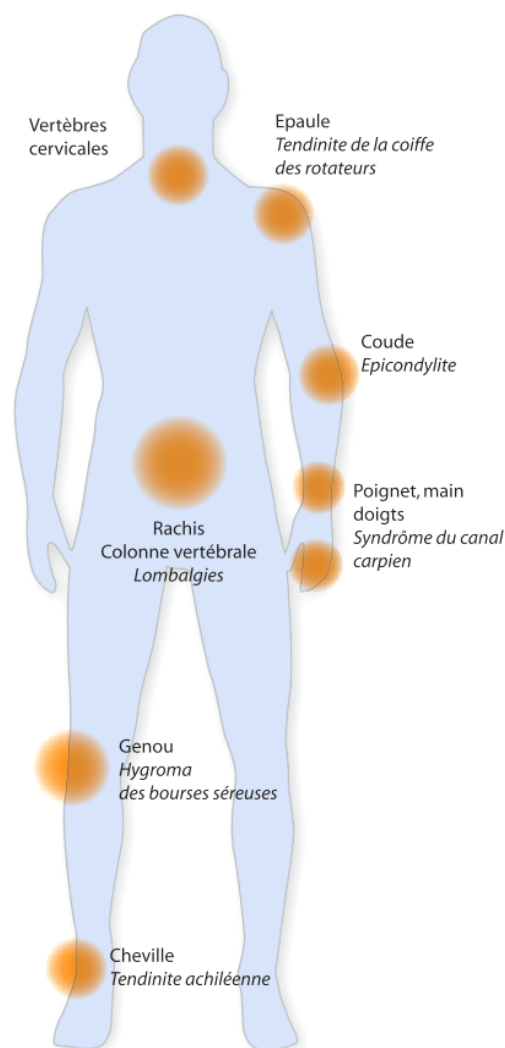


Figure 1. Les différentes structures articulaires touchées par les TMS (CNAMTS, Octobre 2011)

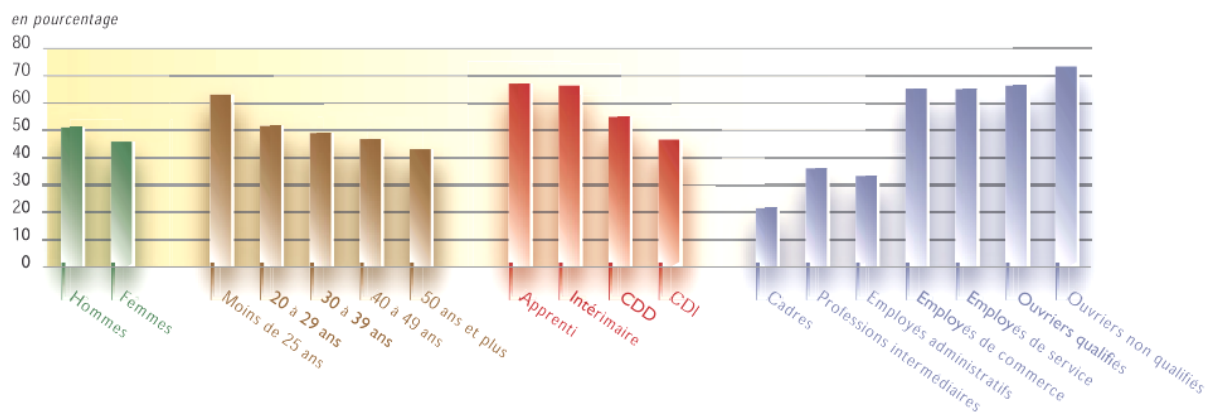


Figure 2. Pourcentage des personnes susceptibles de développer des TMS selon le sexe, l'âge et les secteurs d'activité (DARES DRT, 2003).

« Prévenir efficacement les TMS ne s'improvise pas » et exige une implication forte et durable tant professionnelle que personnelle. Il n'existe pas de solution globale, efficace et applicable à tout le monde. Chaque démarche de prévention est spécifique et doit être adaptée aux particularités de chacun et aux secteurs d'activités concernés. Un état des lieux en amont est indispensable pour évaluer les risques liés à la survenue des TMS et construire un plan de prévention efficace, pouvant se traduire par des actions simples et peu coûteuses : aménagement des postes de travail, outils d'aide à la manutention, alternance des tâches, solidarité entre équipes, parcours professionnels ou encore transmission de savoir-faire. Cette démarche commence donc par un état des lieux pour évaluer les risques de TMS dans le monde de l'entreprise afin de construire un plan d'action efficace nécessitant des échanges entre salarié et médecin du travail ou encore l'analyse des chiffres liés à l'absentéisme et aux arrêts maladies des salariés.

« Il est indispensable que la démarche de prévention soit participative et s'inscrive dans la durée... Ensuite, il convient d'alerter, sensibiliser et **mobiliser l'ensemble des acteurs** (de l'entreprise, du corps médical et de la recherche, etc.) pour parvenir à trouver des **solutions préventives**. Prévenir les TMS, c'est arriver à réduire l'exposition de la personne à un facteur de risque. Encore faut-il pour cela pouvoir **les identifier**. Cette étape est **la clé** d'une solution adaptée », poursuit le même expert durant la Campagne d'information et de prévention des TMS en Octobre 2011.

De nombreux TMS, en l'absence d'un diagnostic précoce se développent de manière chronique jusqu'à ce que la douleur ne permette plus aucune activité. Détectés et donc traités trop tardivement, certains TMS auparavant réversibles deviennent irréversibles, provoquant

une incapacité de travail temporaire de longue durée voire définitive. Les TMS arrivés à ce stade nécessitent alors un traitement chirurgical coûteux. Cela implique encore plus de répercussions sur le fonctionnement de l'entreprise ainsi que sur la vie sociale et psychique des salariés.



Figure 3. Brochure de la campagne nationale d'information et de prévention des TMS (*Ministère du travail, de l'emploi et de la santé, Mai 2009*).

Les TMS de l'épaule, caractérisés par un inconfort, une raideur, un affaiblissement et des douleurs plus ou moins importantes, constituent actuellement les pathologies professionnelles de loin les plus répandues dans les pays industrialisés et sont devenus la première cause de maladie professionnelle en France. Parmi ces TMS, la tendinopathie qui consiste en une altération de la structure tendineuse, est un motif majeur de consultation. Elle affecte plus fréquemment les tendons de la coiffe des rotateurs de l'épaule et en particulier le tendon supra-épineux (90% des tendinopathies de l'épaule). Ainsi il est courant de constater une pathologie du tendon supra-épineux chez des personnes ayant une activité professionnelle qui

requiert une mobilisation répétitive du bras, en particulier en élévation au dessus de l'épaule (ouvriers du bâtiment, manutentionnaires, hôtesses de caisse, etc.). La tendinopathie du supra-épineux de la coiffe des rotateurs de l'épaule est également une pathologie coûteuse pour le monde de l'entreprise.

I.2. La tendinopathie du supra-épineux

Le membre supérieur, pour remplir la fonction de préhension, assure l'orientation du bras par des mouvements d'épaule (ceinture scapulaire), et l'orientation de la main par des mouvements de l'avant-bras et du poignet. L'orientation du bras et de la main nécessite que l'épaule autorise des mouvements de circumduction dans les trois plans de l'espace. Cette articulation est complexe car composée de trois segments : l'humerus, la scapula et la clavicule (Figure 4). Les mouvements de circumduction, au niveau de l'articulation gléno-humérale, sont réalisables par la présence de surfaces articulaires peu congruentes dont la schématisation serait une sphère sur une surface plane (Figure 5a). De plus le système ligamentaire étant moins important que pour les autres articulations (ex. membre inférieur), la stabilité de l'épaule est assurée par la présence de structures musculaires engainantes (l'ensemble est décrit comme la coiffe des rotateurs) (Figure 4). Les muscles jouent donc à la fois un rôle mobilisateur et/ou stabilisateur.

L'apparition de douleur ou de TMS au niveau de l'épaule est liée à des conflits articulaires apparaissant au cours du mouvement. Lors de ce mouvement, la tête humérale doit réaliser un mouvement de roulement avec glissement, ce qui nécessite une gestion fine des actions mécaniques articulaires. L'ensemble de la chaîne articulaire, allant de la colonne cervico-thoracique jusqu'au membre supérieur, est impliqué. Le recrutement musculaire doit respecter un synchronisme pour maintenir le centrage de la tête. Un défaut en termes de position, de stabilité, ou de cinématique des différents segments de cette chaîne articulaire peut conduire à une action élévatrice trop prononcée du deltoïde (Figure 5b) qui peut prendre en défaut l'action stabilisatrice de la coiffe des rotateurs. Cela entraîne une ascension de la tête humérale comprimant la coiffe sous la voûte acromiale (Figure 6) et induisant un conflit entre la tête de l'humerus, la bourse séreuse et l'acromion et qu'on appelle le conflit du pincement. Ce conflit articulaire peut générer un excès de contraintes locales responsable de douleur ou de tendinopathie du supra-épineux.

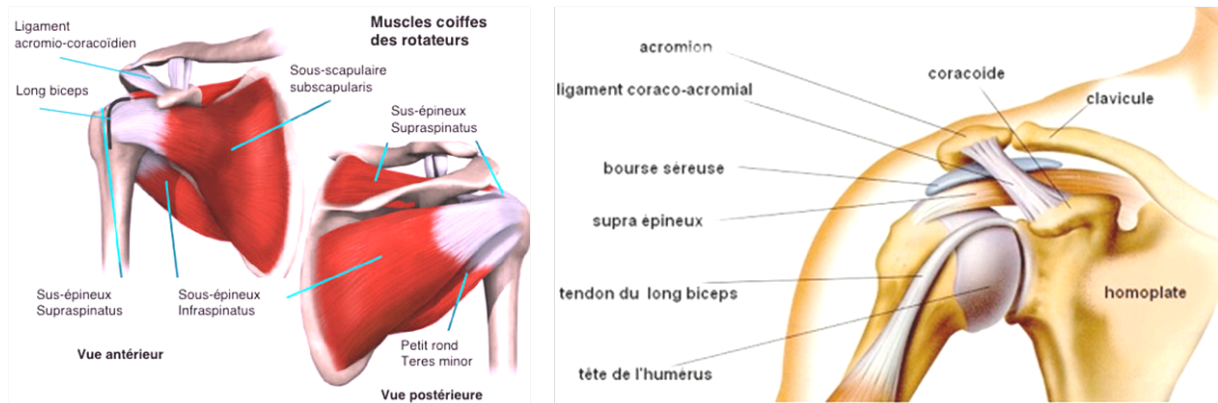


Figure 4. Anatomie osseuse, musculaire et tendineuse de la coiffe des rotateurs de l'épaule.

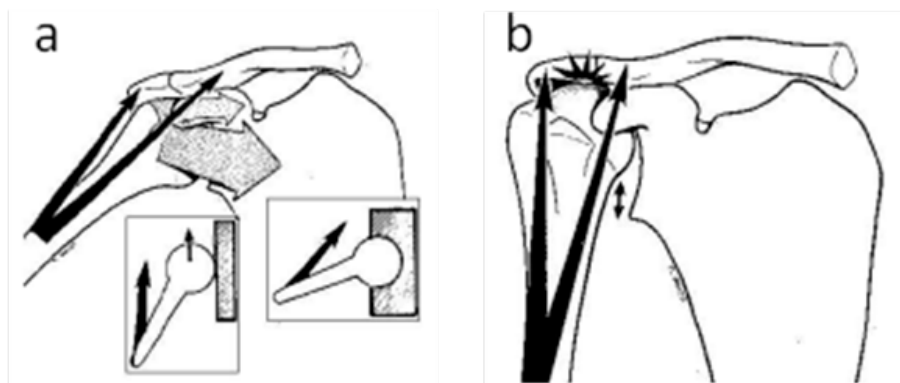


Figure 5. Action du deltoïde par rapport à l'articulation scapulo-humérale.

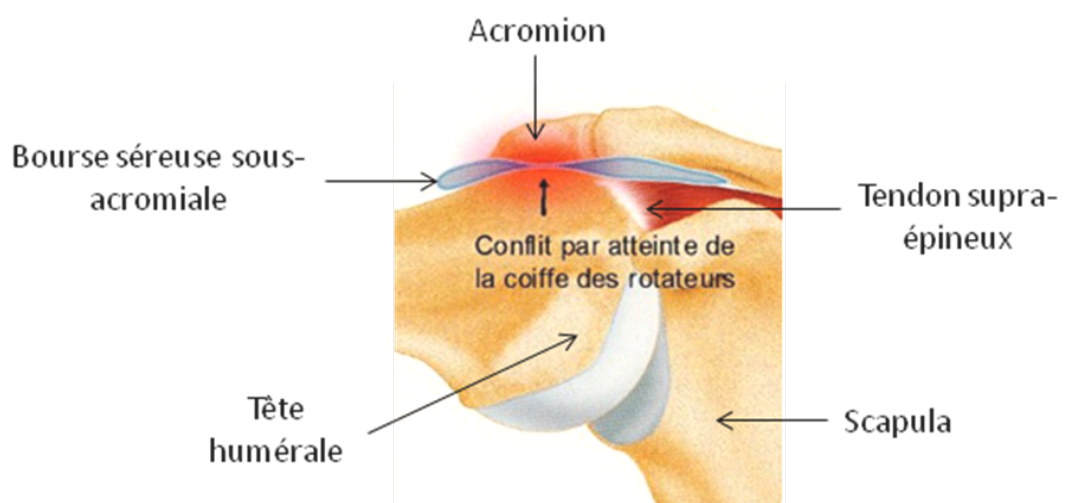


Figure 6. Illustration du conflit sous-acromial affectant le tendon supra-épineux.

La pathologie dégénérative de la coiffe des rotateurs de l'épaule commencera toujours par une atteinte du supra-épineux. Il existe plusieurs théories qui expliquent l'origine des tendinopathies du supra-épineux. Cependant, je ne citerais que celle de Neer (Neer 2005) qui est la plus acceptée par le corps médical et orthopédique. Elle suit 3 stades cliniques (Neer 2005) (Figure 7) :

Stade 1 : Ce stade correspond à une irritation non significative de la coiffe. Il s'agit d'une réaction de micro-œdème et de micro-hémorragies au sein de la bourse séreuse sous-acromiale. Ce stade se traduit par des signes asymptomatiques au repos mais des douleurs au cours d'un travail prolongé avec des mouvements répétitifs.

Stade 2 : À ce stade, s'installe la fibrose de la bourse sous-acromiale, avec tendinopathie du supra-épineux. Cliniquement, la douleur survient en fin de journée. Pendant une élévation prolongée du bras, les douleurs obligent le sujet à arrêter son activité. La douleur cède au repos. La bourse a perdu ses capacités lubrifiantes de glissement et les tendons sont partiellement atteints.

Stade 3 : À ce stade, la pathologie devient chronique et les lésions tendineuses sont plus sévères avec plus souvent une rupture dégénérative du supra-épineux. Les douleurs sont permanentes, nocturnes et empêchent le sujet de dormir.

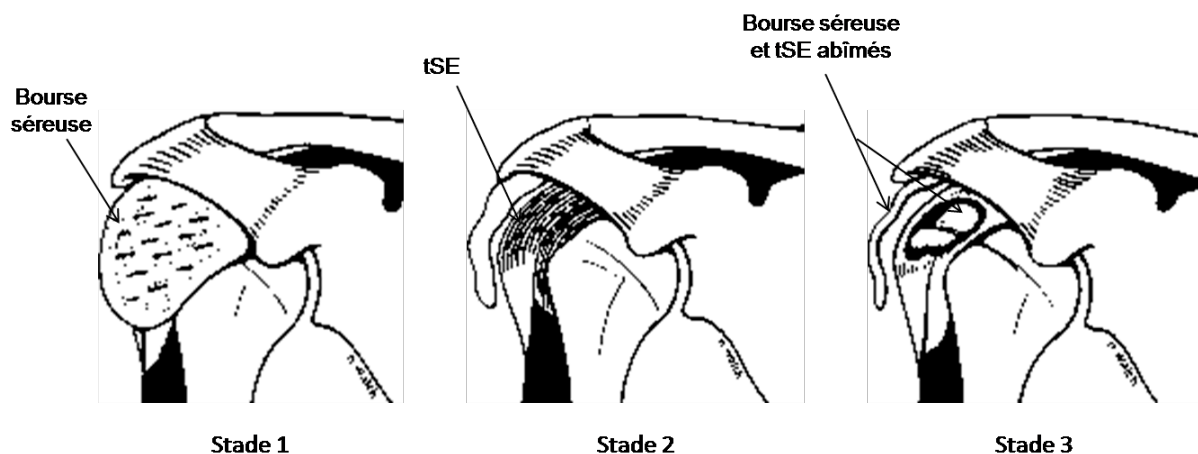


Figure 7. Illustration schématique de l'évolution de la tendinopathie du supra-épineux selon Neer (Neer 2005).

Les trois stades apparaissent théoriquement à des âges différents : Le stade 1 vers 20 ans, le stade 2 vers 30 ans et le stade 3 après 40 ans. En outre, plus le tendon vieillit, plus il

s'atrophie, se fragilise et les lésions deviennent plus importantes que dans un tendon jeune (Goutallier *et al.* 2003).

L'origine de la tendinopathie est dégénérative, liée à une mauvaise vascularisation qui entraîne une réparation lente. D'importants efforts de recherche restent à accomplir en particulier dans la caractérisation fine de ces tendinopathies et dans la connaissance du contexte biomécanique qui les génère.

I.3. Physiopathologie de la tendinopathie du supra-épineux

Les tendinopathies se produisent fréquemment à la suite d'un usage excessif du tendon dans un contexte professionnel ou sportif. La physiopathologie tendinopathique du supra-épineux est vraisemblablement multifactorielle. En effet, la combinaison de facteurs intrinsèques et extrinsèques peut être impliquée dans cette pathologie (Longo *et al.* 2011) (Tableau 1). Les mécanismes intrinsèques, d'ordre biologique, ont été identifiés comme les blessures du tendon qui proviennent du tendon lui-même, comme la dégénération intra-tissulaire. Alors que les processus extrinsèques, d'ordre mécanique, ont été identifiés comme les blessures du tendon induites par la compression et le frottement de ce dernier contre les structures osseuses environnantes et plus particulièrement au niveau de la voûte coraco-acromiale. Selon le mécanisme prédominant, différentes approches permettant de prévenir et de traiter la tendinopathie peuvent être appropriées. Au cours de ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés particulièrement à l'incidence des facteurs extrinsèques dans la pathologie.

Facteurs intrinsèques	Facteurs extrinsèques
Age et sexe de la personne	Travail
Vascularisation du tendon	Sport
Nutrition	-type de sport
Prédisposition anatomique	-mauvais gestes techniques
-position de l'acromion	Charge
-espace sous-acromial	-force excessive
-mauvais alignement tendon/tête humérale	-répétition et intensité élevée
Laxité articulaire	-mouvements inhabituels
Faiblesse et déséquilibre musculaire	Fatigue
Poids corporel	Equipements et matériels utilisés
Pathologie systémique	Conditions environnementales
-diabète	-température
-vieillesse	-état de surface du sol

Tableau 1. Les différents facteurs pouvant être impliqués dans la tendinopathie du supra-épineux (Riley 2004).

La tendinopathie s'accompagne généralement d'une élévation du nombre de micro-déchirures dans le tissu tendineux qui sont détectables à l'échographie comme des zones très focalisées de basse échogénéité. Ces micro-déchirures sont des facteurs prémonitoires de déchirures partielle ou totale du tendon supra-épineux comme on peut l'observer également dans le tendon d'Achille (Gibbon *et al.* 1999). On assiste à la modification quantitative et qualitative des éléments de la matrice extracellulaire dont le réseau collagénique et protéoglycanique et enfin à une mort cellulaire élevée. Au niveau biomécanique, on constate une perte de raideur qui se traduit par une déformation excessive du tendon pour une même intensité de contrainte. Des signes cliniques inflammatoires (œdème et douleur) sont présents à l'état installé de la pathologie dans un tendon humain, sans qu'on puisse mettre en évidence de manière importante la présence de cellules inflammatoires et de marqueurs moléculaires inflammatoires. Ainsi cette pathologie, dénommée tendinose, est considérée désormais par de nombreux scientifiques comme une pathologie dégénérative et non pas inflammatoire. La tendinose qui perdure peut devenir une tendinite inflammatoire (Tableau 2). Celle-ci peut conduire à une calcification de l'articulation ou une rupture partielle voire totale du tendon.

Diagnostic	Évaluation macroscopique	Histopathologie
Tendinose	Dégénération intra-tendineuse communément causée par le vieillissement et la redistribution de l'apport sanguin	Désorientation et séparation des fibres de collagène, augmentation de la cellularité et de la vascularité
Tendinite	Dégénération symptomatique d'un tendon accompagnée par un bris vasculaire et une réponse inflammatoire	Dégénérescence accompagnée d'une déchirure, d'accumulation de fibroblastes et myofibroblastes, d'hémorragie

Tableau 2. Différence macroscopique et histopathologique entre une tendinose et une tendinite (Khan *et al.* 2002).

Seules les altérations mécaniques avancées (déchirure partielle ou totale) sont actuellement accessibles aux traitements chirurgicaux ou pharmacologiques. Ainsi la plupart des études existantes concernent des approches chirurgicales ou cliniques des tendinopathies. Peu de données concernent les processus cellulaires et moléculaires à l'origine de cette pathologie.

II. Origine embryonnaire du tendon

Le système musculo-squelettique nécessite le développement temporel et spatial synchronisé de 3 tissus: muscle, tendon et cartilage/os. Le tendon fait partie des tissus conjonctifs qui n'ont pas beaucoup suscité l'intérêt des biologistes du développement comparé à d'autres tissus mésodermiques tels que les vaisseaux sanguins, les os ou encore les muscles. Cependant, des études récentes (Brent *et al.* 2003; Tozer et Duprez 2005) sur l'origine, la structure et la différenciation du tissu tendineux au cours du développement ont contribué significativement à améliorer nos connaissances. Les cellules du tendon proviennent d'un compartiment mésodermique différent de celui des cellules myogéniques ; cependant, les muscles et les tendons se développent en étroite association spatiale et temporelle. Les tendons sont originaires du compartiment dorsal du sclérotome, appelé plus communément le syndétome (Brent *et al.* 2003); alors que les muscles sont originaires du myotome. Les tendons apparaissent dans le mésenchyme du bourgeon de membre à 6-8 semaines d'âge foetal et rejoignent ensuite les muscles. Le développement ultérieur des tendons nécessite généralement la présence du tissu musculaire (Kieny et Chevallier 1979; Brent *et al.* 2005).

L'induction et la différenciation des cellules progénitrices du tendon se produisent en 3 phases (Figure 8) (Schweitzer *et al.* 2010) :

1^{ère} phase : L'induction. L'induction initiale de l'expression de Scléroxin par les cellules progénitrices du tendon se fait au niveau du syndétome. Cette induction est due à la signalisation du Fibroblast Growth Factor (FGF), sécrété par le myotome adjacent, via le facteur de transcription Pea3 (Brent et Tabin 2004). Les cellules progénitrices du tendon situées au niveau de leur position fonctionnelle, c'est-à-dire entre les cellules myogéniques et les cellules squelettiques, sont induites au niveau des bourgeons de membres où leur induction n'est pas liée à leur destination finale.

2^{ème} phase : L'organisation. Dans un embryon, les cellules progénitrices du tendon s'organisent et se positionnent entre les cellules myogéniques différenciées et le tissu squelettique tout au long du corps embryonnaire. Cette étape dépend de la signalisation du TGF- β qui sert d'intermédiaire pour le recrutement de cellules progénitrices supplémentaires provenant du muscle ou de l'os. De plus, le TGF- β exprimé par ces cellules, contribue au maintien du phénotype ténoblastique des cellules progénitrices.

3^{ème} phase : La différenciation et l'agrégation. Les cellules progénitrices du tendon se différencient, se condensent et s'organisent en tendons structurellement distincts reliant les muscles et le cartilage. Dans certains cas, la différenciation des cellules progénitrices dépend de l'expression et de la fonction du facteur de transcription scléroxin.

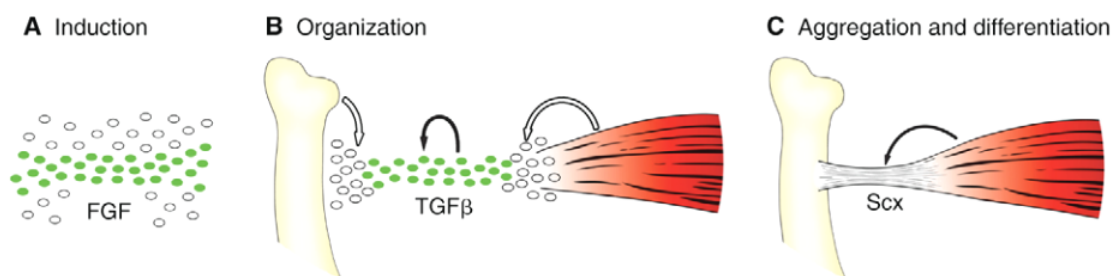


Figure 8. Illustration des étapes et des régulateurs importants de la formation du tissu tendineux au cours du développement. Scx=scléraxis, en vert les cellules progénitrices du tendons, en blanc les cellules progénitrices provenant du muscle et de l'os. (Schweitzer *et al.* 2010).

Le tendon est un tissu très dense composé de fibroblastes particuliers appelés ténocytes qui produisent de la matrice extracellulaire, principalement du collagène. Ce collagène s'organise dans l'espace en réseau très organisé de gros câble. Cette disposition spatiale et structurelle confère au tendon une certaine résistance qui lui permet de jouer son rôle d'une façon optimale.

III. Structure et fonction des tendons

III.1. Généralités

Le tendon est une structure qui lie les pièces osseuses aux muscles. Bien que passif (c'est-à-dire ne produisant pas activement de mouvement comme le font les muscles), il joue un rôle essentiel dans la stabilisation et la mobilisation des articulations du squelette. Sa fonction principale est de transmettre les forces musculaires aux pièces osseuses produisant par conséquent la stabilisation ou le mouvement articulaire. Le tendon permet aussi au muscle d'être à une distance optimale de l'articulation favorisant ainsi un bras de levier permettant de développer une force optimale. Il agit donc directement sur la façon dont la force musculaire va stabiliser ou mettre en mouvement les os autour d'une articulation donnée. Tendon et muscle forment ainsi une unité fonctionnelle dynamique qui permet le mouvement.

Le tendon est plus résistant que le muscle. Il peut être soumis à des forces de traction et de compression très élevées. Il peut supporter, à certains endroits, 17 fois le poids du corps. Le tendon joue le rôle d'amortisseur, de réservoir d'énergie et de maintien de la posture grâce à des éléments proprioceptifs (Benjamin *et al.* 1995). Contrairement au ligament qui offre une stabilité permanente des articulations osseuses, le tendon offre une stabilité par intermittence

avec l'aide du muscle auquel il est attaché. L'augmentation du niveau de contraintes subies par le tendon, induit une fragilisation de ce dernier qui absorbe et restitue ainsi moins d'énergie et devient par conséquent moins efficace (Fyfe et Stanish 1992).

Le tendon concentre souvent la force musculaire sur une petite zone. Ceci permet ainsi aux muscles de contrôler l'intensité et la direction des forces. La force d'un tendon et sa capacité de résistance dépendent de la composition et de la structure fibreuse interne, en particulier du nombre, de la taille et de l'orientation des fibrilles de collagène qu'il contient.

III.2. Structure et composition moléculaire du tendon

III.2.1. La structure

Le tendon apparaît de couleur blanche car il est relativement peu vascularisé. Il varie en taille et en forme, il peut être aplati ou arrondi. Il peut être à l'origine ou à l'insertion d'un muscle ou encore former une intersection tendineuse au sein d'un même muscle.

Le tendon possède une structure hiérarchisée (Wang 2006) (Figure 9) rappelant étroitement la structure du muscle strié squelettique. Le tendon est composé principalement de fibres de collagènes de plusieurs types disposées en faisceaux de fibres primaires, secondaires et tertiaires (Figure 9). Les différents types de collagène seront détaillés un peu plus loin dans ce manuscrit. Elles sont orientées principalement dans l'axe longitudinal. Les fibres longitudinales se croisent formant ainsi des spirales et des tresses (Chansky et Iannotti 1991; Jozsa *et al.* 1991). Outre ces fibres longitudinales, il existe des fibres transversales et circulaires (Jozsa *et al.* 1991). Dans un tendon, lorsque la contrainte est appliquée dans les trois directions de l'espace, les faisceaux de fibres s'entremêlent sans orientation organisée. Mais si la contrainte est exercée dans la seule direction longitudinale, les fibres s'organisent davantage en s'orientant parallèlement à la force de traction.

Le tendon est couvert par deux gaines fibreuses, la plus interne appelée épitendon et la plus externe nommée paratendon. Les faisceaux de fibres primaires, secondaires et tertiaires sont recouverts par une gaine appelée endotendon (Butler *et al.* 1978). Ces gaines, ou aponévroses, sont composées de plusieurs couches de fibres de collagènes denses et bien organisées. Elles permettent aux faisceaux de fibres de glisser entre elles et au tissu tendineux de glisser sur les pièces osseuses. Elles réduisent les forces de friction lorsque le tendon glisse sur une poulie osseuse ou lorsque le muscle se contracte (Kastelic *et al.* 1978). La plupart des aponévroses sont principalement fibreuses, mais elles peuvent également être fibro-cartilagineuses (Benjamin *et al.* 1995) comme dans le cas des tendons du long et du court fibulaire.

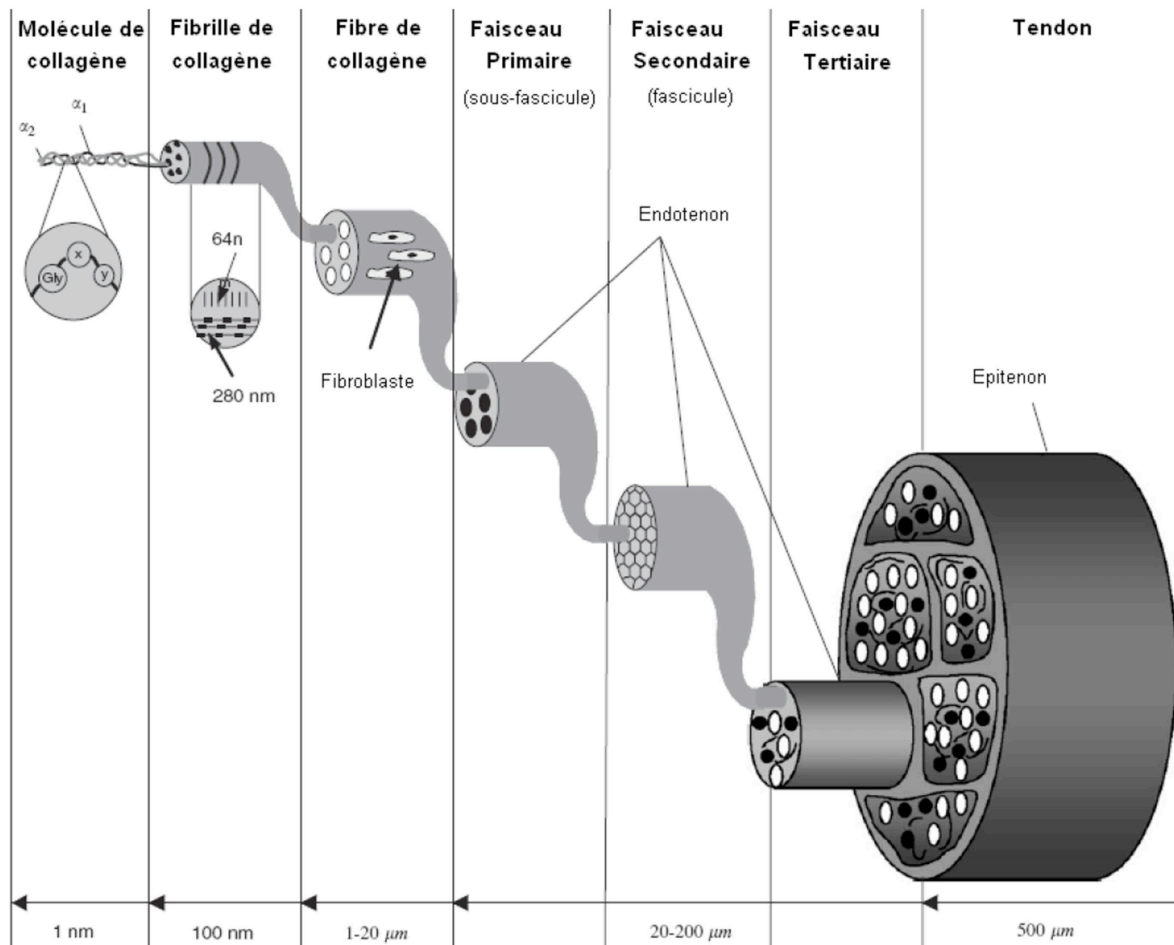


Figure 9. Représentation schématique de la structure hiérarchisée du tendon (Wang 2006).

Le tissu tendineux est composé de 60 à 80% d'eau (Woo *et al.* 2000; Kjaer 2004; Wang 2006), de 7 à 10 % de cellules et de la matrice extracellulaire. La MEC est constituée de collagène (80 à 86%), d'élastine (2%) et des protéoglycannes (3 à 5%) (Jozsa et Kannus 1997; Woo *et al.* 2000).

III.2.2. La vascularisation

Comparé à celle des muscles, la vascularisation du tendon est très limitée, notamment au niveau de la zone centrale. Cette vascularisation réduite pourrait expliquer la difficulté et le temps nécessaire d'un tendon à se régénérer lors d'une rupture. La surface occupée par les vaisseaux ne représente qu'environ 1-2% de la surface totale du tendon. Les vaisseaux sont disposés longitudinalement sur toute la longueur du tendon. Depuis le paraténon, ils atteignent l'épitenon puis envahissent l'endoténon (Ahmed *et al.* 1998) jusqu'aux faisceaux primaires de fibres de collagène (Figure 10). En raison de leur longueur importante et des étirements qu'ils

subissent lors de la contraction musculaire, les tendons ont la nécessité d'avoir des vaisseaux disposés de manière sinueuse pour éviter la rupture.

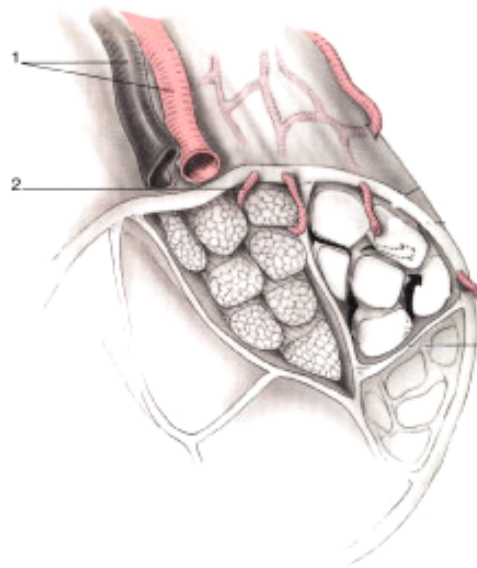


Figure 10. Représentation schématique de la vascularisation du tendon. 1 : artère et veine. 2 : artérioles entre les faisceaux de fibres primaires de collagène.

Le muscle et l'os peuvent fournir une vascularisation supplémentaire au tendon provenant respectivement du péri-mysium et de la jonction ostéo-tendineuse (Carr et Norris 1989). Cependant, le débit sanguin au sein de cette vascularisation n'est pas le même que celui du muscle. En effet, il est 3 fois moins important dans un tendon. Il est également connu que le débit sanguin dans un tendon augmente de 7 fois avec l'exercice physique et pendant la réparation tissulaire, tant chez les individus jeunes que les individus âgés (Boushel *et al.* 2000; Knobloch 2008). Dans le muscle, le débit sanguin augmente de 20 fois dans des conditions d'exercices physiques similaires (Boushel *et al.* 2000). Ce qui veut dire que les flux sanguins du tendon et du muscle ne sont pas corrélés et que le tendon possède son propre système de régulation.

III.2.3. Les fibroblastes du tendon : les ténocytes

Les types cellulaires du tendon sont des fibroblastes particuliers (différenciés) appelés également ténocytes. Ils sont plats et coniques. Ils possèdent une forme de fuseau en coupe longitudinale (Figure 11) et présentent de longs prolongements cytoplasmiques en étoile, visibles en coupe transversale (Figure 12).

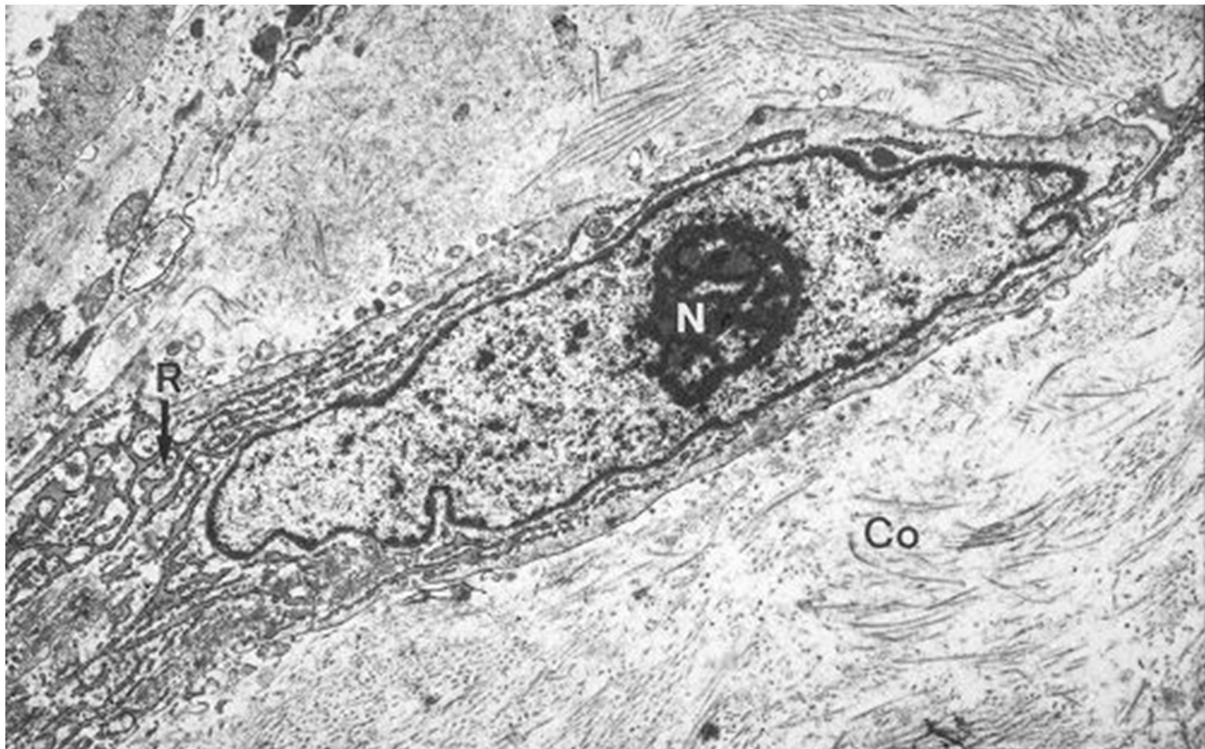


Figure 11. Image en microscopie électronique d'une coupe longitudinale d'un ténocyte. N : nucléole, Co : collagène, R : réticulum endoplasmique (Kraushaar et Nirschl 1999).

Les ténocytes sont disposés longitudinalement en rangées de cellules entre les fibres de collagène (Butler *et al.* 1978). Les ténocytes communiquent entre eux via des prolongements cellulaires et si nécessaire, ils peuvent migrer au sein du tendon vers des zones lésées afin d'induire la cicatrisation (O'Brien 1997; Kraushaar et Nirschl 1999). L'architecture des ténocytes et leurs interconnexions forment un réseau tridimensionnel autour des fibres de collagène permettant les interactions cellule-cellule. *In vitro*, il a été montré que les ténocytes, sous la contrainte mécanique, augmentent leurs interconnexions et également leur synthèse de collagène. En effet, l'inhibition pharmacologique de ces interconnexions conduit à l'inhibition de synthèse du collagène (Waggett *et al.* 2006). Les ténocytes sont des cellules mécanosensibles qui répondent à une contrainte mécanique en exprimant plusieurs composants matriciels quantitativement et qualitativement adaptés (Banes *et al.* 1999).

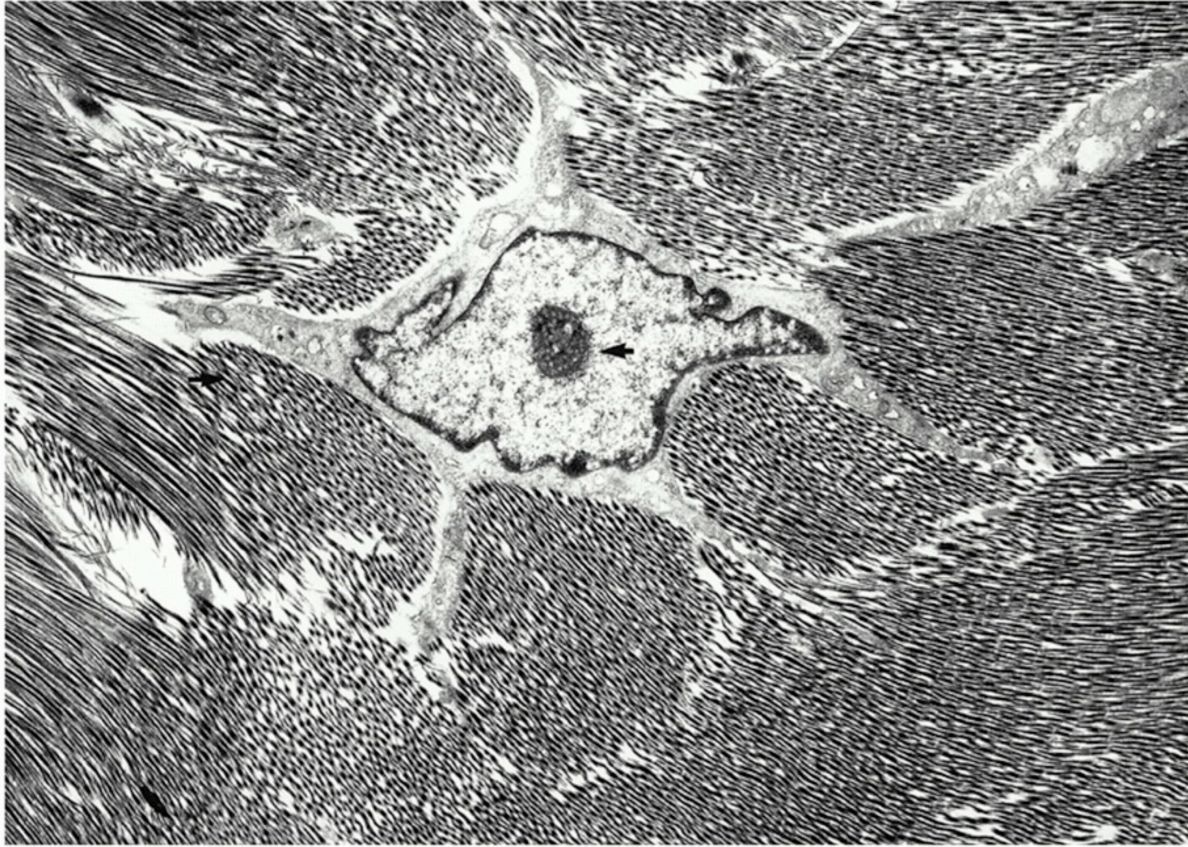


Figure 12. Image en microscopie électronique d'une coupe transversale d'un ténocyte (Kraushaar et Nirschl 1999).

Les ténocytes ont une grande activité proliférative et réparatrice. Ils possèdent un réticulum endoplasmique rugueux (RER) beaucoup plus développé, ce qui traduit une activité de synthèse importante. Ils synthétisent davantage les composants de la matrice extracellulaire du tendon tels que les protéoglycanes, l'élastine, les glycoprotéines et surtout le collagène dont la nature et l'orientation ne sont pas encore définitives. Par la suite, le collagène essentiellement de type I s'organise en fibres longitudinales caractéristiques du tendon (Beck *et al.* 1996).

III.2.4. Les fibres et fibrilles de collagènes

III.2.4.1. Structure du collagène

Le collagène est une protéine fibrillaire, composée de trois chaînes alpha polypeptidiques enroulées autour d'un même axe et formant, sur la majeure partie de leur longueur, une structure en triple hélice (Figure 13).

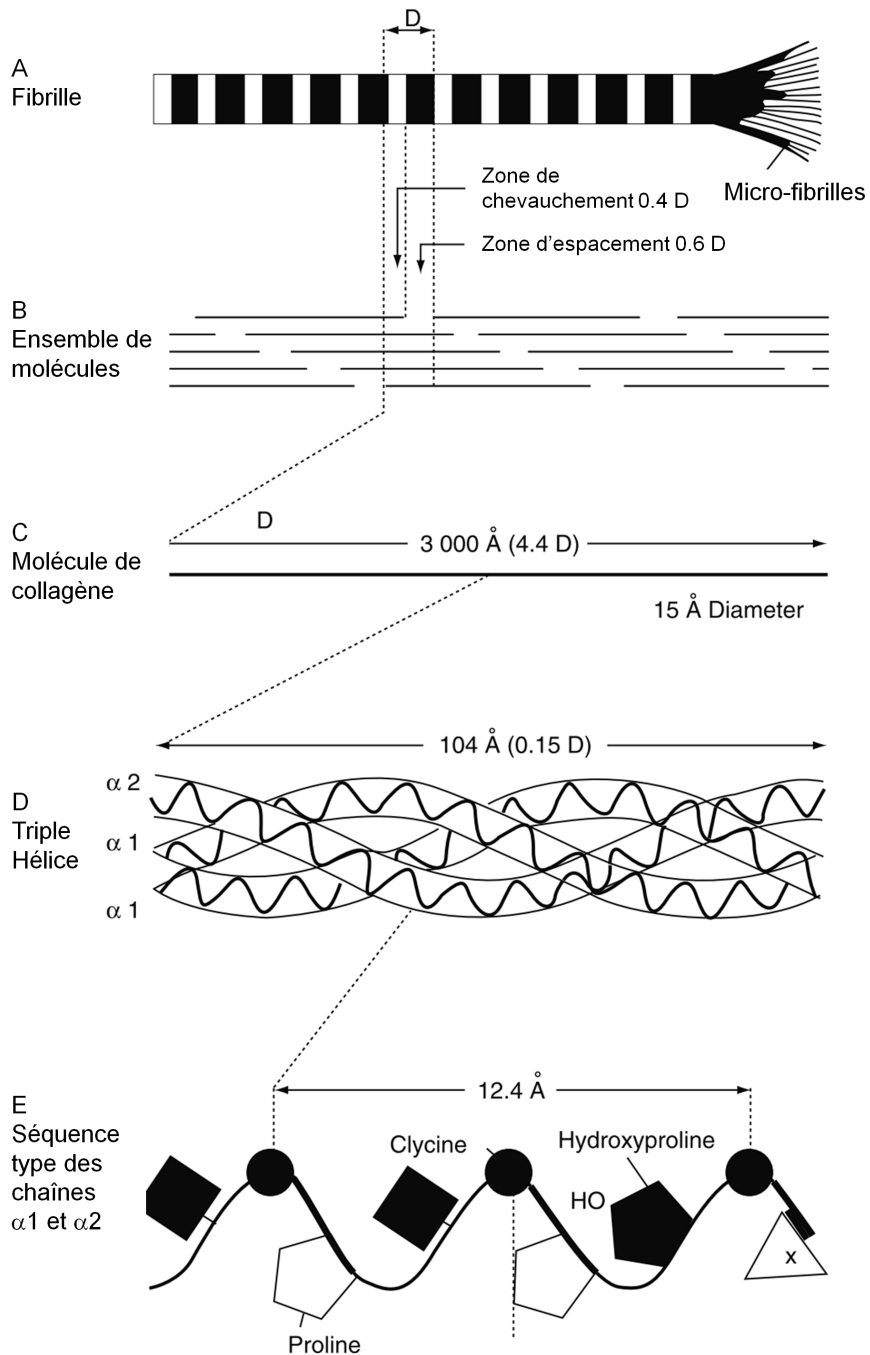


Figure 13. Structure détaillée d'une fibrille de collagène de type I (O'Brien M. *Tendon injuries : basic science and clinical medicine*. Edition Springer, page 10, 2005)

Ces trois chaînes présentent des espèces différentes qui peuvent se combiner de différentes manières et donc former des types moléculaires variés. Chaque type de collagène possède une structure propre et se retrouve dans des tissus spécifiques (Tableau 3).

Type	Composition moléculaire	Gènes	Distribution tissulaire
<i>Collagènes fibrillaires</i>			
I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	COL1A1 COL1A2	Os, derme, tendon , ligament, cornée
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1	Cartilage, tendon
III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1	Peau, tendon , paroi des vaisseaux, poumon, foie, rein
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	COL5A1	Poumon, tendon , cornée, os, membrane foetale
XI	$\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha 3(XI)$	COL11A1 COL11A2 COL11A3 = COL2A1	Cartilage, tendon
<i>Collagènes formant la membrane basale</i>			
IV	$[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV); \alpha 1-\alpha 6$	COL4A1 COL4A2 COL4A3 COL4A4 COL4A5 COL4A6	Membranes basales des vaisseaux sanguins, muscle
<i>Collagènes microfibrillaires</i>			
VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$	COL6A1 COL6A2 COL6A3	Dermes, cartilage, tendon , placenta, poumon, paroi des vaisseaux, disques intervertébraux
<i>Collagène d'ancrages</i>			
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	COL7A1	Peau; jonction derme-épiderme; muqueuse orale, col de l'utérus
<i>Collagènes formant les réseaux hexagonaux</i>			
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_2 \alpha 2(VIII)$	COL8A1 COL8A2	Cellules endothéliales, membrane de Descemet
X	$[\alpha 3(X)]_3$	COL10A1	Cartilage hypertrophié, région fibrocartilagineuse
<i>Collagènes FACIT</i>			
IX	$\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha 3(IX)$	COL9A1 COL9A2	Cartilage, cornée
XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	COL12A1	Perichondre, ligament, tendon
XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$	COL14A1	Derme, tendon , paroi des vaisseaux, placenta, poumon, foie
XIX	$[\alpha 1(XIX)]_3$	COL19A1	human rhabdomyosarcoma
XX	$[\alpha 1(XX)]_3$	COL20A1	Epithélium cornéen, peau embryonnaire, cartilage du sternum, tendon
XXI	$[\alpha 1(XXI)]_3$	COL21A1	Paroi des vaisseaux sanguin
<i>Collagènes transmembranaires</i>			
XIII	$[\alpha 1(XIII)]_3$	COL13A1	Epiderme, follicule de cheveu, endomysium, intestin, chondrocytes, poumon, foie
XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	COL17A1	Jonctions derme-épiderme
<i>Multiplexines</i>			
XV	$[\alpha 1(XV)]_3$	COL15A1	fibroblaste, cellules musculaires lisses, rein, pancréa
XVI	$[\alpha 1(XVI)]_3$	COL16A1	fibroblaste, amnion, keratinocytes
XVIII	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	COL18A1	Poumon, foie

Tableau 3. Tableau des différents types de collagènes et leur distribution tissulaire (Gelse *et al.* 2003).

L'arrangement des collagènes en triple hélice est rendu possible grâce à la répétition de triplets d'acides aminés de type (Gly-X-X'), où X et X' sont fréquemment la proline (40% des cas) et la 4-L-trans-hydroxyproline (10% des cas) (Figure 13E). Le nombre de répétitions varie selon le type de collagène. Dans le cas des collagènes fibrillaires comme le collagène de type I, le triplet est répété de façon continue sur une distance d'environ 1000 acides aminés, alors que les collagènes non fibrillaires présentent des interruptions de ce motif le long de leur séquence primaire, conduisant à la formation de domaines « non collagéniques » plus nombreux. L'enroulement des 3 chaînes alpha, aboutit à la constitution de la molécule de collagène, appelée aussi tropocollagène, dont la cohésion est assurée par des liaisons hydrogène entre la glycine et l'hydroxyproline.

La molécule de collagène est longue d'environ 300 nm avec un diamètre de 1.5 nm. Les chaînes alpha sont constituées chacune d'environ 1050 acides aminés pour une masse moléculaire approximative de 95 kDa (Ricard-Blum et Ruggiero 2005). Dans la molécule de procollagène immature, il existe une succession de domaines globulaires qui sont les parties N- et C-terminales et de domaines hélicoïdaux qui formeront après maturation les molécules de collagènes matures. La molécule de procollagène renferme 1400 acides aminés. De chaque côté de la molécule en triple hélice, on trouve des régions non hélicoïdales composées de 16 à 24 résidus d'acides aminés appelées télopeptides. Ces dernières ont principalement un rôle stabilisateur des fibres de collagène et régulateur des fonctions cellulaires.

III.2.4.2. La biosynthèse du collagène

Les gènes des collagènes sont transcrits sous forme de pré-pro, puis de pro-chaînes alpha (procollagène). Suite à la traduction, les résidus proline et lysine sont hydroxylés en hydroxyproline et hydroxylysine, des glucides (glucose et galactose) sont ensuite ajoutés aux chaînes de procollagène dans la lumière du réticulum endoplasmique (Figure 14). L'hydroxyproline représente 12 à 14 % des acides aminés de la molécule de collagène (Kivirikko *et al.* 1989).

Après clivage du peptide signal, les chaînes de procollagène s'assemblent en triple hélice (Figure 13D et 14) dans la lumière des vésicules de Golgi après les étapes d'hydroxylation et de glycosylation. La triple hélice est stabilisée par des ponts disulfures mis en place entre les propeptides C-terminaux par le disulfure isomérase sous-unité β de la prolyl 4-hydroxylase.

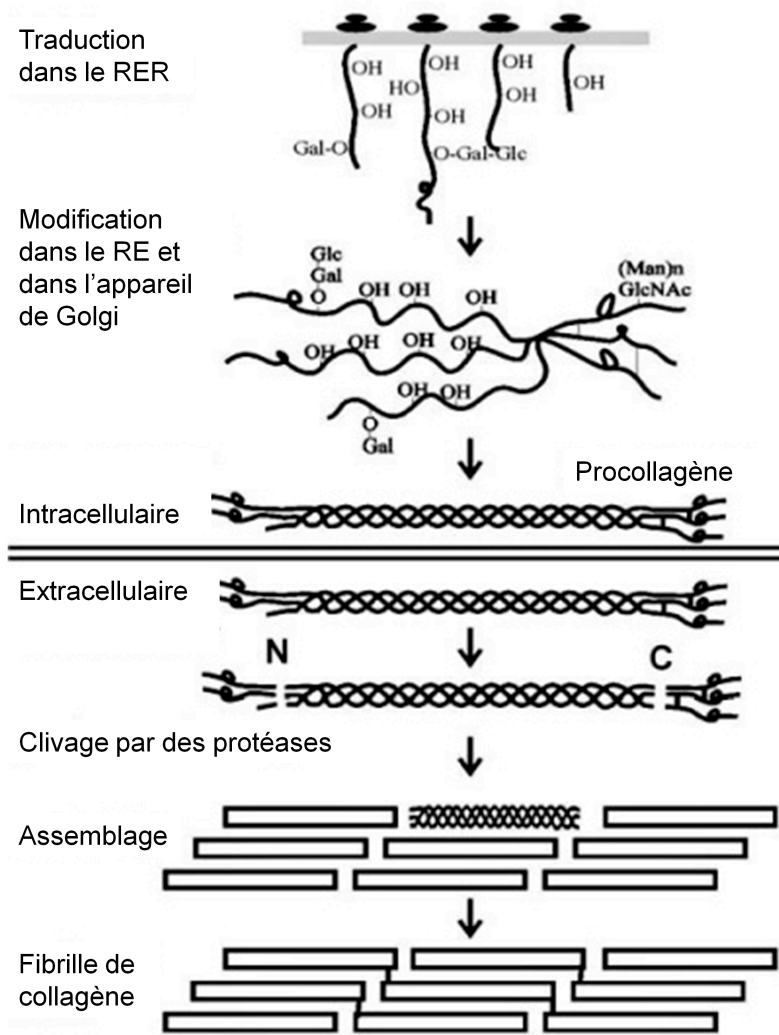


Figure 14. Représentation des étapes de production des collagènes (O'Brien M. *Tendon injuries : basic science and clinical medicine*. Edition Springer, page 10, 2005)

Les molécules de procollagène sont ensuite transportées à l'extérieur de la cellule, où elles sont converties en collagène. Ce processus implique le clivage des propeptides N- et C-terminaux par la procollagène N-protéinase et la procollagène C-protéinase (endopeptidases) qui élimine les ponts disulfures reliant les chaînes de collagène. Cette étape est nécessaire à la fibrillogenèse ultérieure. Selon le modèle le plus accepté, les molécules de collagènes s'associent radialement par six grâce à des liaisons hydrophobes et des liaisons hydrogènes, parallèlement entre elles et avec un décalage d'environ un quart de leur longueur. Cette association produit dans les fibrilles une alternance de bandes claires et sombres qui leur donne un aspect strié, caractéristique en microscopie électronique, d'une périodicité de 64 nm. Cette périodicité représente une zone appelée zone GAP. Ce décalage laisse libre une de leurs

extrémités et permet ainsi la formation de fibres d'épaisseur et de longueur virtuellement indéterminées. Dans le tendon, la présence de ce décalage est importante car elle permet la communication entre les cellules *via* leur prolongement cytoplasmique (Khan et Scott 2009). À ces fibrilles de collagène s'associent d'autres molécules, comme la décorine ou le biglycane, qui participent à la régulation du diamètre de ces fibrilles (Danielson *et al.* 1997; Keene *et al.* 2000). En effet, en les entourant, ces protéoglycannes limitent l'association des molécules de collagène et par conséquent leur diamètre.

Le collagène est synthétisé de façon importante au cours du développement embryonnaire, mais cette synthèse est fortement ralentie après la naissance et chez l'adulte où le renouvellement des molécules de collagènes devient extrêmement lent (Lejard *et al.* 2007).

III.2.4.3. Les collagènes du tendon

Au sein du tissu tendineux, il existe de nombreux types de collagène. On y trouve du collagène de type I, II, III, V, VI, XII et XIV (Tableau 4). Le collagène de type I représente 95% du collagène total du tendon (Evans et Barbenel 1975; Riley *et al.* 1994), ce qui fait de lui le composant le plus abondant de la matrice extracellulaire. Il forme la structure de base du tissu tendineux et est très résistant aux forces de traction notamment grâce à sa capacité à s'organiser en fibres collagéniques longitudinales (Riley *et al.* 1994). Dans un tendon sain, le collagène de type III est principalement localisé dans l'endoténon et l'épitenon (Duance *et al.* 1977). L'augmentation de son expression est souvent un indicateur d'une lésion tendineuse (Eriksen *et al.* 2002) et d'une fibrose. Le collagène de type III est constitué de fibres plus fines et moins bien organisées (Lapiere *et al.* 1977) que celles du collagène de type I. Il est plus flexible que le collagène de type I et se déforme davantage sous les forces de traction, ce qui peut diminuer la force mécanique qu'il transmet. Le collagène de type VI est intercalé entre les fibres de collagène de type I et régule la croissance de ces dernières (Birk *et al.* 1990). Le collagène de type II est limité aux zones fibro-cartilagineuses du tendon, c'est-à-dire à la jonction ostéo-tendineuse et aux régions en contact avec les poulies osseuses. Il permet au tendon d'assurer son rôle de transition mécanique entre le muscle et l'os, en lui conférant une augmentation de la raideur et de la résistance en compression (Archambault *et al.* 2007). Cependant, les microtraumatismes répétés, dus à une sur-utilisation, induisent des micro-ruptures au niveau intra-fibrillaire qui deviennent par la suite des ruptures partielles ou totales des fibres de collagène.

Type de collagène	Structure moléculaire	Localisation et fonction
I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	Collagène prédominant du tendon (95% du collagène total)
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Localisé dans les zones de compression, caractéristique du tissu cartilagineux, forme un réseau collagénique moins organisé
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Localisé dans l'endotendon, forme des fibrilles moins organisées et plus petites
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	Représente le core des fibrilles de collagène de type I
XI	$\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha 3(XI)$	Représente le core des fibrilles de collagène de type II
IV	$[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV); \alpha 1-\alpha 6$	Localisé dans la membrane basale des vaisseaux sanguins
VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$	Associé aux ténocytes, localisé de façon tridimensionnelle entre les grosses fibrilles de collagène
X	$[\alpha 3(X)]_3$	Localisé au niveau des insertions tendineuses, associé à la minéralisation du tissu
IX	$\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha 3(IX)$	Sert d'intermédiaire pour les interactions entre les ténocytes et la matrice via le collagène de type II
XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	Sert d'intermédiaire pour les interactions entre les ténocytes et la matrice via le collagène de type I
XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$	Sert d'intermédiaire pour les interactions entre les ténocytes et la matrice via le collagène de type I

Tableau 4. Composition moléculaire en collagène de la matrice extracellulaire du tendon (Riley 2005).

III.2.4.4. Régulation de la synthèse des collagènes dans le tendon

Le stress mécanique *via* différents facteurs de croissance et cytokines, comme le TGF- β (Transforming growth factor-beta), l'IGF-I (Insulin-like growth factor I), le CTGF (Connective tissue growth factor), le FGF (Fibroblast Growth Factor), IL-1 (Interleukin 1) et IL-4 (Interleukin 4), peut induire une augmentation de la synthèse du collagène dans le tissu tendineux (O'Callaghan et Williams 2000, Kjaer, 2004 #179) (Figure 15). Cette synthèse, due au stress mécanique, est donc directement dépendante des mécanorécepteurs cellulaires tendineux qui vont activer la production des facteurs de croissance. Ces derniers en agissant sur leurs récepteurs spécifiques réguleront la synthèse collagénique. D'autre part, il est généralement admis que certains facteurs de croissance, comme le TGF- β , peuvent induire directement la synthèse de collagène et d'autres facteurs de croissance comme le CTGF ou le FGF (Strutz *et al.* 2001) qui induisent à leur tour la synthèse de collagène.

Tous ces mécanismes sont donc liés et plusieurs facteurs pourraient agir simultanément pour finalement mener à la régulation de la synthèse du collagène tendineux.

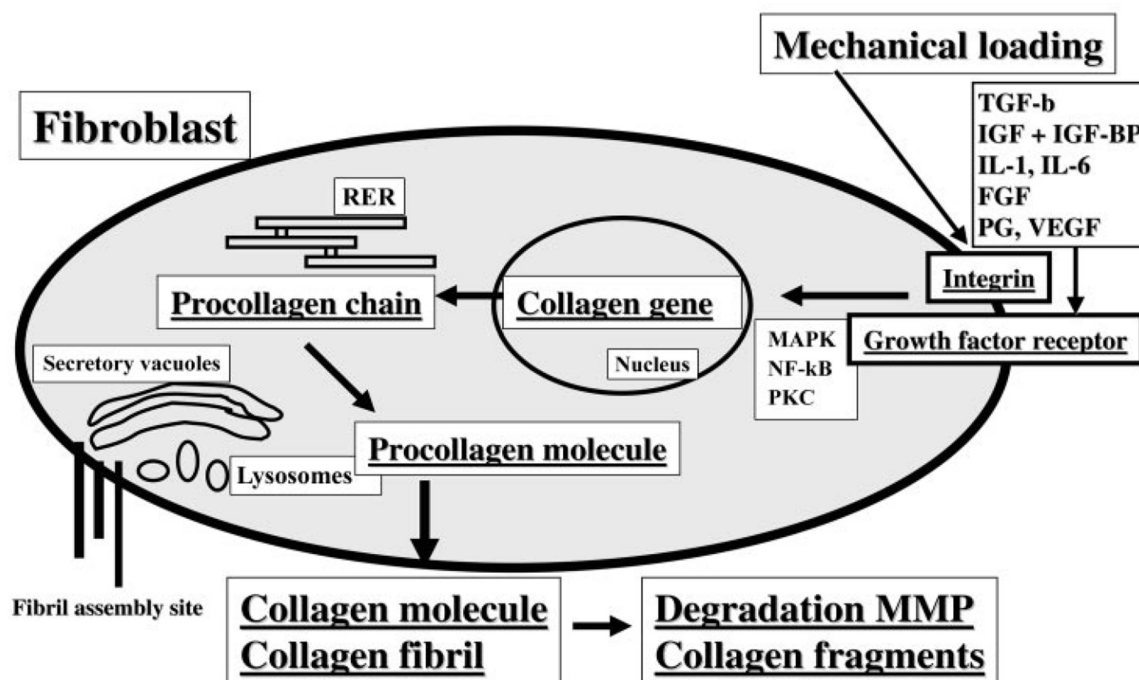


Figure 15. Schéma illustrant l'influence potentielle de nombreux facteurs sur le contenu en collagène du tissu tendineux (Kjaer 2004).

D'autres facteurs intrinsèques peuvent donc influencer la régulation de la synthèse du collagène par les cellules tendineuses comme l'âge, la nutrition, la prédisposition anatomique du tendon, le poids corporel, etc. Des facteurs extrinsèques peuvent également influencer ces mécanismes comme une intensité élevée de contrainte due à l'application d'une force excessive sur le tendon, une intensité élevée de stress mécanique, la fatigue mécanique, etc (Riley 2004).

III.2.5. Les protéoglycanes (PGs)

III.2.5.1. Généralités

Les protéoglycanes (PGs) sont des macromolécules hydrophiles complexes constituées d'un core protéique (partie polypeptidique) sur lequel sont fixés, par l'intermédiaire de liaisons covalentes, des composants polysaccharidiques qu'on appelle les glycosaminoglycannes (GAGs). Les PGs sont situés à la surface des cellules, dans la matrice extracellulaire et ils peuvent être dans certains cas intracellulaires voire circulants. Ils ne représentent que 3 à 5% du poids sec total d'un tendon. Les GAGs représentent plus de 90% de la masse totale des PGs. Ils sont accrochés dans l'appareil de Golgi sur des résidus sérine ou thréonine de la

chaîne polypeptidique par une liaison de type O-glycosidique (au moyen d'un trisaccharide de liaison: xylose-galactose-galactose).

Grâce à leurs fonctions acides, les GAGs confèrent aux PGs des charges négatives permettant de piéger cations et eau, contribuant ainsi à l'hydratation du tissu tendineux et à sa résistance à la déformation sous l'effet de forces de traction, de compression et de cisaillement. De plus, la gamme de métabolites avec lesquels les GAGs interagissent est si large (facteurs de croissance, cytokines, chimiokines, enzymes et autres protéines de la MEC) que les PGs sont impliqués dans de nombreux processus biologiques essentiels tels que la prolifération, le remodelage matriciel, la migration, l'angiogenèse, etc. Par exemple, les PGs jouent un rôle important dans la formation des fibrilles et des fibres de collagènes (Scott 1988) en régulant leur diamètre (Danielson *et al.* 1997; Keene *et al.* 2000) par inhibition de leur fibrillogenèse (Keene *et al.* 2000).

Les PGs représentent potentiellement une classe de protéines très diversifiée. A un même core protéique, plusieurs types de chaînes de GAGs peuvent y être attachés en nombre plus ou moins important. On distingue au sein du tendon, les grands PGs (ex. versicane et aggrecanne) et les petits PGs (ex. décorine et biglycane) (Keene *et al.* 2000). L'appellation grands ou petits PGs fait référence à la taille du core protéique mais également au nombre de chaînes de GAGs associées (Figure 16).

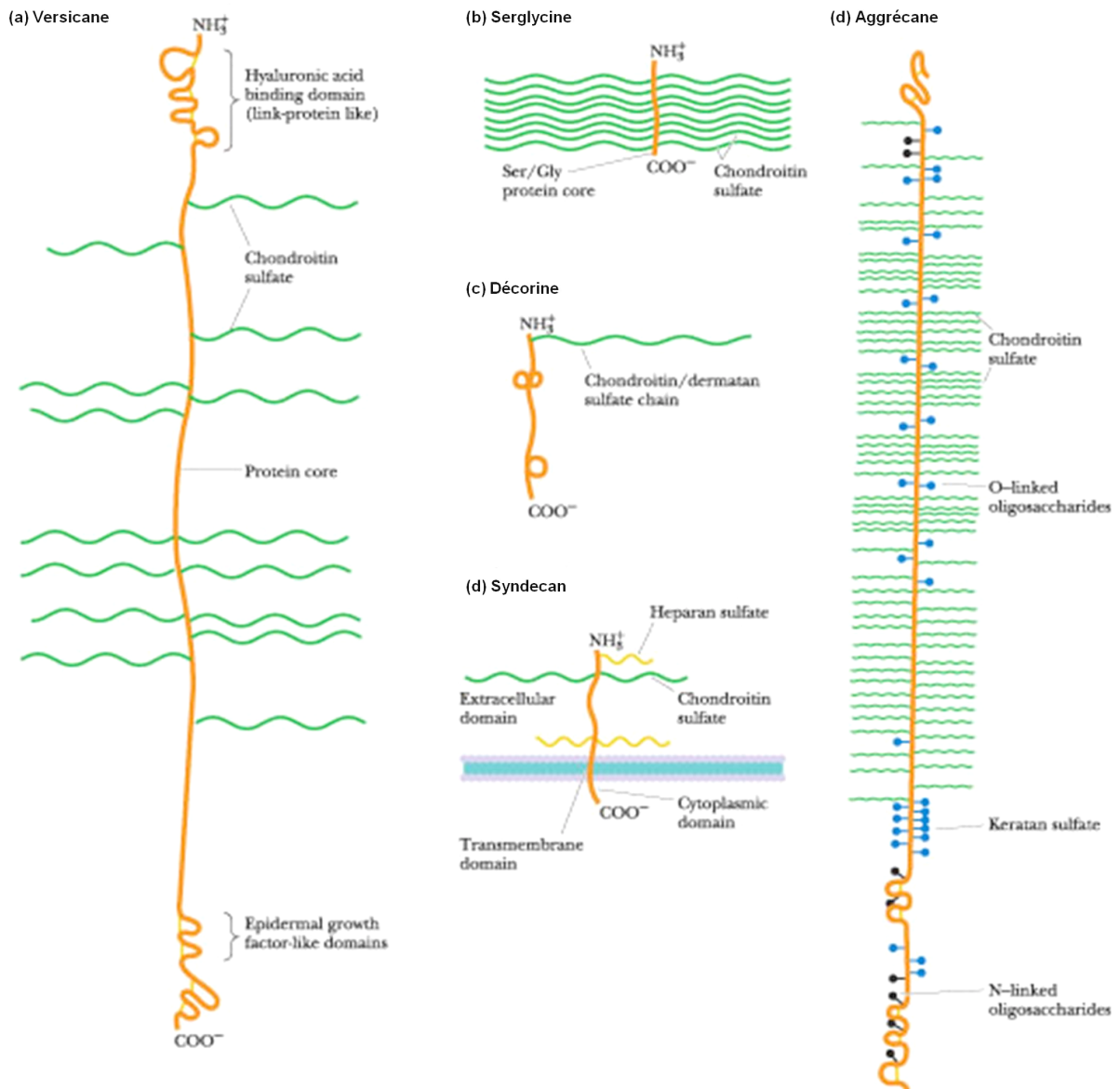


Figure 16. Représentation schématique de divers PGs et leurs chaînes de GAGs associés (Ruoslahti 1989).

III.2.5.2. Les glycosaminoglycanes (GAGs)

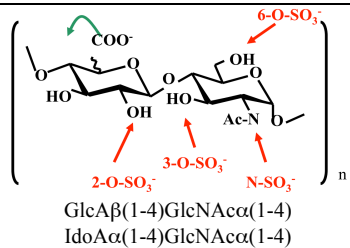
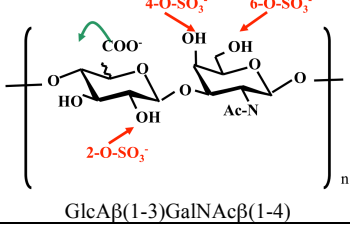
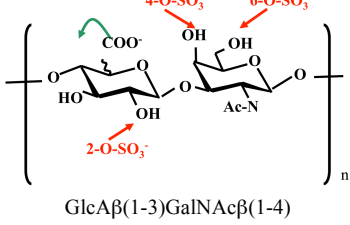
III.2.5.2.1. Généralités

Les GAGs sont des chaînes polysaccharidiques non ramifiées, constituées par polymérisation d'unités disaccharidiques répétitives. Ces disaccharides sont composés de 2 sucres simples non hydrolysables qui sont reliés entre eux par une liaison osidique (1-3 ou 1-4). Ils peuvent être plus ou moins sulfatés et sont composés d'une manière générale d'un acide hexuronique (acide glucuronique (GlcA) ou acide iduronique (IdoA)) et d'une hexosamine (N-

acétylglucosamine (GlcN) ou *N*-acétylgalactosamine (GalN). La configuration répétitive de ces disaccharides dans chaque GAG peut être modifiée par la configuration des groupements sulfates. Du fait de la présence des groupements sulfates ou carboxyles sur la plupart de leurs sucres, les GAGs possèdent une forte charge négative. En effet ce sont les molécules les plus anioniques produites par les cellules animales. Leurs propriétés physico-chimiques sont directement liées au degré de sulfatation. Ainsi la configuration sous-jacente répétitive de ces disaccharides dans chaque GAG peut être modifiée par la configuration complexe des groupements sulfates.

Les GAGs présentent une grande hétérogénéité. En effet, la longueur, la composition, le type de liaison osidique de ses chaînes oligosaccharidiques et le nombre de groupements sulfates peut être très variable. Ainsi, le nombre de combinaisons et de structures possibles pour une chaîne oligosaccharidique semble être quasi infini.

On distingue 5 groupes ou sous-familles qui sont les héparanes sulfates (HS), les chondroïtines sulfates (CS), les dermatanes sulfates (DS), l'acide hyaluronique (AH) et les kératanes sulfates (KS) (Tableau 5). L'acide hyaluronique est le seul GAG à ne pas posséder des groupements sulfates.

GAG	Acide uronique	Hexosamine	disaccharide
Héparine (Hp) Héparane sulfate (HS)	Acide D-glucuronique ou Acide L-iduronique	D-glucosamine	 <p>GlcAβ(1-4)GlcNAcα(1-4) IdoAα(1-4)GlcNAcα(1-4)</p>
Chondroïtine sulfate (CS)	Acide D-glucuronique	D-galactosamine	 <p>GlcAβ(1-3)GalNAcβ(1-4)</p>
Dermatane sulfate (DS)	Acide D-glucuronique ou Acide L-iduronique	D-galactosamine	 <p>GlcAβ(1-3)GalNAcβ(1-4) IdoAα(1-3)GalNAcβ(1-4)</p>

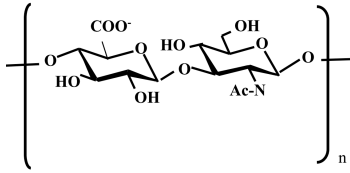
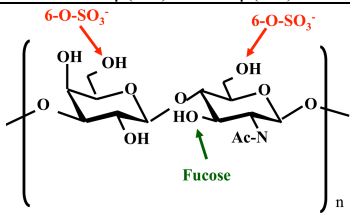
Acide hyaluronique (AH)	Acide D-gluconique	D-glucosamine	 <p style="text-align: center;">GlcAβ(1-3)GlcNAcβ(1-4)</p>
Kératane sulfate (KS)	D-galactose	D-glucosamine	 <p style="text-align: center;">Galβ(1-4)GlcNAcβ(1-3)</p>

Tableau 5. Représentation schématique des motifs disaccharidiques répétitifs constituant les différents GAGs. En rouge, les positions possibles de sulfatation ; et en vert, les autres modifications.

Dans le tissu tendineux, la concentration des GAGs est beaucoup moins importante que dans le tissu cartilagineux ou dans d'autres types de tissu conjonctif. Les zones de tension d'un tendon comprennent environ 0,2% de GAGs du poids sec, dont 60% de DS, tandis que les régions de compression dont les zones d'insertion osseuse comprennent de 3,5% à 5,0% de GAGs dont 65% de CS (Merrilees et Flint 1980). Les HS se trouvent principalement à la jonction myotendineuse (Jarvinen *et al.* 1991).

III.2.5.2.2. Les sous-familles des GAGs

III.2.5.2.2.1. L'Héparine (Hp) et les héparanes sulfates (HS)

Les héparanes sulfates (HS) ou l'héparine (Hp) sont des GAGs dont l'unité disaccharidique est composée d'un acide hexuronique et d'une N-acétyl-glucosamine liées ainsi: 4GlcA α 1-4GlcNAc α 1 (**Tableau 5**). La glucosamine peut être soit N-acétylée (GlcNAc) soit N-sulfatée (GlcNS). Une 6-O-sulfatation (GlcNAc(6S) ou GlcNS(6S)) et une 3-O-sulfatation sur les GlcNS (GlcNS(3S) ou GlcNS(3,6S)) peuvent également avoir lieu. Au cours de la synthèse des HS, l'acide glucuronique (GlcA) peut être épimérisé en C5 pour donner l'acide iduronique (IdoA). Les deux formes épimérisées peuvent également subir ensuite une 2-O-sulfatation: IdoA(2S) et GlcA(2S). Il est rare, mais possible de trouver la glucosamine sous forme non aminée (GlcNH₂) (Rabenstein 2002). Les HS se composent d'une alternance de région très sulfatées (régions dites de type héparine) et de régions peu ou pas sulfatées

(Lindahl *et al.* 1998; Esko et Lindahl 2001; Gallagher 2001). Toutes ces modifications (sulfatation et épimérisation) génèrent une hétérogénéité et une variabilité de structure quasi infinie le long d'une chaîne de HS.

L'héparine et les HS n'ont pas le même lieu de synthèse et n'ont pas les mêmes fonctions. L'héparine est uniquement exprimée par les mastocytes situés dans les tissus conjonctifs. Les HS, quant à eux, sont exprimés par la plupart, voire toutes les cellules. Sauf digestion enzymatique par des héparanases ou des héparitinases, les HS ne se trouvent jamais sous forme libre mais associés à divers cores protéiques pour former les protéoglycanes à héparanes sulfates (HSPGs). Ces HSPGs se trouvent soit dans les matrices extracellulaires, soit à la surface des cellules (Rabenstein 2002).

III.2.5.2.2.2. Les chondroïtines sulfates (CS)

Le chondroïtine sulfate (CS) ou sulfate de chondroïtine, est un GAG que l'on retrouve principalement dans les tissus conjonctifs. L'unité disaccharidique de base qui le compose est: 4GlcA β (1-3)GalNAc β 1 (Figure 17 et Tableau 5). Comme les autres GAGs, il peut subir des modifications en fonction des cellules qui le synthétisent ou du contexte physiologique (normal ou pathologique). Ainsi, sur toute la chaîne de CS, la N-acétyl-galactosamine peut être sulfatée en position C4 pour donner le chondroïtine sulfate de type A (CS-A) ou en position C6 pour donner la CS-C.

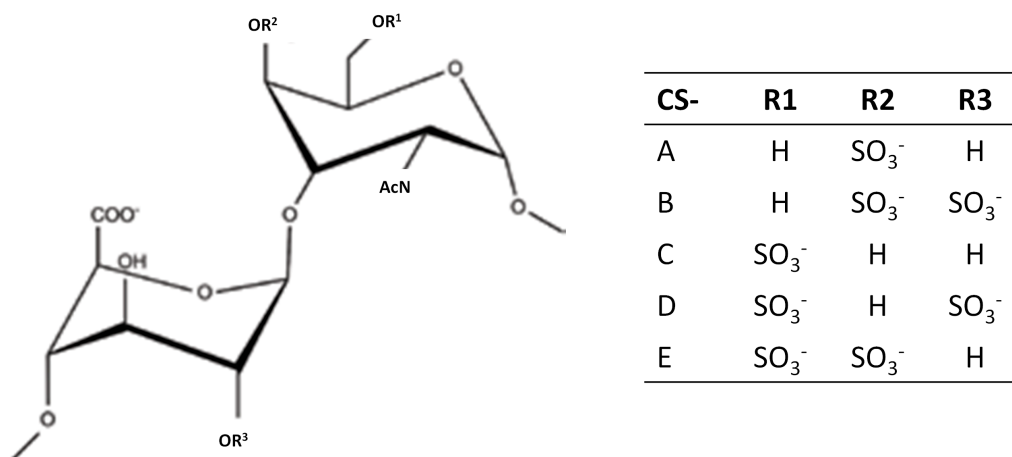


Figure 17. Représentation des différents types de chondroïtines sulfates et de leur position de sulfatation.

III.2.5.2.2.3. Les dermatanes sulfates (DS)

Les DS sont souvent classés comme étant des dérivés des CS. On peut d'ailleurs les trouver sous le nom de CS-B. En fait, on pourrait définir les DS comme étant des chaînes de CS comportant au minimum un acide iduronique issu d'une épimérisation en C5 d'un acide glucuronique (Tableau 5). Ainsi, l'information structurale que peut contenir les chaînes de DS est plus diversifiée que celle des CS puisque l'acide glucuronique peut être épimérisé pour donner l'acide iduronique qui peut alors être 2-O-sulfaté. La réaction d'épimérisation se fait préférentiellement lorsque la GalNAc est 4-O-sulfaté.

L'épimérisation de l'acide uronique qui distingue les CS des DS ne se fait pas d'une façon aléatoire. En effet, la caractérisation d'interactions protéines-GAGs a permis de démontrer que cette épimérisation pouvait apporter une certaine spécificité fonctionnelle aux DS qui leur confère des rôles biologiques particuliers. Les DS, par exemple, vont interagir avec l'héparine co-facteur II alors que les CS ne le peuvent pas (Mascellani *et al.* 1993). Plus spécifiquement encore, seuls les DS parmi les GAGs sont capables d'activer le NF-kB dans des cellules endothéliales *in vitro* et d'induire l'expression d'Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) par un mécanisme encore mal défini (Penc *et al.* 1999). De plus, les interactions des DS avec certains facteurs de croissance comme HARP/Pleiotrophine sont essentielles pour leurs activités biologiques (Vacherot *et al.* 1999).

III.2.5.2.2.4. L'acide hyaluronique (AH)

L'AH a été décrit pour la première fois au début des années 50 (Meyer *et al.* 1953). C'est un GAG composé d'une seule unité disaccharidique répétitive constitué de GlcA et de GlcNAc (4GlcA β (1-3)GlcNAc β 1-). L'AH présente une taille moyenne entre 10^2 et 10^4 kDa représentant environ 50000 unités disaccharidiques. Il a la particularité de ne jamais être lié à un core protéique et de n'être jamais sulfaté. Il est largement réparti dans les tissus conjonctifs et épithéliaux. La charge anionique qu'il possède par la présence d'acétates, fait de ce GAG une molécule déterminante dans le maintien de l'hydratation tissulaire (Turino et Cantor 2003).

III.2.5.2.2.5. Les kératanes sulfates (KS)

Les kératanes sulfates (KS) ont été identifiés pour la première fois au début des années 40 dans des extraits de cornée bovine, mais réellement caractérisés bien plus tard par Meyer *et al.* (Meyer *et al.* 1953). Trois types de KS ont été ainsi identifiés: les KS de type I, II ou III. Cette distinction est liée au fait que les KSI se lient à un corps protéique par une asparagine (Asp)

(N-glycosylation) alors que les KSII et III se lient aux Ser ou Thr (Funderburgh, 2000 ; Krusius et al, 1986). Bien que les KS soient classés dans la famille des GAGs, ils présentent plusieurs particularités exceptionnelles. Chaque unité disaccharidique de KS est constituée d'un galactose à la place d'un acide hexuronique et d'un glucose N-acétylé (Tableau 5). Ces disaccharides (3Gal β (1-4)GlcNac β 1) peuvent être sulfatés en C6 sur les deux oses. Un fucose peut également se fixer sur la glucosamine (Greiling 1994).

III.2.5.2.3. La biosynthèse des GAGs

Comme nous venons de le préciser, les GAGs constituent une famille de macromolécules ayant des caractéristiques différentes par leur structure, leur taille, leurs modifications post-synthétiques, leurs lieux de biosynthèse, leur fonction et leur localisation. Ainsi, on distingue 2 types de biosynthèse : la biosynthèse de l'AH, le seul GAG « libre » non lié à un core protéique, et la biosynthèse des autres GAGs « à protéoglycane » liés à un core protéique pour donner des PGs.

III.2.5.2.3.1. La biosynthèse de l'AH, le seul GAG « libre »

L'AH est un GAG particulier mais c'est le moins complexe. En effet, il est synthétisé directement dans l'espace extracellulaire par des enzymes spécifiques qu'on appelle les AH synthases (HAS) et ne subit aucune modification post-synthétique. Chez les mammifères, 3 HAS ont été identifiées (HAS I, II et III) (Weigel *et al.* 1997) et elles agissent d'une manière unique et spécifique. Contrairement à tous les autres types de GAGs, l'élongation de l'AH par ajout de monosaccharides se fait sur la partie réductrice de la chaîne puisqu'elle est libre et non greffée à un core protéique.

La longueur de la chaîne des AH semble être un élément essentiel de la régulation de leur fonctions biologiques (Noble 2002). Cette longueur dépend de l'activité de chacune des enzymes HAS. Les HAS I, II et III produisent respectivement des chaînes d'une longueur de $2 \cdot 10^5$ Da, de $2 \cdot 10^6$ Da et de supérieur à $2 \cdot 10^6$ Da.

III.2.5.2.3.2. La biosynthèse des GAGs « à protéoglycane »

A l'exception de l'AH, tous les autres GAGs sont synthétisés à partir d'un core protéique. Selon le core protéique et l'environnement tissulaire, la nature des GAGs synthétisés varie. Cependant, le même schéma est généralement observé. En effet, une séquence tetra-

saccharidique consensus d'ancrage, appelée également « linker », est ajoutée sur un acide aminé bien précis (la sérine ou la thréonine) et l'élongation peut alors être initiée (Figure 18). A cet acide aminé, une xylose est ajoutée sur la sérine suivie par l'ajout de 2 résidus galactosamines puis d'un acide glucuronique.

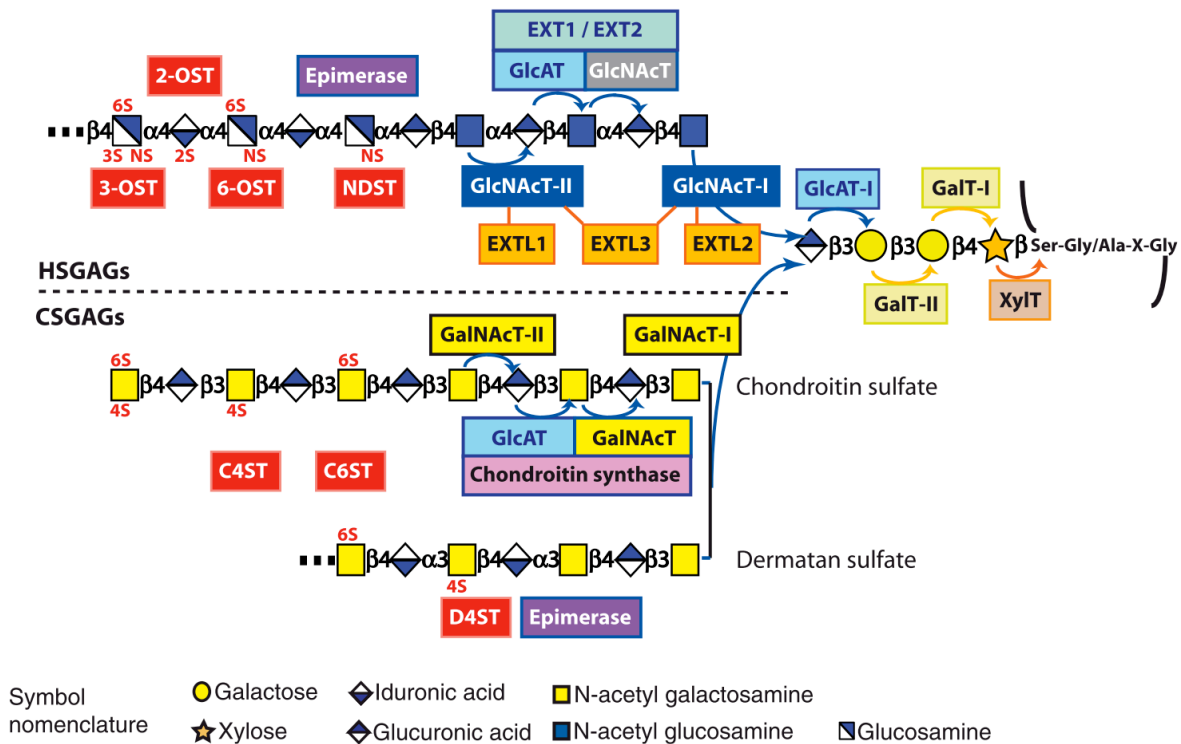


Figure 18. Biosynthèse des chaînes oligosaccharidiques d'HS, de CS et de DS (Sasisekharan *et al.* 2006).

Chaque réaction est catalysée par des glycosyltransférases spécifiques qui sont respectivement la xylosyltransférase (XylT), la galactosyltransférase I (GalT-I) puis la galactosyltransférase II (GalT-II) et enfin la glucuronyltransférase I (GlcAT-I). Les enzymes GlcNAc transférase I et GalNAc transférase I ou II permettent respectivement l'ajout sur le tétra-saccharide d'ancrage d'une GlcNAc ou d'une GalNAc. Cette étape est décisive pour le choix de biosynthèse entre les Héparines/HS et les CS/DS. Les GAGs peuvent alors être synthétisés par l'ajout alternatif et répété d'un acide glucuronique et d'une hexosamine N-acétylée. Les Heparine/HS sont synthétisés par l'HS polymérase composée de deux enzymes EXT1 et EXT2 qui possèdent les activités de GlcNAc transférase et GlcA transférase. La synthèse des CS et des DS est possible grâce à la Chondroïtine Synthase (ChSy). Cette enzyme récemment découverte

possède les deux activités enzymatiques qui sont les GalNAc transférase II et GlcA transférase II.

Le mécanisme de polymérisation ainsi achevé, des modifications post-synthétiques peuvent avoir lieu. Elles se déroulent de façon bien ordonnée. Ces modifications qui sont la déacétylation, l'épimérisation et la sulfatation, ont lieu dans l'appareil de Golgi grâce à des enzymes spécifiques qui agissent directement sur les polysaccharides déjà polymérisés. Elles sont essentielles pour rendre les GAGs fonctionnels. L'environnement biologique a une très grande importance sur les différentes modifications qui peuvent orner les GAGs. Chaque modification est effectuée sous le contrôle d'enzymes (Tableau 6) régulées de manière fine afin d'aboutir aux structures de GAGs nécessaires pour répondre aux besoins du microenvironnement biologique tissulaire (physiologique ou pathologique) à un instant donné.

GAGs concernés	Enzymes	Nomenclature	Rôle
Héparine/ Héparane Sulfate	N-déacétylase/N-sulfotransférase 1/2/3/4	NDST1, NDST2, NDST3, NDST4	N-déacétylent et N-sulfatent la GlcNAc
	C5 épimérase	C5 épimérase	Epimérisation en C5 de GlcA
	2-O-sulfotransférase	2OST	Sulfatent l'IdoA en position C2 et bloquent l'épimérisation
	6-O-sulfotransférase 1/2/2S/3	6OST1, 6OST2, 6OST2S, 6OST3	Sulfatent la GlcNS ou la GlcNAc en position C6
Chondroïtine Sulfate/ Dermatane Sulfate	3-O-sulfotransférase 1/2/3a/3b/4/5	3OST1, 3OST2, 3OST3a, 3OST3b, 3OST4, 3OST5	Sulfatent la GlcNS en position C3
	C5 épimérase	C5 épimérase	Epimérisation en C5 de GlcA
	Chondroïtine 4-O-sulfotransférase 1/2/3 et dermatane-4-O-sulfotransférase	C4ST1, D4ST, C4ST2, C4ST3	Sulfatent le GlcA ou l'IdoA en position C4, D4ST appelé aussi CHST4 est spécifique des DS
	Chondroïtine 6-O-sulfotransférase 1/2 et dermatane-6-O-sulfotransférase	C6ST1, C6ST2, D6ST	Sulfatent la GalNAc en position C6, agissent principalement dans des régions riches en GlcA, D6ST est spécifique des DS
	Hexuronyl Chondroïtine dermatane 2-O-sulfotransférase	C2ST	Sulfate le GlcA ou l'IdoA en position C2

Tableau 6. Rôles des enzymes de modifications post-synthétiques des GAGs.

Le tableau ci-dessus représente toutes les enzymes connues à ce jour ayant un rôle dans la modification post-synthétique des GAGs. Il représente les modifications susceptibles d'avoir lieu pour chaque GAG spécifique.

III.2.5.3. Rôles biologiques et mécaniques des PGs et des GAGs associés au sein du tissu tendineux

Plusieurs dizaines de PGs ayant été identifiés à ce jour chez les mammifères, nous discuterons dans cette partie uniquement de ceux qui sont présents dans le tendon et y jouent un rôle important (Tableau 7).

Comme indiqué précédemment, on distingue au sein du tendon 2 familles de PGs :

- les petits PGs, comme la décorine et le biglycane, sont localisés autour des fibrilles de collagènes (Keene *et al.* 2000) ;
- les grands PGs, comme le versicane et l'aggrécane, sont localisés dans les régions péricellulaires et respectivement dans les zones de tension et de compression (Vogel et Hernandez 1992; Robbins et Vogel 1994; Vogel *et al.* 1994).

Au sein d'un tendon, les zones de tension contiennent 90% de petits protéoglycanes et 10% de grands protéoglycanes ; alors que les zones de compression contiennent 50% de petits protéoglycanes et 50% de grands protéoglycanes (Vogel et Heinegard 1985; Vogel et Evanko 1987).

Les PGs sont des molécules hydrophiles chargées négativement, ce qui leur permet de retenir jusqu'à 50 fois leur masse en eau. Ils sont pour la plupart localisés autour des fibrilles et fibres de collagènes. Grâce à la densité élevée des charges négatives fixées, qui entraînent d'importantes forces de répulsion, les PG confèrent aux fibrilles de collagène une grande résistance aux forces de compression et de tension. Les PGs ont également pour rôle de réguler les activités des facteurs de croissance en contrôlant leur biodisponibilité. Au sein du tendon, ils ont pour rôle principal de réguler la fibrillogenèse des fibrilles de collagène en les entourant et en limitant leur diamètre.

III.2.5.3.1. La décorine

La décorine représente le PG le plus abondant dans le tissu tendineux. Elle fait partie de la famille des petits PGs. La forme commune de la décorine possède une chaîne de CS/DS alors que la seconde forme, qui est l'homologue du biglycane, possède soit 2 chaînes de DS (Blaschke *et al.* 1996) soit une chaîne de CS/DS et une chaîne de KS (Blochberger *et al.*

1992) ([Tableau 7](#)). La décorine se lie presque à tous les types de collagène aussi bien par sa partie protéique que par sa partie glucidique. Le site de fixation se situe au niveau des domaines cystéines libres du core protéique (Svensson *et al.* 1995). Ses principales fonctions au sein du tendon pourraient être résumées comme suit (Kuc et Scott 1997) :

1. Maintient et régule la structure des fibrilles de collagène ;
2. Régule la prolifération cellulaire ;

En effet, la décorine est considérée comme « le » PG clé régulant l'assemblage de la matrice extracellulaire car il limite le diamètre des fibrilles de collagène de type I, II et III en orientant, d'une certaine façon, le remodelage du tendon selon les contraintes subies (de tension et/ou de compression) (Danielson *et al.* 1997; McCormick 1999). Chez des souris déficientes en décorine, il a été montré que la peau très fragile ne résistait pas à des contraintes tensiles élevées (Danielson *et al.* 1997). L'examen au microscope électronique de la peau montre, qu'en l'absence de décorine, les fibrilles de collagène sont de diamètre important et désorganisées au sein de la MEC. Outre ce rôle important, la décorine permet de réguler la prolifération cellulaire en inhibant le TGF β (Ruoslahti et Yamaguchi 1991) et en se fixant directement sur le récepteur à l'EGF (Iozzo *et al.* 1999).

III.2.5.3.2. Le biglycane

Le biglycane est un autre membre de la famille des petits PGs (Iozzo et Murdoch 1996; Lorenzo *et al.* 2001) ([Tableau 7](#)). Il est considéré comme l'homologue de la décorine et possède 2 chaînes de DS. Le biglycane est exprimé principalement dans le tendon, le cartilage et l'os ainsi que dans le derme et les vaisseaux sanguins (Bianco *et al.* 1990; Schonherr *et al.* 1995; Ameye *et al.* 2002). Tout comme la décorine, il est capable de se lier à différents collagènes, mais cette interaction n'est pas encore bien définie. Une étude (Kilts *et al.* 2009) a montré que les fibrilles de collagène du tissu tendineux de souris déficientes en biglycane sont complètement désorganisées. L'absence du biglycane réduit la formation des fibrilles matures de collagène et par conséquent diminue la raideur et la force des tendons. Le biglycane est également capable d'inhiber la prolifération cellulaire en se fixant sur le TGF β (Ruoslahti et Yamaguchi 1991).

III.2.5.3.3. La fibromoduline

La fibromoduline est un autre membre de la famille des petits PGs ([Tableau 7](#)). Elle ne possède pas de chaînes CS/DS mais elle contient 4 chaînes de KS (Lorenzo *et al.* 2001). La structure de la fibromoduline montre de grandes homologies avec les autres membres de la

famille des petits PGs (décorine, biglycane et lumicane) (Antonsson *et al.* 1991). Elle est fortement exprimée dans le tendon. De même que la décorine et le biglycane, la fibromoduline est capable de se lier aux fibres de collagène de type I, II et III mais sur des sites de fixation distincts. Contrairement à la décorine, la fibromoduline favorise la formation de fibrilles de collagène matures (Jepsen *et al.* 2002). En effet, les tendons de souris déficientes en fibromoduline montrent une augmentation de la souplesse tendineuse. Les tendons de ces souris montrent une augmentation des fibrilles immatures de collagène de petit diamètre qui n'évoluent pas vers des fibrilles matures de plus gros diamètre (Jepsen *et al.* 2002). L'absence de la fibromoduline peut avoir des conséquences importantes sur la fonction et le rôle du tendon (Jepsen *et al.* 2002) en particulier sur la force qu'ils développent (Ezura *et al.* 2000).

III.2.5.3.4. L'aggrécane

L'aggrécane est le PG le plus abondant dans le tissu cartilagineux. Il est hautement glycosylé et possède de nombreuses chaînes de CS et de KS. Il fait partie de la famille des grands PGs. Chaque molécule d'aggrécane possède environ 100 chaînes de CS et 60 chaînes de KS. La quantité, la longueur et la sulfatation des chaînes de KS dépendent du tissu, des contraintes mécaniques subies et de l'âge (Valhmu *et al.* 1998).

L'aggrécane se lie à l'acide hyaluronique via une protéine de liaison pour former des agrégats de PG qui permettent de stabiliser la matrice extracellulaire grâce aux nombreuses charges négatives qu'ils possèdent. Ces charges induisent également une pression osmotique élevée et augmentent par conséquent l'hydratation tissulaire. Cela fournit au tissu un degré élevé de résistance aux déformations dues aux forces de compression via le flux hydrique tissulaire entrant et sortant. Les régions tendineuses fibrocartilagineuses qui subissent aussi des contraintes en compression (Valhmu *et al.* 1998) y sont également adaptées grâce à leur teneur en aggrécane. Ces régions, qui sont généralement les régions ostéo-tendineuses, révèlent la présence de fibrocartilage riche en aggrécane et en collagène de type II qui sont les composants principaux du tissu cartilagineux (Benjamin et Ralphs 1998). La teneur en KS de l'aggrécane augmente avec la contrainte compressive à laquelle le tissu est soumis. Ainsi dans le tendon gastrocnémien, l'aggrécane de la région supérieure, exposée à des forces de tension, possède uniquement des chaînes de CS et aucune chaîne de KS (Vertel et Ratcliffe 2000). Alors que l'aggrécane de la région inférieure, s'exerce des forces de compression, possède 50% de CS et 50% de KS (Vertel et Ratcliffe 2000). Enfin, l'aggrécane contribue donc d'une façon importante à la viscoélasticité tissulaire.

III.2.5.3.5. Le versicane

Le versicane fait également partie de la famille des grands PGs (Tableau 7). C'est un PG qui possède environ 30 chaînes de CS/DS. Il est exprimé dans de nombreux tissus, en particulier dans les tissus mous à croissance cellulaire rapide, par exemple le derme de la peau et l'aorte. Tout comme l'aggrécane, le versicane possède un site de fixation à l'acide hyaluronique (Iozzo et Murdoch 1996; Wight 2002).

Une surexpression du versicane induit une expansion de la matrice extracellulaire et une augmentation importante de la viscoélasticité au niveau de l'environnement péri-cellulaire. Au sein du tendon, cette augmentation permet de protéger les ténocytes des forces de traction et de compression et ainsi les maintenir bien ancrés dans la matrice (Oldberg *et al.* 1990). Le versicane joue également un rôle au niveau de l'adhésion, de la prolifération et de la migration cellulaire.

PG	Classe (petit ou grand PG)	Poids du core protéique (kDa)	Chaînes de GAGs (n)	Propriété et rôle dans le tendon
Décorine	petit	36	CS/DS (1) ou DS (2) ou CS/DS (1) + KS (1)	-Entoure les fibrilles de collagènes -Inhibe la fibrillogenèse -Se lie au TGFβ et à l'EGF
Biglycan	petit	38	DS (2)	-homologue de la décorine -Entoure les fibrilles de collagènes -Inhibe la fibrillogenèse
Fibromoduline	petit	42	KS (4)	-Se lie au collagène de type I -Facilite la formation des fibrilles de collagène matures -Module la force du tendon
Aggrécane	grand	220	CS (~ 100) + KS (~ 60)	-Se lie à l'AH -Résistance élevée aux contraintes de compression -Peu exprimé dans les régions de tension du tendon -Fortement exprimé dans les régions de compression du tendon -Principal PG du cartilage
Versicane	grand	265-370	CS/DS (10-30)	-Se lie à l'AH -Peu exprimé dans les régions de tension du tendon -Présent dans les régions de compression du tendon -Augmente la viscoélasticité -Maintient et protège les ténocytes

Tableau 7. Propriétés et rôles des PGs présents dans le tendon. D'après (Yoon et Halper 2005).

Dans des conditions physiologiques ou pathologiques, les molécules présentes dans la matrice extracellulaire du tendon sont susceptibles d'être renouvelées. Pour cela, les protéoglycanes, le collagène tout comme le reste des composants matriciels doivent être dégradés par des enzymes qu'on appelle les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et remplacés. Par exemple, le degré d'atteinte d'un tendon dépend des changements de l'expression et de l'activité des MMPs et des TIMPs (Riley 2004). Ainsi, au cours du chapitre suivant, nous allons nous intéresser aux MMPs en général, à leur régulation, leur mode d'action et à leurs principales fonctions biologiques qui leur sont associées au sein du tendon.

III.2.6. Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et leurs inhibiteurs (TIMPs)

III.2.6.1. Les métalloprotéinases matricielles (MMPs)

III.2.6.1.1. Généralités

Les MMPs font partie de la grande famille des protéinases qui ont été décrites pour la première fois en 1962 (Gross et Lapiere 1962). Ce sont des enzymes qui dégradent les protéines de la matrice extracellulaire (MEC). Elles sont impliquées dans plusieurs processus biologiques et jouent un rôle majeur dans le remodelage tissulaire au sein du tendon, à la fois dans des conditions physiologiques et pathologiques (Riley *et al.* 2002). Ainsi, elles sont associées à différentes pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde, les maladies cardiovasculaires ou encore le développement tumoral. A ce jour, 25 MMPs ont été identifiées chez les vertébrés dont 22 chez l'Homme. Elles sont identifiées soit par un nom commun, soit par une nomenclature numérique ([Tableau 8](#)). Elles présentent plusieurs caractéristiques communes comme la présence au sein de leur domaine catalytique d'un site de fixation d'un atome de zinc, de fortes homologies structurales et leur sécrétion sous forme d'une proenzyme inactive. Chaque MMP dégrade au moins un composant de la MEC (Visse et Nagase 2003; Nagase *et al.* 2006). Elles sont secrétées dans la MEC, hormis six d'entre elles qui possèdent un domaine transmembranaire et sont exprimées à la surface cellulaire ([Figure 19](#)).

III.2.6.1.2. Classification et structure des MMPs

Les MMPs forment une famille d'endopeptidases structurellement homologues. Toutes ces enzymes ont des domaines de séquences communes : un peptide signal, un propeptide, un domaine catalytique et un domaine carboxylique. Selon la spécificité de leur substrat et leur

structure, les membres de la famille des MMPs ont été classés en au moins 6 familles distinctes : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines, les MMPs de type membranaire (MT-MMPs) et les MMPs non classées (Tableau 8).

Famille et nom	MMP	Substrat
<i>Collagénases</i>		
Collagénase-1	MMP-1	Collagène I, II, III, VII et X, gélatine, aggrecane, versicane, tenacine, entactine
Collagénase-2	MMP-8	Collagène I, II, III, V, VII, VIII et X, gélatine, aggrecane, fibronectine
Collagénase-3	MMP-13	Collagène I, II, III, IV, IX, X et XIV, gélatine, aggrecane, perlecan, fibronectine, ostéonectine
Collagénase-4	MMP-18	ND
<i>Gélatinases</i>		
Gélatinase-A	MMP-2	Collagène I, IV, V, VII, X, XI et XIV, gélatine, élastine, fibronectine, laminine-1, laminine-5, aggrecane, décorine, ostéonectine
Gélatinase-B	MMP-9	Collagène IV, V, VII, X et XIV, gélatine, élastine, aggrecane, fibronectine, entactine, ostéonectine, plasminogène
<i>Stromélysines</i>		
Stromélysine-1	MMP-3	Collagène III, IV, V et XI, gélatine, aggrecane, versicane, perlecan, décorine, fibronectine, laminine, entactine, ostéonectine, plasminogène, E-cadhérine
Stromélysine-2	MMP-10	Collagène III, IV et V, gélatine, caséine, aggrecane, élastine
Stromélysine-3	MMP-11	Collagène IV, caséine, laminine, fibronectine, gélatine
<i>Membrane type MMPs</i>		
MT1-MMP	MMP-14	Collagène I, II et III, CD44, caséine, élastine, fibronectine, gélatine, laminine-5, vitronectine, entactine, protéoglycanes
MT2-MMP	MMP-15	Fibronectine, laminine, entactine, perlecan, aggrecane
MT3-MMP	MMP-16	Collagène III, gélatine, caséine, fibronectine
MT4-MMP	MMP-17	ND
MT5-MMP	MMP-24	ND
MT6-MMP	MMP-25	ND
<i>Matrilysines</i>		
Matrilysine-1	MMP-7	Collagène IV et X, gélatine, aggrecane, décroïne, fibronectine, laminine, entactine, ténascine-C, ostéonectine, intégrine, élastine, caséine, plasminogène, transferrine
Matrilysine-2	MMP-26	Collagène IV, gélatine, fibronectine, fibrinogène
<i>MMPs non classées</i>		
Macrophage Elastase		Collagène IV, gélatine, caséine, élastine, laminine, fibronectine, vitronectine, entactine, fibrinogène, fibrine, plasminogène
-	MMP-19	Gélatine
Enamelysine	MMP-20	Amélogénine
CA-MMP	MMP-23	ND
XMMP (xenopus)	MMP-21	ND
CMMP (poulet)	MMP-27	ND
Epilysine	MMP-28	ND

Tableau 8. Classification, nom, localisation chromosomique et substrats spécifiques des MMPs (Visse et Nagase 2003). ND : non définie.

Malgré une certaine spécificité de substrats, les spectres protéolytiques des différentes MMPs sont assez larges permettant ainsi la dégradation de l'ensemble des composants de la MEC

(Visse et Nagase 2003). Il est important de préciser qu'à ce jour, tous les substrats des différentes MMPs ne sont pas encore connus et restent à être déterminés, c'est notamment le cas de la MMP-18.

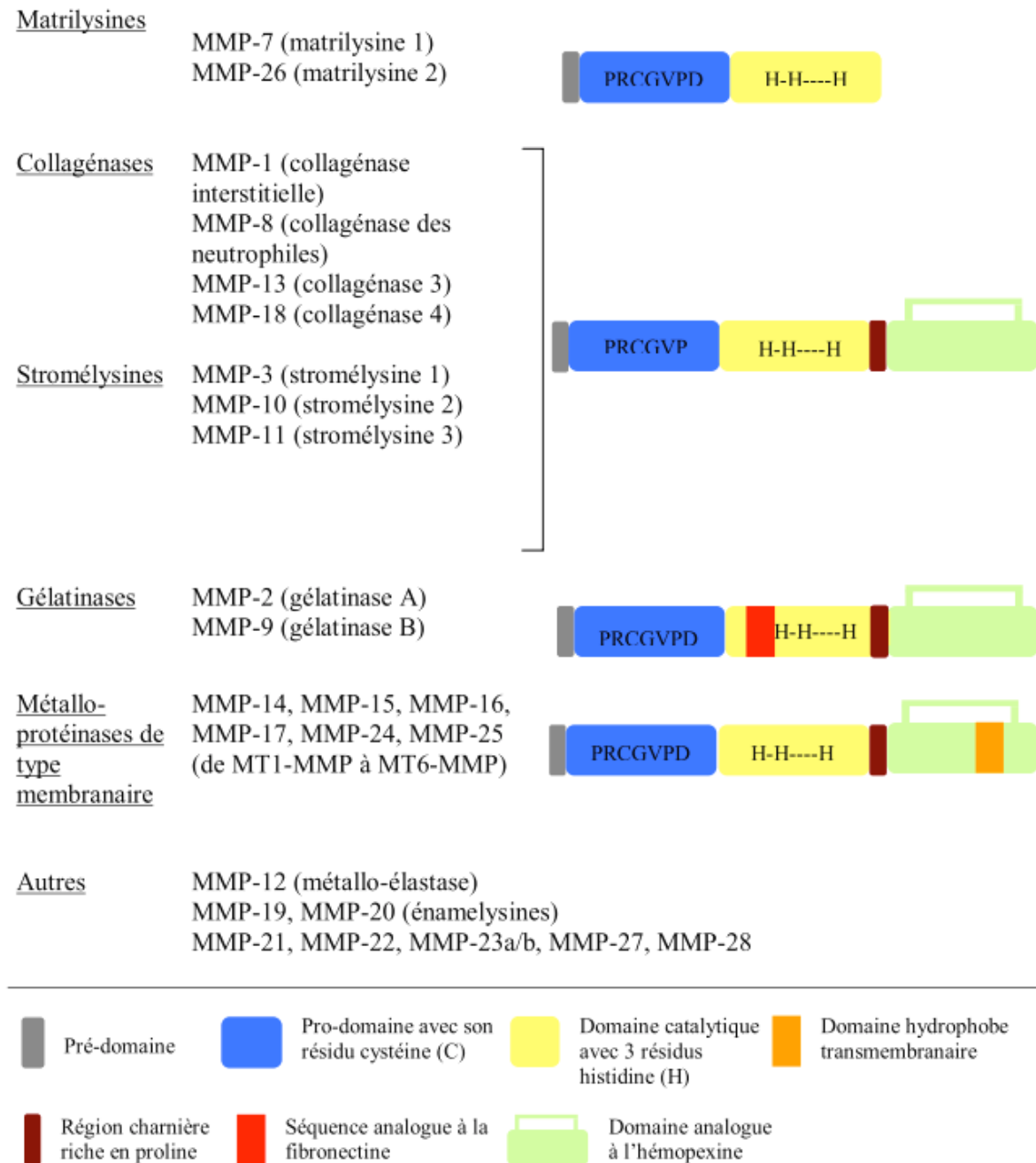


Figure 19. Structure des différentes familles des MMPs.

La structure primaire des MMPs (Figure 19) contient au minimum trois domaines: un pré-domaine, un pro-domaine et un domaine catalytique proprement dit. Le pré-domaine, au

niveau N-terminal, correspond à un peptide signal. Il est nécessaire pour orienter les MMPs vers la voie sécrétoire puis est rapidement dégradé. Le pro-domaine maintient l'activité enzymatique sous forme latente et est classiquement constitué d'une séquence peptidique comprenant un résidu cystéine qui interagit avec l'atome de zinc au niveau du domaine catalytique. Toutes les MMPs (hormis la MMP-7, la MMP-26 et la MMP-23) possèdent un domaine hémapexine relié au domaine catalytique par la région charnière (H ; hinge). Quand le domaine hémapexine est présent, il module les liaisons des MMPs à leurs inhibiteurs les TIMPs et à certains substrats et régule également leur activité protéolytique.

Les MMPs sont donc sécrétées sous forme latente ou zymogène. Pour être activées, le pro-domaine doit être éliminé ou modifié par clivage protéolytique, libérant ainsi l'atome de zinc du résidu cystéine et entraînant l'activation du domaine catalytique. La plupart des MMPs possèdent en plus un domaine riche en proline et un domaine C-terminal contenant une séquence homologue à l'hémapexine ou à la vitronectine. Ce dernier domaine intervient dans la reconnaissance du substrat des MMPs.

Des particularités de structure sont observées pour certaines MMPs. Les MMP-2 et MMP-9 possèdent, à l'intérieur de leur domaine catalytique, un domaine homologue à la fibronectine qui est responsable de la forte affinité de ces enzymes pour la gélatine. Les MT-MMPs possèdent un domaine additionnel qui leur permet l'ancrage à la membrane plasmique.

III.2.6.1.3. Régulation des MMPs

Pour éviter une protéolyse excessive qui causerait des dommages tissulaires, l'activité des MMPs est régulée de telle façon qu'un équilibre entre leur inhibition et leur activation soit permanent. Les MMPs sont régulées à différents niveaux, aussi bien au niveau de leur transcription, traduction, sécrétion, que de leur activation et inhibition ([Figure 20](#)) (Sternlicht et Werb 2001; Nagase *et al.* 2006).

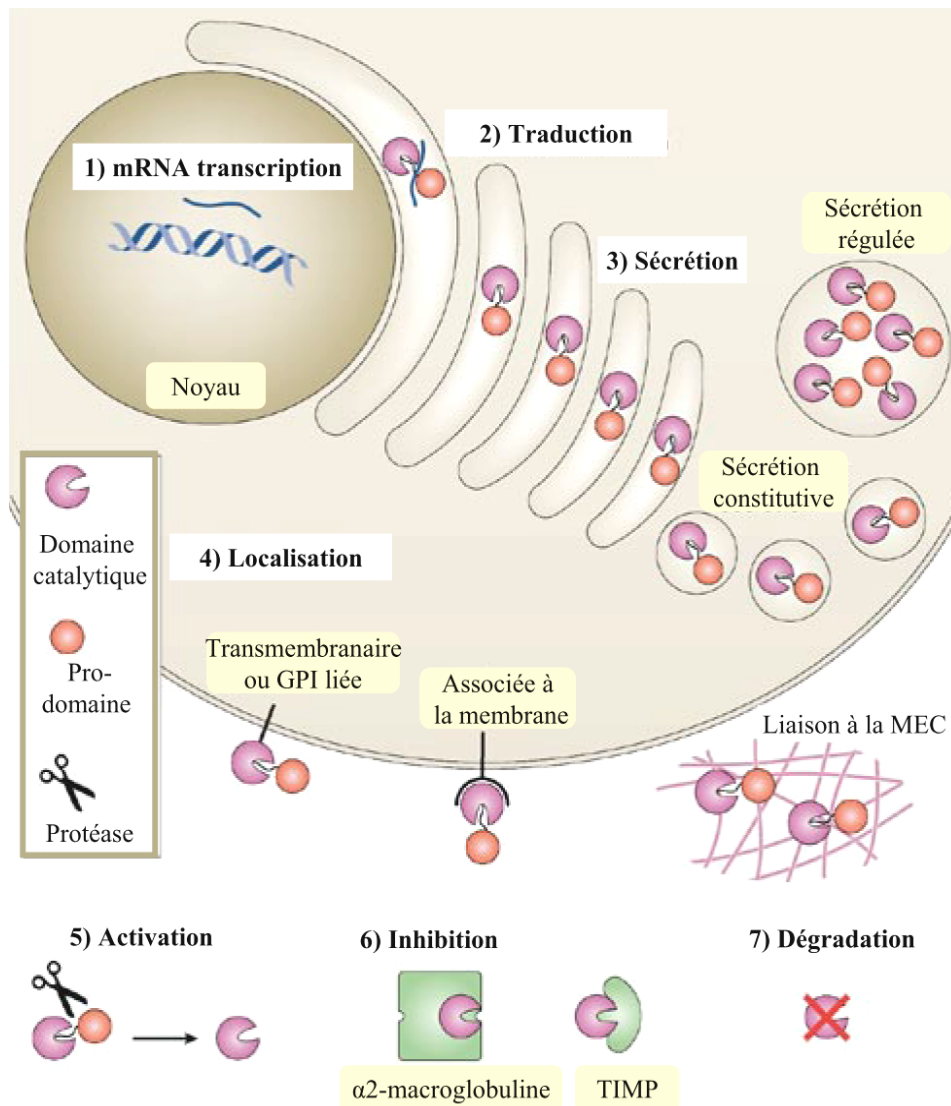


Figure 20. Les différents systèmes de régulation des MMPs (Page-McCaw *et al.* 2007).

Malgré la grande hétérogénéité des substrats des MMPs, les fonctions biologiques de ces enzymes sont, en grande partie, dictées par un profil d'expression différentielle. Ce sont des différences dans leur expression spatiale et temporelle au niveau tissulaire qui leur confèrent un rôle unique.

La plupart des MMPs sont finement régulées au niveau transcriptionnel. Elles sont exprimées à un faible niveau de base et ne voient leur expression varier que lorsque le remodelage tissulaire de la MEC est requis ou lors de processus pathologiques caractérisés par une forte désorganisation et/ou dégradation matricielle. Une forte conservation d'éléments régulateurs est observée dans les régions promotrices de divers gènes de MMPs. L'expression génique des MMPs est régulée par des facteurs inducteurs (stress mécanique, cytokines, etc) (Kataoka

et al. 1993; Shapiro 1998; Kjaer 2004) ou répresseurs (TGF- β , etc) (Vincenti *et al.* 1996) qui influencent de multiples voies de signalisation. Certains facteurs peuvent induire de façon coordonnée, à la fois l'augmentation de l'expression de certaines MMPs et la diminution de l'expression de certaines autres.

L'inducteur des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (EMMPRIN/CD147) est l'un des facteurs permettant la synthèse des MMPs (Huet *et al.* 2008). Cette protéine est capable d'induire la synthèse de plusieurs MMPs comme la MMP-1, la MMP-2, la MMP-3 ou encore la MMP-9, cependant elle n'a pas d'effet sur la synthèse de leurs inhibiteurs naturels (Toole 2003). Cette glycoprotéine membranaire qui fait partie de la superfamille des immunoglobulines joue un rôle dans de nombreux systèmes physiologiques et pathologiques. EMMPRIN a été identifiée tout d'abord à la surface des cellules tumorales et elle est connue pour son rôle dans les interactions épithélio-stromales de différents tissus. Cependant, son rôle principal qui a été largement démontré est son implication dans le remodelage matriciel via les MMPs. EMMPRIN est composé d'un domaine extracellulaire composé de 2 boucles immunoglobulines, d'un domaine transmembranaire et d'un petit domaine cytoplasmique. Le domaine extracellulaire peut être plus ou moins glycosylé. Cette glycosylation d'EMMPRIN détermine son rôle inducteur des MMPs puisque la protéine déglycosylée n'induit plus les MMPs et inhiberait même la protéine native (Li *et al.* 2001). La présence de l'acide glutamique chargé et de la leucine au sein de la séquence hydrophobe du domaine transmembranaire suggère que des interactions intramembranaires peuvent se produire avec d'autres protéines transmembranaires (Muramatsu et Miyauchi 2003) telles que les intégrines, les transporteurs de monocarboxyaltes (MCT) ou encore la cyclophiline-A. De plus, EMMPRIN peut s'associer à d'autres EMMPRIN des cellules avoisinantes en formant des homooligomères (Yoshida *et al.* 2000), ce qui suggère qu'elle peut être son propre récepteur. EMMPRIN a été montré également comme un acteur important de la différenciation cellulaire. Par exemple, EMMPRIN est exprimée dans le muscle au cours de la myogenèse où elle joue le rôle de régulateur de la différenciation myogénique (Attia *et al.* 2011). Ou encore, elle est impliquée dans la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes au cours de la cicatrisation de la cornée (Huet *et al.* 2008). Bien que son rôle dans la synthèse des MMPs ait été clairement défini, son mode d'action reste encore à élucider. L'existence et l'évolution des MMPs dans les tendinopathies conduit à émettre l'hypothèse d'un rôle possible d'EMMPRIN au cours de ces pathologies. Néanmoins, aucune étude n'a porté jusqu'à ce jour sur le rôle possible de cette protéine dans le tissu tendineux.

Des mécanismes post-transcriptionnels peuvent également réguler l'expression des MMPs. Ils correspondent le plus souvent à des processus de stabilisation ou de dégradation des transcrits (Sternlicht et Werb 2001). Par exemple, la demi-vie des ARNm codant pour la MMP-1 et la MMP-3 est augmentée par l'EGF, alors que celle des ARNm codant pour la MMP-13 est augmentée par le PDGF et diminuée par le TGF- β (Vincenti 2001).

Les différents mécanismes d'activation des MMPs peuvent également participer à leur régulation. La plasmine issue de la dégradation du plasminogène est l'un des activateurs physiologiques majeur des MMPs et de ce fait les activateurs de sa production tels que les activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA) ou de type tissulaire (tPA) le sont également (Carmeliet *et al.* 1997). Les MMPs elles-mêmes peuvent en activer d'autres (Figure 21). De plus, d'autres protéases telles que la cathepsine-G, la chymase, l'élastase, la thrombine et les espèces réactives de l'oxygène sont également capables d'activer les MMPs (Dollery et Libby 2006).

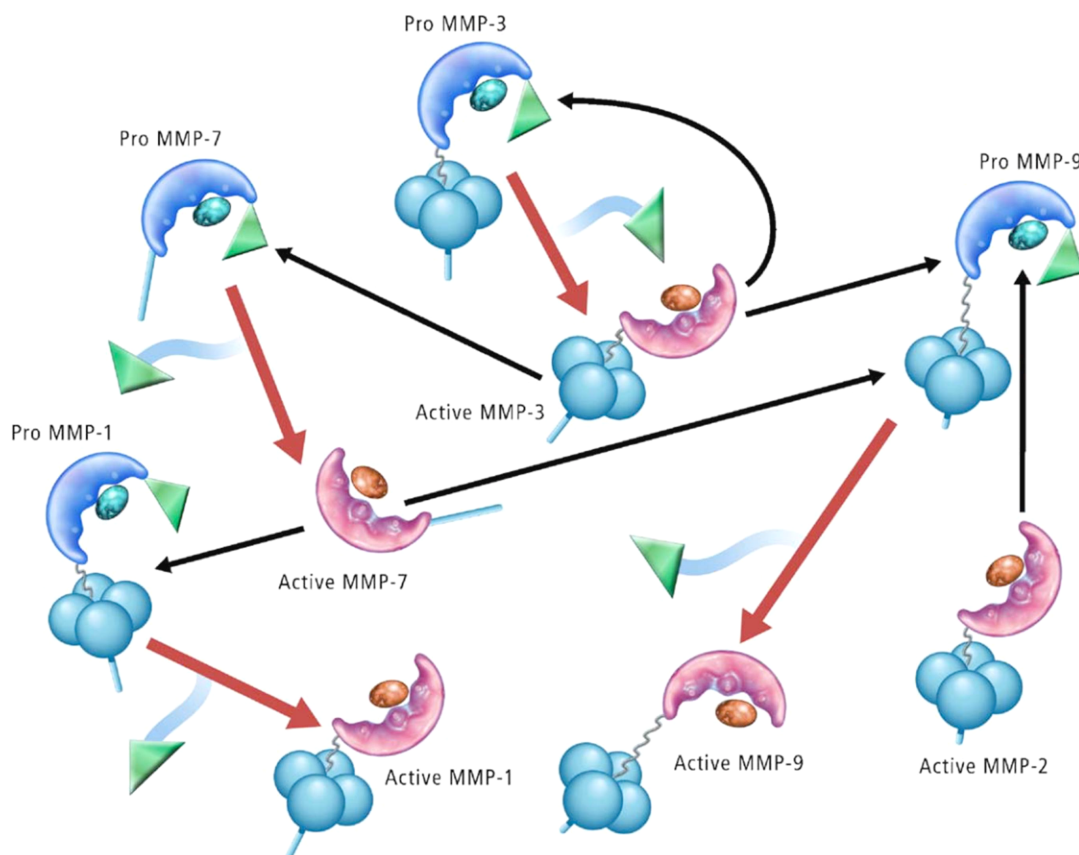


Figure 21. Le système d'activation de certaines MMPs par les MMPs elles-mêmes (Dollery et Libby 2006).

Un autre mécanisme d'activation a été décrit au niveau de la surface cellulaire. Il s'agit d'un mécanisme d'activation de la MMP-2 unique et quelque peu différent de ce qui vient d'être cité (Figure 22).

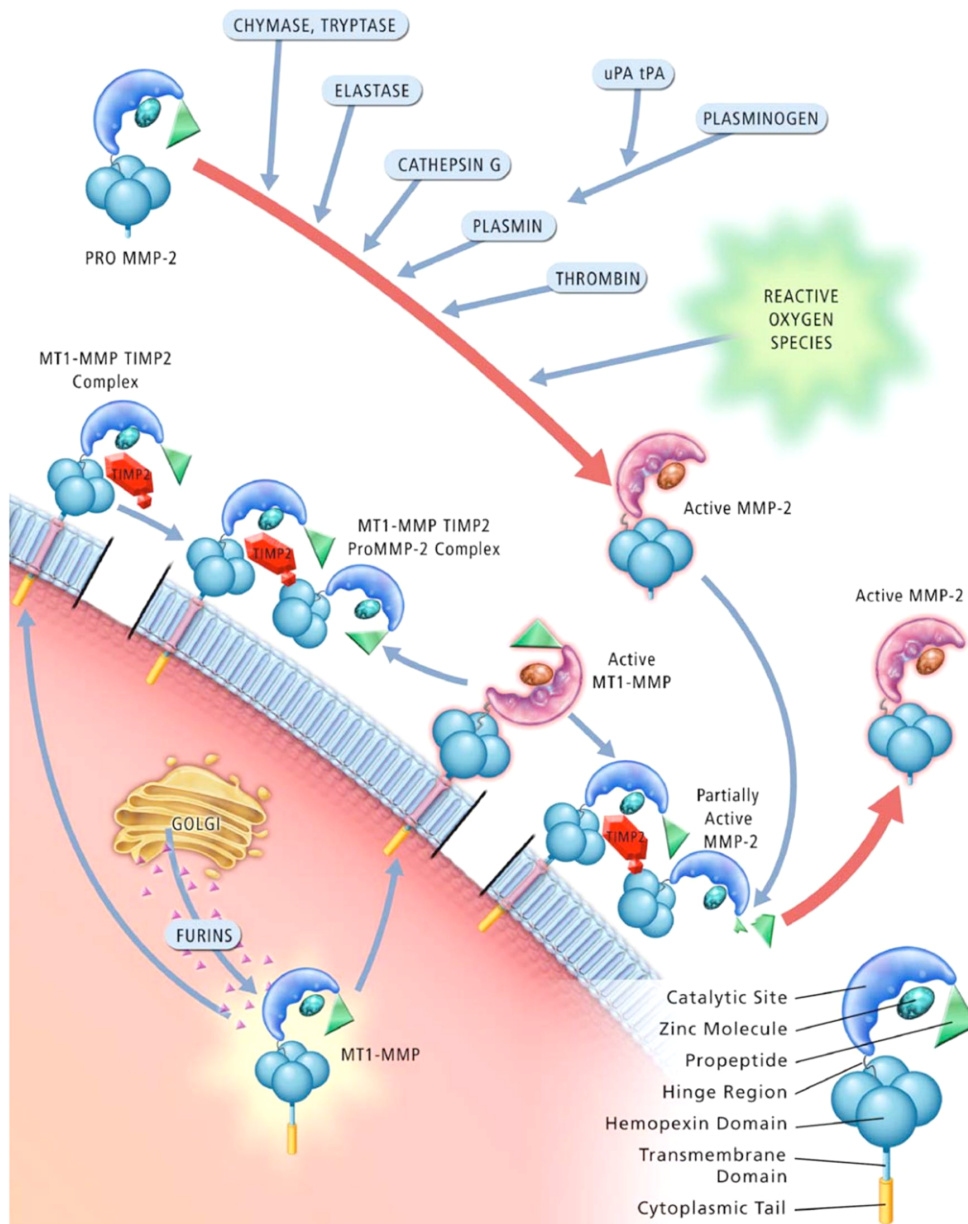


Figure 22. Système d'activation de la MMP-2 par l'intermédiaire de MT1-MMP et de TIMP-2 (Dollery et Libby 2006).

Tout d'abord, la MT1-MMP est activée par les furines au niveau de l'appareil de Golgi puis transloquée par la suite vers la membrane cellulaire où elle est inhibée par TIMP-2 (tissue

inhibitor of matrix metalloproteinases-2) en formant un complexe. La proMMP-2 se lie ensuite au complexe MT1-MMP/TIMP-2 via son domaine hémopexine. TIMP-2 agit ici comme un régulateur de l'activation (nous parlerons des TIMPs un peu plus loin dans ce manuscrit). La formation de ce complexe permet à une deuxième MT1-MMP de couper le peptide N-terminal de la proMMP-2 et ainsi de l'activer (Strongin *et al.* 1995; Butler *et al.* 1998). L'optimisation de l'activation de la MMP-2 peut dépendre de l'interaction entre les 3 éléments du complexe. Ici, la MT1-MMP joue à la fois le rôle de récepteur et d'activateur. Il faut noter que les autres MT-MMPs sont également capables d'activer la MMP-2 (Chakraborti *et al.* 2003).

Une fois leur prodomaine clivé, les MMPs actives peuvent être très rapidement inactivées par les TIMPs qui vont se fixer directement au niveau du domaine catalytique empêchant l'accès au substrat. Dans la partie suivante, nous nous intéresserons aux différents inhibiteurs endogènes de ces enzymes.

III.2.6.2. Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases matricielles (TIMPs)

L'activité des MMPs est inhibée spécifiquement par les TIMPs (Figure 23). Quatre TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, et TIMP-4) ont été identifiés chez les vertébrés, et leur expression est régulée pendant le développement et le remodelage tissulaire. Ce sont de molécules de petite taille (20 à 29 kDa), qui se lient aux MMPs de manière stœchiométrique non covalente et entraînent une inhibition réversible. Elles sont sécrétées dans la MEC mais peuvent également se retrouver à la surface cellulaire associées à des protéines membranaires comme les protéoglycanes à héparanes sulfates (HSPGs) (Yu *et al.* 2000) (Figure 23). Tandis que l'expression de TIMP-2 est constitutive, celle des TIMP-1, 3 et 4 est inductible. Les TIMPs possèdent deux domaines structuraux distincts N- et C-terminaux. Le domaine N-terminal confère l'activité inhibitrice des TIMPs en bloquant l'accès à la poche contenant l'atome de zinc (Willenbrock et Murphy 1994; Nagase *et al.* 2006) et le domaine C-terminal se lie à certaines MMPs (Bode *et al.* 1999). Les TIMPs sont exprimés par de nombreux types cellulaires incluant, les cellules épithéliales et endothéliales, les ostéoblastes, les chondroblastes, les cellules musculaires ainsi que les fibroblastes comme les ténocytes. Le TIMP-1 peut se complexer à la quasi-totalité des MMPs actives sauf la MT1-MMP, cependant il inhibe préférentiellement la MMP-9, ainsi que les MMP-1 et -3, alors que TIMP-2 inhibe préférentiellement la MMP-2 (Goldberg *et al.* 1989). TIMP-3 présente des propriétés inhibitrices préférentielles pour les MMP-2, -9, -1 et -3. Enfin, TIMP-4 est également capable

d'inhiber la MMP-2. Les TIMPs ont aussi la capacité d'inhiber d'autres protéases telles que les ADAMs (A Disintegrine And Metalloprotease domain) (Lambert *et al.* 2004).

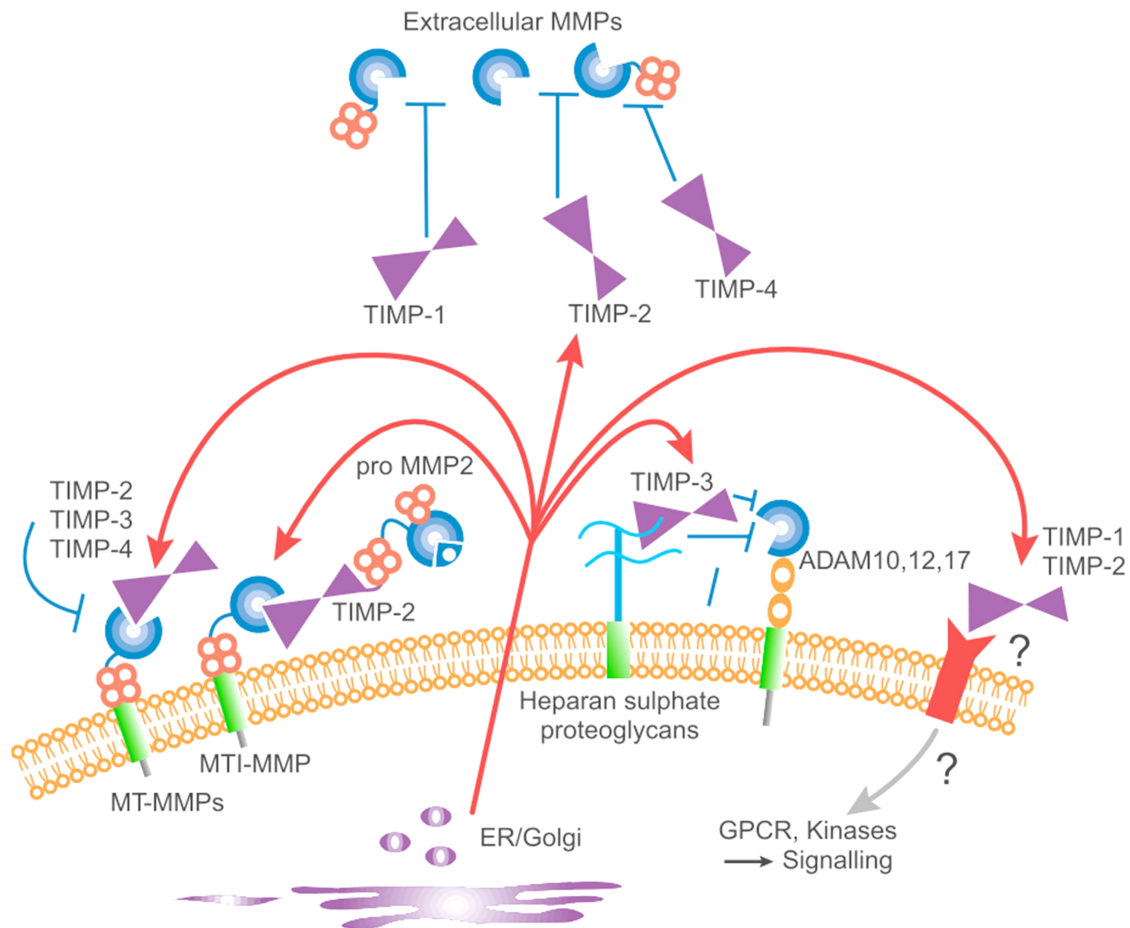


Figure 23. Expression et action des TIMPs au sein de l'environnement péricellulaire (Baker *et al.* 2002).

Le TIMP-1, découvert en premier, est une glycoprotéine de 28 kDa, constituée de 207 acides aminés dont les 23 premiers sont clivés lors de la sécrétion dans le MEC. C'est un inhibiteur très stable notamment grâce à sa conformation tridimensionnelle et aux 12 résidus cystéine formant 6 ponts disulfure et 6 boucles.

Le TIMP-2 est une petite protéine de 21 kDa. Il permet la régulation de l'activité de la proMMP-2 selon son niveau d'expression. En effet, une forte concentration de TIMP-2 inhibe l'activation de la proMMP-2 alors qu'une faible concentration l'active. Le complexe proMMP-2/TIMP-2 stabilise la proMMP-2 en prévenant son auto-activation. Le TIMP-2 est également capable d'inhiber d'autres MMPs.

Le TIMP-3 est une protéine non glycosylée de 24 kDa. Elle a d'abord été purifiée à partir de fibroblastes de poulet et identifiée comme le ChIMP-3 (Chicken Inhibitor of MMP) (Pavloff *et al.* 1992). L'homologie de structure de cette protéine avec le TIMP-1 et le TIMP-2 est relativement faible. Le TIMP-3 est le seul membre de la famille des TIMPs qu'on trouve exclusivement dans la MEC. Il a été montré comme favorisant le détachement cellulaire et les changements morphologiques associés à la transformation oncogénique des fibroblastes embryonnaires de poulet (Yang et Hawkes 1992).

Le TIMP-4 est une petite protéine de 22 kDa. Il présente une homologie de structure avec le TIMP-2 d'environ 70 %. Le profil d'expression du TIMP-4 dans les tissus adultes humains montre un fort taux de transcrits dans le cœur et le cerveau mais un niveau faible voire non détectable dans les autres organes. Comme le TIMP-2, le TIMP-4 peut se lier à la proMMP-2 et empêcher son activation via la MT1-MMP (Hernandez-Barrantes *et al.* 2001).

Les TIMPs peuvent également jouer un rôle dans les processus biologiques n'impliquant pas leur activité anti-protéasique tels que la croissance et la survie cellulaire. Ainsi, la régulation des MMPs dépend de l'équilibre entre leur inhibition et leur activation. C'est cet équilibre qui contrôle le renouvellement de la MEC et le remodelage tissulaire durant les processus de développement normal ou pathologique.

III.2.6.3. Expression physiologique et pathologique des MMPs et des TIMPs au cours des tendinopathies

Au cours d'une tendinopathie, une évolution des contenus en PGs et en collagènes peut être observée. En effet, les tendons fortement sollicités, tels que le tSE de la coiffe des rotateurs de l'épaule, montrent un niveau important de remodelage matriciel (Riley *et al.* 2002). On peut penser que ce remodelage est principalement induit par les MMPs actives dans la MEC. La preuve de leur importance en matière de réparation tendineuse vient de l'observation des effets des inhibiteurs à large spectre des MMPs. En effet, ces inhibiteurs utilisés dans les essais cliniques, provoquent des troubles musculo-squelettiques incluant la tendinopathie (Drummond *et al.* 1999).

Si les niveaux de transcrits des TIMPs sont le reflet de leur teneur en protéines, l'activité enzymatique des MMPs au sein des tendons de la coiffe des rotateurs de l'épaule en réparation, peut être le résultat d'une combinaison de l'augmentation du niveau d'expression des MMPs et de la diminution des TIMPs. Choi *et al.* ont été les premiers à rapporter l'évolution d'expression des MMPs et des TIMPs au cours de la pathologie du supra-épineux.

Ils ont montré que l'activation de la MMP-2 au cours du processus de réparation pouvait contribuer au remodelage matriciel observé (Choi *et al.* 2002). L'expression plus importante de la MMP-1, MMP-9 et MMP-13 lors d'une rupture totale du tSE comparée à une rupture partielle, laisse supposer que la dégénérescence et l'inflammation sont positivement corrélées à la taille de la rupture (Shindle *et al.* 2011). De plus, le niveau des transcrits de TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4 diminue dans le tSE lésé (Birkedal-Hansen *et al.* 1993). Un niveau élevé de TIMP-3 est généralement associé à des cellules en apoptose (Baker *et al.* 2002). Toutefois, compte tenu de l'augmentation du nombre de cellules en apoptose au cours de la tendinopathie, la diminution du niveau des transcrits de TIMP-3 suggère que ce dernier n'est pas impliqué dans le processus apoptotique (Lo *et al.* 2004). L'induction de TIMP-1, quant à lui, permet de contrôler et d'inhiber la dégradation excessive de la MEC par la MMP-2 (Choi *et al.* 2002). Le niveau d'expression des transcrits de la MMP-3 diminue au cours de la tendinopathie (Lo *et al.* 2004). Cette diminution pourrait être responsable de l'augmentation des niveaux de transcrits des PGs (décorine, biglycane, versicane et aggrecane) observée au sein du tSE (Riley *et al.* 1994). L'expression de la MMP-13 augmente au niveau transcriptionnel, protéique ainsi qu'au niveau de son activité enzymatique. Elle dégrade le collagène de type I aussi efficacement que la MMP-1 ou la MMP-8, cependant sa capacité à dégrader la gélatine est 40 fois supérieure à celle des autres MMPs au cours de la tendinopathie (Vincenti 2001). L'inhibition de la MMP-13 avec la doxycycline, accélère la régénération post-opératoire du tSE. En effet, cette inhibition améliore l'organisation du collagène et les propriétés biomécaniques et histologiques dans un modèle de rat (Bedi *et al.* 2010).

Une étude sur les tendons d'Achille a montré des différences de cinétique d'expression des MMPs entre les tendons peu lésés et les tendons déchirés (Jones *et al.* 2006). En effet, dans les tendons déchirés, le niveau d'expression de MMP-1, MMP-9, MMP-19, MMP-25 et TIMP-1 est élevé par rapport au contrôle, alors que le niveau d'expression de MMP-3, MMP-7, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4 est faible. Dans les tendons peu lésés, le niveau d'expression de MMP-3, MMP-10 et TIMP-3 est faible alors que le niveau d'expression de MMP-23 est élevé. Le rôle et la fonction de la MMP-23 dans le tendon sont encore mal connus bien qu'elle soit associée à des changements phénotypiques cellulaires comme la chondrogenèse (Clancy *et al.* 2003).

La MT1-MMP est impliquée dans le développement embryonnaire du tissu tendineux (Apte *et al.* 1997). En effet, selon une étude récente chez le rat, cette enzyme membranaire est impliquée dans la formation des sites d'insertion ostéo-tendineux au cours de l'embryogenèse

et pourrait donc favoriser la régénération tendineuse (Gulotta *et al.* 2010). La surexpression de MT1-MMP induit la présence de plus de fibrocartilage au sein du tendon et par conséquent une plus grande résistance biomécanique aux contraintes (Gulotta *et al.* 2010). Outre sa capacité à participer à l'activation de la MMP-2 à la surface cellulaire, le rôle exact de cette enzyme dans le tendon est encore mal connu. La MT1-MMP pourrait jouer un rôle dans la dégradation du tissu cicatriciel lors de la régénération tendineuse et contribuer à la restauration d'une matrice semblable au tissu non lésé.

Pour conclure cette section sur la physiologie des tendons, on peut penser que la fonction tendineuse est déterminée par le contenu de sa MEC qui est lui-même déterminé par l'équilibre entre les mécanismes de synthèse et de dégradation de ses composants. Différentes MMPs ont la capacité de dégrader ou de participer au renouvellement des composants de la MEC tendineuse. Ces enzymes sont soumises à des mécanismes de régulation complexes avant d'être transcrites puis libérées sous forme de pro-enzymes puis activées. Les contraintes mécaniques subies par le tendon peuvent moduler ces processus de maturation et d'activation. Ces enzymes sont activées et cette activation peut être contrebalancée par la présence de leurs inhibiteurs naturels, les TIMPs, qui possèdent à leur tour des mécanismes de régulation complexes. Cependant, leur contribution respective dans la régulation de l'homéostasie et la réparation tendineuse semble être importante et reste encore largement à préciser.

III.2.7. Les facteurs de croissance

III.2.7.1. Généralités

Les facteurs de croissance ont été découverts pour la première fois en 1976 principalement pour leur rôle stimulateur de la croissance cellulaire (Gospodarowicz et Moran 1976). En outre, les activités biologiques de ces molécules concernent également la synthèse matricielle, la différenciation et la migration cellulaire. De plus, les facteurs de croissance sont impliqués dans certains processus physiologiques tels que l'angiogenèse et l'hématopoïèse mais aussi dans des processus pathologiques tels que les tendinopathies.

La réparation tendineuse est un processus très complexe et finement régulé par une grande variété de molécules. Les facteurs de croissance représentent l'une des plus importantes familles de molécules impliquées dans ce processus et un grand nombre d'études ont été conduites dans un effort d'élucider leurs nombreuses fonctions (Kjaer 2004; Mehta et Mass 2005; Kovacevic et Rodeo 2008). Il a été montré que certains facteurs de croissance, comme le FGF-2, le CTGF, l'IGF-1, le PDGF, le TGF β -1, peuvent avoir des rôles spécifiques au cours des tendinopathies. Ces facteurs présentent des profils d'expressions temporelles

uniques corrélés au stade de la pathologie ou de la réparation tendineuse (Thomopoulos *et al.* 2003; Wurgler-Hauri *et al.* 2007). Considérant le rôle important des facteurs de croissance dans la modulation et la réparation tissulaire, la compréhension et l'évaluation de leurs rôles, de leur localisation et leur cinétique d'expression dans le processus de réparation sont importantes. Cependant, l'utilisation de ces cytokines comme moyen thérapeutique dans les tendinopathies, reste pour le moment, largement expérimentale.

III.2.7.2. Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)

Il a été clairement démontré que le FGF est impliqué dans la cicatrisation et la réparation de nombreux tissus y compris le tendon. Il a été montré que l'administration de FGF-2 avait un effet positif sur la régénération tendineuse. Plus précisément, la supplémentation de FGF-2 *in vitro* stimule la prolifération des ténocytes du tendon rotulien de rat (Chan *et al.* 1997). De même, il stimule la prolifération des ténocytes du supra-épineux humain en culture tout en inhibant de manière dose dépendante la synthèse du collagène (Takahasih *et al.* 2002). Par conséquent, seule l'utilisation précoce du FGF-2 pourrait avoir des effets bénéfiques sur la régénération tendineuse avant que la synthèse de collagène I ne se déclenche, en particulier dans le tSE (Kobayashi *et al.* 2006). Le FGF-2 est également exprimé dans les tendons sains suggérant qu'il peut avoir d'autres rôles. Il permet d'induire la synthèse de la connexine-43, une protéine membranaire qui joue un rôle dans la communication entre les ténocytes (Doble et Kardami 1995) en transformant et transmettant des informations mécaniques en réponses biochimiques conduisant à une réorganisation de la MEC.

Le FGF-2 en association avec le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), permet la synthèse du collagène de type I (Bishop *et al.* 1998). Cependant, au niveau du tissu cartilagineux, le FGF-2 permet d'inhiber l'effet d'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) et du TGF β -1 (Transforming Growth Factor beta-1) sur la synthèse du collagène de type II et l'induction de la décorine (Sonal 2001).

III.2.7.3. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)

PDGF présente plusieurs rôles au sein du tendon. En effet, il a été montré que ce facteur de croissance stimule la synthèse du collagène de type I, la prolifération cellulaire et induit également la sécrétion du TGF β -1 (Spindler *et al.* 2003; Wang *et al.* 2004). En outre, l'injection de PDGF dans les ligaments collatéraux de lapins en réparation augmente la synthèse des composants matriciels et ainsi améliore leur comportement biomécanique (Woo *et al.* 1998).

III.2.7.4. Bone Morphogenic Protein (BMP)

Plusieurs études ont montré que BMP-12, connu également sous le nom de Growth Differentiation Factor-7 (GDF-7) et appartenant à la superfamille des TGF β , induit la formation embryonnaire des tendons et des ligaments (Wolfman *et al.* 1997). Il joue également un rôle essentiel dans les phases précoces de la régénération tendineuse en stimulant la synthèse des composants de la MEC et en augmentant la prolifération des ténocytes (Fu *et al.* 2003).

On connaît beaucoup moins BMP-13 (GDF-6) et BMP-14 (GDF-5/Cartilage-derived morphogenetic protein-1 (CDMP-1)) ainsi que leurs effets et leurs rôles au sein du tissu tendineux. Cependant, ils font également partie de la même superfamille que BMP-12 et on pense qu'ils agissent de la même manière. En effet, il a été montré que BMP-14 joue un rôle dans la réparation des tendons de la coiffe des rotateurs de l'épaule, principalement au niveau de la zone de rupture (Nakase *et al.* 2002). Il a été ainsi conclu que lors d'une tendinopathie, BMP-14 est synthétisé afin de participer à la modulation de la réparation.

III.2.7.5. Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)

COMP est un marqueur de la réparation du tissu cartilagineux. Cependant, il a été montré que cette protéine matricielle est un médiateur de la croissance du tendon. En effet, l'expression de COMP est plus importante dans les tendons de jeunes poulains que dans les tendons de chevaux adultes (Smith *et al.* 2002). Une étude plus récente a montré que COMP augmente avec l'entraînement et que son expression est importante pour l'intégrité et l'organisation structurale du tendon en se liant aux fibres de collagène (Sodersten *et al.* 2005). Les cultures primaires de ténocytes humains ont montré que COMP peut être inductible par le TGF β -1 et que ses effets sont inhibés par l'IL-1 β (Recklies *et al.* 1998). COMP est également fortement exprimée lors de l'inflammation du tissu synovial. Il est important qu'un certain niveau de COMP soit exprimé, toutefois sa surexpression pourrait nuire aux structures cellulaires, entraînant ainsi des blessures.

III.2.7.6. Transforming Growth Factor β (TGF β)

Chez les mammifères, il existe 3 isoformes connus de TGF β (TGF β -1, TGF β -2 et TGF β -3). Ils ont pour rôle de moduler l'expression de la plupart des protéines de la MEC ainsi qu'induire l'activation génomique et la formation protéique du collagène via des facteurs de

transcription (Chen *et al.* 1999; Arai *et al.* 2002; Lindahl *et al.* 2002). Ils sont donc essentiels dans la formation et le maintien de la MEC. Il a été montré que le TGF β pouvait être induit par le stress mécanique dans plusieurs types cellulaires et tissulaires comme les vaisseaux sanguins, l'os, le muscle et le tendon (Skutek *et al.* 2001). L'augmentation de synthèse du collagène de type I due à ces contraintes mécaniques, peut être abolie en inhibant l'activité du TGF β (Lindahl *et al.* 2002). Dans un modèle humain *in vivo* et en utilisant la microdialyse dans le tendon d'Achille, il a été constaté que le TGF β -1 augmente après 1 h d'entraînement (Heinemeier *et al.* 2003; Heinemeier *et al.* 2003). Cette augmentation a été attribuée à une libération tissulaire locale de ce facteur de croissance dans le tendon et à l'augmentation de sa concentration dans le plasma. Néanmoins, ces données sont compatibles avec le rôle du TGF β comme régulateur de la synthèse des protéines matricielles comme le collagène de type I ou encore les protéoglycanes (Robbins *et al.* 1997).

Bien que le TGF β soit connu depuis longtemps comme un facteur de croissance important dans la formation et le maintien de la MEC, il possède également d'autres rôles. En effet, il permet d'activer l'IGF-1 ainsi que les fibroblastes, de stimuler l'angiogenèse et d'améliorer l'adhérence cellulaire (Klein *et al.* 2002; Hou *et al.* 2009). Il joue également un rôle important dans la réparation et la régénération tissulaire. Suite à la rupture totale du tendon patellaire chez le lapin, l'injection du TGF β améliore significativement les propriétés mécaniques tissulaires comme la force développée, le modulus et la résistance à la rupture (Anaguchi *et al.* 2005). La caractérisation de l'expression du TGF β dans le tendon supra-épineux au cours de la tendinopathie a montré qu'il est localisé au niveau des zones lésées, des zones d'insertion et au niveau des surfaces articulaires (Galatz *et al.* 2006). De plus, le niveau d'expression maximal du TGF β -1 au cours des tendinopathies coïncide avec les phases précoces de la régénération (Wurgler-Hauri *et al.* 2007).

III.2.7.7. Connective Tissue Growth Factor (CTGF)

Le rôle du CTGF, indépendamment des autres facteurs de croissance, n'a été investigué que récemment. Bien qu'il soit connu que le TGF β puisse induire la synthèse du CTGF, il a été prouvé que le niveau d'expression de ce facteur de croissance dépend plutôt de la contrainte mécanique subie par le tissu et non du niveau d'expression du TGF β . Le CTGF permet d'augmenter la prolifération et la différenciation des cellules du cartilage (Fukunaga *et al.* 2003) et il joue aussi un rôle majeur dans la production du collagène de type I et d'autres protéines de la MEC dans les fibroblastes lors de contraintes mécaniques (Schild et Trueb

2002). Par conséquent, le CTGF représente un facteur important dans l'organisation, le maintien et la régénération du tissu conjonctif.

III.2.7.8. Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)

L'IGF tient son nom de son rôle hypoglycémique. Ses effets biologiques ont été démontrés dans de nombreux types cellulaires comme le cartilage, l'os, le muscle ainsi que le tendon (Trippel *et al.* 1993; Scott *et al.* 2007). Il a été montré que dans le tendon supra-épineux de rat, le stress mécanique augmente d'une façon significative l'expression d'IGF-1 (Scott *et al.* 2007). Ce facteur de croissance est connu pour stimuler la synthèse du collagène dans le tissu tendineux d'une manière dose dépendante (Abrahamsson et Lohmander 1996; Hansen *et al.* 2012). Par ailleurs, l'administration locale d'IGF-1 augmente la synthèse des protéines matricielles selon le type de tendon et selon la région tendineuse (Abrahamsson et Lohmander 1996). L'ensemble de ces données indique que l'IGF-1 peut être directement ou indirectement impliqué dans la synthèse et le remodelage matriciel du tissu tendineux. Au cours de la régénération tendineuse, l'IGF-1 semble également stimuler la prolifération et la migration cellulaire au cours des phases précoces de la tendinopathie (Dahlgren *et al.* 2006). Ces rôles confèrent à l'IGF-1 la capacité d'accélérer la régénération et la réparation tendineuses (Abrahamsson et Lohmander 1996; Kurtz *et al.* 1999; Mehta et Mass 2005).

III.2.7.9. InterLeukin-1 et Interleukin-6 (IL-1 et IL-6)

IL-6 est une cytokine connue pour avoir à la fois des propriétés anti- et pro-inflammatoires, alors que l'IL-1 est uniquement pro-inflammatoire. L'IL-6 est synthétisée, entre autres, par les fibroblastes (Van Snick 1990). Il a été suggéré qu'IL-6 pouvait être impliquée dans le métabolisme du collagène au sein du tissu osseux (Greenfield *et al.* 1999). Dans le tissu tendineux humain, sa sécrétion est significativement augmentée suite à un stress mécanique dans des ténoocytes en culture et demeure élevée pendant les heures suivantes (Skutek *et al.* 2001). De plus, en utilisant la technique de microdialyse, il a été démontré que la concentration d'IL-6 dans la région péri-tendineuse du tendon d'Achille est 100 fois plus importante que dans le plasma suite à un exercice physique prolongé (Langberg *et al.* 2002). Il a été montré qu'IL-6 induisait la synthèse du collagène et des GAGs dans les fibroblastes de peau (Duncan et Berman 1991). Elle permet également la libération du TGF- β , d'IL-2 et d'IL-1 dans l'environnement péri-cellulaire qui améliorent l'adhésion, la prolifération cellulaires ainsi que la réparation tissulaire (Wojciak et Crossan 1994).

En ce qui concerne IL-1, son rôle pro-inflammatoire est souligné par sa capacité à induire l'expression des MMPs dans les fibroblastes humains. Comme l'IL-6, l'expression d'IL-1 est augmentée d'une façon significative dans le tendon suite aux contraintes mécaniques (Archambault *et al.* 2001; Sakai *et al.* 2001). Ces contraintes induisent la libération de molécules d'ATP qui stimulent l'expression d'IL-1, d'IL-6, de MMP-1, de MMP-3 et de COX-2 par les ténocytes (Tsuzaki *et al.* 2003). De plus, cette induction favorise la dégradation tissulaire contribuant au remodelage matriciel (Tsuzaki *et al.* 2003).

III.2.7.10. Le facteur de croissance Heparin Affin Regulatory Peptide (HARP)

HARP est un facteur de croissance qui a été décrit au début des années 90 comme étant une cytokine possédant une forte affinité pour l'héparine. Selon la source d'extraction et ses propriétés biologiques, les chercheurs lui ont attribué des noms différents : Heparin-Binding Growth Factor-8 (HBGF-8) (Milner *et al.* 1989), Heparin-Binding Neurotrophic Factor (HBNF) (Kovesdi *et al.* 1990), Heparin-Binding Brain Mitogen (HBBM) (Huber *et al.* 1990), Osteoclast Specific Factor-1 (OSF-1) (Tezuka *et al.* 1990), Pleiotrophine (PTN) (Li *et al.* 1990; Wellstein *et al.* 1992) et Heparin Affin Regulatory Peptide (Courty *et al.* 1991). Sa découverte au niveau des cerveaux de rats et de bœufs a laissé penser que son rôle biologique était principalement lié au système nerveux (Merenmies et Rauvala 1990). Cependant, différents travaux ont démontré la présence d'HARP dans d'autres tissus comme le cœur (Hampton *et al.* 1992), l'utérus (Milner *et al.* 1989), le cartilage (Neame *et al.* 1993), les os (Gieffers *et al.* 1993) ou encore les muscles (Caruelle *et al.* 2004). Jusqu'à présent, aucune étude n'a été réalisée sur la présence et sur le rôle de HARP dans le tissu tendineux adulte. Pour cette raison, cette partie évoquera uniquement les rôles de cette cytokine d'une façon générale dans tous les types cellulaires.

III.2.7.10.1. Structure de la protéine

La structure primaire d'HARP est composée de 168 acides aminés contenant une séquence N-terminal très hydrophobe qui correspond à son peptide signal (Kretschmer *et al.* 1993). Il est composé de feuilletts β portant des motifs ThromboSpondin type I Repeat (TSR-1) (Figure 24). Ces motifs ont pour rôle la fixation d'HARP à la matrice et à la surface cellulaire et régulent la migration de nombreux types cellulaires (Raulo *et al.* 2006). Les feuilletts β présentent des ponts disulfures qui confèrent à la protéine une certaine rigidité et stabilité conformationnelle. La réduction de ces ponts diminue l'affinité des glycosaminoglycanes

pour HARP, plus précisément des héparines et des héparanes sulfates, indiquant ainsi l'importance de sa structure native pour interagir avec ces derniers (Kilpelainen *et al.* 2000).

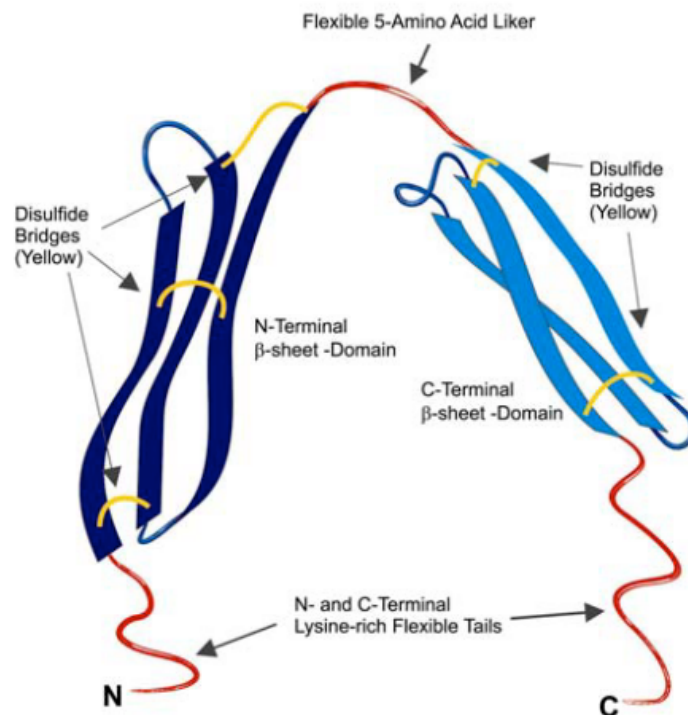


Figure 24. Représentation schématique de la structure secondaire de HARP (Raulo *et al.* 2006). Les feuillets beta avec les motifs TSR-1 sont en bleu, les régions N- et C- terminaux ainsi que les acides aminés de liaison sont en rouge et les ponts disulfures sont en jaune.

III.2.7.10.2. Rôles biologiques de la protéine HARP

HARP a été décrite ayant diverses activités biologiques dans des conditions physiologiques ou pathologiques : angiogenèse, différenciation, prolifération et migration cellulaires. Son effet sur la prolifération a été décrit *in vitro* dans de nombreux types cellulaires tels que les cellules endothéliales (Courty *et al.* 1991; Laaroubi *et al.* 1994), épithéliales (Delbe *et al.* 1995), gliales (Rumsby *et al.* 1999), les hépatocytes (Sato *et al.* 1999) et les fibroblastes (Milner *et al.* 1989).

HARP est capable de stimuler la croissance des cellules cérébrales de rat *in vitro*. Elle peut également stimuler la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales d'un carcinome pulmonaire (Jager *et al.* 1997). Il a été montré par la suite que la prolifération des chondrocytes est aussi inhibée par HARP (Tapp *et al.* 1999).

L'activité de différenciation d'HARP a été principalement étudiée *in vitro* sur des cellules neuronales. En effet, HARP induit la croissance neuritique de types cellulaires variés telles que les cellules neuronales embryonnaires (Rauvala 1989), les neurones corticaux périnataux (Hampton *et al.* 1992) et les cellules de neuroblastome (Kuo *et al.* 1990). HARP est connue également pour être impliquée dans la différenciation des myoblastes et dans la formation de la synapse neuromusculaire au cours du développement (Peng *et al.* 1995). De plus, HARP a été décrite comme jouant un rôle clé de régulateur de la différenciation des chondrocytes au cours du développement. En effet, une étude sur le poulet a montré que l'apparition d'HARP dans les phases précoces du développement de l'embryon est concomitante avec le processus de chondrogenèse (Dreyfus *et al.* 1998).

Mise à part ses rôles sur la prolifération et la différenciation de plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales, HARP a été décrite comme ayant également une activité angiogénique. Cette cytokine est capable de stimuler la formation de néo-capillaires à partir des cellules endothéliales dans plusieurs modèles *in vitro* (Souttou *et al.* 2001). *In vivo*, sa surexpression est impliquée dans la néo-angiogenèse tumorale (Czubayko *et al.* 1996). L'inhibition de HARP dans le modèle de souris athymiques, induit une régression de cette angiogenèse. Par ailleurs, HARP régule le système rénine-angiotensine connu pour son rôle important dans l'angiogenèse (Herradon *et al.* 2004).

Enfin, l'activité d'HARP peut être régulée par plusieurs composants dont les glycosaminoglycanes qui jouent le rôle de réservoir en modulant sa biodisponibilité au sein de la matrice extracellulaire. En effet, il est connu que HARP interagit et possède une affinité importante pour les chondroitines sulfates et plus précisément les CS-B qui sont les dermatanes sulfates (Vacherot *et al.* 1999).

IV. Modèle animal d'induction de la tendinopathie du supra-épineux

IV.1. Pertinence et développement du modèle-rat de sur-utilisation

Les tendinopathies résultantes de la sur-utilisation articulaire constituent un problème clinique important. Le terme tendinopathie désigne les blessures tendineuses sans rupture. Le manque de connaissances sur leur étiologie rend les résultats des traitements thérapeutiques classiques très aléatoires. Des facteurs environnementaux mécaniques semblent contribuer à la manifestation des tendinopathies. Pour concevoir des traitements appropriés, il est important de comprendre les processus cellulaires et moléculaires fondamentaux qui conditionnent l'installation de la pathologie et de savoir comment la sur-utilisation affecte les tendons.

Les limitations inhérentes à la clinique humaine et aux études post-mortem sont des éléments en faveur du développement de modèles animaux pour explorer ces mécanismes pathologiques. Le développement d'un modèle animal pertinent reproductible est en effet une condition incontournable afin de pouvoir décrire précisément les processus mis en jeu, poser un diagnostic précoce et éventuellement envisager une thérapie préventive, de préférence non invasive.

Ce projet de thèse a permis donc de mettre en place en France un récent modèle animal de tendinose débutante à caractère non inflammatoire et d'origine mécanique, qui évolue vers une tendinose installée analogue à celle observée en clinique humaine. Ce modèle a été établi et validé aux Etats-Unis (Soslowsky *et al.* 2000) et reproduit à ce jour seulement dans un laboratoire canadien avec lequel nous collaborons (University of British Columbia, Vancouver) et un laboratoire australien (University of New South Wales, Sydney). Il n'était pas encore exploité en France. Sa finalité est de compléter les nombreux travaux en cours qui étudient la pathologie avancée chez l'Homme en établissant la pathogénèse précoce de la tendinopathie du supra-épineux et les interactions mécanobiologiques et biomécaniques qui lui sont associées.

Pour évaluer la pertinence de différents modèles animaux dans le but de reproduire une tendinopathie du supra-épineux analogue à celles observées chez l'homme, une liste de plusieurs critères spécifiques associés à la pathologie a été établie. Elle comprend des critères liés à la musculature de l'articulation de l'épaule (Baron *et al.* 1991) dont les muscles supra- et infra-épineux, le deltoïde et le biceps ; et des critères liés à l'anatomie osseuse de l'articulation gléno-humérale, de l'acromion, du coracoïde, de la clavicule et de l'humérus (Herberts *et al.* 1984; Inman *et al.* 1996). Des critères cinématiques concernant les mouvements de flexion, d'extension et de rotation ont été également pris en compte (Leadbetter 1992). Une attention particulière a été accordée à la région sous-acromiale. Le critère considéré comme le plus important était la position anatomique du tendon supra-épineux par rapport aux pièces osseuses se situant à proximité (acromion, coracoïde, tête de l'humérus, cavité glénoïde de la scapula) (Figure 4).

Dans une étude publiée en 1996, 33 animaux différents, tel que chats, chinchillas, vaches, chiens, hamsters, lapins, primates, rats, etc ; ont été analysés par l'équipe du Dr Louis J Soslowsky pour une possible utilisation en tant que modèle animal de tendinopathie de la coiffe des rotateurs (Soslowsky *et al.* 1996). Les résultats ont montré que seul le rat est un modèle approprié car il satisfait l'ensemble des critères évoqués. En effet, les anatomies osseuse, ligamentaire et musculaire de l'articulation de l'épaule chez la grande majorité des

animaux ne ressemblent pas à celle de l'être humain. Sur les 33 animaux étudiés, 28 avaient l'acromion peu développé. Dans 12 cas, l'acromion tendait plus vers l'infra-épineux que vers le supra-épineux. Parmi les espèces animales potentiellement intéressantes, seul le rat avait le tendon supra-épineux qui passait en-dessous d'un arc formé par le coracoïde, l'acromion et le ligament acromio-coracoïdien et se trouvait donc adjacent à l'acromion comme on l'observe chez l'Homme (Figure 25).

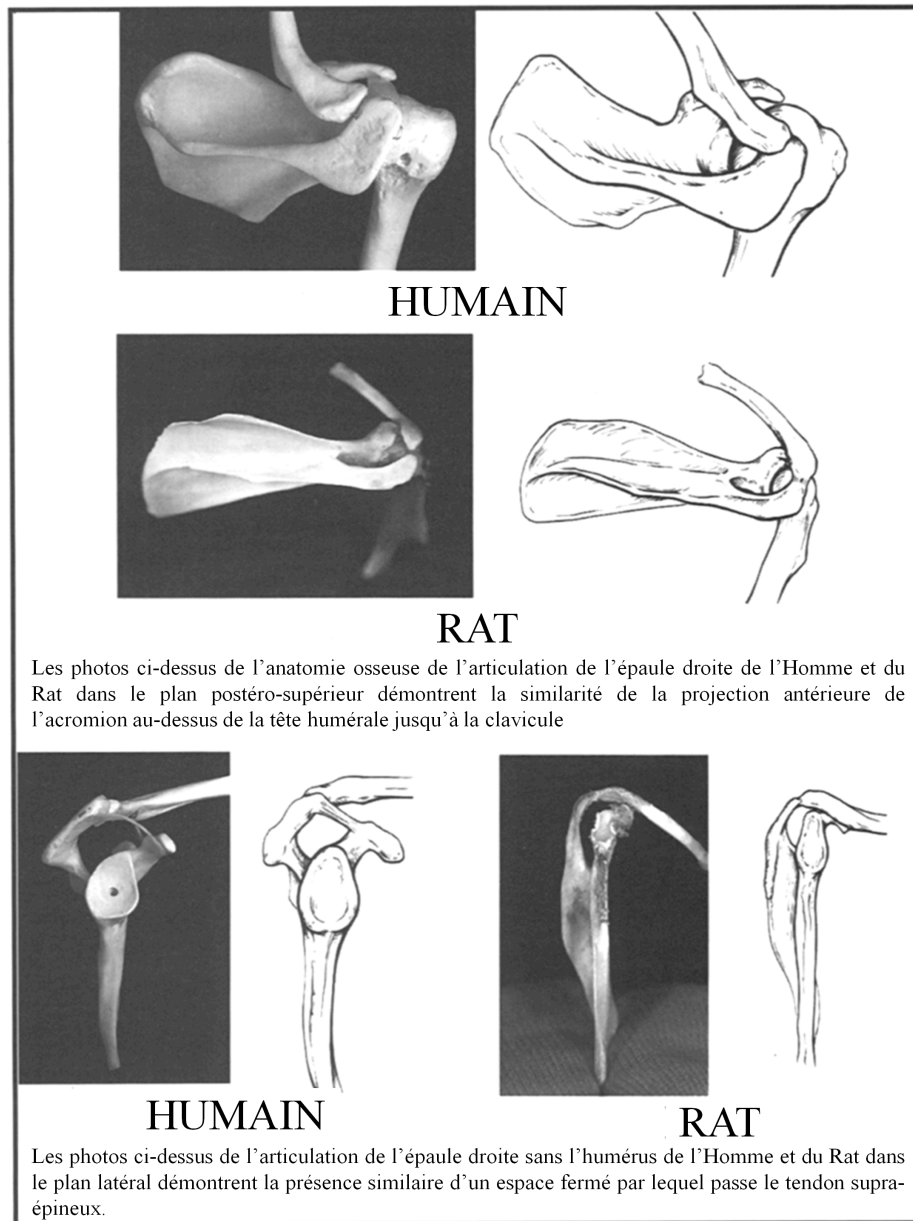


Figure 25. Comparaison anatomique de l'articulation de l'épaule entre l'Homme et le rat (Soslowsky *et al.* 1996).

La figure ci-dessus illustre la relation anatomique entre l'acromion, le coracoïde, la clavicule et la fosse du supra-épineux (Figure 4). Ce chemin anatomique du tendon serait le fondement de l'étiologie mécanique liée au conflit sous-acromial de pincement.

Cette étude fournit des preuves anatomiques et fonctionnelles de la pertinence du choix du rat pour étudier la tendinopathie du supra-épineux. De plus, il a été démontré que les altérations tendineuses sont reproductibles si l'on suit un protocole rigoureux de sur-utilisation.

IV. 2. Les acquis dans le modèle de sur-utilisation chez le rat


Le modèle de sur-utilisation du tendon supra-épineux chez le rat consiste à soumettre l'animal à un entraînement quotidien adapté (cf. Matériels et Méthodes) provoquant une tendinose micro-lésionnelle précoce et non-inflammatoire. Cette tendinose est représentative de la pathologie observée chez l'Homme. Ce modèle a donné lieu à quelques études récentes, menées à court ou à long terme, qui ont fourni une première collecte de résultats (Tableau 9).

Publications	Durée de l'entraînement	Observations et résultats
(Soslowsky <i>et al.</i> 2000)	De 4 semaines à 16 semaines	Analyse histologique, géométrique et biomécanique. Dès 4 semaines : <ul style="list-style-type: none"> - Fibres de collagènes désorganisées - Prolifération et forme cellulaire modifiées - Augmentation de la taille des surfaces de section transversale - Diminution du modulus et de la résistance à la rupture.
(Perry <i>et al.</i> 2005)	Jusqu'à 16 semaines	Analyse transcriptionnelle sur le tendon entier : <ul style="list-style-type: none"> - Augmentation des marqueurs inflammatoires : FLAP et COX-2 - Augmentation des marqueurs angiogéniques : VEGF et VWF.
(Scott <i>et al.</i> 2007)	De 4 semaines à 16 semaines	Etude zonale tendineuse colorimétrique et immunologique : <ul style="list-style-type: none"> - Différenciation chondroïde dans la zone purement tendineuse - Hausse des GAGs totaux - Hausse de la prolifération cellulaire - Augmentation de la teneur et de l'activité d'IGF - Pas d'apoptose - Pas d'invasion cellulaire extra-tendineuse.
(Jelinsky <i>et al.</i> 2008)	Jusqu'à 4 semaines	<ul style="list-style-type: none"> - Effet du repos après sur-entraînement - Retour à la normale des teneurs en eau et en GAGs, mais déficit en collagène.
(Archambault <i>et al.</i> 2007)	Jusqu'à 4 semaines	Analyse transcriptionnelle du tendon entier. Dès 2 semaines : <ul style="list-style-type: none"> - Augmentation du collagène de type II - Diminution du collagène de type I et III - Augmentation de l'aggrécane et diminution de la décorine - Pas de changement des MMPs et du TGFβ.
(Millar <i>et al.</i> 2008)	Jusqu'à 4 semaines	Etude transcriptionnelle de la régulation de l'apoptose : <ul style="list-style-type: none"> - Augmentation conjointe des marqueurs apoptotiques (caspases) et anti-apoptotique (HSPs) - Diminution du facteur hypoxique HIF

(Molloy <i>et al.</i> 2006)	Jusqu'à 4 semaines	Etude transcriptionnelle des acteurs de la communication interfibroblastique : <ul style="list-style-type: none"> - Augmentation des marqueurs pro-apoptotique - Augmentation du glutamate.
(Szomor <i>et al.</i> 2006)	Jusqu'à 4 semaines	Etude transcriptionnelle des acteurs de la production de NO (nitric oxide) : <ul style="list-style-type: none"> - Augmentation des NO et des enzymes NO synthases

Tableau 9. Etat de l'art des principaux changements histologiques, cellulaires et moléculaires observés utilisant le modèle animal-rat de sur-utilisation du tendon supra-épineux.

OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

A large, empty rectangular box with a thin black border, intended for the user to enter the objectives of their thesis project.

Approche préventive de la tendinopathie du supra-épineux : un enjeu médical majeur

Les TMS caractérisés par un inconfort, une raideur, un affaiblissement, des douleurs plus ou moins importantes, pouvant conduire à une rupture partielle ou totale du tendon, sont devenus la première cause de maladie professionnelle en France et une préoccupation majeure de santé publique. Cependant, les mécanismes physiopathologiques restent encore mal connus et n'ont fait l'objet que d'un nombre très restreint d'études. Parmi ces TMS, nous nous sommes plus spécifiquement intéressés dans ce projet de thèse à la tendinopathie du supra-épineux engendrée par une sur-utilisation répétitive en élévation de l'articulation de l'épaule.

Le diagnostic de la tendinopathie du supra-épineux est simple notamment grâce à l'imagerie médicale mais il est malheureusement tardif. Le traitement souvent d'ordre médicamenteux et/ou chirurgical laisse aujourd'hui de plus en plus de place à une prise en charge pluridisciplinaire (orthopédique, kinésithérapeutique, ostéopathe, etc.). Ainsi, la question de la thérapie qu'il faut utiliser selon le degré pathologique et selon le tendon atteint reste posée.

Approfondir les connaissances sur l'étiologie de la tendinopathie du supra-épineux

Le travail qui m'a été confié au cours de cette thèse est de contribuer à une meilleure compréhension étiologique de la tendinopathie micro-lésionnelle du tendon supra-épineux au cours des phases précoces afin de pouvoir agir en amont de l'apparition des symptômes et ainsi les prévenir.

Le schéma ci-dessous (Figure 26) propose les bases des mécanismes qui peuvent conduire à des microlésions puis à la rupture d'un tendon soumis à des contraintes répétitives. Que cela soit au cours des phases précoces ou tardives de la tendinopathie ou quel que soit le tendon concerné, les études antérieures suggèrent des mécanismes communs qui induisent cette pathologie incluant la contrainte mécanique sur les structures tendineuses. Les contraintes mécaniques modifient la composition de la MEC du tissu tendineux par synthèse ou dégradation de ses composants. Ces contraintes modifient la capacité des ténocytes à métaboliser les éléments matriciels et/ou à répondre par exemple à des facteurs de croissance. Ces changements cellulaires qui surviennent alors, peuvent affecter en retour la composition de la MEC du tendon et par conséquent ses propriétés biomécaniques.

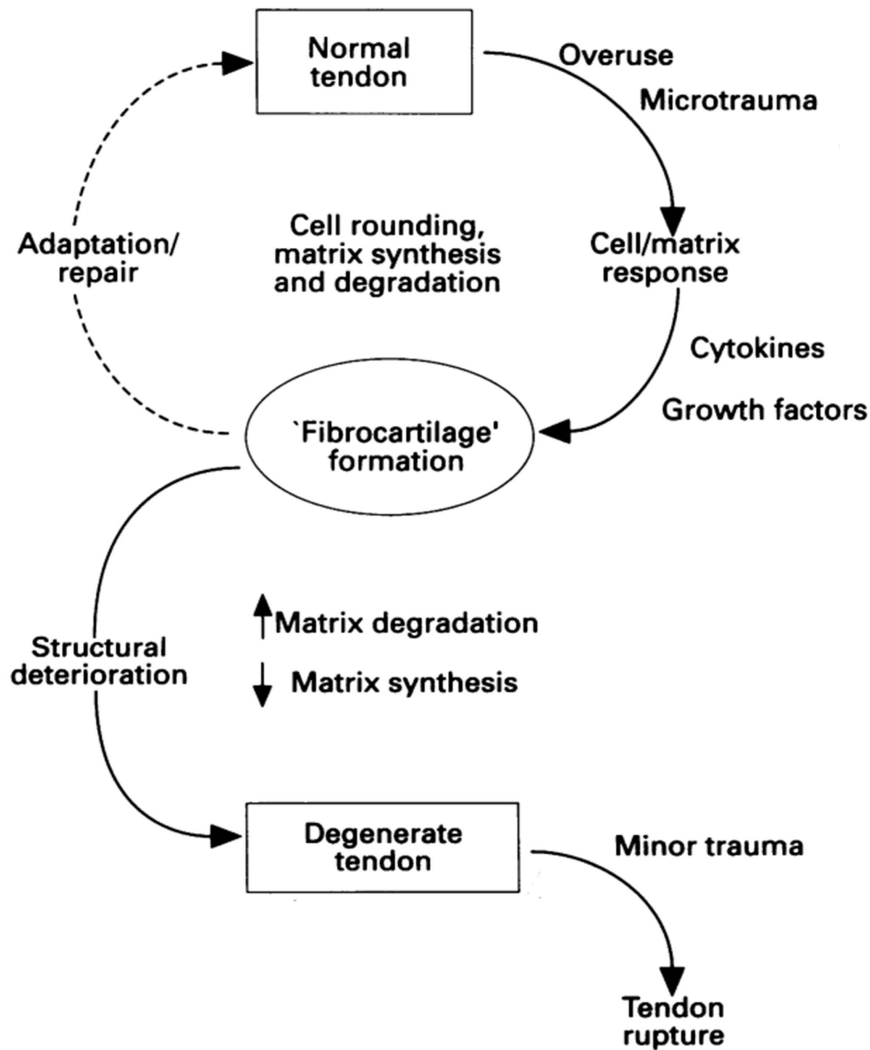


Figure 26. Mécanisme lésionnel ou adaptatif au cours de la tendinopathie du supra-épineux.
D'après (Cawston *et al.* 1996).

Dans ce cadre, notre problématique a consisté à identifier les changements pertinents survenant au cours des phases précoces dans le tendon supra-épineux sur-utilisé et à déterminer leur chronologie relative. Pour ce faire, le projet de thèse a visé en premier lieu à mettre en place et à maîtriser un modèle animal indispensable déjà validé afin de déterminer les caractéristiques cellulaires et moléculaires précoces de cette pathologie. La mise en place d'un tel modèle animal qui s'intéresse aux phases précoces de la tendinopathie, était une nécessité afin de pouvoir décrire précisément les processus mis en jeux.

Plusieurs modèles animaux existent dans le monde pour étudier cette pathologie. Le modèle choisi pour ce projet consiste à provoquer, par un entraînement quotidien sur tapis roulant en pente descendante, une sur-utilisation du tendon supra-épineux chez le rat. C'est le seul

modèle qui permet de reproduire, sur la base des analogies anatomiques avec l'Homme, une tendinopathie du supra-épineux analogue à celle observée chez l'être humain. A notre connaissance, ni ce modèle, ni aucun autre modèle animal permettant d'étudier les phases précoces d'une tendinopathie n'avait été développé à ce jour en France et les études antérieures utilisant ce modèle s'étaient généralement intéressées aux phases tardives de la tendinopathie.

Le tendon est une structure très dense et très résistante qui fait partie du tissu musculo-squelettique. Il relie les muscles aux os en stabilisant l'ensemble. Il est composé principalement de collagène, mais il contient également des GAGs associés aux PGs possédant un fort potentiel de rétention d'eau. Ces composants matriciels sont des éléments clés du tissu tendineux car ils lui confèrent certaines propriétés biomécaniques, comme la viscoélasticité, qui lui permettent de transmettre les forces musculaires d'une façon optimale. Il a déjà été montré que la tendinopathie du supra-épineux, au cours des phases tardives de la pathologie, se manifestait par une déstructuration partielle ou totale du réseau collagénique, une modification quantitative et qualitative des GAGs ainsi que des changements de certains médiateurs chimiques locaux. On peut supposer que la tendinopathie débute par des altérations du tissu collagénique-protéoglycanique et par d'autres signes asymptomatiques qui constitueront une source de vulnérabilité et engendreront un cercle vicieux de détérioration tissulaire progressif.

La question que nous nous sommes alors posée était de savoir quand et comment les composants matriciels majeurs évoluent au cours de ces phases asymptomatiques de la tendinopathie du supra-épineux. Pour ce faire, l'objectif de la deuxième partie de mon projet de thèse a donc consisté à caractériser et à tenter de comprendre le déterminisme cellulaire et moléculaire du profil d'évolution des composants de la MEC au cours des phases précoces de la tendinopathie. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'expression des collagènes, des PGs et de leurs GAGs associés ainsi qu'à certains médiateurs chimiques locaux, qui pourraient influencer sur la nature tissulaire du tendon et donc son comportement biomécanique. Cette partie a fait l'objet d'une publication dans la revue *Journal Orthopaedic Research* en Juin 2011.

Les changements matriciels constatés, sont une première réponse à la variation des contraintes mécaniques intra-tissulaires entraînant une réponse métabolique cellulaire. En effet, ces contraintes, qui pourraient être associées à des microlésions des fibres de collagène,

engendreraient une réaction cellulaire libérant des enzymes qui dégradent les composants matriciels du tendon. Ces changements matriciels pourraient aussi être liés à une réponse inflammatoire débutante. Des changements d'expression et d'activité d'enzymes de dégradation de la MEC et de leurs inhibiteurs, respectivement les MMPs et les TIMPs, ont été observés au cours des phases tardives de la tendinopathie du supra-épineux chez l'Homme.

La question que nous nous sommes alors posée était : « Quelle est la contribution, à la modification du métabolisme cellulaire, des médiateurs chimiques locaux spécifiques libérés par les cellules constitutives du tendon et par les cellules inflammatoires ? ». L'objectif de la troisième partie a été alors d'analyser dans le tendon supra-épineux, au cours des phases précoces de la pathologie, la présence et le niveau d'activité des MMPs et de leurs inhibiteurs identifiées au préalable dans les phases tardives. Nous nous sommes intéressés plus spécifiquement à la MMP-2 et à l'un de ses systèmes activateurs (TIMP-2 et MT1-MMP) et inducteurs (EMMPRIN et cytokines inflammatoires). Cette partie a fait l'objet d'une seconde publication, en soumission, dans la revue *Arthritis and Rheumatism*.

Le dernier objectif de ce travail de thèse a été de savoir si l'évolution des composants matriciels, observée au cours de la tendinopathie dans le modèle animal de rat, est représentative des changements constatés au cours de la tendinopathie humaine. En d'autres termes, il s'agissait de savoir si une corrélation pouvait être établie chez l'Homme entre le niveau de changements moléculaires et cellulaires observés et le degré de sévérité de la tendinopathie diagnostiquée. Pour ce faire, la dernière partie de ce projet de thèse a consisté principalement à étudier l'évolution quantitative des GAGs totaux par une méthode histologique dans des échantillons de tendon patellaire humain sains et pathologiques. Plus spécifiquement, nous avons cherché à corréler la quantité de GAGs à un score de référence (VISA score) indiquant le stade d'avancement de la tendinopathie. Nous avons ainsi tenté de savoir s'il était possible, à des fins diagnostiques, de déterminer le degré de la tendinopathie à partir de la quantité de GAGs présente dans le tendon et ainsi fournir des éléments informatifs pour les thérapeutes afin qu'ils adaptent leurs traitements.

Ce projet de thèse a donc pour ambition de contribuer à améliorer nos connaissances des phases précoces du processus d'altération du tendon du supra-épineux. Les connaissances acquises, constituent un préalable au développement d'outils de diagnostic précoce, de prévention et de thérapies « intelligentes » non invalidante des TMS en amont de l'apparition des symptômes délétères. D'importants efforts de recherche et de formation resteront à

accomplir en particulier dans la caractérisation de la pathogenèse précoce des tendinopathies et dans la connaissance du contexte biomécanique qui les génère.

MATERIELS ET METHODES



I. Liste des matériels et réactifs

Matériels	Fournisseurs
Acide Acétique	VWR
Acide chlorhydrique (HCl)	VWR
Acide Sulfurique (H ₂ SO ₄)	VWR
Acrylamide/bis 30%	Bio-Rad
Agarose	Invitrogen
Anticorps anti-IgG de chèvre couplé à la peroxydase	Jackson ImmunoResearch
Anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase	Jackson ImmunoResearch
Anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase	Jackson ImmunoResearch
Anticorps anti-IgG de souris couplé au FITC Alexa fluor 488	Interchim
Anticorps anti-VSV tag P5D4	Dr Toin Van Kuppevelt
APMA (acide phényle mercurique acétate)	Sigma
Appareil de broyage des tissus, Ultraturrax	IKA laborotechnik
Appareil de comptage de scintillation liquide 1450-Microbeta Plus	Wallac
Appareil de rinçage des plaques ELISA, Asys Atlantis 2	Biochrom
Appareil PCR GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer Biosystems
Appareil RT, Thermocycler	ThermoJet
APS (ammonium persulfate)	Sigma
Bleu 1,9-déméthylméthylène	Sigma
Bleu de Comassie G-250/R-250	Merck
Centrifugeuse Biofuge fresco	Heraeus centrifuge
Chloroforme	VWR
Chlorure de calcium (CaCl ₂)	VWR
Chondroïtinase B	Sigma
Cocktail d'inhibiteurs de protéases	Sigma
Collagénase Type IA, clostridium histolyticum	Sigma
Cuve d'électrophorèse des gels PCR, Mupid-ex	Mupid
Cuve d'électrophorèse Western blot Mini Protean II	Bio-Rad
DQ-gélatine de porc couplée à la fluorescéine	Invitrogen
DTT (1,4-dithiothréitol)	Invitrogen
ECL (réactif de détection par chimiluminescence)	Roche
EDTA (acide éthylène-diamine-tétra-acétique)	Sigma
Ethanol	VWR
FGF-2, fibroblast growth factor-2	Laboratoire CRRET
Gélatine type A de porc	Sigma
Glycérol	MP biomedicals
Glycine	VWR
HARP, Heparin affin regulatory peptide	Laboratoire CRRET

Héparine	Sigma
Hyperfilm ECL	Amersham
Isopropanol	VWR
Kit BCA de dosage protéique	Thermo Scientific
Kit ELISA de TGF β -1	R&D system
Logiciel d'analyse d'images et de quantification, ImageJ	National Institute of Health
Logiciel d'analyse statistique, GraphPad Prism	GraphPad Software
Membrane PVDF Immobilon-P (polyfluorure de vinylidène)	Millipore
Méthanol	VWR
Microscope optique à fluorescence, fluoview FV-1000	Olympus
Microscope optique à lumière blanche, Aristoplan	Leitz
NaCl (Chlorure de sodium)	VWR
NaOH (hydroxyde de sodium)	VWR
Nitrite de sodium	Sigma
Pentobarbital de sodium	CentraVet
Petit tube 1,5ml et 2ml	Eppendorff
pH-mètre CG-820	Schott Gerate
Plaque biochimie 96 puits pour dosage protéique	Costar
Plaque biochimie 96 puits pour test ELISA	Costar
Protéinase-K	Promega
SAB (sérum albumine bovine)	Sigma
SDS (Dodécyl sulfate de sodium)	MP biomedical
Spectrophotomètre iEMS Reader MF	LabSystems
Spectrophotomètre lambda 3 UV/VIS	Perkin Elmer Biosystems
Substrat de la peroxydase, TMB substrate kit	Pierce
Sulfamate d'ammonium	Sigma
SuperScript II transcriptase inverse	Invitrogen
Système d'acquisition d'image en fluorescence, Cell spin	Olympus
Système d'acquisition d'image en lumière blanche, CoolSNAP	RS photometrics
Système de capture d'image des gels PCR, GeneSNAP	Syngene
Système de capture d'image Western blot et zymographie, Scion Image	National Institute of Health
Système de transfert Western blot MiniTransblot	Bio-Rad
TAE (Tampon tris, acétate, EDTA)	Invitrogen
Taq polymérase, thermus aquaticus	Invitrogen
TEMED, Tetra-méthyle-éthylène-diamine	Sigma
Tris (tris-(hydroxyméthyl))-aminométhane	MP biomedical
Triton X-100	MP biomedical
Tween-20	MP biomedical
β -2-mercaptoéthanol	Sigma

II. Liste des anticorps utilisés

AC I anti-	Isotypes	Dilution		Fournisseur
		WB	IF	
Aggrécane	polyAb	1/500	1/100	Santa Cruz
CD-163/ED2	polyAb	NR	1/200	abSerotec
CD-68/ED1	polyAb	NR	1/200	abSerotec
Collagène III	polyAb	NR	1/200	abCam
Décorine LF-113	polyAb	1/5 000	1/500	Dr Larry Fisher
EMMPRIN/CD147 G-19	polyAb	1/3 000	1/500	Santa Cruz
GAPDH	monoAb	1/10 000	NR	Applied Biosystem
HARP/PTN	polyAb	1/1 000	NR	R&D system
MMP-13 (IM35L)	monoAb	1/1 000	NR	Calbiochem
Versicane	polyAb	1/500	1/100	Santa Cruz
β -actine clone AC-15	monoAb	1/5 000	NR	Sigma
α -tubuline	polyAb	1/5 000	NR	Sigma

HARP/PTN= Heparin Affin Regulatory Peptide/Pleiotrophin; MMP-13= matrix metalloproteinase-13; EMMPRIN= Extracellular matrix metalloproteinase inducer ; GAPDH= Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ; PolyAb/monoAb= polyclonal antibody/monoclonal antibody ; WB= western blot; IF= immunofluorescence ; NR= non réalisé.

III. Modèle animal d'induction de la tendinopathie du supra-épineux ; le modèle de sur-utilisation

Des rats mâles Sprague Dawley (Janvier), âgés de 8 semaines et pesant entre 400 et 450g ont été utilisés pour cette étude. Vingt-cinq animaux contrôles ont été soumis à une activité normale de cage. Vingt-cinq autres ont été soumis à une activité de course quotidienne sur un tapis roulant après une période d'adaptation à l'effort d'une dizaine de jours (Figure 27).

La mise en œuvre de ce programme d'entraînement chez le rat s'est révélée particulièrement délicate. Les animaux sont d'abord entraînés à courir sur le plat, quotidiennement pendant des durées croissantes allant de 10 minutes à une heure avec une vitesse qui augmente graduellement de 0.5 à 1 km/h. Nous avons remarqué qu'environ la moitié des animaux refusait de courir. Il semblerait que certains rats atteignent plus que d'autres un niveau élevé d'anxiété et de stress qui les rend récalcitrants. D'autre part, il est connu que chez cette espèce, certains individus ont naturellement un tempérament passif qui les rendrait rétifs aux sollicitations d'entraînement auxquelles le protocole les soumet. Une étape importante, au cours de l'adaptation à l'entraînement, a consisté à détecter ces animaux récalcitrants et à les écarter du lot « entraînés ».

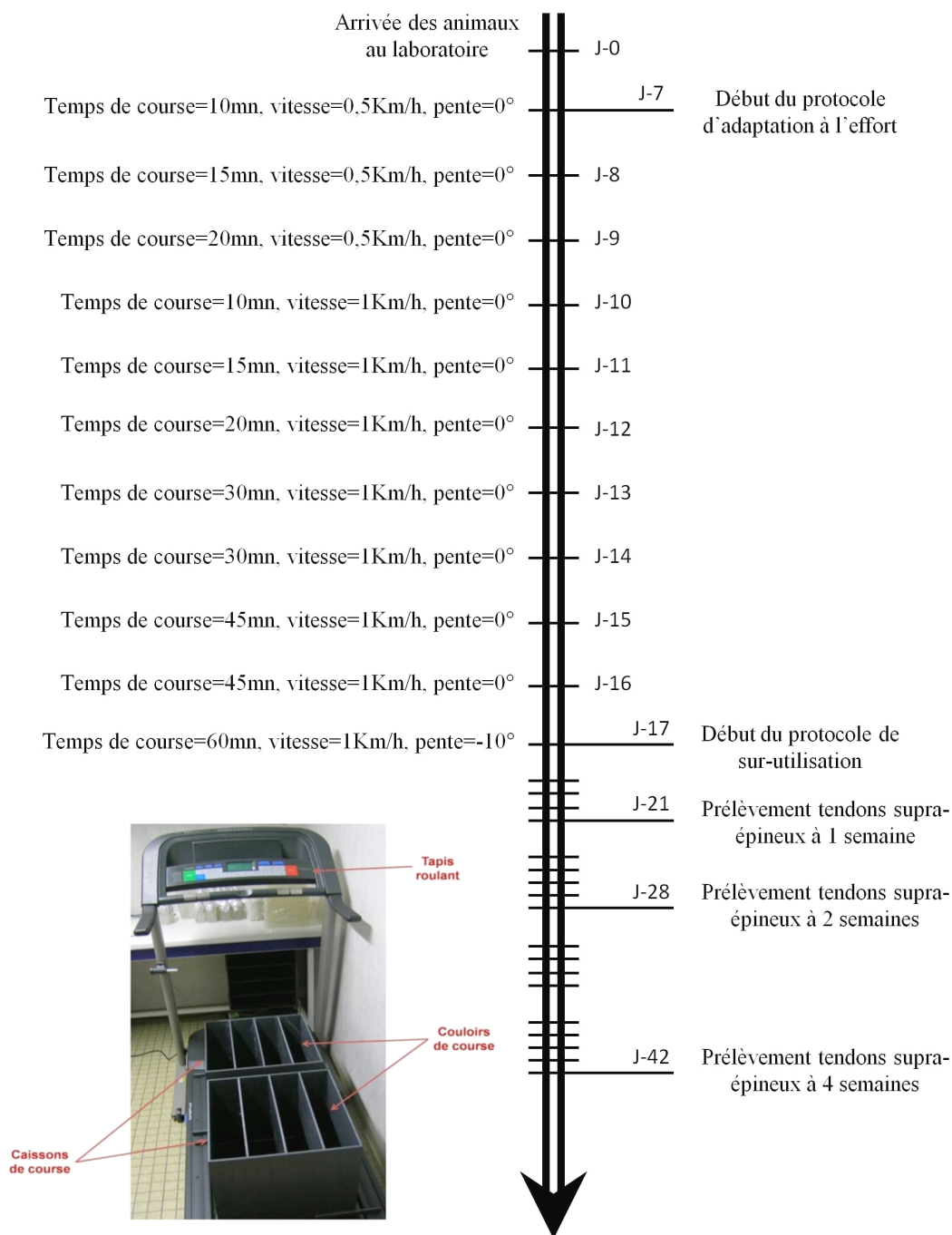


Figure 27. Protocole de sur-utilisation du tSE chez le modèle animal rat.

Une fois les animaux « *coopératifs* » sélectionnés, le protocole de sur-utilisation proprement dit commence. Le protocole expérimental consiste à faire courir les rats sur un tapis roulant avec une pente descendante de 10°, 5 jours/semaine, à raison d'1 h/jour, à une vitesse de 17 m/min, pendant 1, 2 et 4 semaines (Figure 27). La pente descendante est l'un des paramètres les plus importants du protocole de sur-utilisation. En effet, le rat est un animal quadrupède et

pour induire la tendinopathie du supra-épineux, le travail doit obligatoirement être concentré sur les pattes antérieures. Lors de la course, les tendons de la coiffe des rotateurs dont fait partie le supra-épineux, ont une action antagoniste sur le plan fonctionnel qui correspond à un travail en freinage. Ce travail, défini comme un travail excentrique, serait responsable de la tendinopathie.

La maîtrise de ce protocole d'entraînement a été acquise au cours d'un séjour de 2 mois dans le laboratoire du Dr Louis Soslowsky (Université de Pennsylvanie, Philadelphie, USA) avec qui nous collaborons.

IV. Prélèvement des tendons supra-épineux (tSE)

Après 1, 2 et 4 semaines d'entraînement, les rats contrôles (n=25) et entraînés (n=25) ont été euthanasiés avec une solution de pentobarbital, les tSE ont été disséqués et séparés de leurs attaches musculaires et osseuses, pesés, congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Pour les études histologiques, des tendons que nous avons prélevés et congelés ont été coupés au cryostat en coupes transversales de 8 µm. D'autres tSE utilisés proviennent d'une cohorte de rats (n=32) d'une étude précédente (Scott *et al.* 2007) entraînés selon le même protocole. Ils ont été prélevés avec leurs muscles et ensuite fixés et inclus dans la paraffine. Pour chaque temps (4, 8, 12 et 16 semaines), cinq rats entraînés et trois rats contrôles ont été étudiés. Nous avons utilisé ces échantillons afin de réduire le nombre d'animaux requis pour ce projet.

V. Etude des glycosaminoglycanes (GAGs) totaux et spécifiques (Figure 28)

V.1. Extraction des GAGs totaux

Les GAGs tissulaires ont été extraits à partir des tSE de rats contrôles et entraînés à différents temps (2 et 4 semaines). Les tendons sont décongelés puis incubés dans du tampon phosphate K_2HPO_4 (100 mM, pH 8) selon leur masse (1 ml/25 mg de tissu) et traitées à la protéinase-K à 200 µg/ml pendant 24 h à 56 °C. Dans ces conditions, la protéinase-K dégrade la plupart des protéines détachant ainsi les GAGs des protéoglycanes. L'enzyme est ensuite inactivée en augmentant la température à 90 °C pendant 30 min. L'ADN, pouvant interférer avec les GAGs au moment du dosage, a été ensuite éliminé par digestion à la DNase (7,5 U/25 mg de tissu) pendant 24 h à 37 °C. Puis, les échantillons ont été dilués, avec un rapport 1/1, dans du NaCl 4 M afin d'abolir les interactions entre les GAGs et les peptides formés après la dégradation à la protéinase-K. Les échantillons ont été ensuite traités à l'acide trichloracétique (TCA) à 10

% finale afin de précipiter et d'éliminer les peptides résiduels. Les lipides tissulaires sont ensuite dissous en rajoutant du chloroforme avec un rapport 1/1. Après centrifugation à 13000 rpm, la phase aqueuse contenant les GAGs est récupérée et dialysée dans un tampon de dialyse (50 mM Tris-HCl, 50 mM acétate de sodium, 5 mM CaCl₂, pH 8) deux fois pendant 4h, puis toute une nuit dans de l'eau. Suite à la dialyse, les extraits de GAGs totaux sont enfin récupérés, congelés puis lyophilisés. Après l'extraction, les GAGs sulfatés ont été quantifiés en utilisant le bleu 1,9-diméthylméthylène (DMMB).

V.2. Quantification des GAGs totaux au bleu 1,9-diméthylméthylène (DMMB)

Le DMMB est un cation coloré pouvant se fixer aux GAGs par l'intermédiaire de leurs groupements anioniques. Le principe du dosage par ce cation (Barbosa *et al.* 2003) est basé sur la capacité d'interaction spécifique du DMMB avec les groupements sulfates présents tout au long des chaînes de GAGs (Farndale *et al.* 1982). Par conséquent, cette méthode ne permet de doser que les GAGs sulfatés. Ainsi, l'acide hyaluronique (le seul GAG non sulfaté) qui ne sera pas étudié au cours de ce projet, n'est pas quantifiable par cette technique.

Pour ce dosage, deux étapes sont nécessaires. La première est la complexation du DMMB sur les groupements sulfates des GAGs, alors que la deuxième est sa décomplexation à l'aide d'une solution à base de guanidine.

Après extraction, dialyse et lyophilisation, les extraits de GAGs totaux sont dilués dans 500 µl d'H₂O stérile. Le dosage s'effectue à l'aide d'une gamme étalon préparée avec la CS-A dans un intervalle allant de 0 à 5 µg pour une prise d'essai de 50 µl. De la même façon, le dosage a été effectué avec une prise d'essai de 50 µl pour tous les échantillons. Ensuite, 1ml de la solution de DMMB a été ajouté à chacun des échantillons, puis le mélange a été soumis à une forte agitation pendant 30 min à température ambiante afin de permettre la liaison entre le DMMB et les groupements sulfates des GAGs. Les échantillons sont précipités par une centrifugation de 15 min à 13000 rpm. Après élimination de l'excès de solution de DMMB, 220 µl de solution de décomplexant sont ajoutés au précipité contenant les GAGs complexés au DMMB puis le mélange est à nouveau agité pendant 30 min à température ambiante. La densité optique du mélange pour tous les échantillons a été mesurée à 650 nm. La quantité de GAGs totaux est déterminée à l'aide de la gamme de CS-A réalisée en même temps et dans les mêmes conditions.

V.3. Quantification des GAGs spécifiques au bleu 1,9-diméthylméthylène (DMMB)

Quantification des HS :

Après extraction des GAGs, les échantillons sont traités à l'acide nitreux qui dégrade spécifiquement les HS sans altérer les CS ni les DS. Deux gammes étalons sont parallèlement préparées, une gamme de CS-A (0 à 5 µg) pour le dosage et une gamme de HS (0 à 5 µg) pour le contrôle positif de la réaction chimique. Comme pour le dosage des GAGs totaux, ce dosage spécifique a été effectué avec une prise d'essai de 50µl. Les gammes ainsi que tous les échantillons ont été repris dans 100 µl d'H₂O, ensuite 100 µl de nitrite de sodium (0,25 M) et 100 µl d'acide acétique (33 %) ont été ajoutés au mélange pendant 2h à température ambiante. La réaction est arrêtée par l'ajout de 100 µl de sulfamate d'ammonium 14 %. Les échantillons sont dosés par complexation au DMMB, comme précédemment décrit. Dans ce cas, le dosage aboutit à la quantification des CS+DS présents dans l'échantillon. La quantité d'HS est ensuite déterminée par une simple soustraction qui est la suivante :

$$\text{HS} = \text{GAGs totaux} - (\text{CS} + \text{DS})$$

Quantification des DS :

Après extraction des GAGs totaux, les échantillons sont incubés avec de la chondroïtinase-B qui dégrade spécifiquement les DS sans altérer les CS ni les HS. Deux gammes étalons sont parallèlement préparées, une gamme de CS-A (0 à 5 µg) pour le dosage et une gamme de CS-B (0 à 5 µg) pour le contrôle positif de la réaction enzymatique. Comme pour les dosages précédents, ce dosage spécifique des DS a été effectué avec une prise d'essai de 50 µl. Les gammes ainsi que tous les échantillons ont été repris dans 100 µl de tampon de dialyse (50 mM Tris, 50 mM acétate de sodium, 2 mM CaCl₂, pH 8), puis sont digérés à la chondroïtinase-B (0,5 U/ml) pendant 2h à 37°C. Les échantillons sont dosés par complexation au DMMB, comme précédemment décrit. Dans ce cas, le dosage aboutit à la quantification des CS+HS présents dans l'échantillon. La quantité de DS est ensuite déterminée par une soustraction qui est la suivante :

$$\text{DS} = \text{GAGs totaux} - (\text{CS} + \text{HS})$$

Quantification des CS :

Après le dosage des GAGs totaux, des HS et des DS, la quantité de CS est enfin déterminée par une équation mathématique de soustraction qui est la suivante :

$$\text{CS} = \text{GAGs totaux} - \text{DS} - \text{HS}$$

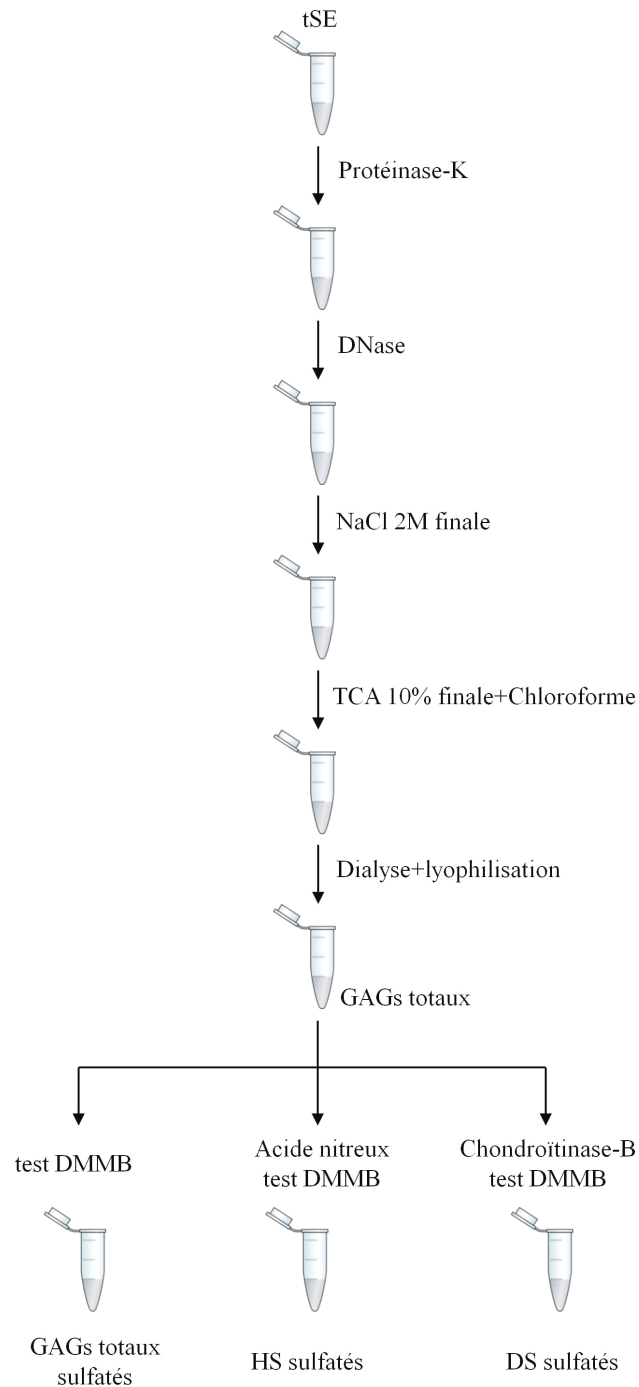


Figure 28. Méthode d'extraction et de quantification biochimiques des GAGs totaux et spécifiques.

V.4. Histochimie des GAGs totaux par la technique de complexation au DMMB

L'histochimie des GAGs totaux a été réalisée sur des coupes de tSE fixées et incluses dans la paraffine. Le principe de cette méthode histochimique repose sur le même principe que celui

de la quantification biochimique des GAGs totaux. Tout d'abord, les coupes ont été chauffées à 50°C pendant 10 min et déparaffinées avec le xylène. Elles ont été ensuite réhydratées à l'aide de bains successifs d'éthanol 100 %, 95 %, 90 %, 70 % et enfin 50 % puis incubées pendant toute une nuit dans la solution de complexation au DMMB. Enfin, les coupes ont été rincées 3 fois avec du PBS et les lames ont été montées avec des lamelles appropriées. Ce marquage a été validé en utilisant la digestion enzymatique à la chondroïtinase-ABC avant la coloration. L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'une caméra CoolSNAP. L'analyse d'image et la quantification du marquage ont été réalisées en créant une procédure de segmentation à l'aide du logiciel ImageJ (Rasband 1997-2009).

V.5. Immunomarquage des GAGs spécifiques

L'immunomarquage des GAGs spécifiques a été réalisé sur des coupes de tSE fixées et incluses dans la paraffine provenant de la même cohorte de rats que celle décrite précédemment. Des coupes de tendons patellaires humains ont également été utilisées. Après avoir éliminé la paraffine et réhydraté les coupes, ces dernières ont été saturées avec du PBS 3 % SAB (p/v) et incubées dans l'anticorps primaire « phage display single chain » anti-DS, anti-CS et anti-HS (Tableau 10) à 4 °C pendant toute une nuit (Figure 29). Les coupes ont été rincées 3 fois avec du PBS 0,05 % Tween-20 ensuite incubées avec l'anticorps anti-VSV tag IgG, clone P5D4, pendant 1 h 30 min à température ambiante. Après un nouveau rinçage, 3 fois avec du PBS 0,05 % Tween-20 (v/v), les coupes ont été incubées 1 h à température ambiante, dans l'anticorps secondaire IgG anti-souris couplé au FITC Alexa-488 (Fluoprobes Interchim). Enfin, le marquage des noyaux a été effectué en incubant les coupes dans le DAPI (1 µg/ml) pendant 5 min. Ce marquage a été validé par digestion chimique et enzymatique en incubant les coupes respectivement avec l'acide nitreux, la chondroïtinase-B et la chondroïtinase-ABC pour les HS, les DS et les CS. Les images du marquage fluorescent ont été obtenues à l'aide d'une caméra CCD monochrome CFW-1310M (Scion, NIH) associée à un microscope BH-2 epifluorescence (Olympus).

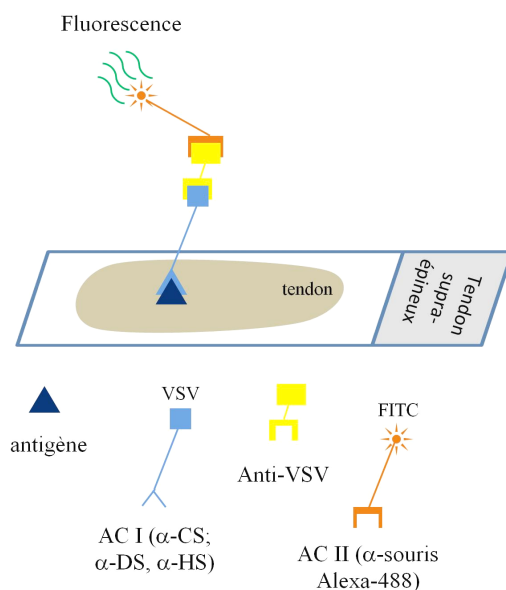


Figure 29. Méthode d'immunomarquage des GAGs spécifiques avec des anticorps « phage display single chain ».

Clone	Séquence V _H CDR3 ^a	Spécificité	Références	Modifications préférentielles	Dilution
IO3H10	AKRLDW	CS	(Smetsers <i>et al.</i> 2004)	6-O-sulfatation	1/5
LKN1	GIKL	DS	(Lensen <i>et al.</i> 2006)	2-O-sulfatation 4-O-sulfatation 6-O-sulfatation	1/5
AO4B08	SLRMNGWRAHQ	HS	(Jenniskens <i>et al.</i> 2000)	N-sulfatation C5-épimerisation 2-O-sulfatation 6-O-sulfatation	1/5

^a Séquence aminoacide du V_H de la région déterminante complémentaire 3 (CDR3).

Tableau 10. Caractéristiques des anticorps des GAGs spécifiques « phage display single chain » (anti-CS, anti-DS et anti-HS).

V.6. Evaluation des propriétés biologiques des GAGs

V.6.1 ELISA compétitif

Un « ELISA compétitif » a été réalisé afin d'évaluer les propriétés qualitatives des GAGs vis-à-vis de certains facteurs de croissance. Cette technique permet de mettre en évidence la

capacité des GAGs, pris comme compétiteurs, d'empêcher la liaison à l'héparine d'une protéine, en l'occurrence les facteurs de croissance HARP ou FGF-2 (Najjam *et al.* 1997) (Figure 30). L'efficacité de la compétition dépend de la composition des GAGs testés.

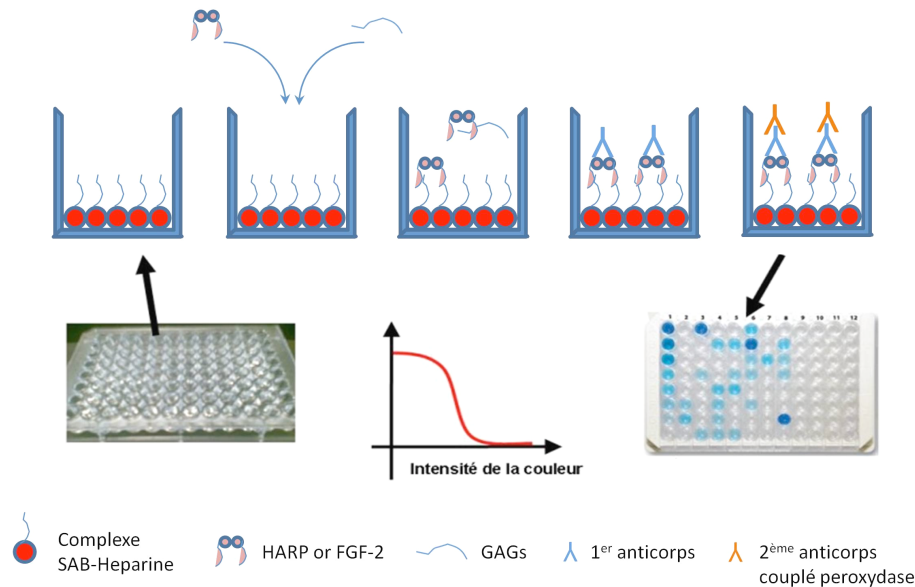


Figure 30. Technique d'ELISA compétitif entre HARP/FGF-2 et les extraits de GAGs totaux naturels par rapport à l'héparine.

Tout d'abord, les puits des plaques type ELISA ont été recouverts pendant une nuit à 4 °C avec 2 µg/ml d'une solution de SAB-Héparine préparée au préalable comme décrit dans des études précédentes (Najjam *et al.* 1997). Après 3 lavages au PBS 0,05 % Tween-20, les puits ont été saturés pendant 2h avec une solution de PBS 3 % SAB (p/v). Après 3 lavages au PBS 0,05 % Tween-20, HARP ou FGF-2 (50 ng/ml) a ensuite été ajouté simultanément avec les GAGs totaux extraits de tendons (4µg/ml) dans les puits et le mélange a été incubé pendant une nuit à 4 °C. HARP et FGF-2 ont été produits au laboratoire CRRET à partir de bactéries *E. coli* transfectées avec un plasmide contenant l'ADNc d'HARP ou de FGF-2 (Seddon *et al.* 1994). Les plaques ont été ensuite lavées 3 fois au PBS 0,05 % Tween-20 et incubées 2 h avec les anticorps primaires polyclonaux anti-HARP (1/5000) ou anti-FGF-2 (1/5000) (R&D system, Inc) puis incubées à nouveau 2 h avec les anticorps secondaires appropriés, couplés à la peroxydase. Les puits ont été lavés une dernière fois et le substrat de la peroxydase (TMB substrate) a été ajouté jusqu'à l'apparition d'une coloration bleue. La réaction a été ensuite arrêtée avec 100 µl de 2 M d'H₂SO₄ et l'absorbance a été mesurée à 450 nm. La liaison

d'HARP ou de FGF-2 à l'héparine en l'absence des GAGs totaux compétiteurs a été définie comme la référence (100 % de la liaison).

V.6.2. Analyse des disaccharides d'HS et de CS par la méthode de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Après leur extraction et leur quantification, les GAGs totaux issus des tSE contrôles et sur-utilisés ont été isolés et hydrolysés en disaccharides par un traitement enzymatique approprié afin d'être analysés par HPLC. Pour l'analyse des HS, les extraits ont été dégradés par la chondroïtinase ABC à une concentration de 0.25 mU/ml dans un tampon de dialyse (50 mM Tris, 50 mM acétate de sodium, 2 mM CaCl₂, pH 8) pendant 24 h à 37 °C. Les HS ont été ensuite séparés des CS/DS par une rapide dialyse dans de l'eau. Pour l'analyse des CS, les extraits ont été dégradés par un mélange d'héparinase I, II et III à une concentration de 0.5 mU/ml dans le même tampon dialyse pendant 24 h à 37 °C. Les CS ont été ensuite séparés des HS par une rapide dialyse dans de l'eau. Après la dégradation des HS et CS/DS respectivement par de l'héparinase I, II, III et de la chondroïtine ABC, 90 µl des disaccharides obtenus ont été filtrés et injectés dans le système HPLC contenant une colonne Propac PA-1 échangeuse d'anions (4.6 x 250 mm ; Dionex). Les disaccharides ont été ensuite élués par un gradient de NaCl 100 mM et 1 M à 0.25 ml/min et passés par dérivation dans une colonne contenant une solution de cyanoacétamide 2 % en gardant le même flux. Après élution, les saccharides obtenus ont été contrôlés à la sortie par un détecteur de fluorescence à 346 nm d'excitation et 410 nm d'émission. Delta-HS et delta-CS disaccharides (MoBiTec) ont été utilisés comme standard pour l'identification des pics. Les surfaces sous les courbes ont été mesurées et le pourcentage de chaque disaccharide a été calculé. Les résultats ont été exprimés en pourcentage des disaccharides totaux HS et CS.

Sachant que les DS sont des CS qui ont subi une épimérisation en position C5 de l'acide glucuronique en acide iduronique, cette technique ne permet pas de les analyser séparément. Les résultats obtenus concernant les CS représentent donc l'ensemble des CS épimérisés ou non épimérisés. Enfin, en utilisant des standards de disaccharides HS et CS, le type et la quantité des disaccharides ont été établis.

VI. Evaluation de la masse hydrique des tSE

Après prélèvement, les tSE ont été pesés à l'aide d'une balance de précision (10 µg) et congelés à -80 °C. Afin d'évaluer la quantité d'eau présente, les tendons contrôles et sur-utilisés ont été soumis à un processus de lyophilisation sans être décongelés au préalable. Le

principe de la lyophilisation consiste à ôter l'eau d'un produit liquide ou solide préalablement surgelé par sublimation à l'aide de l'évaporation sous vide. Les tendons ont été ensuite repesés et la masse hydrique a été ensuite déterminée par une soustraction qui est la suivante :

$$m_{H_2O} = m_{tSE} \text{ frais} - m_{tSE} \text{ lyophilisé}$$

m_{H_2O} = Masse hydrique ; m_{tSE} frais = masse du tSE avant lyophilisation ; m_{tSE} lyophilisé = masse du tSE après lyophilisation.

La masse a été normalisée par rapport au poids frais des tendons.

VII. Immunomarquage des PGs

L'immunomarquage des PGs a été réalisé en utilisant les mêmes coupes de tSE provenant de la même cohorte de rats du laboratoire canadien ainsi que les coupes de tendons patellaires humains de même provenance. Après avoir éliminé la paraffine et réhydraté les coupes, ces dernières ont été saturées avec du PBS 3 % SAB (p/v) et incubées dans l'anticorps primaire anti-décorine, anti-versicane et anti-aggrécane à 4 °C pendant toute une nuit. Les coupes ont été rincées 3 fois avec du PBS 0,05 % Tween-20 ensuite incubées à nouveau avec l'anticorps secondaire approprié couplé à un fluorochrome pendant 1 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Enfin, le marquage des noyaux a été effectué en incubant les coupes dans le DAPI (1 µg/ml) pendant 5 min. Les images du marquage fluorescent ont été obtenues à l'aide d'une caméra CCD monochrome CFW-1310M (Scion, NIH) associée à un microscope BH-2 epifluorescence (Olympus).

VIII. Analyse des transcrits de la MEC du tendon supra-épineux

VIII.1. Extraction des ARNm

Les ARN totaux ont été extraits des tSE prélevés stérilement des rats contrôles et entraînés. Les tSE ont été homogénéisés à l'aide de l'ultra-turrax dans le tampon Trizole contenant du phénol à raison de 1 ml/20-25 mg de tissu et ensuite incubés pendant 30 min dans la glace. Après ajout du chloroforme (200 µl/1 ml de Trizol), le mélange a été incubé 5 min et centrifugé à 12000 rpm pendant 15 min à 4 °C. La phase aqueuse a été prélevée et transférée dans un nouveau tube, puis les ARN ont été précipités à l'isopropanol (500 µl/1 ml de Trizol) pendant 10 min à température ambiante ou 30 min à 4° C. Après centrifugation le culot contenant les ARN a été lavé 3 fois à l'éthanol 70 % et solubilisé dans l'eau RNase free puis conservé à -80 °C jusqu'à leur utilisation. La qualité et la quantité des ARN ont été déterminées en mesurant l'absorbance à 260 et 280 nm. Une électrophorèse sur gel d'agarose

à 2 % a été réalisée avant de débiter la RT-PCR, ce qui a permis de contrôler si les ARN totaux extraits étaient dégradés ou pas.

VIII.2. RT-PCR semi-quantitative ; Transcription inverse-réaction en poly-chaîne

Après extraction, 1 µg d'ARN totaux ont été rétrotranscrits en ADNc à l'aide de 200 UI d'une enzyme appelée la transcriptase inverse Superscript II selon la méthode décrite par le fournisseur. La PCR a été ensuite réalisée avec 3 µl d'ADNc dans un volume final de 50 µl pour chaque échantillon contenant 1.5 mM de MgCl₂, 0.1 mM de dNTP, 1 µM de chaque amorce sens et anti-sens et enfin 1 UI de Taq-polymérase. La liste des amorces utilisées est présentée dans le tableau ci-dessous. Les réactions d'amplification ont été réalisées à l'aide d'un thermocycler Perkin-Elmer GeneAmp 9600. La méthode PCR semi-quantitative a été validée par des expériences préliminaires qui ont permis d'établir les conditions optimales (température d'hybridation des amorces et nombre de cycle) pour chaque molécule étudiée. Le produit de PCR a été ensuite soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 2 % contenant 0.5 mg/ml de bromure d'éthidium. Les gels ont été photographiés à l'aide d'un système d'acquisition Chimigenius (Syngene, Cambridge, RU) et l'intensité des bandes a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ (Rasband 1997-2009).

Gènes	Amorces	Séquences	T° d'hybridation	Cycles (T°)	Produits (bp)
Collagène 1α1	sens	5'-CTGCTGGTCTTAAGGGAGAG-3'	62	35	372
	Anti-sens	5'-CAATACCAGGAGCACCATTG-3'			
Collagen 2α1	sens	5'-GGAAGAGCGGAGACTACTGG-3'	64	40	390
	Anti-sens	5'-CCCTCATCTCCACATCATTG-3'			
Collagen 3α1	sens	5'-GGATTCCCTGGATCTCCTGGTG-3'	62	35	309
	Anti-sens	5'-TCCTGGCTCTCCCTTTGCTC-3'			
Collagen 6α1	sens	5'-ATACCGGCGCAATTTACGGC-3'	64	40	311
	Anti-sens	5'-AACCTTCTCTCCACGGCTTCC-3'			
Decorin	sens	5'-GGAATGAAGGGTCTCGGATA-3'	62	35	394
	Anti-sens	5'-GACTCACGGCAGTGTAGGAA-3'			
Biglycan	sens	5'-TGTCTTTTGGCTGCCACTGC-3'	64	40	350
	Anti-sens	5'-AACACGCCCTTGGGCACTTTG-3'			
Fibromoduline	sens	5'-GCTCTGGGCTCCTACTCCTT-3'	62	35	450
	Anti-sens	5'-GTCCTGCCATTCTGAGGTGT-3'			
Versican	sens	5'-AGACATGATGGGAAGGAAG-3'	64	40	351
	Anti-sens	5'-AGAGGGAAGCATGTCTGGTT-3'			
Aggrecan	sens	5'-CTGGCATTACGTTTGTGGAC-3'	64	40	374
	Anti-sens	5'-AGCAGTAGGAGCCAGGGTTA-3'			
CHST14	sens	5'-CGCAGTGACTTGGTGTCTTCT-3'	64	40	363
	Anti-sens	5'-ATCAGCTCCAGCCTCTCAT-3'			

SOX9	sens	5'-ATGACCGACGAGCAGGAGAAGG-3'	64	40	370
	Anti-sens	5'-CGTTGTGCAGATGCGGGTACTG-3'			
HARP	sens	5'-TCGTCCCAGCAATACCAGCAGC-3'	62	35	390
	Anti-sens	5'-ACAGTCGGCATTGTGCAGAGC-3'			
Ténomoduline	sens	5'-TGGGTGGTCCCACAAGTGAAG-3'	62	35	255
	Anti-sens	5'-GCAAGGCATGATGACACGACAG-3'			
MT1-MMP	sens	5'-CCTGCCTGCATCCATCAACAC-3'	58	35	317
	Anti-sens	5'-CCATGAATGAGCCTCTGGGAGAC-3'			
MMP-2	sens	5'-TATGGGAACGCTGATGGCGAG-3'	58	35	388
	Anti-sens	5'-TGAAGGGGAAGACACATGGGG-3'			
TIMP-2	sens	5'-AAGCAGTGAGCGAGAAGGAGG-3'	62	35	348
	Anti-sens	5'-ATGGGATCATAGGGCAGCGTG-3'			
EMMPRIN	sens	5'-CGTGTTCACATCCATGCCACC-3'	62	35	301
	Anti-sens	5'-GTACCTGCCACCTCTCATCCAG-3'			
TFIID	sens	5'-CGTCTAGTGGCCCAGATCTGT-3'	60	30	347
	Anti-sens	5'-CGGTAGGCATCTTGATTGTCA-3'			

Tableau 11. Liste et détails des amorces utilisées pour les réactions d'amplification PCR.

IX. Analyse de la composition protéique des tendons

IX.1. Extraction des protéines totales

Les protéines totales ont été extraites des tSE prélevés stérilement des rats contrôles et entraînés. Tout d'abord, les tSE ont été coupés en petits morceaux (1 mm²) et homogénéisés à l'aide de l'ultra-turrax à raison de 500 µl/20-25 mg de tissu dans un tampon RIPA d'extraction (60mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,1 % SDS, 1 % désoxycholate de sodium, 1 % Triton X-100 et 1 % mélange inhibiteur de protéases, pH 7.5). Les échantillons ont été ensuite lysés à 4 °C pendant toute une nuit puis centrifugés. Après la centrifugation à 12000 g pendant 15 min, le surnageant a été récolté et son contenu en protéine a été dosé selon la méthode du kit BCA de Bradford en utilisant le SAB comme gamme étalon.

IX.2. Western blot

Le principe de cette technique est de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire sur un gel de polyacrylamide en présence de dodécyle sulfate de sodium (PAGE-SDS) selon la méthode décrite par Laemmli UK en 1970 (Laemmli 1970). Un gel de polyacrylamide est préparé à une concentration dépendante de la molécule étudiée (de 6 % à 10 %, Tris-HCl 0.375 M, SDS 0.1 % (p/v), APS 0.05 % (p/v), TEMED 0.05 % (v/v), pH 8.8). 20 à 30 µg de protéines totales de chaque échantillon ainsi qu'un témoin de masse moléculaire ont été déposés dans le gel. Le gel a été alors soumis à une tension de 50 V pendant 30 min puis de 100 V pendant 1 h 30 min permettant ainsi la concentration et la

migration des protéines (tampon de migration : Tris 25 mM, SDS 0.1 % (p/v), glycine 192 mM, pH 8.3). Après migration, le gel d'électrophorèse a été équilibré 15 min dans le tampon de transfert (Tris 48 mM, Glycine 39 mM, méthanol 20 % (v/v), pH 8.2) et les protéines ont été alors transférées par un courant de 90 mA pendant toute la nuit à 4 °C sur une membrane de polyvinylidifluorure (PVDF) Immobilon-P à l'aide du système de transfert semi-sec TransBlot SD. Après le transfert, la membrane a été rincée avec le tampon PBS 3 fois pendant 10 min et incubée 1 h sous agitation et à température ambiante en présence de PBS 5 % lait (p/v) en vue de saturer les sites de liaisons non spécifiques. La membrane a été ensuite incubée toute une nuit à 4 °C ou 1 h à température ambiante dans les anticorps suivants pour l'immunorévélation : anti-décorine (pAb, LF-113, 1/5000, donation de Larry Fisher, NIH, Bethesda, MD), anti-versicane (pAb, 1/500, Santa Cruz Bio-technology), anti-aggrécane (pAb, 1/500, Santa Cruz Biotechnology), anti-HARP (pAb, 1/1000, R&D system, Inc), anti-EMMPRIN (pAb, 1/3000, Santa Cruz Biotechnology), anti-GAPDH (mAb, 1/10000, Applied Biosystems) et anti- α -tubulin (pAb, 1/5000, Sigma). Après l'anticorps primaire, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire approprié couplé à la peroxydase.

La révélation a été effectuée par chimioluminescence. L'activité de la peroxydase a été mise en évidence en incubant la membrane avec le substrat de chimioluminescence ECL pendant 1 min. La membrane a été ensuite mise à exposer sur un film photographique pendant 30 sec à 15 min. Enfin, le film photographique a été développé, séché et photographié.

IX.3. Mise en évidence de l'expression et de l'activité des protéinases et de leurs inhibiteurs par la technique de zymographie

IX.3.1. Principe

La présence et l'activité des protéinases est mise en évidence par la technique de zymographie (Overall et Limeback 1988). Cette technique repose sur le principe d'une séparation électrophorétique dans un SDS-PAGE, en milieu non réducteur, où un substrat protéique a été ajouté avant la polymérisation du gel de séparation. L'électrophorèse se déroule de la même façon que pour la technique du Western blot, les protéinases migrent donc en fonction de leur masse moléculaire respective. Après la migration, le SDS est éliminé afin de renaturer les protéinases et le gel est incubé à 37 °C, permettant ainsi la dégradation du substrat par les protéinases. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie et la mise en évidence des protéinases se traduit par des bandes blanches sur fond bleu due à la dégradation du substrat. L'intensité des bandes est proportionnelle à la quantité des protéinases présentes.

Cette technique présente une particularité pour les MMPs, notamment en ce qui concerne les formes pro-enzymatiques. Le passage de la forme pro- à la forme active nécessite la modification de la liaison Zn-Cystéine en une liaison Zn-H₂O. Le SDS dénature la protéinase et supprime l'interaction cystéine-Zn²⁺ activant ainsi les MMPs. Après élimination du SDS, la protéine retrouve sa forme initiale mais elle conserve la liaison Zn-H₂O. L'activation de la MMP se fait alors par un système d'auto-clivage qui élimine le prodomaine. Comme l'activation se fait après l'électrophorèse, la forme pro- conserve sa masse moléculaire apparente plus élevée. La zymographie permet donc de révéler, mais également, de distinguer les formes pro- et les formes actives des MMPs.

IX.3.2. Zymographie en gel de gélatine

Cette zymographie permet de mettre en évidence la présence et l'activité des gélatinases MMP-2 et MMP-9. Le substrat, qui est la gélatine, a été préparé au préalable par dissolution de 1 g pour 100 ml d'eau distillée en chauffant à 50 °C et a été stockée à -20 °C. Avant de préparer le gel, la gélatine a été chauffée à 37 °C pendant 30 min dans un bain-marie. Le gel de polyacrylamide a été ensuite copolymérisé avec 1 mg/ml finale de gélatine. 10 à 20 µg de protéines totales ont été mis en suspension dans le tampon Laemmli 4X (Tris-HCl 62.5 mM, 2 % SDS (p/v), 10 % glycérol (v/v), 0,01 % bleu de bromophénol (p/v), pH 6.8) dans un volume total de 25 µl maximum, sans réduction au β-mercaptoéthanol. Après dépôt des échantillons, la migration a été réalisée dans les mêmes conditions que les gels pour Western blot. Comme témoin positif de la proMMP-2 et de la MMP-2, un volume du milieu de culture des cellules HT1080 a été déposé en parallèle. La zone de linéarité de l'activité enzymatique des gélatinases est obtenue entre 10 et 200 pg d'enzyme (Kleiner et Stetler-Stevenson 1994). Après migration, le gel a été récupéré et rincé 2 fois pendant 30 min dans une solution de lavage contenant 2.5 % (p/v) de Triton X-100. Le Triton X-100 permet d'éliminer le SDS fixé aux protéines et par conséquent de les renaturer. Le gel a été ensuite incubé à 37 °C pendant 24 h à 48 h dans le tampon d'activation composé de Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, Triton X-100 0.02 % (p/v), pH 7.6. Le calcium est nécessaire à l'activation des MMPs, d'où la présence de CaCl₂ dans le tampon d'activation.

Après incubation, le gel a été coloré au bleu de Coomassie G-250 (bleu de Coomassie 0.1 % (p/v), acide acétique 10 % (v/v) et éthanol 40 % (v/v)) pendant 30 min et ensuite décoloré pendant 1 h à l'aide d'une solution de décoloration contenant de l'acide acétique à 7.5 % (v/v) et de l'éthanol à 10 % (v/v). Le gel a été photographié à l'aide d'un système de capture

d'image Scion Image (NIH). La quantification des gélatinases a été réalisée en mesurant la densité des bandes à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images ImageJ (NIH, Bethesda, USA).

IX.3.3. Zymographie inverse en gel de gélatine

Le principe est identique à celui de la zymographie des gélatinases. La zymographie inverse permet de mettre en évidence la présence et l'activité inhibitrice des inhibiteurs naturels des MMPs, les TIMPs. Tout d'abord, 20 ng/ml de MMP-2 ont été activés extemporanément, en présence de 1 mM d'APMA, à 37 °C pendant 30 min. Le gel de polyacrylamide a été ensuite copolymérisé avec 1 mg/ml de gélatine et la MMP-2 activée. Les protéines totales (10 à 20 µg) ont été préparées de la même manière que pour une zymographie des gélatinases. Après migration et rinçage, le gel a été incubé dans le tampon d'incubation à 37 °C pendant 16 h à 24 h. Au cours de l'incubation, la MMP-2 dégrade la gélatine présente dans le gel hormis les zones où les TIMPs sont présents. Par conséquent, seules ces zones apparaissent après coloration du gel au bleu de Coomassie (DeClerck 1988). La zone de linéarité est obtenue entre 10 et 60 pg d'inhibiteur (Oliver *et al.* 1997).

IX.3.4. Zymographie in situ sur une coupe histologique

L'activité gélatinolytique a été détectée en utilisant la DQ-gélatine couplée à la fluorescéine en tant que substrat. Sa dégradation par les MMPs permet de libérer de la fluorescence et ainsi d'évaluer l'activité et l'expression des gélatinases. Des coupes transversales congelées du tSE ont été séchées à l'air pendant 10 min et ensuite rincées avec du PBS à température ambiante. Avant son utilisation, la DQ-gélatine est dissoute à une concentration de 1 mg/ml dans l'eau distillée puis diluée au 1/10 dans 1 % d'agarose (p/v) contenant du DAPI à une concentration de 0.1 µg/ml finale. Après 3 rinçages de 5 min avec du PBS, 20 µl du mélange DQ-gélatine, agarose et DAPI ont été déposés sur les coupes. Après gélification du mélange pendant 20 min à 4 °C, les coupes ont été incubées pendant 30 min à température ambiante dans une chambre humide et à l'abri de la lumière. Pour déterminer la spécificité de l'activité gélatinolytique, une solution de 20 mM d'EDTA (inhibiteur général des MMPs) a été utilisée. Les coupes ont été recouvertes avec 1 ml d'EDTA et pré-incubées pendant 30 min dans une chambre humide pour éviter l'évaporation. Immédiatement après l'incubation, la fluorescence a été détectée à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et une longueur d'onde d'émission de 500-550 nm. Les images ont été obtenues à l'aide d'une caméra CCD monochrome CFW-1310M (Scion, NIH) associée à un microscope BH-2 épifluorescence (Olympus).

IX.4. Membrane anticorps d'un panel de cytokines inflammatoires

L'expression d'un certain nombre de cytokines inflammatoires a été analysée et quantifiée dans des extraits protéiques des tendons supra-épineux contrôles et sur-utilisés en utilisant des membranes RayBio® à anticorps (RayBiotech Inc, Nanterre, France). Les membranes ont été incubées avec 150 µg de protéines totales pendant toute une nuit à 4 °C et ensuite traitées selon le protocole conseillé par le fournisseur. Les membranes ont été scannées à l'aide d'un système de capture d'image Scion Image (NIH) et ensuite analysées par densitométrie à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images ImageJ (NIH, Bethesda, USA). L'intensité du signal a été normalisée par rapport à une moyenne de contrôles positifs.

X. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées selon le test t de Student à l'aide d'un logiciel de statistiques GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, San Diego, CA). Les valeurs calculées sont exprimées en moyenne ± écart type. Chaque expérience a été réalisée en triplicate. Les différences significatives ont été déterminées à une valeur de $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), et $p < 0.05$ (*).

RESULTATS



Le projet de thèse a pour but de mettre en place un modèle animal de tendinose du supra-épineux de la coiffe des rotateurs de l'épaule afin de développer et de valider des outils technologiques préventifs et thérapeutiques. Son objectif principal est d'identifier les événements précoces associés aux altérations du tSE sur-utilisé par des méthodes histologiques et biochimiques afin d'améliorer nos connaissances sur cette pathologie et de mettre en relation ces observations avec les observations cliniques. Les résultats obtenus au cours de cette thèse nous éclairent sur les interactions mécanobiologiques et biomécaniques au niveau du tSE. Ces données devraient être prochainement présentées sous forme d'une maquette numérique 3D qui sera mise au service de la validation des performances d'outils de diagnostic (IRM, expertise ergonomique), préventifs (conception des éléments de l'organisation du poste de travail) et thérapeutiques (appareils de rééducation) afin de faire régresser ce type de tendinopathie chez l'Homme.

Les différents résultats des travaux menés au cours de ce projet de thèse seront exposés sous forme d'articles scientifiques publiés, soumis ou en préparation. Chaque article, constituant le cœur d'un chapitre, sera précédé d'une brève introduction dans laquelle seront explicités le but et les objectifs décrits. Des résultats complémentaires des articles pourront être apportés.

Le premier chapitre portera sur la caractérisation du profil d'évolution histologique et biochimique de certains composants de la MEC qui marquent les débuts du processus pathologique. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux changements quantitatifs et qualitatifs des glycosaminoglycanes (GAGs). Nous avons également cherché à comprendre l'implication possible du facteur de croissance HARP/Pleiotrophine dans les changements observés. Cette partie abordera la question de la relation existant entre la contrainte mécanique et la réponse biologique du tissu tendineux.

La seconde partie portera sur l'évaluation du profil d'expression et/ou d'activités des enzymes impliquées dans le remaniement matriciel (les MMPs), de leurs inhibiteurs spécifiques (les TIMPs) ainsi que de leur inducteur (EMMPRIN/CD147) dans le tSE au cours du protocole de sur-utilisation. Nous chercherons à savoir si le profil inflammatoire change avec les variations des MMPs.

Enfin, la 3^{ème} partie des Résultats présentera une validation du modèle animal utilisé en établissant le profil glycanique de tendons patellaires humains sains et pathologiques. Nous chercherons à établir une relation entre ce profil et le degré pathologique des tendons.

1^{ère} partie : Caractérisation de l'évolution du profil matriciel du tendon supra-épineux au cours de la sur-utilisation et implication possible des GAGs et du facteur de croissance HARP/Pleiotrophine dans cette évolution

Les tendinopathies du supra-épineux, sont généralement dues à une mobilisation répétitive du bras en élévation au dessus de l'articulation de l'épaule. Nous avons vu dans l'introduction de ce manuscrit que les tendinopathies dégénératives chroniques observées chez l'Homme, sont caractérisées par des altérations structurales et biochimiques. Ces altérations incluent une désorganisation des fibres et fibrilles de collagène, une différenciation fibrocartilagineuse du tendon et l'accumulation de GAGs et de certains PGs. Cependant, le moment d'apparition de ces phénomènes est encore mal connu.

Dans cette partie du projet de thèse, nous avons cherché à identifier au cours des phases précoces de la sur-utilisation du supra-épineux le profil d'évolution de certains composants matriciels considérés comme importants mécaniquement et biologiquement, à savoir, les PGs et leurs GAGs associés. Les GAGs participent à l'hydratation et à la lubrification du tendon en réduisant au maximum les forces de friction qui peuvent être générées par le glissement des fibrilles et des fibres de collagène entre elles. Selon leur nature et leur qualité, ils peuvent jouer un rôle important dans le conditionnement de la déformation tissulaire sous la contrainte. Par ailleurs, les PGs se lient à des molécules régulatrices des fonctions cellulaires comme les facteurs de croissance et les cytokines. Les PGs interagissent avec les différentes fibres de collagène, dont les types peuvent évoluer au cours du processus de sur-utilisation. Les caractéristiques collagéniques modifiant également la raideur tissulaire, il était donc important de déterminer également ce profil collagénique du tSE. Nous avons montré dans ce premier article :

- Des changements dans la composition collagénique du tSE au cours du processus de sur-utilisation. En effet, on observe une diminution du collagène de type I et une augmentation du collagène de type II, III et VI à partir de 2 semaines. L'augmentation du collagène de type II est un élément en faveur d'une différenciation chondrocytaire des ténocytes.
- Une augmentation significative des GAGs totaux sulfatés à partir de 4 semaines de sur-utilisation. Cette augmentation perdure encore à 16 semaines. De plus, la

proportion de chaque GAG spécifique par rapport au GAGs totaux varie légèrement. L'augmentation des CS est cohérente avec la différenciation chondrocytaire des ténocytes.

- Une augmentation significative de l'expression des transcrits de la décorine, du biglycane, du versicane et de l'aggrecane à partir de 2 semaines de sur-utilisation. L'augmentation de l'aggrecane confirme la différenciation chondrocytaire des ténocytes.
- La possible implication du facteur de croissance HARP/Pleiotrophine dans ces changements. En effet, on observe une augmentation progressive du niveau de la protéine HARP de 2 à 4 semaines. Les GAGs produits par les tSE sur-utilisés présentent alors une affinité accrue pour HARP améliorant sa biodisponibilité.

L'article présente donc de nouvelles informations concernant l'évolution des GAGs et des PGs au cours des phases précoces de la tendinopathie associée à la sur-utilisation. Nos résultats suggèrent aussi la possible implication du facteur de croissance HARP dans la transformation chondrocytaire des ténocytes.

En outre, nous avons cherché à savoir si ces changements plus subtils dans la composition des GAGs pouvaient être détectés par une analyse des types de disaccharides sulfatés qui les composent. Nous avons montré que les GAGs produits sont formés de disaccharides dont le profil de sulfatation ne change pas de façon notable au cours de la sur-utilisation. Ceci suggère que des changements subtils dans les chaînes, non détectables par la technique utilisée, peuvent avoir des conséquences importantes sur l'environnement matriciel des cellules en modifiant sa composition protéique.

Puisque l'hydratation contribue à la déformation tissulaire et que les GAGs sont des molécules capables de retenir l'eau, nous avons donc cherché à quantifier la masse hydrique globale des tendons à différents temps de la sur-utilisation. Nous n'avons pas décelé de changements significatifs dans la teneur en eau des tSE contrôles et sur-utilisés. Ces résultats n'excluent pas cependant des micro-changements locaux qui pourraient avoir des effets mécaniques sur les cellules du tendon.

I. Article 1

Titre : Alterations of Overused Supraspinatus Tendon : Possible Role of Glycosaminoglycans and HARP/Pleiotrophin in Early Tendon Pathology

Auteurs : Mohamed Attia, Alexander Scott, Arlette Duchesnay, Gilles Carpentier, Louis J Soslowsky, Minh Bao Huynh, Toin H Van Kuppevelt, Camille Gossard, José Courty, Marie-Claude Tassoni et Isabelle Martelly

Date : Juin 2011

Journal : Journal of Orthopaedic Research

Alterations of Overused Supraspinatus Tendon: A Possible Role of Glycosaminoglycans and HARP/Pleiotrophin in Early Tendon Pathology

Mohamed Attia,^{1,2} Alexander Scott,³ Arlette Duchesnay,¹ Gilles Carpentier,¹ Louis J. Soslowsky,⁴ Minh Bao Huynh,¹ Toin H. Van Kuppevelt,⁵ Camille Gossard,⁶ José Courty,¹ Marie-Claude Tassoni,² Isabelle Martelly¹

¹Laboratoire CRRET CNRS EAC 7149, Université Paris-Est Créteil, 61 Av du Général de Gaulle, 94010 Créteil Cedex, France, ²Cogitobio, Département de mécanobiologie, Cachan, France, ³Department of Physical Therapy, Centre for Hip Health and Mobility, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada, ⁴McKay Orthopaedic Research Laboratory, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, ⁵The Department of Biochemistry, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Nijmegen, The Netherlands, ⁶Osteobio, Ecole Supérieure d'Ostéopathie et de Biomécanique Appliquée, Cachan, France

Received 4 February 2011; accepted 23 May 2011

Published online 17 June 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jor.21479

ABSTRACT: Supraspinatus tendon overuse injuries lead to significant pain and disability in athletes and workers. Despite the prevalence and high social cost of these injuries, the early pathological events are not well known. We analyzed the potential relation between glycosaminoglycan (GAG) composition and phenotypic cellular alteration using a rat model of rotator cuff overuse. Total sulfated GAGs increased after 4 weeks of overuse and remained elevated up to 16 weeks. GAG accumulation was preceded by up-regulation of decorin, versican, and aggrecan proteoglycans (PGs) mRNAs and proteins and biglycan PG mRNA after 2 weeks. At 2 weeks, collagen 1 transcript decreased whereas mRNAs for collagen 2, collagen 3, collagen 6, and the transcription factor Sox9 were increased. Protein levels of heparin affine regulatory peptide (HARP)/pleiotrophin, a cytokine known to regulate developmental chondrocyte formation, were enhanced especially at 4 weeks, without up-regulation of HARP/pleiotrophin mRNA. Further results suggest that the increased GAGs present in early lesions may sequester HARP/pleiotrophin, which could contribute to a loss of tenocyte's phenotype. All these modifications are characteristic of a shift towards the chondrocyte phenotype. Identification of these early changes in the extra-cellular matrix may help to prevent the progression of the pathology to more disabling, degenerative alterations. © 2011 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc. *J Orthop Res* 30:61–71, 2012.

Keywords: supraspinatus tendon; proteoglycans; glycosaminoglycans; chondrogenesis; HARP/pleiotrophin

Tendon is composed primarily of type 1 collagen molecules organized into fibrils that constitute the tension-bearing structure in association with biglycan and decorin. Decorin, a small dermatan sulfate (DS) rich proteoglycan (PG) associated with collagen fibrils, regulates their diameter and longitudinal organization into fibers.^{1,2} The collagen fibrils are embedded in the colloid extra-cellular matrix, containing most of the 70–80% tendinous water bound to the compression-bearing sulfated glycosaminoglycans (GAGs) of PGs. Tendon cells are surrounded by versican, a large chondroitin sulfate (CS) rich PG, which buffers load transmitted from the collagen matrix.³ Overuse human chronic degenerative tendinopathy due to repetitive loading is characterized by structural and biochemical alterations including collagen fibrils disarray, separation, and disorganization, fibrocartilaginous cellular metaplasia, GAGs accumulation^{4,5} and PGs variations at mRNA levels and protein content.^{6,7} However tendinopathic biopsies are mostly available at late stages of pathology; knowledge of early pathological events is still incomplete.

A rat model of tendon overuse has been developed that generates changes in histology and mechanical properties reproducing key characteristics of human

supraspinatus tendinopathy.^{8,9} This early experimental tendinosis is associated with collagen fragmentation, GAG accumulation, proliferating tenocytes, and higher expression of cartilage matrix markers mRNA.^{10,11} These events are not primarily mediated by the presence of inflammatory cells, although mRNAs of some inflammatory mediators were detected.¹² Because of their long polysaccharidic anionic chains, GAGs retain water molecules that influence biomechanical tissue environment¹³ and also interact with proteins, such as cytokines, both mechanisms finally regulating tenocyte metabolism. It could thus be hypothesized that changes in GAG composition may be involved in early stages of tendon overuse pathology. These changes may temporarily interfere with the tendon's tensile load-bearing capacity, thus serving as a prelude to subsequent recurring collagen microtears and cell-mediated pathoetiological events.

The rat model appears suitable for studying the time course of early changes in tendon matrix composition and to establish the relationship between chemical and mechanical modulators of cellular phenotype. Our objective was to analyze when, in overused supraspinatus tendon, changes in GAGs composition occur and whether these changes are associated with previously suggested tenocyte phenotypic alterations.

MATERIALS AND METHODS

Rat Running Protocol and Sample Collection

Male Sprague–Dawley rats (500 ± 20 g) (Janvier, Le Genest Saint-Isle, France) were used. Twelve control animals were

Marie-Claude Tassoni and Isabelle Martelly contributed equally to this work.

Correspondence to: Isabelle Martelly (T: +33-1-45171457; F: +33-1-45171816 E-mail: martelly@u-pec.fr)

© 2011 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc.

allowed normal cage activity. Twelve other rats were subjected to daily treadmill downhill running.⁹ After 2 and 4 weeks, control ($n = 6$) and running ($n = 6$) rats were euthanized, and the supraspinatus tendons were dissected free from their muscular and bony attachments, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use for biochemical studies. For immunohistochemistry on fixed rat supraspinatus tendon, paraffin blocks from a previous cohort of rats ($n = 32$) trained according to the same protocol were used.¹¹ At each time (4, 8, 12, and 16 weeks), five running and three control rats were studied. We used these tissue blocks to reduce the required number of animals, following principles of the Canadian Council on Animal Care (192/2002).

GAG Extraction and Quantification

GAG extraction and quantification was performed according to.¹⁴ Aliquots of total GAG extracts were treated with nitrous acid or 0.5 U/ml chondroitinase B (Sigma, St-Quentin-Fallavier, France), and the remaining GAGs was quantified with the same DMMB method. Using these chemical and enzymatic treatments, the heparan sulfate (HS), DS, and CS contents were calculated:

$$\text{HS} = \text{Total GAGs} - \left(\frac{\text{DS}}{\text{CS}}\right); \text{DS} = \text{Total GAGs} - \left(\frac{\text{CS}}{\text{HS}}\right) \text{ and} \\ \text{CS} = \text{Total GAGs} - \text{DS} - \text{HS}.$$

Histological Analysis of Total Sulfated GAG by DMMB Complexation

At each time point, paraffin sections ($7 \mu\text{m}$) were deparaffinized, and DMMB solution was used labeling of total sulfated GAGs on tissue sections after incubation overnight in the dark at room temperature. The labeling was validated using chondroitinase ABC. A CoolSNAP camera (Princeton Instruments; Acton, MA) was used for images acquisition. Image analysis was performed using a color segmentation procedure programmed with ImageJ.¹⁵

Immunolabeling of GAGs and PGs

At each time point, deparaffinized sections were blocked with PBS-BSA 3% (w/v) and incubated overnight with phage display single chain anti-HS, anti-DS, and anti-CS (produced by T. Van Kuppevelt). Bound antibodies were detected with mouse anti-VSV tag IgG antibody P5D4. PGs were detected using anti-decorin, anti-versican, and anti-aggrecan antibodies, followed by Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Fluoprobes Interchim, Montluçon, France). Fluorescence images were obtained using a CCD monochrome camera (CFW-1310M; Scion; Frederick, MD) fitted to a BH-2 epifluorescence microscope (Olympus; Rungis, France).

Protein Extraction and Western Blot Analysis

The frozen supraspinatus tendons were homogenized in RIPA buffer containing 60 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate supplemented with 1/100 protease inhibitor cocktail (Sigma). Tissue was lysed overnight at 4°C then centrifuged at 12,000g for 10 min. Twenty micrograms proteins were analyzed by Laemmli SDS-PAGE (Biorad, Marne la Coquette, France) and then transferred to Immobilon-P PVDF membrane (Millipore, Guyancourt, France) for detection of:

decorin (pAb LF-113, 1/5,000, kind gift from Larry Fisher, NIH, Bethesda, MD), versican (pAb, 1/200, Santa Cruz Biotechnology, Le Perray en Yvelines, France), aggrecan (pAb, 1/100, Santa Cruz Biotechnology), heparin affine regulatory peptide (HARP) (pAb, 1/1,000, R&D system, Inc, Oxon, UK), GAPDH (mAb, 1/10,000, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), and α -tubulin (pAb, 1/5,000, Sigma). Appropriate horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies were visualized with BM chemiluminescence substrate (Roche Diagnostics, Meylan, France).

mRNA Isolation and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from supraspinatus tendons using Trizol reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed on 1 μg mRNA extracts using the SuperScript II RNase H (Invitrogen). The resulting cDNA were used for PCR amplification. Primers were as shown in Table I. The method was validated by preliminary experiments that established the optimal conditions. RT-PCR products were subjected to electrophoresis on 2% (w/v) agarose gels containing 0.5 mg/ml ethidium bromide. Gels were photographed using a Chimigenius system (Syngene, Cambridge, UK) and band intensities were quantified using ImageJ.¹⁵

Heparin Versus GAGs Competition Assay Towards Growth Factors

A competition ELISA using HARP, also called pleiotrophin or fibroblast growth factor-2 (FGF-2) was performed. This assay allows evaluation of the ability of GAGs from tendons, taken as competitor, to prevent the binding of HARP or FGF-2 to heparin.¹⁶ This is a qualitative assay for GAGs, which competitive power depends on their composition. A heparin-BSA complex was coated overnight at 4°C on 96-well plates. Wells were blocked with PBS-BSA 3% (w/v). HARP, or FGF-2 (50 ng/ml) in PBS-BSA 1% (w/v) was added to wells simultaneously with GAGs (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) from each time point. Plates were incubated overnight at 4°C for competition then washed and further incubated for 2 h at room temperature with pAb against HARP or FGF-2 (R&D system, Inc), then incubated for 2 h with the appropriate peroxidase-labeled secondary antibody. Peroxidase activity was determined according to manufacturer's protocol (Thermo Scientific, Brebières, France). Binding of HARP or FGF-2 to heparin in the absence of GAG competitor was defined as 100% binding.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm SD. Means were compared with Student's *t*-test using GraphPad software (San Diego, CA). Significant differences were determined at $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.05$ (*).

RESULTS

Changes in Extra-Cellular Matrix Components in Overused Supraspinatus Tendon

Compared to controls, Col 1 α 1 mRNA expression slightly decreased at 2 weeks, then more substantially at 4 weeks (by ~ 4 fold). Col 2 α 1 transcripts increased progressively from 2 to 4 weeks, whereas Col 3 α 1 and Col 6 α 1 mRNA expressions significantly increased at 2 weeks but returned to the control level at 4 weeks (Fig. 1). Levels of decorin and biglycan transcripts

Table I. Primer Sequences and Products Size

Genes	Primers	Annealing temperature (°C)	Cycles	Product size (bp)
Collagen 1 α 1	5'-CTGCTGGTCCTAAGGGAGAG-3' (forward) 5'-CAATACCAGGAGCACCATTG-3' (reverse)	62	35	372
Collagen2 α 1	5'-GGAAGAGCGGAGACFACFGG-3' (forward) 5'-CCCTCATCTCCACATCATTG-3' (reverse)	64	40	390
Collagen 3 α 1	5'-GATTCCCTGGATCTCCTGGTG-3' (forward) 5'-TCCTGGCTCTCCCTTTGCTC-3' (reverse)	62	35	309
Collagen 6 α 1	5'-ATACCGGCGCAATTTACGGC-3' (forward) 5'-AACCTTCTCTCCACGGCTTCC-3' (reverse)	64	40	311
Decorin	5'-GGAAFGAAGGGTCTCGGAF-3' (forward) 5'-GACFCACGGCAGFTAGGAA-3' (reverse)	62	35	394
Biglycan	5'-TGFCCTTTTGGCTGCCACTGC-3' (forward) 5'-AACACGCCCFTGGGCACTTTG-3' (reverse)	64	40	350
Versican	5'-AGACATGA 1 GGGGAAGGAAG-3' (forward) 5'-AGAGGGAAGCATGTCTGGTT-3' (reverse)	64	40	351
Aggrecan	5'-CIGGCATTACGTTTGTGGAC-3' (forward) 5'-AGCAGTAGGAGCCAGGGTTA-3' (reverse)	64	40	374
CHST14	5'-CGCAGTGACTTGGTGTCT-3' (forward) 5'-ATCAGCTTCCAGCCTCTCAT-3' (reverse)	34	34	363
SOX9	5'-ATGACCGACGAGCAGGAGAAGG-3' (forward) 5'-CGITGIGCAGATGCGGGIACGTG-3' (reverse)	64	40	37
HARP	5'-TCGTCCCAGCAATACCAGCAGC-3' (forward) 5'-ACAGTCGGCATTGTGCAGAGC-3' (reverse)	62	35	390
TFIID	5'-CGTCTAGTGGCCAGATCTGT-3' (forward) 5'-CGGTACIGCAFCTGAFTGFCA-3' (reverse)	60	43	347

increased at both 2 and 4 weeks of overuse compared to controls (Fig. 2a). The levels of mRNA of the large PGs versican and aggrecan also increased at both times (Fig. 2a). The corresponding protein levels increased concomitantly (biglycan could not be tested) (Fig. 3a). These increases persisted for at least 8 weeks (Fig. 3b). The mRNA of transcription factor Sox9 almost absent in controls was highly expressed at 2 weeks and remained high at 4 weeks (Fig. 2b). Table II shows results for all the molecules examined.

Changes in Sulfated GAGs in Overused Tendon

Since overuse enhanced the expression of several PGs, we examined the amount and composition of GAGs in overused tendons and control animals (Fig. 4 and Table II). Whereas after 2 weeks of running the amount of total sulfated GAGs measured biochemically was not significantly altered compared to controls, it increased by almost three times in 4 weeks-overused tendons (Fig. 4a). This increase was also observed by histology. The high level of sulfated GAGs observed at 4 weeks then decreased progressively but still remained significantly higher than in controls at 16 weeks (Fig. 5). In controls, the main GAG species was DS (~80%), whereas HS or CS each represented ~10% of total GAG (Fig. 4a). In overused tendons, the proportion of CS slightly increased whereas that of DS decreased at 2 weeks, and more at 4 weeks (Fig. 4a). However, these GAG species increased by ~2.5-fold at

4 weeks and thus accounted for the observed GAG accumulation. This was corroborated by the increase in the 4S sulfotransferase (CH4ST) mRNA as early as 2 weeks (Fig. 4b); CHST14 is specifically involved in DS synthesis.

The use of phage display antibodies against HS, CS, and DS showed a labeling of parallel long stripes located between collagen fibers in the environment of tenocytes (Fig. 6). The enhanced CS and DS labeling compared to controls at 4 weeks was still visible at 8 weeks. Altogether, GAGs accumulation appeared to correspond to the observed increase in transcripts and core protein of PGs.

HARP Protein is Enhanced and Sequestered in Overused Supraspinatus Tendon

HARP is well known as a chondrogenesis promoting factor during development. Although the level of HARP transcript was not altered during the first 4 weeks of training, the protein level was increased up to threefold in tendon extracts at 2 and 4 weeks (Fig. 7a). Since HARP has affinity to HS/DS GAG species,¹⁷ we investigated the possibility that GAG composition and affinity to HARP was altered in overused tendons.

One possibility to detect such qualitative GAG changes towards HARP is to perform an ELISA competition assay based on the ability of GAGs from tendons, taken as competitor, to prevent the binding of

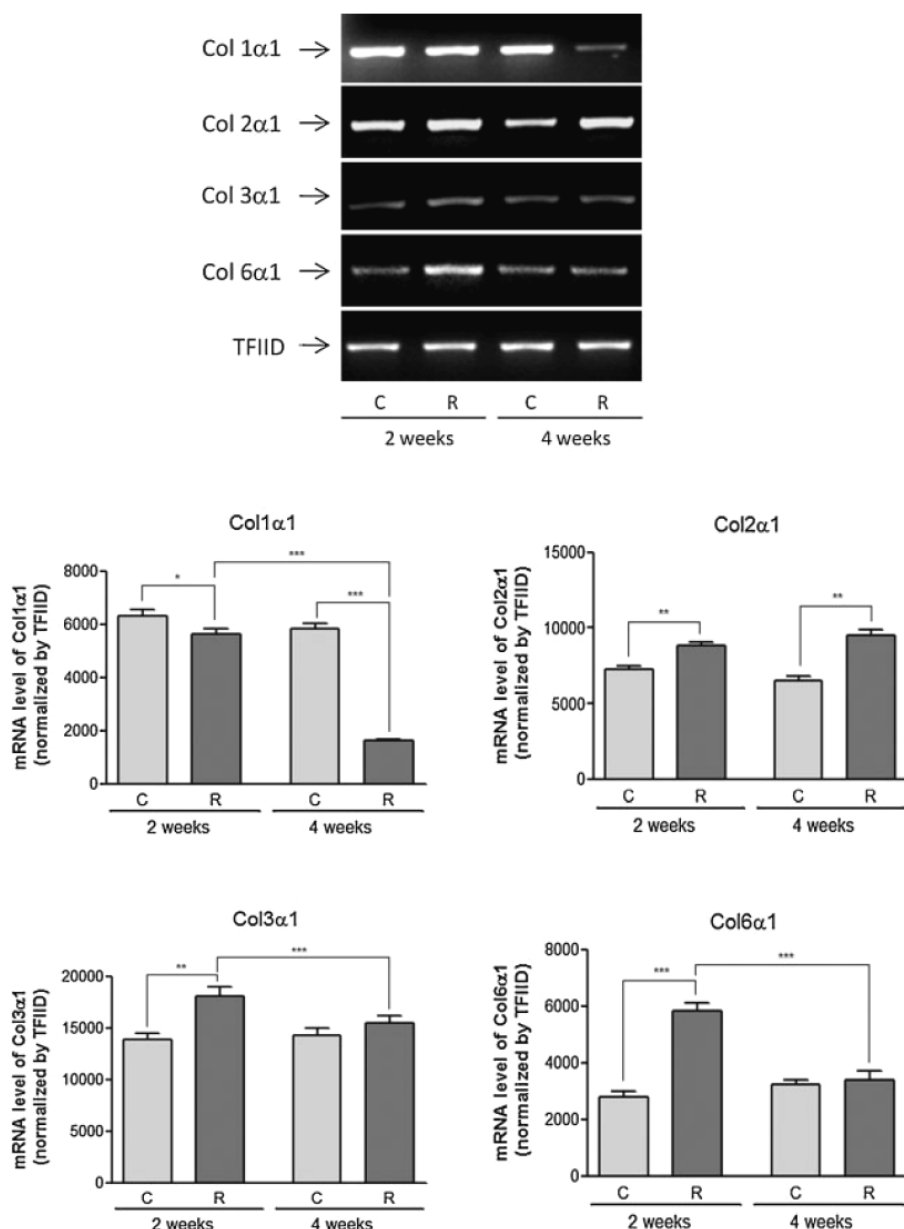


Figure 1. Expression of different collagens in overused supraspinatus tendons (R) compared to controls (C). Col 1α1, 2α1, 3α1, and 6α1 mRNA levels were determined by semi-quantitative RT-PCR. TFIID was used as an internal control. Results are representative of six tendons from three rats.

HARP to heparin. As comparison, similar test was conducted in the presence of FGF-2. GAGs from either controls or overused tendons prevented FGF-2 binding to heparin by <10%, whereas they reduced by 20% the binding of HARP to heparin at 2 weeks of overuse. Thus, these GAGs displayed a low affinity for FGF-2. In contrast, GAGs from tendons at 4 weeks reduced the binding of HARP to heparin by 50% (Fig. 7b).

These results demonstrate that GAG affinity for HARP from overused tendons increased from 2 to 4 weeks in comparison to controls.

DISCUSSION

Understanding early biological events, which may evolve towards extensive injury-repair processes, is necessary to prevent the development of disabling

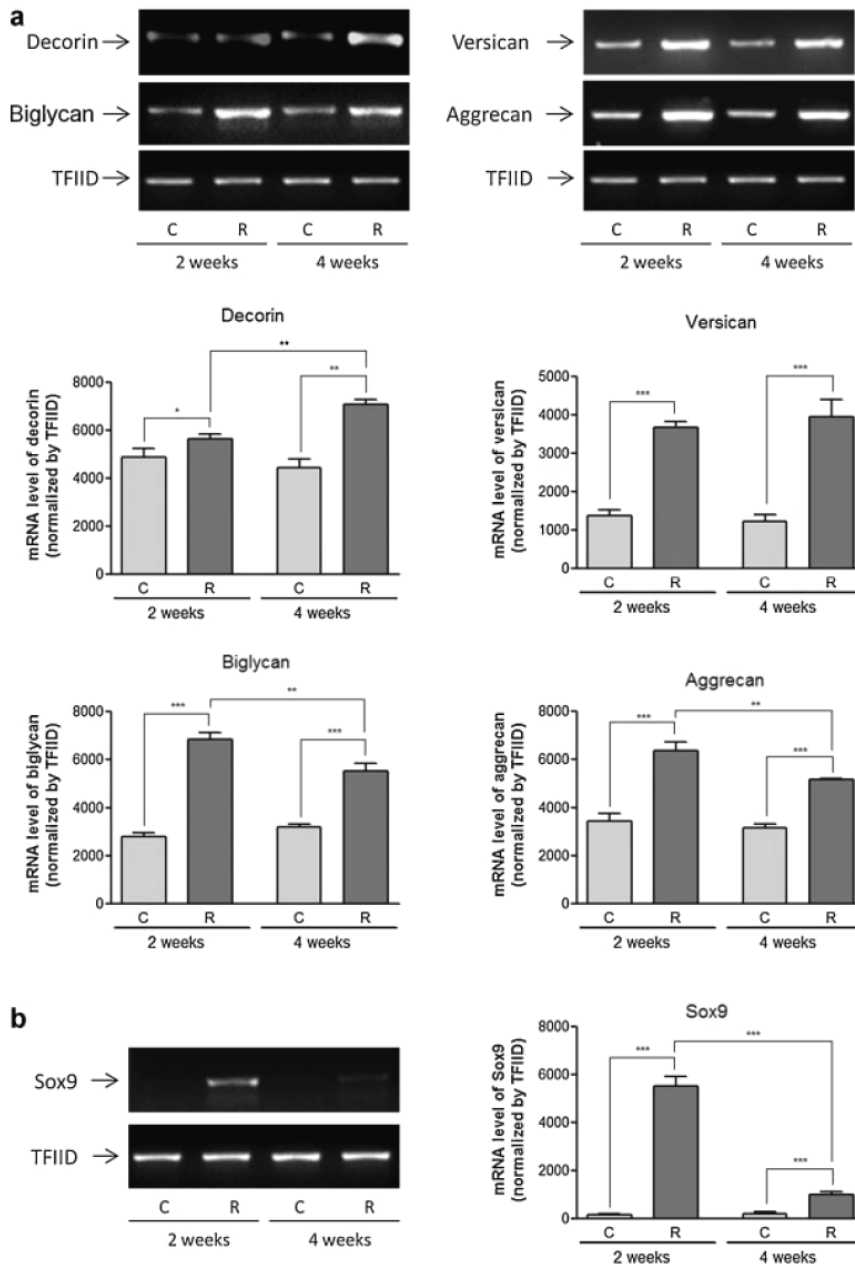


Figure 2. Expression of PGs in overused tendons compared to control. mRNA levels of decorin, biglycan, versican, aggrecan (a), and Sox9 (b) were determined by semi-quantitative RT-PCR. TFIIID was used as an internal control. Results are representative of six tendons from three rats.

tendinopathy pathology. We used a rat overuse rotator cuff model to analyze early changes in GAGs, PGs, and collagen composition related to phenotypic cellular alteration. Total sulfated GAG significantly increased after 4 weeks in overused tendons but not at an earlier time point. This increase lasted up to 16 weeks

as shown by histology. The increase followed up-regulations at 2 weeks of the PGs transcripts of decorin, biglycan, versican, and aggrecan, which characterizes cartilage tissue. At this time point, collagen 2, collagen 3, and especially collagen 6 mRNAs were also up-regulated, whereas collagen 1 transcript

Table II. Overview Changes of all Analyzed Molecules

Molecules	Runners 2 weeks versus controls	Runners 4 weeks versus controls
Collagens		
1 α 1 mRNA	-	--
2 α 1 mRNA	+	+
3 α 1 mRNA	+	=
6 α 1 mRNA	++	=
Decorin		
mRNA	+	++
Protein	=	++
Biglycan		
mRNA	++	++
Versican		
mRNA	++	++
Protein	=	++
Aggrecan		
mRNA	++	++
Protein	++	++
SOX9		
mRNA	++	+
Glycosaminoglycans		
Total	=	++
DS	=	++
CS	=	+
HS	=	=
CHST14	++	=
HARP		
mRNA	=	=
Protein	+	++

Levels of expression; - or --: less, =: equivalent, + or ++: more than controls.

decreased from 2 to 4 weeks. Interestingly, the transcription factor Sox9, known to regulate chondrogenesis, was also highly up-regulated as early as 2 weeks. These molecular alterations were characteristic of a phenotypic shift of tendon cells toward chondrogenesis as observed previously study.¹⁰

Biochemical data show that in tendons, the main GAG species is DS. At 4 weeks, overused tendons, DS, and CS GAGs species both accounted for GAGs accumulation, and their respective proportions slightly changed. These results differ from those in human post mortem supraspinatus tendon in which CS was found as the most abundant GAG species.¹⁸ This discrepancy might arise from different biomechanical environments of rat and human tendons or from recent improvements in the technology used to discriminate GAG species. The increase in total sulfated GAGs was preceded in time by up-regulations of both small (decorin and biglycan) and large PGs (versican and aggrecan), these biochemical and molecular data being obtained from the whole tendon. Changes in PGs and GAGs expressions in overused tendon may be part of an adaptive response to local modifications of compression-elongation exerted on tenocytes. One might argue that up-regulation of decorin and versican

would occur in the tensile region, whereas the up-regulation of biglycan and aggrecan would occur in the osteotendinous fibrocartilaginous region. Alternatively, a shift of tendon to fibrocartilage may occur with overuse. Histology at 8 weeks of overuse showed that GAGs increased at the middle part of the tendon along with pericellular labeling of CS, versican, and aggrecan. These observations are in favor of chondrocyte metaplasia in the middle part of the tendon, known to be the most altered region with overuse.¹¹

Alterations of collagens with overuse, particularly of collagen 2, confirm the fibrocartilaginous alteration in the pericellular matrix. Collagen 6 accumulation is also a feature of chondrogenesis,¹⁹ forming a hexagonal network organized by biglycan²⁰ and connecting with collagen 2 fibers, aggrecan, decorin, and biglycan serving as adaptors.²¹ The chondrogenic transcription factor Sox9, which increased 2 weeks of overuse, is up-regulated in tendon cells in association with mechanical stress²² or cyclic hydrostatic pressure.²³ It can be also induced in tendon cells by TGF- β .²⁴

We further examined which cytokines might promote chondrogenesis in overused tendon. Several cytokines, including TGF- β or FGF family members, involved in developmental chondrogenesis,²⁵ are altered in overused supraspinatus tendon.²⁶ Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) is another cytokine that more specifically increases in longer term mechanically loaded tendons (>4 weeks) and may favor tenocytes proliferation and survival.¹¹ Our results suggest that another growth factor, HARP, may also be involved in the observed change in tendon phenotype. The amount of HARP protein was increased in overused tendons especially at 4 weeks. Changes in HARP protein was probably a local response of cells, presumably tenocytes, to overuse, since the amount of HARP did not increase in blood plasma (data not shown). Whereas HARP transcript was not increased, the increased amount of HARP protein, in keeping with Western blot data, suggested an enhanced sequestration of this growth factor in extra cellular matrix with overuse. The overall proportions of GAG species changed slightly with overuse, but subtle changes in the structure of GAG molecules may have also occurred. Using competitive ELISA technique, we showed that indeed GAGs from overused tendons at 4 weeks present an increased affinity for HARP protein compared to controls. Interestingly, GAG affinity for FGF-2 was not altered with overuse. An increased expression of the *N*-galactosamine 4-*O*-sulfotransferase transcript (CHST14) was also observed at 2 weeks. This increase, which probably leads to higher enzymatic activity, might contribute to an over-sulfation of CS/DS GAGs with a resulting higher affinity to HARP.²⁷ This might contribute to an enhanced sequestration of HARP in the matrix.

Since it could not be excluded that the up-regulation of HARP could be secondary to overuse, it can be hypothesized that HARP is, at least partially,

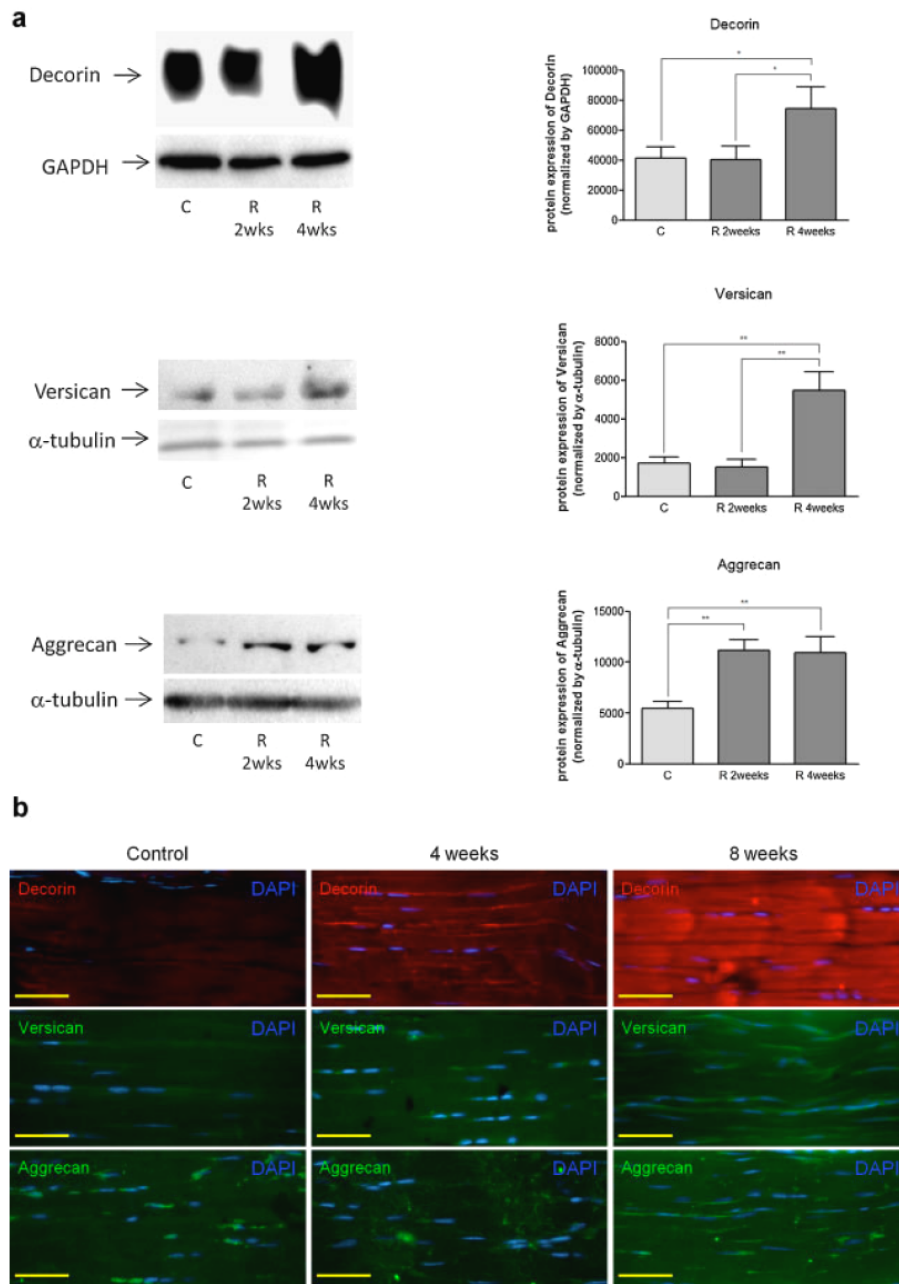


Figure 3. Western blots analysis in control and overused tendons at 2 and 4 weeks (a) and immunolabeling at 4 and 8 weeks (b) of decorin, versican, and aggrecan. GAPDH or α -tubulin were used as loading controls. Results are representative of six tendons from three rats. Scale bar 50 μ m.

the cause of increased GAGs, collagen type 2, and PGs such as biglycan as observed in bovine cartilage²⁸ or in human fibroblasts.²⁹ Indeed this cytokine is known to be involved in chondrogenesis during development.³⁰ Our results are the first to indicate the role of HARP in adult tendon. Further studies are ongoing to clarify

its role in a tenocyte phenotypic shift to chondrocyte phenotypes.

In conclusion, we present new information on the role of GAGs and HARP in early molecular events associated with supraspinatus tendon overuse. In the context of high frequency repeated mechanical loading,

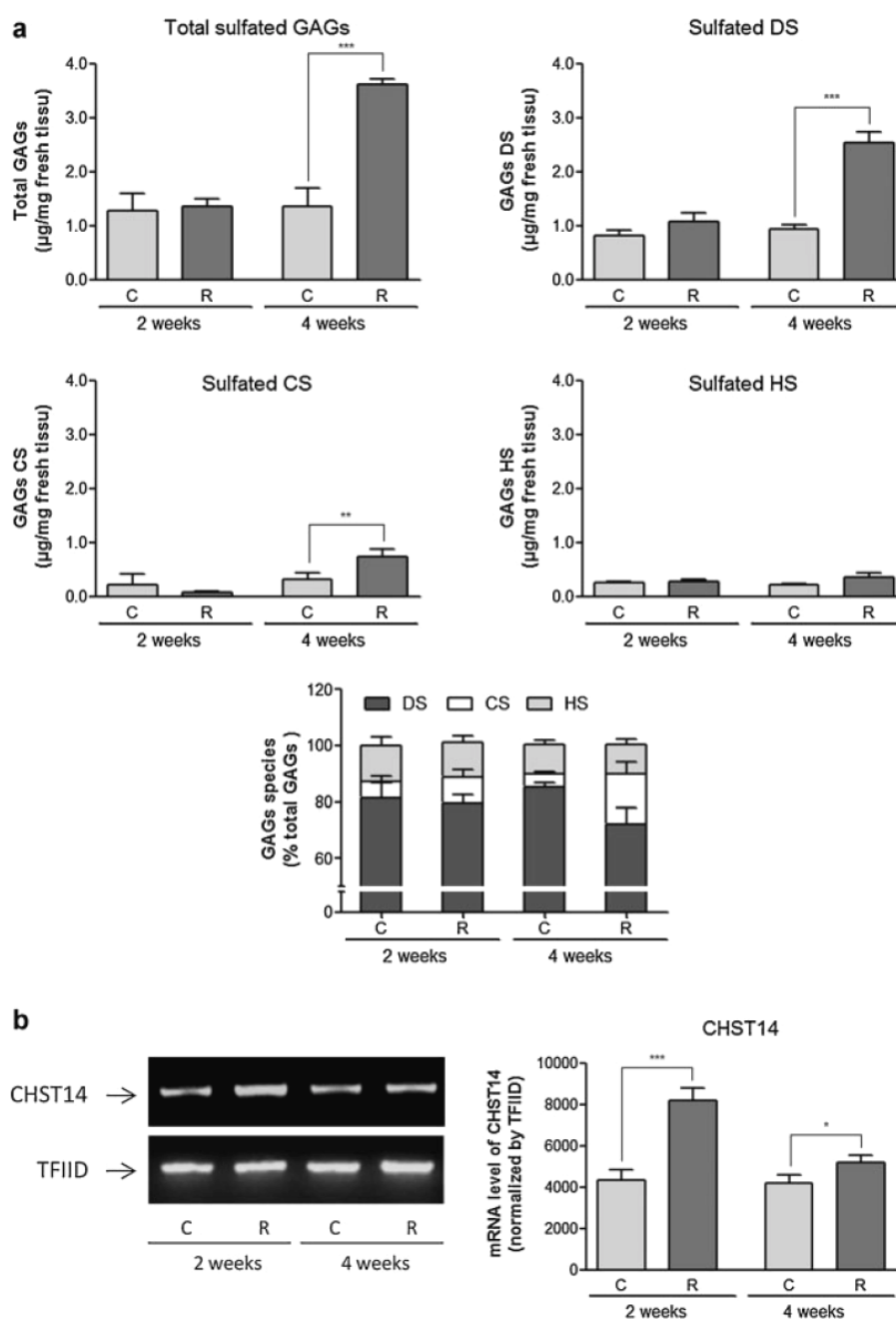


Figure 4. Sulfated GAGs quantification in controls and overused tendons. Total GAGs, DS, CS, and HS were quantified as detailed in the text. GAGs species shown as amount and percent of total GAGs (a). mRNA levels of dermatan 4-*O*-sulfotransferase 1 (CHST14) (b). TFIID was used as an internal control for RT-PCR. Results are representative of six tendons from three rats.

the increase in amount and sulfation of GAGs may enhance the water retention and thus the viscoelasticity of the tendon.¹ These responses may cause an imbalance in the synthesis and degradation of matrix

components, eventually leading to structural alterations and degeneration of tendon. Anticipated detection of these events, some of which may be reversible, could help to develop injury prevention strategies.

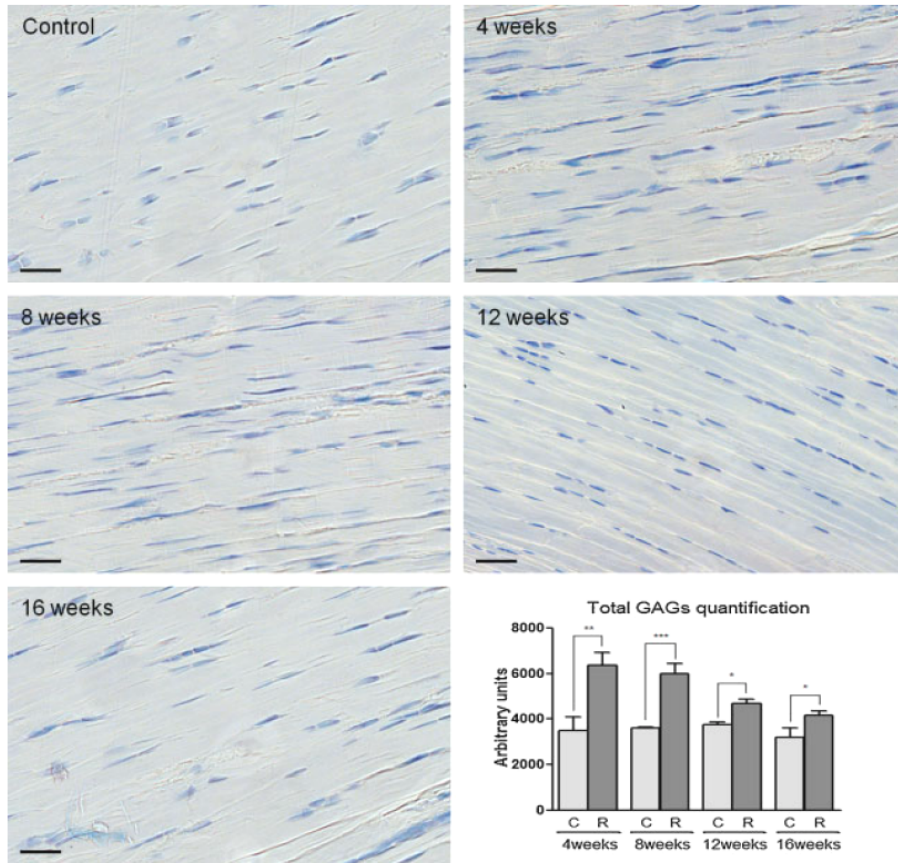


Figure 5. Total sulfated GAGs in supraspinatus tendons after long term training (4, 8, 12, and 16 weeks). Results are representative of 10 runners and 6 controls tendons for each time point from different rats. Scale bar 50 μ m.

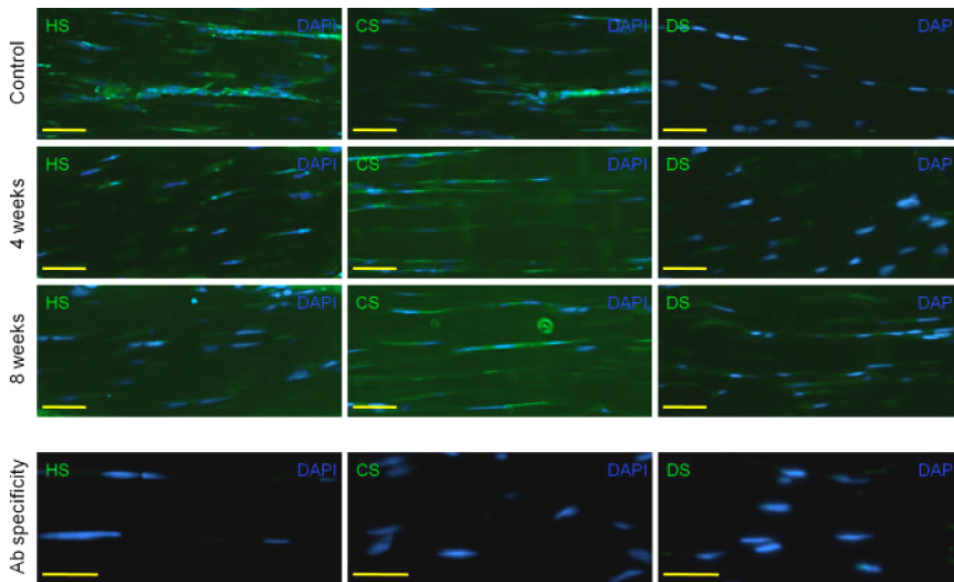


Figure 6. Immunolabeling of HS, CS, and DS in long term of training (4 and 8 weeks) using phage display antibodies (Ab). Ab specificity was checked by enzymatic or chemical treatments. Nuclei were stained with DAPI. Results are representative of 10 runners and 6 controls tendons for each time point from rats. Scale different bar 50 μ m.

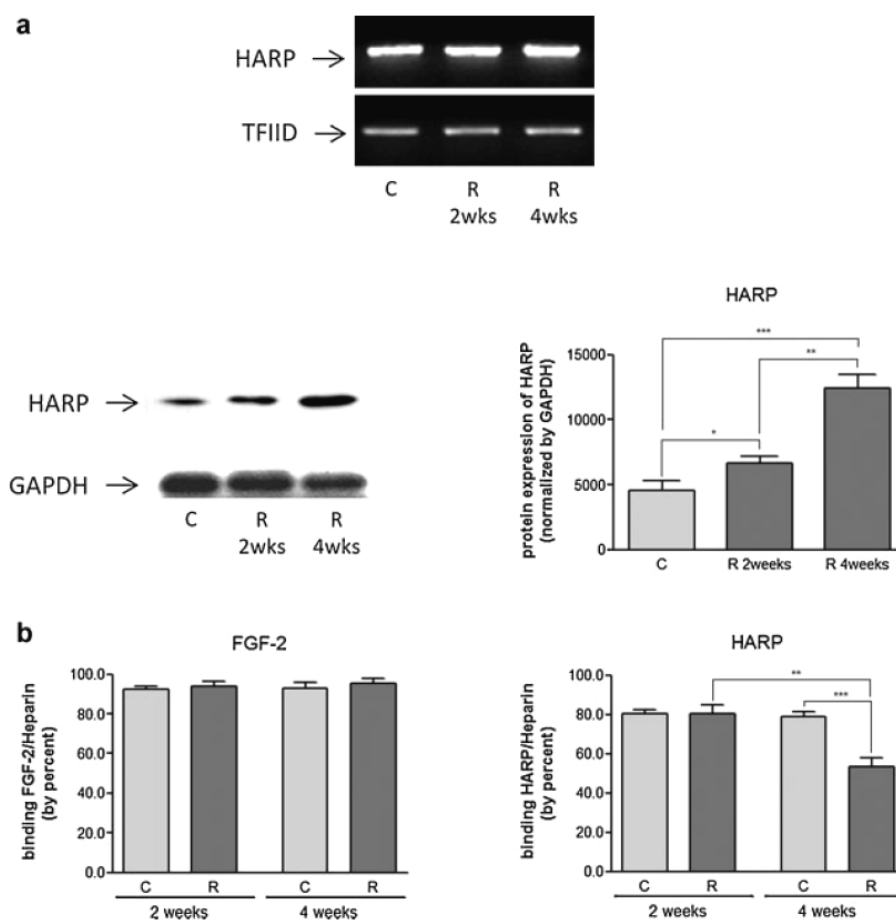


Figure 7. Expression of HARP at 2 and 4 weeks of overuse at transcript and protein levels. TFIID and GAPDH were used as loading controls (a). Data represent the amounts of FGF-2 or HARP that bind to heparin in the presence of GAGs taken as a competitor (b). For each time point, data acquired in triplicate are from six tendons from three rats.

ACKNOWLEDGMENTS

Mohamed Attia has PhD financial support from COGITOBIO and ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie). Alexander Scott received support from the Michael Smith Foundation for Health Research. We thank Eric Huet, Suzanne Menashi, Dulce Papy-Garcia, and Jean Delbé for their valuable discussions and help.

REFERENCES

1. Scott JE. 2003. Elasticity in extracellular matrix 'shape modules' of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model. *J Physiol* 553:335–343.
2. Keene DR, San Antonio JD, Mayne R, et al. 2000. Decorin binds near the C terminus of type I collagen. *J Biol Chem* 275:21801–21804.
3. Ritty TM, Roth R, Heuser JE. 2003. Tendon cell array isolation reveals a previously unknown fibrillin-2-containing macromolecular assembly. *Structure* 11:1179–1188.
4. Cook JL, Feller JA, Bonar SF, et al. 2004. Abnormal tenocyte morphology is more prevalent than collagen disruption in asymptomatic athletes' patellar tendons. *J Orthop Res* 22:334–338.
5. Chard MD, Cawston TE, Riley GP, et al. 1994. Rotator cuff degeneration and lateral epicondylitis: A comparative histological study. *Ann Rheum Dis* 53:30–34.
6. Samiric T, Parkinson J, Ilic MZ, et al. 2009. Changes in the composition of the extracellular matrix in patellar tendinopathy. *Matrix Biol* 28:230–236.
7. Yoon JH, Halper J. 2005. Tendon proteoglycans: Biochemistry and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5: 22–34.
8. Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, et al. 1996. Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg* 5:383–392.
9. Soslowsky LJ, Thomopoulos S, Tun S, et al. 2000. Neer Award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: A histologic and biomechanical study. *J Shoulder Elbow Surg* 9:79–84.
10. Archambault JM, Jelinsky SA, Lake SP, et al. 2007. Rat supraspinatus tendon expresses cartilage markers with overuse. *J Orthop Res* 25:617–624.
11. Scott A, Cook JL, Hart DA, et al. 2007. Tenocyte responses to mechanical loading in vivo: A role for local insulin-like

- growth factor 1 signaling in early tendinosis in rats. *Arthritis Rheum* 56:871–881.
12. Perry SM, McIlhenny SE, Hoffman MC, et al. 2005. Inflammatory and angiogenic mRNA levels are altered in a supraspinatus tendon overuse animal model. *J Shoulder Elbow Surg* 14:79S–83S.
 13. Vogel KG. 2003. Tendon structure and response to changing mechanical load. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 3:323–325, discussion 333–324.
 14. Barbosa I, Garcia S, Barbier-Chassefiere V, et al. 2003. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* 13:647–653.
 15. Rasband W. 1997–2009. Image J. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
 16. Najjam S, Gibbs RV, Gordon MY, et al. 1997. Characterization of human recombinant interleukin 2 binding to heparin and heparan sulfate using an ELISA approach. *Cytokine* 9:1013–1022.
 17. Vacherot F, Delbe J, Heroult M, et al. 1999. Glycosaminoglycans differentially bind HARP and modulate its biological activity. *J Biol Chem* 274:7741–7747.
 18. Riley GP, Harrall RL, Constant CR, et al. 1994. Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: Changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis* 53:367–376.
 19. Vigfusdottir AT, Pasrija C, Thakore PI, et al. 2010. Role of pericellular matrix in mesenchymal stem cell deformation during chondrogenic differentiation. *Cell Mol Bioeng* 3:387–397.
 20. Wiberg C, Heinegard D, Wenglen C, et al. 2002. Biglycan organizes collagen VI into hexagonal-like networks resembling tissue structures. *J Biol Chem* 277:49120–49126.
 21. Wiberg C, Klatt AR, Wagener R, et al. 2003. Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. *J Biol Chem* 278:37698–37704.
 22. Thomopoulos S, Das R, Birman V, et al. 2010. Fibrocartilage tissue engineering: The role of the stress environment on cell morphology and matrix expression. *Tissue Eng Part A* 17:1039–1053.
 23. Shim JW, Elder SH. 2006. Influence of cyclic hydrostatic pressure on fibrocartilaginous metaplasia of achilles tendon fibroblasts. *Biomech Model Mechanobiol* 5:247–252.
 24. Lorda-Diez CI, Montero JA, Martinez-Cue C, et al. 2009. Transforming growth factors beta coordinate cartilage and tendon differentiation in the developing limb mesenchyme. *J Biol Chem* 284:29988–29996.
 25. Quintana L, zur Nieden NI, Semino CE. 2009. Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: New paradigms for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 15:29–41.
 26. Molloy TJ, Kemp MW, Wang Y, et al. 2006. Microarray analysis of the tendinopathic rat supraspinatus tendon: Glutamate signaling and its potential role in tendon degeneration. *J Appl Physiol* 101:1702–1709.
 27. Maeda N, Fukazawa N, Hata T. 2006. The binding of chondroitin sulfate to pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule is regulated by chain length and over-sulfated structures. *J Biol Chem* 281:4894–4902.
 28. Tapp H, Hernandez DJ, Neame PJ, et al. 1999. Pleiotrophin inhibits chondrocyte proliferation and stimulates proteoglycan synthesis in mature bovine cartilage. *Matrix Biol* 18:543–556.
 29. Yamada H, Inazumi T, Tajima S, et al. 1997. Stimulation of collagen expression and glycosaminoglycan synthesis by midkine in human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 289:429–433.
 30. Dreyfus J, Brunet-de Carvalho N, Duprez D, et al. 1998. HB-GAM/pleiotrophin: Localization of mRNA and protein in the chicken developing leg. *Int J Dev Biol* 42:189–198.

II. Résultats complémentaires

Afin de compléter les résultats ci-dessus, des expériences supplémentaires ont été menées concernant les changements moléculaires matriciels et leur induction dans le tSE.

II.1. Localisation du collagène de type III du tSE au cours des phases précoces de sur-utilisation

Nous avons montré qu'une tendinopathie du supra-épineux induite par la sur-utilisation est associée au cours des phases précoces à une diminution significative du niveau des transcrits du collagène de type I et une augmentation des collagènes de type II, III et VI, ce qui produit une désorganisation collagénique.

Le collagène de type III est constitué de plus petites fibres moins bien organisées et moins épaisses que celles du collagène de type I. C'est un collagène souple, il supporte moins les forces de traction que le collagène de type I, cependant il est adapté à des sollicitations en cisaillement. Dans un tendon sain, le collagène de type III est principalement localisé dans l'endoténon inter-fasciculaire, cependant l'augmentation de son expression à l'intérieur des faisceaux de fibres indiquerait une lésion tendineuse et un remodelage matriciel important. Nous avons donc cherché à déterminer si sa localisation était modifiée au cours de la sur-utilisation. Dans les tendons contrôles, lorsque le niveau d'expression des transcrits du collagène de type III est bas (Cf. Article I), le niveau histologique est faible également. Le marquage du collagène III semble augmenter à 2 semaines de sur-utilisation et semble perdurer jusqu'à 4 semaines ([Figure 31](#)). Le marquage montre également que le collagène de type III est principalement localisé autour des fibres de collagène de type I (flèche blanche).

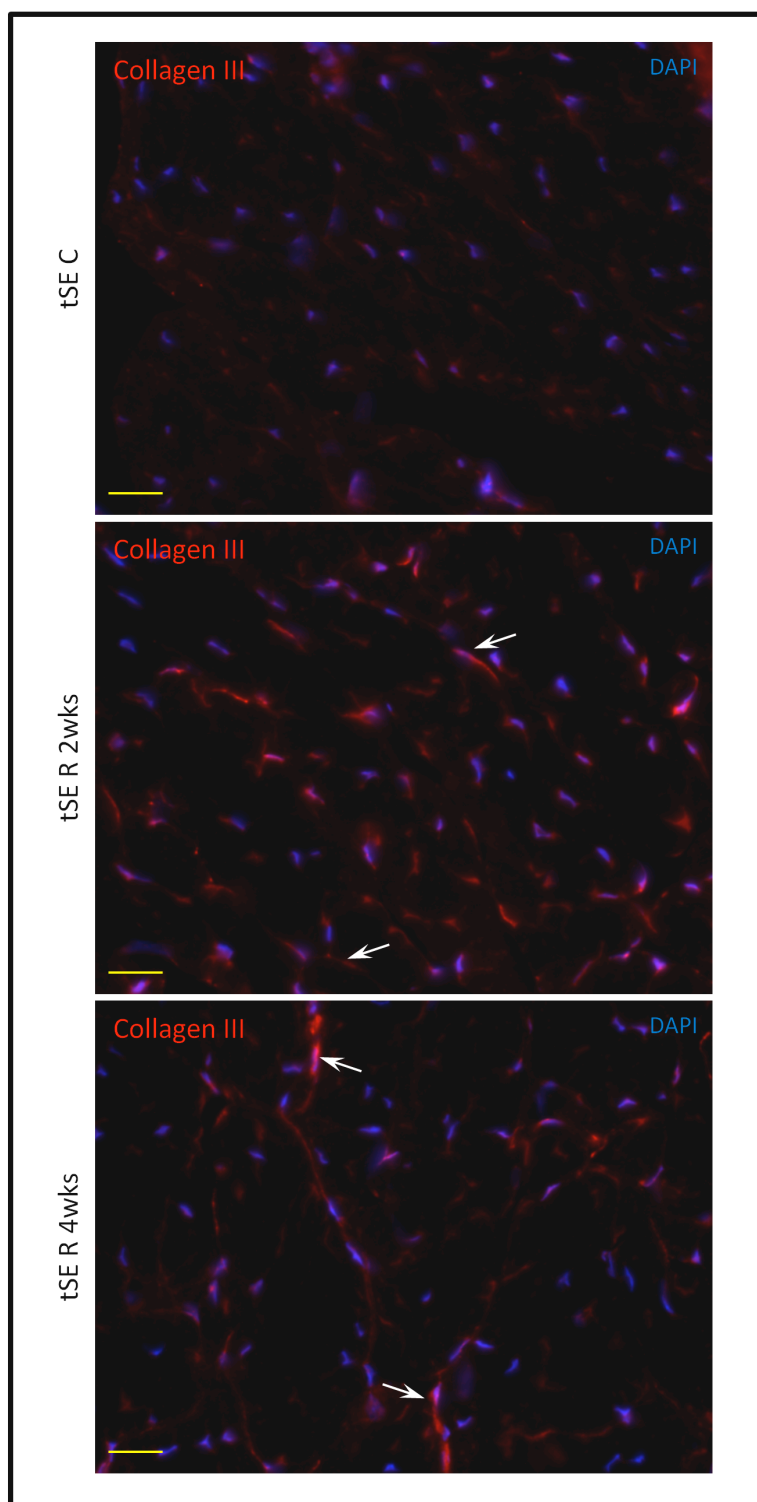


Figure 31. Immunomarquage du collagène de type III dans les tSE contrôles (C) et entraînés (R) au cours du processus de sur-utilisation. Les coupes transversales ont été réalisées au niveau de la région centrale du tendon. Les résultats sont représentatifs de 3 tendons de 3 rats différents pour chaque temps. Echelle = 20 μ m.

II.2. Evolution du facteur de croissance TGF β -1 au cours des phases précoces de sur-utilisation

Les synthèses de collagène et de certains composants matriciels sont régulées directement ou indirectement par certains facteurs de croissance comme le TGF β . Le TGF β -1 joue un rôle important d'inducteur de la synthèse matricielle en réponse à la contrainte mécanique en particulier dans le tendon. Il a été montré que son inhibition a pour conséquence la diminution de synthèse du collagène de type I mécaniquement induite. Nous avons cherché à savoir si la teneur de ce facteur de croissance était modifiée lors de la sur-utilisation, ce qui serait un indicateur pour son implication dans les évolutions matricielles constatées.

En utilisant la technique d'ELISA, nous avons mesuré le niveau d'expression protéique du TGF β -1 total dans le tSE. Nous avons observé une augmentation significative (7 fois le taux basal) de la production du TGF β -1 total à partir d'1 semaine, qui diminue à 2 semaines pour revenir à son taux basal à 4 semaines de sur-utilisation ([Figure 32](#)).

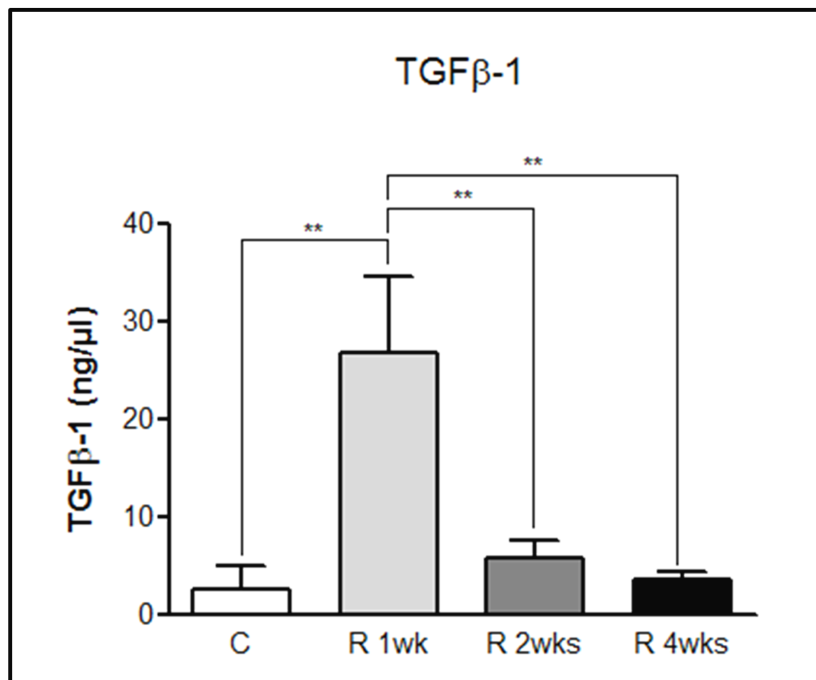


Figure 32. Expression du TGFβ-1 total dans les tSE contrôles (C) et entraînés (R) au cours du processus de sur-utilisation. Les résultats sont représentatifs de 6 tendons de 3 rats différents pour chaque temps. $p < 0.001$ (***) , $p < 0.01$ (**), et $p < 0.05$ (*). 50 μg de protéines totales ont été soumis à un test ELISA. Afin de quantifier le TGFβ-1 total, les échantillons ont été activés préalablement en les incubant 10 min dans du 1 N HCl.

⇒ Le changement très précoce du TGFβ, avant celui des composants matriciels relatés précédemment, suggère que ce facteur pourrait avoir un rôle déterminant en amont.

II.3. Evolution du marqueur tendineux, la ténomoduline, au cours des phases précoces de sur-utilisation

Nous avons montré plus haut que la sur-utilisation conduisait à l'augmentation du collagène de type II, de type VI et de l'aggrécane, ainsi qu'à la surexpression du facteur de transcription spécifique du tissu cartilagineux SOX-9 dans les tSE. La différenciation chondroïde ainsi mise en évidence, nous avons cherché ensuite à déterminer si la chondrogenèse était associée à un changement de marqueurs spécifiques du tendon, à savoir scléraxis et ténomoduline. Nous avons donc déterminé leur profil d'expression au cours du processus de sur-utilisation. En ce qui concerne Scléraxis, nous n'avons pas pu détecter l'expression de ses transcrits, ni dans les échantillons témoins, ni dans les échantillons de tSE sur-utilisés. D'autre part, les résultats obtenus montrent que les transcrits de la ténomoduline diminuent légèrement à 2 semaines puis significativement à 4 semaines (1/5 du taux basal) dans les tSE sur-utilisés (Figure 33).

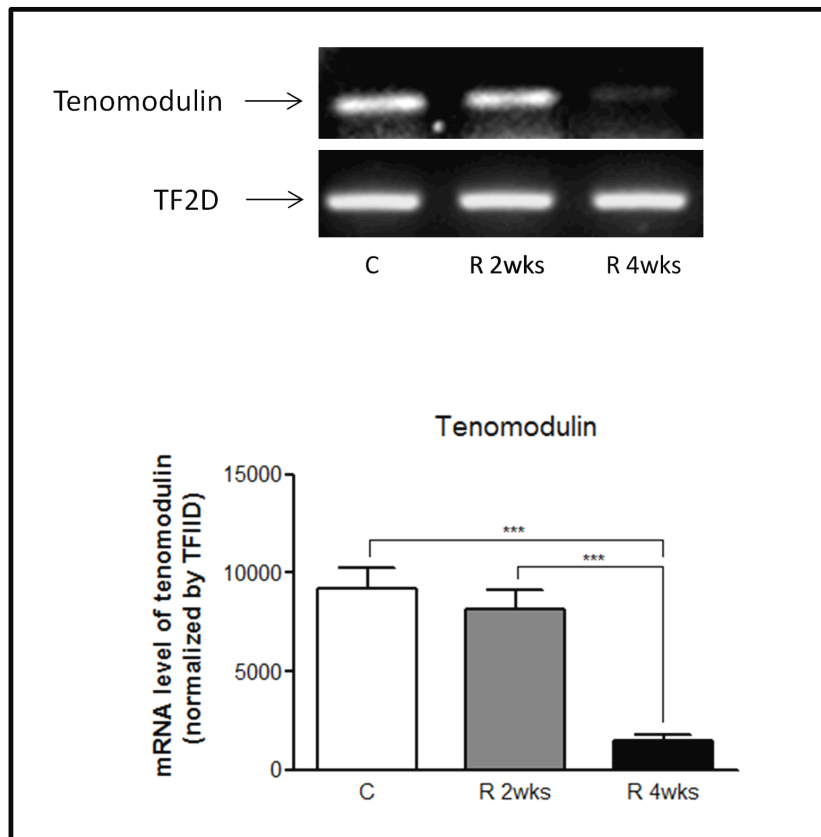


Figure 33. Evolution du niveau d'expression des transcrits de la ténomoduline dans les tSE contrôles (C) et entraînés (R) au cours du processus de sur-utilisation. Les résultats sont représentatifs de 6 tendons de 3 rats différents pour chaque temps. $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), et $p < 0.05$ (*).

⇒ Il est intéressant de constater que le profil d'expression des transcrits de la ténomoduline diminue significativement à 4 semaines de sur-utilisation et que cette diminution est corrélée avec la différenciation chondroïde.

II.4. Régulation de la masse hydrique au cours du processus de sur-utilisation

Les GAGs possèdent une forte charge négative leur permettant de retenir des molécules d'eau (jusqu'à 100 fois leur masse) contribuant ainsi à l'hydratation tissulaire. Dans le tendon, l'hydratation est très importante car elle améliore ses propriétés mécaniques en diminuant les forces de friction entre les fibrilles et fibres de collagène. Après nous être intéressés aux changements quantitatifs des GAGs au cours des phases précoces de sur-utilisation, nous avons cherché à tester leur capacité à réguler la masse hydrique au sein du tendon. Les GAGs totaux augmentent d'une façon significative dans les tendons sur-utilisés à 4 semaines et la proportion des GAGs spécifiques (DS, CS et HS) est modifiée. Nous avons donc tenté de déterminer l'évolution de la masse hydrique dans les tendons contrôles et sur-utilisés. Les résultats obtenus, après lyophilisation, montrent que la quantité d'eau représente environ 80 % \pm 5 % du poids frais des tendons contrôles et sur-utilisés mais qu'aucun changement de la masse hydrique n'est observé (Figure 34).

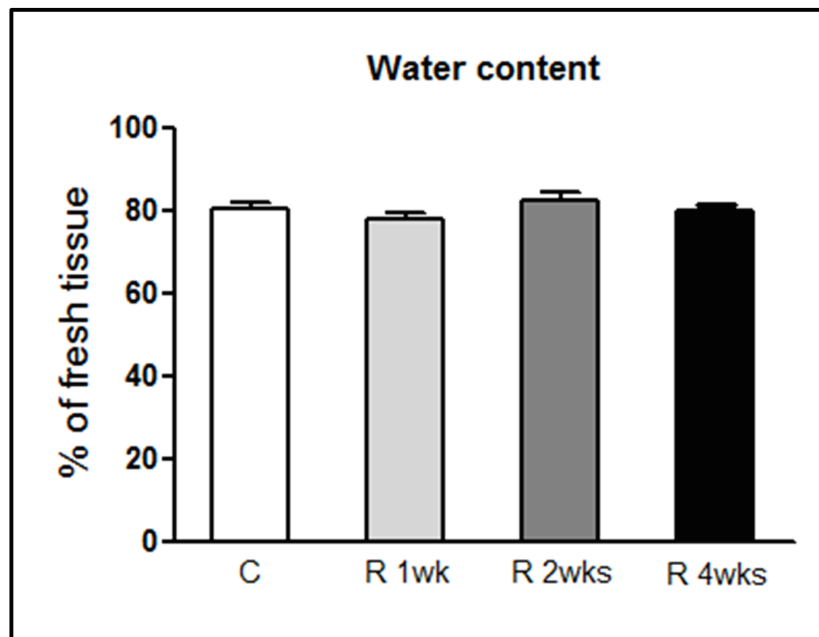


Figure 34. Evolution de la masse hydrique dans les tSE contrôles (C) et entraînés (R) au cours du processus de sur-utilisation. Les résultats exprimés en pourcentage par rapport au poids frais sont représentatifs de 3 tendons entiers de 3 rats différents pour chaque temps.

Il est à noter que ces résultats ont été obtenus à partir de tendons entiers, incluant les régions ostéo- et musculo-tendineuses. On ne peut exclure des micro-changements locaux dans l'hydratation de GAGs qui ne peuvent pas être décelés par la technique de lyophilisation utilisée. Pour les détecter il faudrait faire appel à d'autres techniques telles que la thermogravimétrie ou l'utilisation d'un traceur hydrophile.

II.5. Evolution de la composition en disaccharides des GAGS au cours des phases précoce de la sur-utilisation dans les tSE

D'après nos premiers résultats, la sur-utilisation à court terme modifie la quantité des GAGs totaux et spécifiques à partir de 4 semaines. La proportion des CS augmente légèrement par rapport aux DS et aux HS au cours de la sur-utilisation. Il est connu que les propriétés physico-chimiques et les rôles biologiques des GAGs dépendent directement de leurs types. La qualité des GAGs, la position et le degré de sulfatation des disaccharides dans les chaînes glycosidiques, peuvent conditionner leurs rôles biologiques auxquels ils sont associés. Nous avons donc tenté une analyse des disaccharides des GAGs extraits de tendons à différents temps de sur-utilisation. Les résultats d'une expérience préliminaire sont rapportés sur la figure ci-dessous (Figure 35). On remarque que les tSE contiennent des disaccharides mono-, di- et trisulfatés. Nous observons que la proportion, le degré et la position de sulfatation des disaccharides composant les HS et des CS ne semblent pas changer de façon importante dans les tSE de rats contrôles et entraînés. Le DS est une substitution du CS par épimérisation de l'acide glucuronique en acide iduronique, cette technique ne permet pas de différencier les disaccharides composant les CS et les DS, les résultats ainsi obtenus concernent par conséquent tous les types de CS incluant les CS-B que sont les DS.

Les disaccharides majeurs composant les HS sont le *N*-acétylé et le *N*-sulfaté. Le disaccharide le moins présent est le monosulfaté en C2. Les tSE ne contiennent pas des disaccharides disulfatés en C2 et C6. Bien que la sur-utilisation ne modifie pas la composition en disaccharides des GAGs, on observe néanmoins que l'âge des animaux diminue légèrement la sulfatation des GAGs au niveau du *N*-acétylé alors qu'il augmente les disaccharides trisulfatés en *N*-, C6 et C2. De plus, il semblerait que la sulfatation totale des HS soit augmentée également avec l'âge. Pour le vérifier, il faudrait augmenter le nombre d'échantillons examinés.

Les disaccharides majeurs composant les CS sont le non sulfaté et les monosulfatés en C4 et en C6, mais il existe un très faible taux de disaccharides disulfatés en C6 et C4 et en C6 et C2. Les disaccharides non sulfatés peuvent correspondre à l'acide hyaluronique. On remarque également qu'il n'existe pas de disaccharides monosulfaté en C2 ni des disaccharides trisulfatés en C6, C4 et C2.

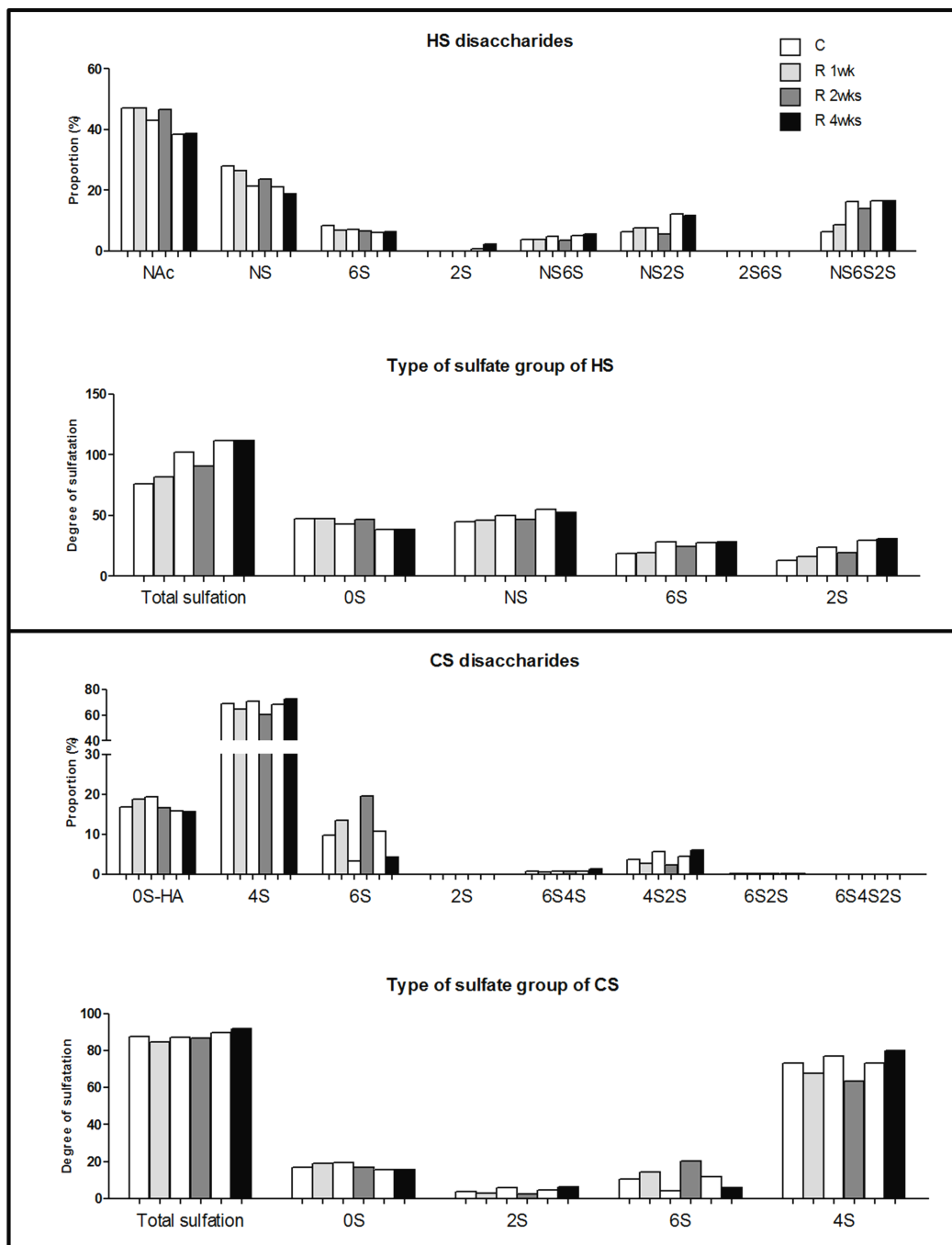


Figure 35. Analyse par HPLC des disaccharides des GAGs spécifiques HS et CS. La digestion des GAGs a été réalisée avec de la chondroïtinase ABC et de l'acide nitreux (Cf. Matériels et Méthodes).

⇒ Il semble que le degré et la position de sulfatation ne varient pas au cours de la sur-utilisation. Ceci pourrait expliquer le non-changement de la masse hydrique dans les tSE.

2^{ème} partie : Evolution de l'expression et/ou de l'activité des MMPs dans le tSE au cours des phases précoces de sur-utilisation : Rôle de la MMP-2 (Gélatinase-A)

La principale caractéristique de la tendinopathie est le changement histologique de la structure du tendon qui révèle une altération profonde de l'environnement matriciel des ténocytes. La MEC du tendon est composée d'un réseau complexe de molécules interagissant entre elles dont les principales sont les fibres de collagènes, les PGs et les GAGs associés. Ces molécules évoluent quantitativement et qualitativement dans la tendinopathie du supra-épineux. Le remodelage de la MEC est essentiellement dû à une famille d'enzymes zinc-dépendantes appelées plus communément les métalloprotéinases matricielles (MMPs). Les MMPs sont connus pour jouer un rôle important dans les processus biologiques et le remodelage tissulaire que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Des études antérieures ont montré que les tendons fortement sollicités induisaient un niveau important d'expression des MMPs. Cependant très peu d'études expérimentales se sont intéressées à ces enzymes dans le tendon et plus particulièrement dans le tendon supra-épineux pathologique. De plus, le peu d'études qui existent chez l'Homme ne s'intéressent qu'aux stades où la pathologie est bien avancée.

Tout au long de ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés aux phases précoces de la tendinopathie. Tout d'abord, on a cherché à déterminer si la sur-utilisation au cours de ces phases induisait une augmentation d'expression et/ou d'activité des MMPs. Ensuite, l'hypothèse émise était que la dégradation matricielle observée pourrait avoir deux provenances cellulaires différentes ne s'excluant pas mutuellement : la réponse catabolique due aux contraintes mécaniques subies par les ténocytes qui libèrent des enzymes dégradant la MEC, ou bien la réponse inflammatoire tissulaire débutante induisant une augmentation de synthèse et d'activité des MMPs par les macrophages. Enfin, si l'augmentation de synthèse et d'activation des MMPs d'origine ténocytaire s'avère prouvée, son origine serait-elle mécanique due à l'évolution des contraintes péri-cellulaires, ou bien serait-elle chimique due à la hausse des médiateurs locaux pro-inflammatoire émis par les macrophages ?

Tout d'abord, le premier objectif de cet article a été d'analyser dans le tSE, au cours des phases précoces de la pathologie, le profil évolutif d'activité et/ou d'expression des MMPs et de leurs inhibiteurs. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au rôle essentiel de la

MMP-2, de son système activateur (TIMP-2 et MT1-MMP) et de son système inducteur (EMMPRIN). Ensuite, le deuxième objectif a été d'analyser l'expression d'un panel de cytokines inflammatoires au cours des phases précoces de la tendinopathie pour déterminer si un processus inflammatoire était corrélé à l'activation de la MMP-2.

L'article apporte ainsi de nouvelles connaissances concernant les MMPs et leurs activités dans la tendinopathie du supra-épineux au cours des phases précoces de la sur-utilisation. Il étudie le rôle important de l'augmentation de l'activité et/ou de l'expression de la MMP-2 et de ses activateurs et inducteur, respectivement le complexe MT1-MMP/TIMP-2 et la glycoprotéine EMMPRIN. Il analyse enfin la participation inflammatoire au remodelage matriciel constaté qui survient au début de cette pathologie.

Article 2

Titre : Early events of Overused Supraspinatus Tendon involve MMPs and EMMPRIN in the absence of inflammation

Auteurs : Mohamed Attia, Eric Huet, Camille Gossard, Suzanne Menashi, Marie-Claude Tassoni, Isabelle Martelly

Date : Avril 2013 (publié)

Journal : Arthritis Rheumatism

The American Journal of Sports Medicine

<http://ajs.sagepub.com/>

Early Events of Overused Supraspinatus Tendons Involve Matrix Metalloproteinases and EMMPRIN/CD147 In the Absence of Inflammation

Mohamed Attia, Eric Huet, Camille Gossard, Suzanne Menashi, Marie-Claude Tassoni and Isabelle Martelly
Am J Sports Med 2013 41: 908 originally published online February 12, 2013
DOI: 10.1177/0363546512473817

The online version of this article can be found at:
<http://ajs.sagepub.com/content/41/4/908>

Published by:



<http://www.sagepublications.com>

On behalf of:



American Orthopaedic Society for Sports Medicine

Additional services and information for *The American Journal of Sports Medicine* can be found at:

Email Alerts: <http://ajs.sagepub.com/cgi/alerts>

Subscriptions: <http://ajs.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

Permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

>> Version of Record - Apr 2, 2013

OnlineFirst Version of Record - Feb 12, 2013

[What is This?](#)

Early Events of Overused Supraspinatus Tendons Involve Matrix Metalloproteinases and EMMPRIN/CD147 in the Absence of Inflammation

Mohamed Attia,^{*†} PhD, Eric Huet,^{*} PhD, Camille Gossard,[‡] Suzanne Menashi,^{*} PhD, Marie-Claude Tassoni,^{†‡} PhD, and Isabelle Martelly,^{*§} Prof.
Investigation performed at Laboratoire CRRET CNRS EAC 7149, Université Paris-Est Créteil, Créteil Cedex, France

Background: The principal feature of tendon degeneration is structural change of the extracellular matrix (ECM) including collagens. In painful tendons, alterations of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) have been described; however, the initial molecular mechanism at the origin of these alterations is still poorly understood. A rat model of supraspinatus tendon overuse has been developed, which may be predictive of pathological tendon alterations.

Purpose: To determine which MMPs are involved in early ECM remodeling during overuse and their relationship with the inflammatory context.

Study Design: Controlled laboratory study.

Methods: Analyses were performed on rat supraspinatus tendons at 2 and 4 weeks of overuse on a downhill treadmill. Transcript levels of MMPs and TIMPs were assessed by semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction. Western blotting and/or immunolabeling were used for MMP-2, MMP-3, MMP-13, and extracellular MMP inducer (EMMPRIN, also called cluster of differentiation [CD] 147) detection. In situ and/or sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gelatin zymography was performed for MMP-2 and MMP-9. TIMP activity was revealed by reverse zymography. Inflammation was assessed by cytokine antibody array and/or immunolabeling.

Results: Compared with a control, overused supraspinatus tendons showed a significantly higher gelatinolytic activity at 2 weeks, which slightly decreased at 4 weeks. MMP-9 and MMP-13 were undetectable; MMP-3 was downregulated in overused tendons. Only MMP-2, particularly its active form, and the MMP-2 activator MMP-14 were upregulated at 2 weeks of overuse when an increase in TIMP-2 transcripts was observed. MMP-2 upregulation occurred in the absence of inflammation but was associated with an increase of EMMPRIN/CD147.

Conclusion: EMMPRIN/CD147-regulated MMP-2 and MMP-14, associated with low MMP-3, appear as the main characteristics of ECM remodeling in early overused tendons. Whether alterations in the pattern of these MMPs are an adaptive response or a repair response that may degenerate into tendinosis, is still uncertain. Moreover, there seems to be no indication for an inflammatory response to overuse, suggesting that the increased metalloproteinase activity is rather a response to a mechanical stress than an inflammatory one.

Clinical Relevance: Any strategy aimed at preventing full-thickness tears resulting from initial tendon matrix alterations should consider these changes in MMP-3, MMP-2, and MMP-14, or further upstream, EMMPRIN.

Keywords: supraspinatus tendon; overuse; MMPs; EMMPRIN; inflammation process

Tendon disorders due to overuse during sport, professional activity, or aging are a common cause of rheumatological medical consultations. They often affect the supraspinatus tendon of the rotator cuff.^{23,24} Rotator cuff disease is initiated by an asymptomatic state in which tendon damage may be considered as reversible but that can develop to

more deleterious tears.¹⁸ Medical care is often provided when tendinopathy has reached a chronic pain level or when a rupture has occurred with heavy social and financial consequences.

The principal feature of tendon degeneration is structural changes of the extracellular matrix (ECM) environment of the fibroblasts, also called tenocytes, that lie between collagen fibers and contribute to tendon homeostasis. The ECM is formed by a complex network of molecules interacting with each other including collagens, proteoglycans (PGs) with their glycosaminoglycan (GAG)

moiety, and water.²⁷ Catabolic matrix remodeling is essentially caused by matrix metalloproteinases (MMPs), which include collagenases such as MMP-1 (alias MMP-13 in rats) and MMP-8, gelatinases (MMP-2 and MMP-9), or stromelysin-1 (MMP-3) that are located in the ECM and MMP-14/MT1-MMP, which is a transmembrane protein. MMP expression may be regulated at the transcription level by different proteins including inflammatory cytokines (interleukin [IL]-1, -4, -6, -10 or tumor necrosis factor [TNF]- α)⁷ and extracellular MMP inducer (EMMPRIN, also called cluster of differentiation [CD] 147).¹² MMP activity is controlled by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) that belong to a 4-member family with various MMP specificities. An imbalance between MMPs and TIMPs may alter tendon remodeling, cause alterations in collagenous and proteoglycanous structures, and thereby be relevant for the tendon pathological process.

A profile of the constitutive level of certain MMPs generally characterizes a normal tendon.¹⁶ The basal constitutive activity of most MMPs is greatly modified in human painful tendinopathy. For instance, a complex pattern of MMP and TIMP alterations has been described in painful Achilles tendons, which include MMP-3,^{2,6,15,16} MMP-1,¹¹ MMP-13,⁶ MMP-9,⁶ MMP-2,^{2,15,24} MMP-14/MT1-MMP,¹⁵ and inhibitors TIMP-1¹¹ and TIMP-3.^{15,16}

The supraspinatus tendon in the rotator cuff is frequently stressed and shows higher levels of collagen remodeling compared with other tendons. Despite the considerable amount of research aimed at preventing advanced tendinopathies of this tendon, the molecular mechanism underlying its alteration is still poorly understood. In humans, it was reported that MMP-1 and MMP-3 activities increase in torn rotator cuff tendons, but MMP-2 and MMP-9 are generally reduced compared with normal tendons.^{22,24} These changes were correlated with collagen turnover in the tissues.²⁴ Other studies have shown that in torn tendons, MMP-13 is highly increased compared with normal tendons, whereas MMP-3 is downregulated as well as TIMPs.¹⁷ However, these changes, only reported for the advanced stages of tendinopathy, represent months or years after the onset of symptoms. Initial molecular mechanisms underlying these alterations are still poorly understood.

A rat model of supraspinatus tendon describing tendon alterations until 16 weeks of overuse has been developed.^{29,30} These alterations then resemble those observed in human pathological abnormalities. In a previous study using this rat model, we have described changes at the molecular and cellular levels that occurred already at 2 weeks of overuse and that may be predictive of a pathological evolution of tendon alterations.³ These changes include both a decrease in collagen type I expression and

an increase in collagen type II expression associated with an augmentation of PGs, such as versican and aggrecan, and GAGs of chondroitin sulfate type, while SOX9 transcription factor was upregulated. This suggested an abnormal extension of a fibrocartilaginous-like area in the median part of the tendon caused by chondrocyte metaplasia of tenocytes. The purpose of this study was therefore to investigate whether these early metabolic changes in the ECM of the supraspinatus tendon were associated with changes in specific MMP expression and implicated an inflammatory context.

MATERIALS AND METHODS

Overuse Protocol and Sample Collection

With the approval of the local ethics review board, 24 male, 8-week-old Sprague-Dawley rats (weight, mean \pm standard deviation [SD], 450 \pm 50 g) (Janvier, Le Genest Saint-Isle, France) were divided into 2 groups. Twelve control animals were allowed normal cage activity. Twelve other rats were subjected to daily 10° downhill treadmill running as previously described^{29,30} for 2 (n = 6) and 4 (n = 6) weeks. Control and running rats were euthanized, and the supraspinatus tendons were detached from their muscular and bony insertions, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use for biochemical studies. For immunolabeling experiments, the contralateral supraspinatus tendon with its associated muscle was dissected from the bony attachment, embedded in Tissue-TEK (Sakura Finetek France SAS, Ville-neuve d'Ascq, France), frozen in N₂ precooled isopentane, and stored at -80°C until use.

Protein Extraction

The frozen supraspinatus tendons were thawed and then homogenized using TRIZOL reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), and total protein was extracted as described in the manufacturer's instructions. After extraction, protein determination was performed using a Pierce BCA Protein Assay kit (Perbio Science, Brébières, France) before use. Except for MMP-14, to which no accurate antibodies were available, all enzymatic actors or regulators presently studied were tested at the protein level by Western blot and/or gelatin zymography analysis depending on the best tools available for each of them.

Western Blot Analysis

Ten micrograms of total proteins were separated on 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

⁵Address correspondence to Isabelle Martelly, Laboratoire CRRET CNRS EAC 7149, Université Paris-Est Créteil, 61 Avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil Cedex, France (e-mail: martelly@u-pec.fr).

*Laboratoire CRRET CNRS EAC 7149, Université Paris-Est Créteil, Créteil Cedex, France.

[†]Département de Mécanobiologie, CogitoBio, Cachan, France.

[‡]Ecole Supérieure d'Ostéopathie et de Biomécanique Appliquée, OstéoBio, Cachan, France.

Marie-Claude Tassoni and Isabelle Martelly contributed equally to this article.

The authors declared that they have no conflicts of interest in the authorship and publication of this contribution.

(SDS-PAGE) gels using the Mini-PROTEAN device (Bio-Rad Laboratories, Marne-la-Coquette, France) and then transferred to Immobilon-P PVDF membranes (Millipore, Guyancourt, France). Membranes were immunoblotted with anti-MMP-3 pAb (1/1000, ref. ab18898; Abcam, Paris, France), anti-MMP-13 pAb (1/1000, ref. ab35320; Abcam), anti-EMMPRIN pAb (1/3000, ref. G-19; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti- β -actin mAb (1/5000; Sigma, St Louis, Missouri), and anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mAb (1/10,000; Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) overnight at 4°C and followed by 1-hour incubation at room temperature with appropriate horseradish peroxidase-conjugated antibodies and visualized with BM Chemiluminescence Substrate (Roche Diagnostics, Meylan, France). GAPDH or β -actin was used as protein loading controls. In 1 case, 5 μ g of rat liver total protein extract was used as a positive control.

Gelatin Zymography

MMP-2 and MMP-9 were evaluated by gelatin zymography. The protein extracts were separated under nonreducing conditions using 10% SDS-PAGE containing 1 mg/mL gelatin (Mini-PROTEAN II system; Bio-Rad Laboratories) as previously described.¹⁰ After electrophoresis, gels were washed twice for 30 minutes in washing buffer (2.5% [w/v] Triton X-100) to remove SDS and allow the renaturation of MMPs and then incubated overnight in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM CaCl₂, and 0.02% (w/v) Triton X-100 (incubation buffer). After staining with 0.1% (w/v) Coomassie blue G250, gels were stained by acetic acid and ethanol for 1 hour to visualize white lysis bands due to gelatinolytic activity. Band intensities were quantified by densitometric analysis using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland).²¹

Reverse Gelatin Zymography

TIMP levels were determined by reverse gelatin zymography, an electrophoresis technique in which substrate (gelatin) and activated protease (MMP-2) are incorporated directly into the polyacrylamide gels.²⁰ Twenty micrograms of total proteins were separated on 14% SDS-PAGE containing 1 mg/mL gelatin and 20 ng/mL of 4-aminophenylmercuric acetate (APMA)-activated MMP-2. After electrophoresis, gels were washed twice for 30 minutes in washing buffer (2.5% [w/v] Triton X-100) to remove SDS and allow the renaturation of TIMPs and then incubated for 18 hours in incubation buffer at 37°C. Gels were stained with 0.1% (w/v) Coomassie blue G250 for 30 minutes and stained by acetic acid and ethanol. After gel staining, the inhibitory activity of TIMPs results in dark blue bands on a clear background.

In Situ Zymography

Gelatinolytic activity was detected using fluorescein-conjugated DQ gelatin (Invitrogen) as a substrate. Its proteolysis releases a fluorescent molecule and allows evaluating

locally the expression and activity of gelatinases. Frozen transversal sections performed at the medial part of the supraspinatus tendon were used. DQ gelatin was dissolved at a concentration of 1 mg/mL in water and then diluted at 1/10 in 1% agarose (w/v) containing 0.1 μ g/mL of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI); then 10 μ L of the mixture was overlaid on tissue sections, which were covered with a cover slip. After gelling of the mixture for 20 minutes at 4°C, the sections were incubated for 20 minutes at room temperature in the dark. To check the specificity of the gelatinolytic activity, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 20 mM), a general MMP inhibitor, was used. Fluorescence was immediately detected at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 500 to 550 nm under the same condition. Fluorescence microscopy images were obtained using a CCD monochrome camera (CFW-1310M; Scion, Frederick, Maryland) fitted to a BH-2 epifluorescence optical microscope (Olympus, Rungis, France) with a C-mount optical adaptor (0.33). Sequential single-image acquisition was obtained from VisiCapture 2.0 software (Scion) using a 40 \times objective (immersion oil, NA 1.3).

Immunolabeling

At each time point, cryostat sections (8 μ m) taken at the medial part of supraspinatus tendons were air dried for 10 minutes and fixed in 4% paraformaldehyde (w/v) for 15 minutes at room temperature and blocked with phosphate-buffered saline with bovine serum albumin (PBS-BSA) 3% (w/v). Some sections were successively incubated for 18 hours with anti-EMMPRIN pAb (1/200, ref. G-19; Santa Cruz Biotechnology) and then 18 hours with anti-MMP-2 mAb (1/100, ref. ab-7032; Abcam) for co-immunolabeling. Other sections were incubated with anti-CD68/ED1 mAb (1/200, AbD Serotec, Kidlington, United Kingdom) or anti-CD163/ED2 mAb (1/200; AbD Serotec). Bound antibodies were detected with the appropriate Alexa-conjugated secondary antibodies (Fluorobodies Interchim, Montlupon, France). Regenerating skeletal muscles taken at 8 days after crush injury were used as positive controls for CD68/ED1 and CD163/ED2 antibody labeling. Desmin, a protein characteristic of muscle cells, was labeled with anti-desmin (1/200; Sigma). Fluorescence microscopy images acquired successively for each labeling were taken using the CCD monochrome camera described above. Sequential single-image acquisition was obtained in the same conditions as described above using a 40 \times objective.

RNA Isolation and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

The RNA was extracted from the same supraspinatus tendon sample used for protein extraction. Total RNA extraction was performed using TRIZOL reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After checking RNA extract quality (18S and 28S) on 2% (w/v) electrophoresis agarose gels containing 0.5 mg/mL ethidium bromide, reverse transcription was performed from 2 μ g of extracted total RNA using random hexamer primers

and reverse transcriptase (SuperScript II RNase H; Invitrogen). Three microliters of the resulting cDNA was submitted for PCR amplification using a Gene Amp 9600 system (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Les Ulis, France) in a final volume of 50 μ L. Primers were as follows:

MMP-13: 5'-AAGACCCCAACCCTAAGCACC-3' (forward), 5'-GCAGCACTGAGCCTTTTCACC-3' (reverse);
MMP-3: 5'-GGCTGAAGATGACAGGGAAGC-3' (forward), 5'-GGCATAGGCATGAGCCAAGAC-3' (reverse);
MMP-2: 5'-TATGGGAACGCTGATGGCGAG-3' (forward), 5'-TGAAGGGGAAGACACATGGGG-3' (reverse);
MMP-14: 5'-CCTGCCTGCATCCATCAACAC-3' (forward), 5'-CCATGAATGAGCCTCTGGGAGAC-3' (reverse);
TIMP-2: 5'-AAGCAGTGAGCGAGAAGGAGG-3' (forward), 5'-ATGGGATCATAGGGCAGCGTG-3' (reverse);
TFIID: 5'-CGTCTAGTGGCCAGATCTGT-3' (forward), 5'-CGGTACIGCAFCFTGAFTGFCA-3' (reverse).

The semiquantitative PCR was validated by preliminary experiments that established the optimal conditions of amplification. Negative controls for all primer sets were performed to demonstrate the absence of PCR products in amplifications of extracted total RNA without reverse transcriptase reaction. Transcription factor TFIID was used as an internal control and rat liver transcripts as a positive control. The RT-PCR products were subjected to electrophoresis on 2% (w/v) agarose gels containing 0.5 mg/mL ethidium bromide. Gels were photographed using a ChemiGenius system (Syngene, Cambridge, United Kingdom), and band intensities were quantified using ImageJ software.²¹

Rat Inflammatory Cytokine Array

A panel of rat inflammatory cytokines was assessed by determination of their relative levels of expression using RayBio rat cytokine antibody array (RayBiotech Clinisciences, Nanterre, France). Membranes were incubated overnight at 4°C with 150 μ g of total protein extract from control or overused supraspinatus tendons. Membranes were then treated according to the manufacturer's protocol. Blots were analyzed by densitometry using ImageJ software.²¹

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm SD and were statistically compared by 1-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparison tests using GraphPad software (San Diego, California). Statistical differences were determined at $P < .05$ as the minimum level of significance.

RESULTS

Gelatinolytic Activity in Supraspinatus Tendons

In situ gelatin zymography, which allows detecting resident gelatinases in tissue, was performed on transversal sections on the medial part of supraspinatus tendons.

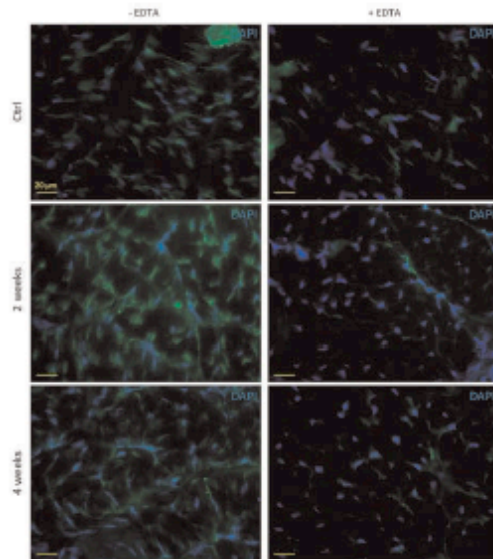


Figure 1. In situ gelatinase activity during overuse. Gelatinolytic activity (green) in control (Ctrl) and overused supraspinatus tendons at 2 and 4 weeks was detected on transversal sections of the medial region of the tendon using a fluorescein-conjugated gelatin. Fluorescence represents the local activity of gelatinase. EDTA (20 mM) was used to assess the contribution of MMP activity to the labeling. Results are representative of at least 12 slices from 6 tendons from 6 different rats for each time point. DAPI (blue) was used to label nuclei. Scale bar = 20 μ m.

Compared with the control, tendons with 2 weeks of overuse showed a higher gelatinolytic activity. This activity seemed to decrease at 4 weeks of training but still remained higher than in control tendons. The strong inhibition of the gelatinolytic labeling in the presence of EDTA confirmed that metalloproteinases contributed mostly to the observed activity (Figure 1).

Among MMPs, Overuse Enhanced Specifically MMP-2 Expression and Its Activator Complex (MMP-14 and TIMP-2) in the Supraspinatus Tendon

To determine which enzyme could be responsible for the increased gelatinase activity in response to overuse, transcript and/or protein analyses of several MMPs reported to be involved in tendinopathy were performed. MMP-13 (the rat homologous of human MMP-1) was undetectable at either the transcript or the protein levels in tendon samples, although it was easily detected in rat liver samples used as a positive control (Figure 2A). Transcript as well as protein levels of MMP-3 (stromelysin-1) were shown to decrease with overuse (Figure 2B). These results suggest that neither MMP-3 nor MMP-13 could be behind the increased in situ gelatinolytic activity.

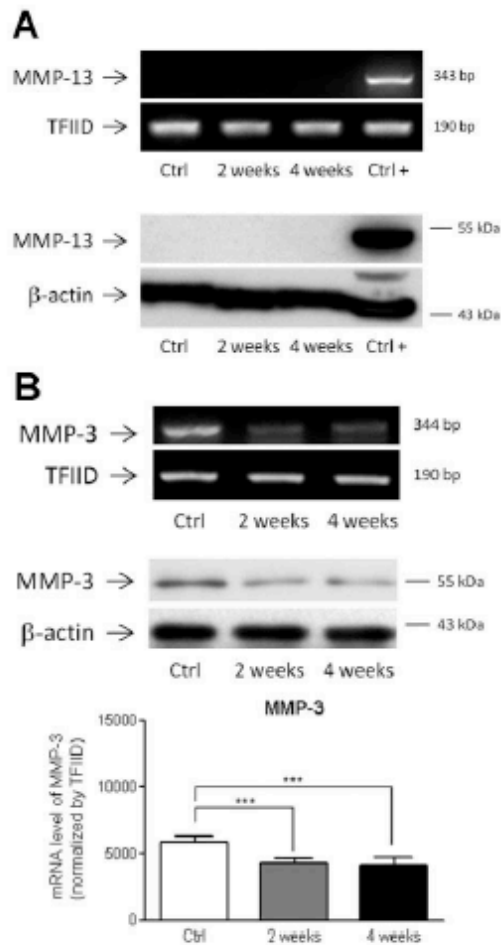


Figure 2. Expression levels of MMP-13 (collagenase-3) and MMP-3 (stromelysin-1) during overuse. Protein and transcript analyses of MMP-13 and MMP-3 in control (Ctrl) and overused supraspinatus tendons at 2 and 4 weeks were performed. (A) Transcript and protein expression of MMP-13. Rat liver extract was used as a positive control. (B) Transcript and protein expression of MMP-3. β -actin was used as a protein loading control, and TFIID was used as an internal control. Graph represents mean \pm SD of transcript amounts expressed relative to TFIID. Results are representative of 6 tendons from 6 different rats for each time point. Values are the mean \pm SD at $P < .05$ (*) as the minimum level of significance.

Analysis of the gelatinolytic activity by gelatin zymography revealed that MMP-9 was almost undetectable (Figure 3A) as well as its transcripts regardless of the sample (data not shown). Zymography also showed that the total amount of MMP-2 increased in overused tendons at 2 weeks. The proportion of active MMP-2 increased at 2 weeks and

remained higher at 4 weeks than in the control. MMP-2 transcript also increased slightly with the time of overuse (Figure 3A).

MMP-2 is known to be activated by MMP-14, also called MT1-MMP, in the presence of low levels of TIMP-2.⁸ An increase in the mRNA transcripts of MMP-14 (6-fold) and TIMP-2 (2.5-fold) was observed in the supraspinatus tendon at 2 weeks of overuse compared with controls (Figure 3B and 3C). Reverse zymography for the detection of TIMP activities has shown that TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 were all increased at 4 weeks compared with controls, showing slight differences among them as a function of time (Figure 3C). TIMP-1 slightly decreased at 2 weeks before increasing at 4 weeks, whereas TIMP-2 and TIMP-3 increased with time.

EMMPRIN: A Potential Candidate for MMP-14 and MMP-2 Upregulation

As EMMPRIN is known as a regulator of several MMPs including MMP-14 and MMP-2,¹⁴ we examined its expression in the rat tendons. Western blotting analysis showed an increase in EMMPRIN protein level in the supraspinatus tendons at 2 weeks of overuse, decreasing after 4 weeks to levels similar to controls (Figure 4A). Immunolabeling of MMP-2 in tendon tissues confirmed this pattern (Figure 4B), which corroborated the expression of this enzyme shown in the in situ gelatin zymography at both 2 and 4 weeks of overuse (Figure 1). Colabeling of EMMPRIN and MMP-2 was observed especially in cellular extensions (Figure 4B).

Early Overuse Tendon Alterations Are Not Associated With Inflammation Status

We next searched for signs of inflammation in tendons using antibodies raised against CD68 known to target pro-inflammatory macrophages (ED1 type). Only a few macrophages were evidenced in control or overused tendons, and no differences could be detected as a function of time of overuse (Figure 5). Similarly, with anti-CD163 antibodies known to label anti-inflammatory macrophages of ED2 type, only a few cells were detected in tendons regardless of the time of overuse (Figure 5). As a positive labeling control, injured skeletal muscles were taken at 8 days after crush injury. In slides from these inflamed muscles, many labeled macrophages of both types ED1 and ED2 could be detected (Figure 5).

Finally, a cytokine array was used to detect the presence in rat tendons of cytokines involved directly or indirectly in the inflammatory process. Low levels of each cytokine in the array could be detected in either control or overused tendon extracts. It must be noted that MMP-8 displayed an unchanged pattern with overuse. Most of the other cytokines seemed to display a common pattern with overuse, showing a slight decrease at 2 weeks and a trend to return to control levels at 4 weeks. This particularly concerned IL-1 and IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and vascular endothelial growth factor (VEGF). Another group of proteins seemed to show a slight progressive increase from 2 to 4

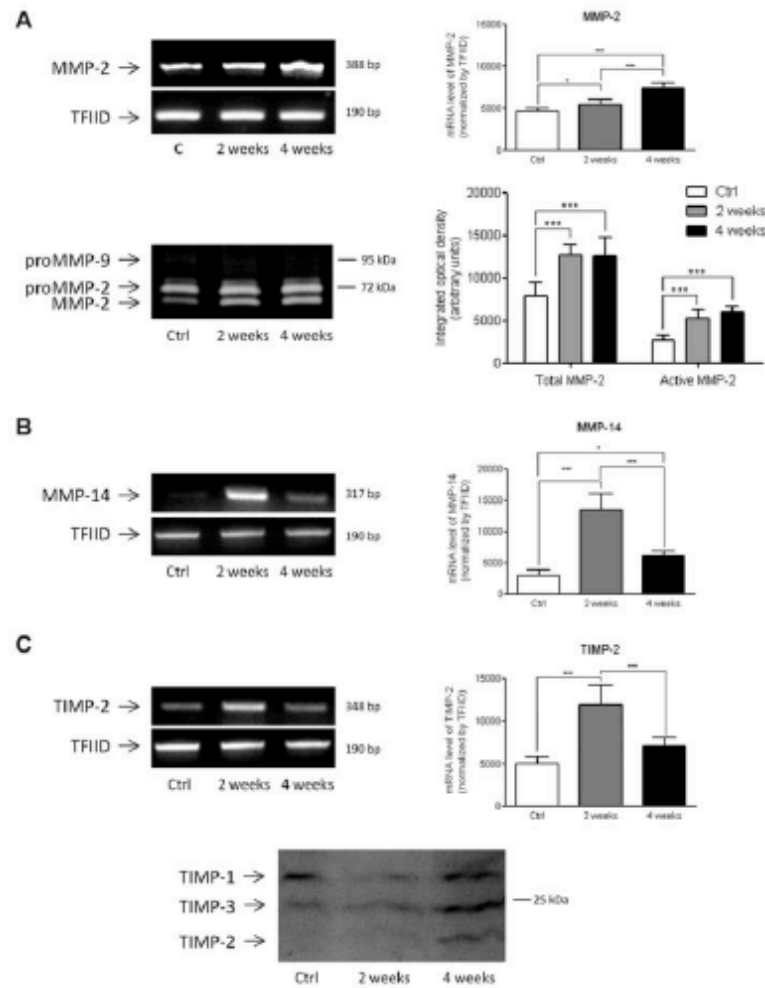


Figure 3. Expression of MMP-2 and its activation system during overuse. The analyses were performed in control (Ctrl) and overused supraspinatus tendons at 2 and 4 weeks. (A) Semiquantitative RT-PCR (upper panel) and zymography analysis (lower panel) of MMP-2. Graph of the upper panel represents the mean \pm SD of transcript amounts expressed relatively to TFIIID. Graph of the lower panel represents the levels of total and active MMP-2 after densitometric analysis of gel bands. (B) Semiquantitative RT-PCR of MMP-14. (C) Semiquantitative RT-PCR of TIMP-2 (upper panel) and reverse zymography analysis of TIMP-1, TIMP-3, and TIMP-2 (lower panel). TFIIID was used as an internal control. (B, C) Graphs represent the mean \pm SD of transcript amounts expressed relatively to TFIIID. Results are representative of 6 tendons from 6 different rats for each time point. Values are the mean \pm SD at $P < .05$ (*) as the minimum level of significance.

weeks of overuse (IL-13, leptin, L-selectin, TNF- α), while fractalkine and especially Fas ligand exhibit a higher enhancement for these time points (Figure 6).

DISCUSSION

Unlike studies on human pathological tendons, the rat model of overused supraspinatus tendons used here

allowed the characterization of early events that may lead to tendinopathy. Looking at several MMPs known to be implicated in tendinopathy, results obtained in this study demonstrate that only MMP-2 and the membrane-type MMP-14 are upregulated early by overuse and therefore may be implicated in early changes, leading to tendon pathological abnormalities. In addition, EMMPRIN, a known MMP inducer, was correlatively upregulated in tendons at 2 weeks. By contrast, inflammatory cytokines,

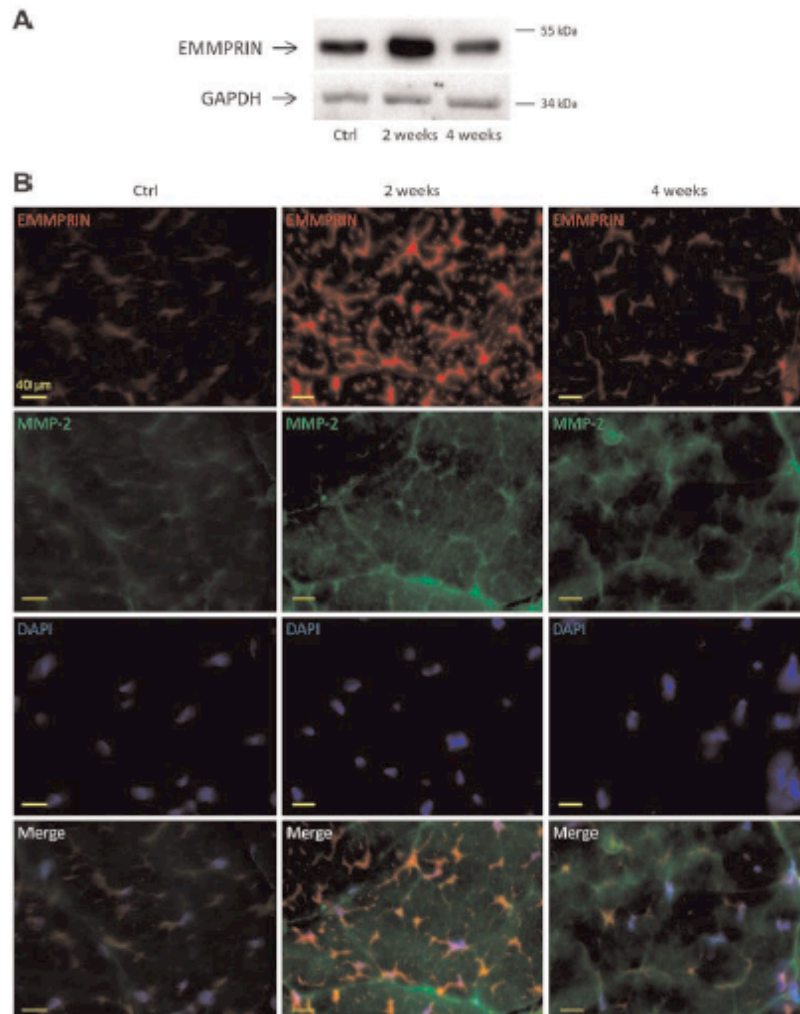


Figure 4. EMMPRIN and MMP-2 expression during overuse. (A) Western blot analysis of EMMPRIN performed with control (Ctrl) and overused supraspinatus tendons at 2 and 4 weeks. GAPDH was used as a protein loading control. (B) EMMPRIN (red) and MMP-2 (green) co-immunolabeling on transverse sections of the medial part of the control and overused tendons. Results are representative of 6 tendons from 6 different rats for Western blot and at least 12 slices from 6 tendons from 6 different rats for immunolabeling. DAPI (blue) was used to label nuclei. Scale bar = 40 μ m.

which are also major regulators of MMPs, were not altered during overuse, suggesting that EMMPRIN is the main regulator of MMP-2 and MMP-14.

An important involvement of MMP-2 and MMP-14 is also found in established human tendon lesions. For instance, global gelatinolytic activity was shown to be high in chronic Achilles tendinopathy,^{6,11} and MMP-2 has been found elevated in some asymptomatic Achilles tendons displaying histopathological degenerative changes.²⁴ In other studies, transcript levels of MMP-2^{2,6,15} and MMP-14¹⁵ were also increased in established states of Achilles tendinopathy.

Our results have shown that an increase in the levels of these enzymes was a precocious sign in the pathological process of the supraspinatus tendon.

Concerning the evolution of other studied MMPs in rat supraspinatus tendons, we found that MMP-13 and MMP-9 were almost undetectable, while MMP-3 was shown to diminish by about half at 2 weeks of overuse. In humans, it has been reported that MMP-1 (alias MMP-13 in rats) and MMP-9 are upregulated in human chronic Achilles or patellar tendinopathy,^{6,11} whereas MMP-3 expression is downregulated.^{2,6,15,16} MMP-3 was also shown to be

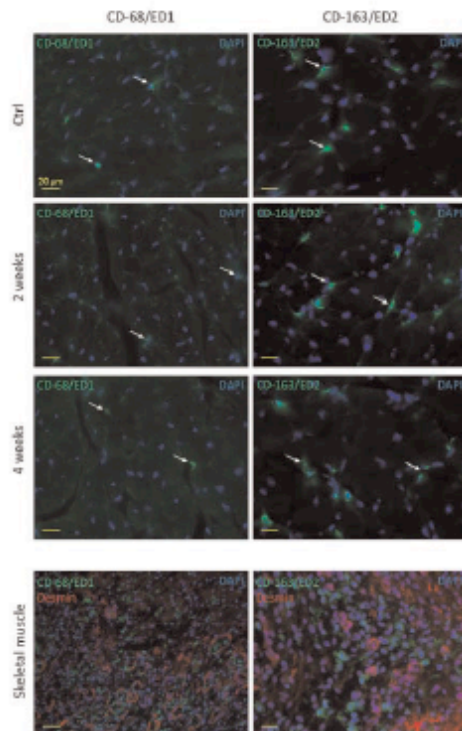


Figure 5. Identification of pro-inflammatory and anti-inflammatory macrophages during overuse. Labeling of pro-inflammatory and anti-inflammatory macrophages (white arrows) was performed using, respectively, CD68/ED1 and CD163/ED2 antibodies in control (Ctrl) and overused supraspinatus tendons at 2 and 4 weeks on transversal sections of the medial region of the tendon. Skeletal muscle sections at 8 days after crush injury were used as control labeling. Anti-desmin was used to label skeletal muscle cells (red). Results are representative of at least 12 slices from 6 tendons from 6 different rats. DAPI (blue) was used to label nuclei. Scale bar = 20 μ m.

lower in human dysfunctional tibialis tendons compared with normal tendons.⁴ These human tendons are different from supraspinatus tendons, and their pathological lesions may have different origins. It may explain the differential results observed in human and rat tendons concerning MMP-1 (or MMP-13) and MMP-9.

MMP-3 is known to be involved in PG catabolism. A decrease in MMP-3 in early supraspinatus overuse tendons may partially explain the accumulation of PGs and associated GAG moiety observed in this model³ as well as in dysfunctional human tibialis tendons.⁴ In addition, in this model where chondrogenesis was assessed, collagen III was also shown to increase (unpublished data). Because MMP-3 preferentially degrades this collagen,³¹ future work on this model may explore the hypothesis for a role

of MMP-3 decrease in tendinopathy. Although transposition of animal data to human pathological conditions requires caution, altogether our results indicate that MMP-9 and MMP-13, taken often as key proteolytic enzymes in established tendon disease, could not be considered as the initial causes of pathological lesions. A decrease in MMP-3 may be taken as an early mark of tendinopathy.

In overused supraspinatus tendons, TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 were increased in rat samples taken at 4 weeks but were low or undetectable at 2 weeks. Such an increase of TIMP-2 at 4 weeks of overuse could explain the reduced gelatinase activity observed by *in situ* zymography, whereas MMP-2 protein levels still remain increased at the same time point. In human patellar tendinosis, an increase in MMP-1 and decrease in TIMP-1 are both conditions favorable to collagen degradation.¹¹

The present results suggest a determinant role of MMP-14 and MMP-2 in the early supraspinatus pathological process associated with a transient imbalance between MMPs and TIMPs that could favor an increase in collagenase activity and could be one of the first consequences of overuse in tendons.

Overuse is known to induce microlesions in collagen fibers. It is generally admitted that collagen degradation starts with MMP-1 and MMP-8 collagenase activities, followed by gelatinase MMP-2 and MMP-9 actions. However, MMP-1, MMP-8, and MMP-9 did not appear to be key actors of matrix remodeling in the early tendinosis of rat supraspinatus tendons. Because MMP-14 is able to degrade several ECM proteins including collagen,¹⁹ both MMP-14 and MMP-2 may act in concert in early tendinosis, the first enzyme-cleaving collagen that is further degraded by MMP-2.⁹ Although criticized by others,²⁶ the idea that, besides its gelatinase activity, MMP-2 could also degrade helical-type collagen has been proposed.¹ It is possible that discontinuity points in the collagen chain structure in rat overused tendons could be recognized by the MMP-2 enzyme as suggested by Seltre and Eisen.²⁶ Altogether, MMP-2 with the help of MMP-14 might both contribute to collagen turnover that was observed in early rat tendon overuse.³ EMMPRIN enhancement in tendon overuse at 2 weeks supports its involvement in the upstream regulation of them both. Interestingly, our results suggest a co-localization of both MMP-2 and EMMPRIN at the cellular membrane where MMP-14 could also be found as observed elsewhere.²⁸ This could not be verified presently because of the lack of appropriate immunological tools.

The mechanism of tendinopathy alterations worsening into tendon tears is still a matter of debate. In the rat model used, the precipitating mechanical stimulus could reside in the initial overcompressive stress revealed by chondrocyte metaplasia and GAG increase.³ These changes may confer lower tensile resistance to the tendon matrix, possibly leading to tears under traction load. Some authors have reported a relationship between tendon tears and reduced acromiohumeral space,²⁵ suggesting that the pathological lesion may come from mechanical compressive overload of the tendon against the coracoacromial arch of the shoulder. Compressive forces acting on Achilles

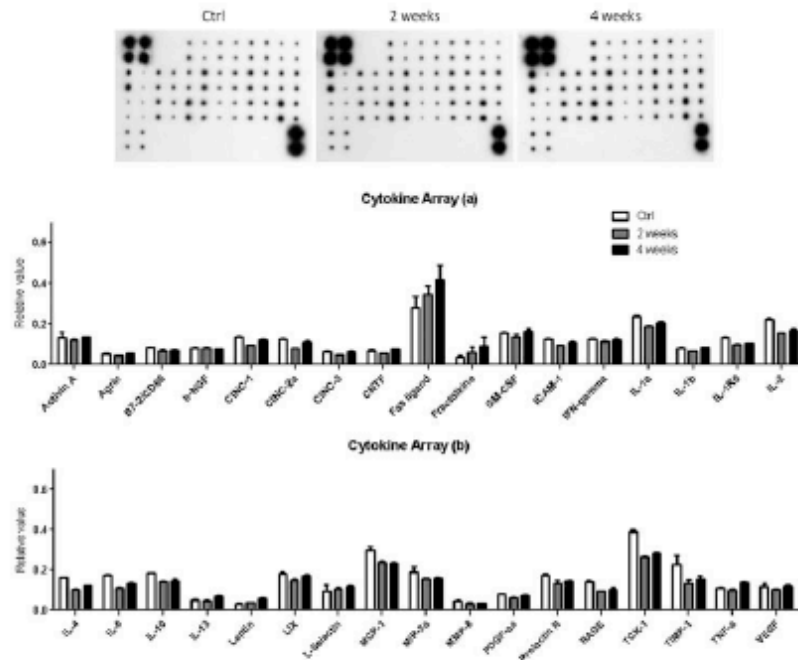


Figure 6. Cytokine expression during overuse. Rat cytokine antibody array was used on protein extracts from control (Ctrl) and overused supraspinatus tendons at 2 and 4 weeks. Densitometric analysis of the dots from the membranes (upper panel) was performed to determine the relative expression levels of certain inflammatory cytokines. Results are representative of 1 sample at each time. Bars represent densitometric analysis of the dots; data are the mean of duplicates.

tendons of rats submitted to a jumping or treadmill training program were shown to induce MMP-2 activation in the absence of any infiltration of inflammatory cells.⁵ This situation seems similar to that of supraspinatus overused tendons. Indeed, the amount of macrophages was not increased in tendons with overuse at least during the 4 weeks of observation. Moreover, the pattern of inflammatory cytokines was not changed either. This suggested that inflammation was not involved in MMP induction.

Mechanical stress could possibly cause MMP-2 release through an EMMPRIN induction pathway in the tenocytes of overused supraspinatus tendons. Such a mechanism was shown to occur in vitro with lung endothelial cells submitted to mechanical stretching.¹³ In overuse tendons, EMMPRIN and MMP-2 seemed to both localize at cell extensions, which constitute the most vulnerable cellular part to mechanical stress.

All together, our results suggest that a low level of MMP-3, increased MMP-2, and MMP-14 induced by EMMPRIN, possibly controlled by mechanical stress, are the main early features of ECM remodeling due to overuse. Whether alterations in the pattern of these MMPs are an adaptive response or a repair response that may degenerate into tendinosis is still uncertain. However, any strategy aimed at preventing full-thickness tears resulting from

initial tendon matrix alterations should consider these changes in MMP-3, MMP-2, and MMP-14, or further upstream, EMMPRIN.

ACKNOWLEDGMENT

The authors sincerely thank Dulce Papy-Garcia, Arlette Duchesnay, Karl Blirando, José Courty, Jean Delbé, and Alexander Scott for their valuable discussion and help. The authors also thank Catherine Chaussain for providing the anti-MMP-3 antibody.

REFERENCES

1. Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase: inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem.* 1995;270(11):5872-5876.
2. Alfredson H, Lorentzon M, Backman S, Backman A, Lerner UH. cDNA-arrays and real-time quantitative PCR techniques in the investigation of chronic Achilles tendinosis. *J Orthop Res.* 2003;21(8):970-975.
3. Attia M, Scott A, Duchesnay A, et al. Alterations of overused supraspinatus tendon: a possible role of glycosaminoglycans and HARP/

- pleiotrophin in early tendon pathology. *J Orthop Res.* 2012;30(1):61-71.
4. Corps AN, Robinson AH, Harra! RL, et al. Changes in matrix protein biochemistry and the expression of mRNA encoding matrix proteins and metalloproteinases in posterior tibialis tendinopathy. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(5):746-752.
 5. De Mello Malheiro OC, Giacomini CT, Justulin LA Jr, Delella FK, Dal-Pai-Silva M, Felisbino SL. Calcaneal tendon regions exhibit different MMP-2 activation after vertical jumping and treadmill running. *Anat Rec (Hoboken).* 2009;292(10):1656-1662.
 6. de Mos M, van El B, DeGroot J, et al. Achilles tendinosis: changes in biochemical composition and collagen turnover rate. *Am J Sports Med.* 2007;35(9):1549-1556.
 7. Del Buono A, Battery L, Denaro V, Maccauro G, Maffulli N. Tendinopathy and inflammation: some truths. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2011;24(1 Suppl 2):45-50.
 8. Doolley CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):625-635.
 9. Ellebroek SM, Wu Yi, Overall CM, Stack MS. Functional interplay between type I collagen and cell surface matrix metalloproteinase activity. *J Biol Chem.* 2001;276(27):24833-24842.
 10. Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res.* 1995;55(12):2548-2555.
 11. Fu SC, Chan BP, Wang W, Pau HM, Chan KM, Rolf CG. Increased expression of matrix metalloproteinase 1 (MMP1) in 11 patients with patellar tendinosis. *Acta Orthop Scand.* 2002;73(6):658-662.
 12. Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S. EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie.* 2005;87(3-4):361-368.
 13. Haseneen NA, Vaday GG, Zucker S, Foda HD. Mechanical stretch induces MMP-2 release and activation in lung endothelium: role of EMMPRIN. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;284(3):L541-L547.
 14. Huet E, Gabison EE, Mourah S, Menashi S. Role of EMMPRIN/CD147 in tissue remodeling. *Connect Tissue Res.* 2008;49(3):175-179.
 15. Ireland D, Harra! R, Curry V, et al. Multiple changes in gene expression in chronic human Achilles tendinopathy. *Matrix Biol.* 2001;20(3):159-169.
 16. Jones GC, Corps AN, Pennington CJ, et al. Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human Achilles tendon. *Arthritis Rheum.* 2006;54(3):832-842.
 17. Lo IK, Marchuk LL, Hollinshead R, Hart DA, Frank CB. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase mRNA levels are specifically altered in torn rotator cuff tendons. *Am J Sports Med.* 2004;32(5):1223-1229.
 18. Neviasser A, Andarawis-Puri N, Flatow E. Basic mechanisms of tendon fatigue damage. *J Shoulder Elbow Surg.* 2012;21(2):158-163.
 19. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem.* 1997;272(4):2446-2451.
 20. Oliver GW, Leferson JD, Stetler-Stevenson WG, Kleiner DE. Quantitative reverse zymography: analysis of picogram amounts of metalloproteinase inhibitors using gelatinase A and B reverse zymograms. *Anal Biochem.* 1997;244(1):161-166.
 21. Rasband WS. *ImageJ*. Bethesda, Maryland: National Institutes of Health; 1997-2009. <http://imagej.nih.gov/ij/>. Accessed January 14, 2013.
 22. Riley G. The pathogenesis of tendinopathy: a molecular perspective. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43(2):131-142.
 23. Riley G. Symposium: tendon and ligament remodelling and regeneration. *Int J Exp Pathol.* 2007;88(4):215-216.
 24. Riley GP, Curry V, DeGroot J, et al. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biol.* 2002;21(2):185-195.
 25. Saupé N, Pfirrmann CW, Schmid MR, Jost B, Werner CM, Zanetti M. Association between rotator cuff abnormalities and reduced acromiohumeral distance. *AJR Am J Roentgenol.* 2006;187(2):376-382.
 26. Seltre JL, Eisen AZ. Native type I collagen is not a substrate for MMP2 (gelatinase A). *J Invest Dermatol.* 1999;112(6):993-994.
 27. Sharma P, Maffulli N. Tendinopathy and tendon injury: the future. *Disabil Rehabil.* 2008;30(22):1733-1745.
 28. Sier CF, Zuidwijk K, Zijlman HJ, et al. EMMPRIN-induced MMP-2 activation cascade in human cervical squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2006;118(12):2991-2998.
 29. Soslowky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, Banerji I, Moalli MR. Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg.* 1996;5(5):383-392.
 30. Soslowky LJ, Thomopoulos S, Tun S, et al. Neer Award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study. *J Shoulder Elbow Surg.* 2000;9(2):79-84.
 31. Wu JJ, Weis MA, Kim LS, Eyre DR. Type III collagen, a fibril network modifier in articular cartilage. *J Biol Chem.* 2010;285(24):18537-18544.

3^{ère} partie : Transposition des changements matriciels observés au cours de la tendinopathie du modèle animal de rat à la tendinopathie patellaire diagnostiquée chez l'Homme : Etude histologique des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes

La tendinopathie chronique constitue clairement un problème majeur de santé publique. Celle observée chez l'Homme est généralement due à une sur-utilisation importante répétitive et à des gestes inappropriés. Elle est généralement diagnostiquée très tardivement et le traitement médical est peu efficace. Pour concevoir les traitements appropriés, il est important de comprendre les phénomènes qui conditionnent l'installation de la pathologie. C'est pour cela que nous avons établi un modèle animal de tendinopathie débutante d'origine mécanique qui évolue vers une tendinose analogue à celle observée en clinique humaine. A l'aide de ce modèle, nous avons réussi à montrer que la tendinopathie est associée à des changements matriciels importants (l'évolution quantitative et qualitative du collagène, des PGs et des GAGs associés) se traduisant en particulier par une transformation fibrocartilagineuse au cours des phases précoces de la pathologie (Cf. Article 1).

Dans ce cadre, nous avons cherché à savoir dans cette dernière partie de thèse, si le modèle animal de sur-utilisation était représentatif des tendinopathies diagnostiquées chez l'Homme. Plus précisément, la question était de savoir si la progression ou le cours des changements matriciels constatés dans la tendinopathie du modèle animal de rat étaient également constatés dans la tendinopathie humaine. Cette partie s'est intéressée plus particulièrement à déterminer, à l'aide d'une méthode histologique, si la quantité des GAGs totaux était directement corrélée au degré pathologique présenté par le tendon humain. Pour ce faire, les GAGs totaux et spécifiques de tendon patellaire humain sains et à différents stades de la pathologie ont été marqués et/ou quantifiés. L'outil indiquant les stades d'avancement de la tendinopathie est une méthode d'évaluation connue sous le nom de VISA score.

A des fins diagnostiques, notre objectif était de savoir s'il est possible de déterminer, à partir de la quantité de GAGs présente dans le tendon, le degré de sévérité de la pathologie et ainsi

fournir des informations précieuses pour les thérapeutes afin qu'ils puissent adapter leur traitements. Cette approche pourra être étendue ensuite à d'autres marqueurs de la pathologie

I. Les GAGs totaux sulfatés dans la tendinopathie patellaire humaine

La tendinopathie patellaire est de loin la plus fréquente des tendinopathies du genou (80%) diagnostiquées chez l'Homme. Elle est due à la surcharge fonctionnelle chronique du tendon patellaire. Elle concerne plus particulièrement les personnes qui font des mouvements répétés de flexion-extension du genou en surcharge. Les lésions initiales de cette tendinopathie sont identiques à celles observées dans la tendinopathie du supra-épineux des modèles animal et humain, à savoir des micro-ruptures d'origine micro-traumatique pouvant conduire à la formation de lésions macroscopiques pathologiques (chondrogenèse, calcifications et ossifications) dont certaines pourront s'accompagner de phénomènes inflammatoires.

Un laboratoire canadien (University of British Columbia) avec lequel nous collaborons nous a fourni des coupes histologiques de tendon patellaire humain à différents stades pathologiques. Nous avons ainsi pu rechercher si nous retrouvions dans cette tendinopathie l'augmentation de GAGs observée dans la tendinopathie du supra-épineux du modèle animal. Ainsi, la première étape a consisté en un marquage des coupes histologiques au DMMB suivie d'une analyse d'image afin de quantifier les GAGs totaux sulfatés dans les tendons contrôles et pathologiques. Il faut noter que le VISA score le plus faible correspond au degré le plus avancé de la pathologie et que le VISA score 100 correspond aux tendons patellaires non pathologiques.

Cette expérience nous a permis de comparer les tendons patellaires humains présentant un degré de pathologie assez élevé (VISA score = 20) et de tendons sains. Les résultats ont montré une augmentation très significative de la quantité des GAGs totaux (de l'ordre de 10 fois) dans les tendons pathologiques ([Figure 36](#)) par rapport au niveau présent dans les tendons contrôles.

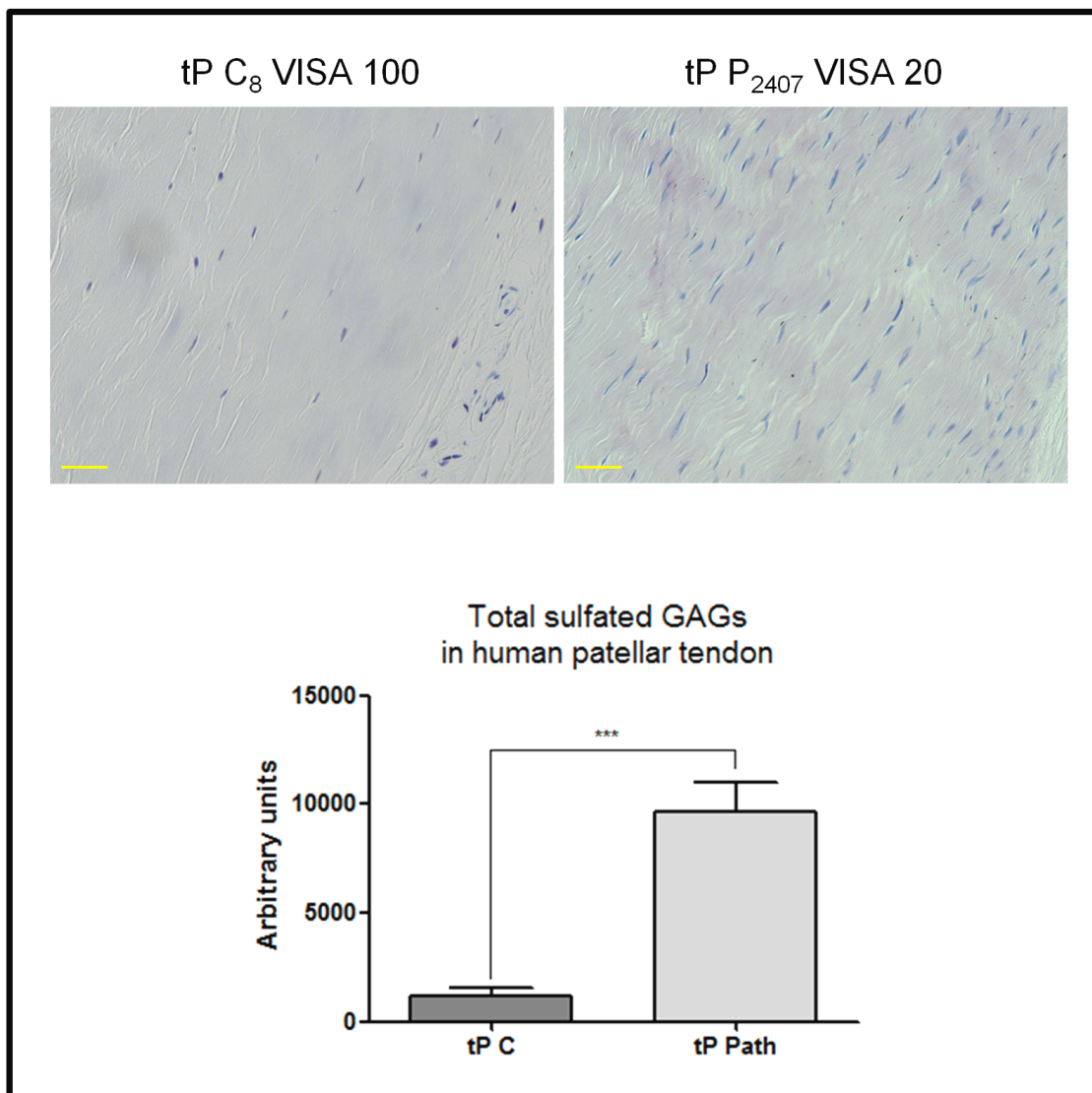


Figure 36. Quantification histologique des GAGs totaux sulfatés dans les tendons patellaires humains contrôles (tP C) et pathologiques (tP P). Echelle = 40 μ m.

⇒ Comme nous l'avons constaté dans la tendinopathie du supra-épineux du modèle animal, la tendinopathie patellaire humaine présente également une augmentation de la teneur des GAGs totaux sulfatés.

II. Les GAGs spécifiques (DS et CS) et les PGs (décorine, versicane et aggrecane) dans la tendinopathie patellaire humaine

Le tendon est composé principalement de collagène, mais il contient également des GAGs associés aux PGs. Il a déjà été montré dans notre modèle animal de tendinopathie du supra-épineux que la sur-utilisation provoquait une augmentation quantitative des DS et CS, de

même que de la décorine, du versicane et de l'aggrécane. Ainsi, nous avons cherché à savoir si nous retrouvions une hausse relative de ces mêmes composants dans la tendinopathie patellaire humaine au niveau histologique.

Les résultats obtenus concernant la teneur des GAGs spécifiques, montrent une augmentation du marquage fluorescent des DS et des CS dans les tendons patellaires pathologiques par rapport aux tendons contrôles (Figure 37). On remarque que les DS sont localisés dans tout le tendon alors que les CS sont plutôt localisés autour des ténocytes, marqués ici au DAPI.

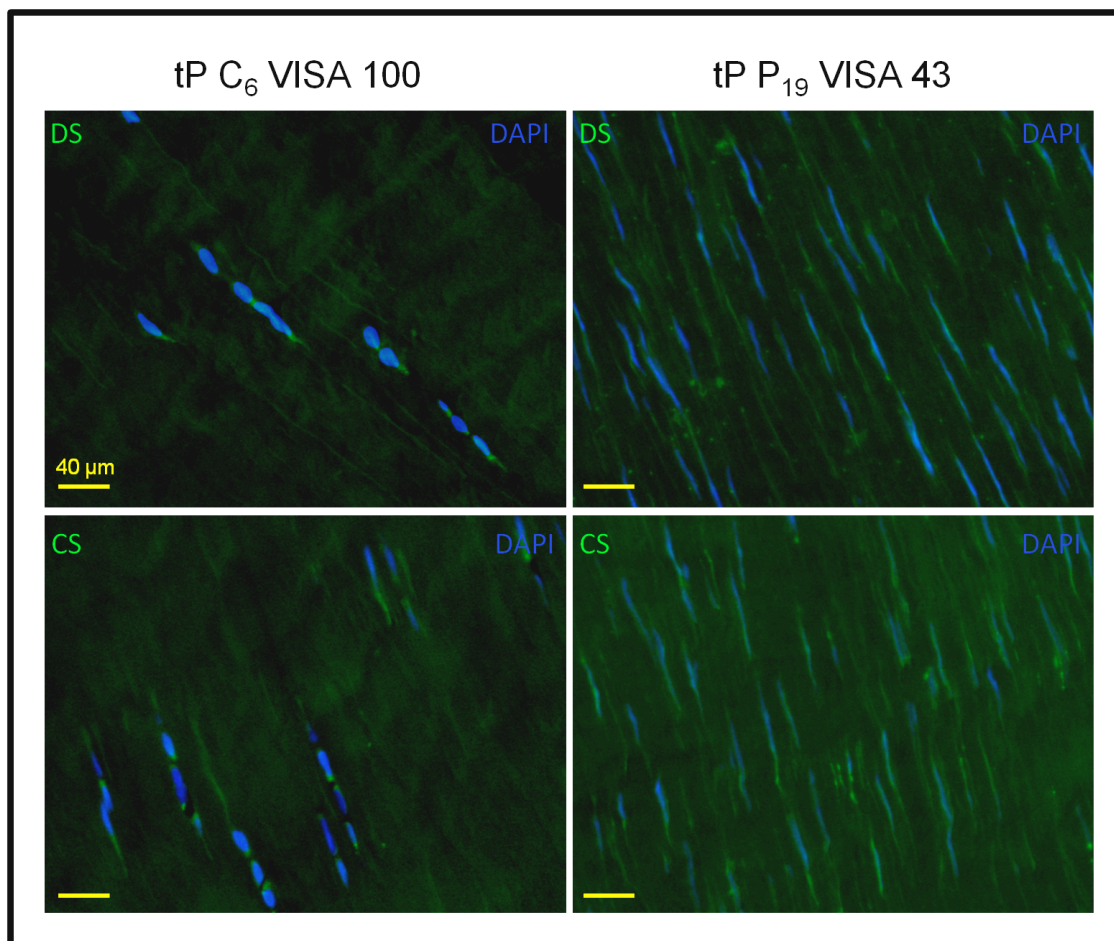


Figure 37. Immunomarquage des DS et CS dans les tendons patellaires humains contrôles (tP C) et pathologiques (tP P). Echelle = 40 μ m.

Après avoir déterminé l'expression des DS et des CS dans les tendons patellaires contrôles et pathologiques, il était important de déterminer également l'expression des PGs porteurs de ces GAGs. Les résultats obtenus montrent une augmentation significative du marquage

fluorescent de la décorine, du versicane et de l'aggrécane dans les tendons patellaires pathologiques (Figure 38). On remarque que le marquage de la décorine est localisé dans tout le tendon, alors que le marquage du versicane et de l'aggrécane prend l'aspect de longues chaînes de part et d'autre des ténocytes dont les noyaux apparaissent très fusiformes.

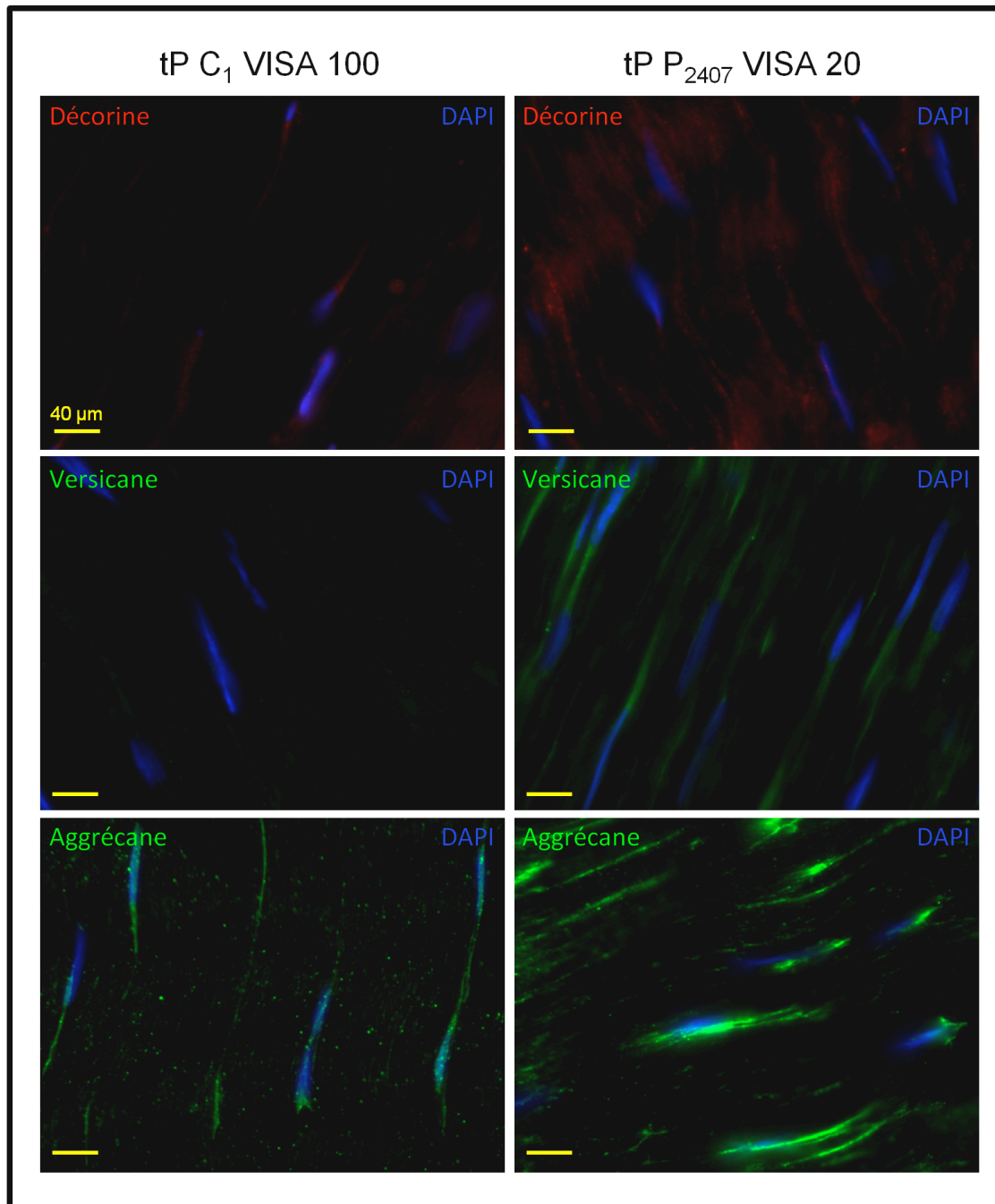


Figure 38. Immunomarquage de la décorine, du versicane et de l'aggrécane dans les tendons patellaires humains contrôles (tP C) et pathologiques (tP P). Echelle = 40 µm.

⇒ Les résultats ci-dessus concernant le profil protéoglycanique, montrent que les DS, les CS, la décorine, le versicane et l'aggrécane augmentent de façon significative dans les tendons patellaires humains pathologiques. L'augmentation du versicane, de l'aggrécane et des CS suggère une transition histologique du tendon patellaire vers un tissu fibrocartilagineux. Ces résultats sont corroborés par les résultats obtenus avec le modèle animal de sur-utilisation dans le tendon supra-épéineux. Notre travail a démontré que cette orientation se produit dès le début d'une mauvaise utilisation du tendon (Cf. Article 1).

III. Corrélation des GAGs totaux sulfatés au degré d'avancement de la tendinopathie patellaire humaine

Sur la base de ces résultats préliminaires, nous avons cherché à savoir ensuite si la quantité des GAGs était corrélée au degré pathologique évaluée par le VISA score. A l'aide de la méthode histologique DMMB, nous avons analysé la quantité de GAGs totaux sur d'autres échantillons présentant des VISA scores variables (de 100 à 4) (Figure 39). Les tendons contrôles (VISA = 100) et les tendons très pathologiques (VISA = 4 et 13) ne contiennent qu'une faible quantité de GAGs, alors que les tendons moyennement pathologiques (VISA score entre 60 et 20) montrent une quantité importante de GAGs.

La corrélation linéaire entre la teneur de GAGs sulfatés et le VISA score n'est pas évidente puisque le coefficient de corrélation calculé est faible ($R^2 = 0.11$) si l'on tient compte de tous les échantillons. Pour les scores entre 53 et 20 il semble qu'il y ait une corrélation forte entre le score et la pathologie. Pour les scores faibles (13 et 4), signifiant une pathologie très avancée et une douleur importante, les tendons ne présentaient pas de marquage de GAGs.

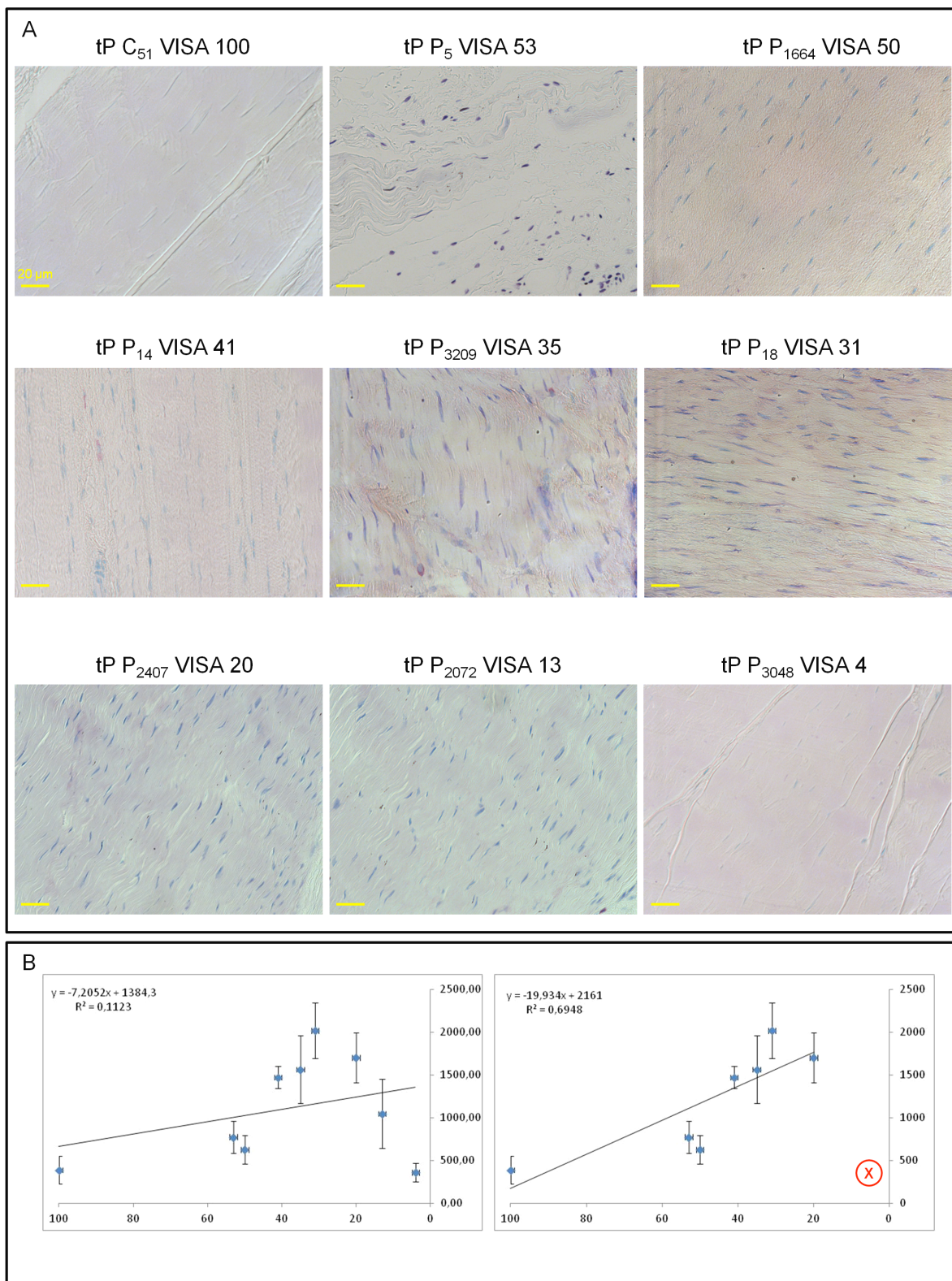


Figure 39. Marquage (A), quantification et corrélation (B) histologique des GAGs totaux sulfatés au VISA Score dans les tendons patellaires humains contrôles (tP C) et pathologiques (tP P). Echelle = 40 μ m.

- ⇒ Les résultats indiquent que les GAGs totaux sulfatés augmentent de façon significative dans les tendons patellaires humains pathologiques ayant des scores intermédiaires (VISA score entre 20 et 40) et inversement pour les tendons ayant des scores faibles (VISA score = 13 et 4).
- ⇒ L'analyse de la teneur en GAGs peut contribuer à un diagnostic pour ces états pathologiques modérément douloureux. Pour les cas de douleurs très importantes, d'autres marqueurs pathologiques devront être trouvés.

DISCUSSION GÉNÉRALE



Les tendinopathies font partie des troubles musculo-squelettiques (TMS) qui sont les maladies professionnelles les plus répandues en France. Elles sont caractérisées par un inconfort, un affaiblissement, des douleurs plus ou moins importantes liées à l'activité et peuvent conduire à une rupture du tendon. La pathologie a été autrefois considérée comme due à une réaction inflammatoire (tendinite) mais est maintenant considérée comme essentiellement dégénérative (tendinose), en partie liée à une mauvaise vascularisation conditionnant une réparation lente du tendon. Prévenir et traiter efficacement ces pathologies exige une bonne connaissance des facteurs les induisant. Il n'existe pas de traitement unique, efficace et applicable pour tous, d'autant que la prise en compte des pathologies est souvent tardive. Chaque démarche thérapeutique doit être adaptée aux particularités du tendon lésé et au degré d'avancement de la pathologie.

Les tendinopathies de la coiffe des rotateurs de l'épaule constituent de loin les tendinopathies les plus répandues parmi les TMS, et plus particulièrement celle du tendon supra-épineux (tSE). Elles sont constatées généralement chez des personnes ayant une activité qui requiert une mobilisation répétitive de l'articulation de l'épaule, en particulier en élévation. La tendinopathie du supra-épineux s'accompagne souvent d'une augmentation du nombre de micro-déchirures. Comme cela a été montré dans des études antérieures sur le tendon d'Achille chez l'Homme (Gibbon *et al.* 1999), ces micro-déchirures favorisent la survenue de déchirures partielles ou totales du tendon. Au cours des phases tardives de la pathologie du tSE chez le rat, on observe au niveau tissulaire une désorganisation du réseau collagénique ainsi que des modifications qualitatives et quantitatives des éléments de la matrice extracellulaire (MEC) tels que les collagènes ou les GAGs (Archambault *et al.* 2007; Scott *et al.* 2007). Au niveau biomécanique, on constate une diminution de la raideur qui se traduit par une moins bonne capacité de déformation du tendon (Soslowky *et al.* 2000).

Le travail qui m'a été confié au cours de ce projet de thèse a été d'apporter certaines réponses à des questions d'ordre biochimique et cellulaire au cours des phases précoces de la pathologie conduisant à une meilleure compréhension de l'étiologie de la tendinopathie du supra-épineux. Déterminer la chronologie des changements dans la matrice tendineuse survenant au cours de la pathologie pourrait nous permettre d'avoir la possibilité d'agir en amont de l'apparition des symptômes et ainsi les prévenir.

Dans ce cadre, le premier objectif de ma thèse a été de mettre en place un modèle animal de tendinose, déjà validé, afin de préciser les caractéristiques cellulaires et moléculaires précoces

de la pathologie. Le deuxième objectif a consisté à déterminer quand apparaissent les changements matriciels constatés dans le tSE pathologique et comment ils évoluent au début de la tendinopathie. On pouvait concevoir que les changements matriciels soient provoqués par une réponse due aux cellules du tendon ou par une réponse inflammatoire débutante, ou une combinaison des deux. Ainsi, le troisième objectif a été d'évaluer d'abord le degré d'implication des ténocytes et des cellules inflammatoires dans la dégradation enzymatique de remodelage matriciel, puis la contribution possible des médiateurs pro-inflammatoires à cette dégradation. Enfin, le dernier objectif de ce projet de thèse a été de déterminer si les changements matriciels observés au cours de la tendinopathie dans le modèle animal étaient représentatifs de ceux d'une tendinopathie humaine.

I. Le modèle animal de sur-utilisation du tSE

Les études histologiques et biochimiques des tendinopathies chez l'Homme sont difficiles car elles nécessitent de pouvoir se procurer des échantillons de tendons. Ils peuvent être obtenus par biopsie lors d'un acte chirurgical mais ils sont malheureusement souvent prélevés sur des personnes qui sont à un stade très avancé de la pathologie. De plus, il est très difficile d'obtenir des échantillons de tendons sains comme contrôles. Ainsi, pour une meilleure compréhension de la tendinopathie et de ses mécanismes sous-jacents, des modèles animaux appropriés à chaque tendinopathie sont nécessaires. Le modèle utilisé au cours de ce projet de thèse est un modèle *in vivo* de sur-utilisation du tSE chez le rat induisant une tendinose. Ce modèle a été établi par l'équipe du Dr Soslowky (Soslowky *et al.* 2000). Il consiste en un entraînement quotidien des rats sur un tapis roulant avec une pente descendante de 10 °, à une vitesse de 17 m/min (soit 1 km/h), 1 h/jour, 5 j/semaine et cela pendant quelques semaines.

Avantages du modèle animal utilisé

Ce modèle induit une tendinose représentative de la tendinose observée chez l'Homme (Soslowky *et al.* 2000).

Le protocole d'entraînement préconisé induit une sur-utilisation du tSE suffisamment reproductible pour permettre l'étude d'un large éventail de composants pouvant être impliqués dans la genèse de la pathologie. Si le protocole est suivi rigoureusement, ce modèle est efficace car il provoque des lésions qui n'ont pas le temps de se réparer et ainsi conduisent à la dégénérescence du tendon. Cependant, les lésions pathologiques sont quasiment réversibles si le protocole est stoppé (Jelinsky *et al.* 2008).

L'usage de la pente descente est un élément très important pour la validité du modèle. En effet, la pente permet de redistribuer la masse de l'animal sur les pattes antérieures ce qui oblige leurs muscles à se contracter alors qu'ils sont étirés (contraction excentrique) (Devkota *et al.* 2007). Cette contraction induit plus de lésions qu'une contraction sans étirement musculaire (contraction concentrique). De plus, les mouvements répétitifs de flexion des membres antérieurs effectués lors de la course sur la pente descendante, compte tenu de la masse de l'animal, favorisent le glissement vertical de la tête de l'humérus dans la cavité glénoïde. Ceci induit par conséquent le frottement répétitif du tSE sur l'acromion. Cette course semble altérer uniquement le tSE, sans effet sur d'autres tendons tels que le tendon d'Achille par exemple (Huang *et al.* 2004). A l'inverse, si le tendon d'Achille avait été notre objet d'étude, une course en pente ascendante aurait été sûrement plus pertinente (Glazebrook *et al.* 2008).

Inconvénients du modèle animal utilisé

Ce protocole, très efficace pour induire une altération du tSE, a néanmoins quelques inconvénients. En effet, la mise en œuvre du programme d'entraînement chez le rat s'est révélée particulièrement délicate. La course sur tapis roulant a nécessité beaucoup de temps et d'efforts car il était difficile d'obliger les animaux à courir assez vite et assez longtemps. Dans un lot d'animaux de même âge (2 mois), au moins la moitié refuse de courir, ainsi nous avons dû acquérir un nombre important d'animaux afin d'obtenir finalement une cohorte d'animaux actifs de taille suffisante pour valider les résultats. Il semblerait que certains rats atteignent plus que d'autres un niveau de stress et d'anxiété élevé qui les rendrait naturellement rétifs aux sollicitations d'entraînement auxquelles nous les soumettons. La période d'adaptation à l'entraînement permet de détecter ces animaux récalcitrants qui sont écartés du lot des animaux entraînés. Les animaux n'ayant pas couru étaient utilisés en tant qu'animaux contrôles.

Outre la difficulté de la mise en place du protocole d'entraînement des animaux, le tSE en lui-même et l'espèce animale rat ont posé également quelques problèmes techniques. Tout d'abord la taille du tSE est très réduite, elle ne dépasse pas 1.5 cm pour 20 mg de poids frais. Ensuite, la quantité faible de matériel extraite d'un tSE du rat a été un facteur limitant pour certaines investigations. Enfin, la qualité du tissu, riche en collagène et sa résistance ont nécessité des mises au point multiples.

Ce projet de thèse a donc permis de mettre en place en France un nouveau modèle animal de tendinose débutante à caractère non inflammatoire et d'origine mécanique, qui évolue vers une tendinose installée analogue à celle observée chez l'Homme. Sa finalité est d'approfondir les connaissances sur le mécanisme de la pathologie précoce de la tendinopathie du supra-épineux et les interactions mécanobiologiques qui lui sont associées.

II. Les changements des GAGs matriciels : signes précoces de tendinopathie

La course en pente descendante induit différents changements matriciels au sein du tSE. A l'aide de ce modèle nous avons détecté et analysé les changements précoces des GAGs, des protéoglycanes et des collagènes et montré que certains de ces changements correspondaient à une altération phénotypique des cellules de tendon vers un profil chondrocytaire.

Le sur-entraînement modifie quantitativement les GAGs

Dans la première partie, nous avons montré une augmentation significative des GAGs totaux sulfatés qui apparaît à partir de 4 semaines de sur-utilisation. Cette augmentation perdure jusqu'à 16 semaines tout en diminuant quelque peu. Ces résultats confirment ceux d'une étude antérieure menée à l'aide du même modèle sur l'évolution de la teneur des GAGs dans la zone tendineuse qui, cependant, croît progressivement jusqu'à 16 semaines (Scott *et al.* 2007). En utilisant un modèle de course sur une pente ascendante, une autre étude a montré par coloration au bleu Alcian, une augmentation croissante des GAGs totaux dans le tendon d'Achille à partir de 4 semaines de sur-utilisation qui perdure et qui demeure plus importante que chez les témoins à 16 semaines (Silva *et al.* 2011). Nous savons que chaque tendon subit des contraintes mécaniques différentes. Cependant, lors d'une sur-utilisation, le tendon d'Achille est principalement soumis, comme le tSE, à la fois à des contraintes tensiles et compressives.

L'augmentation de GAGs est-elle associée à une augmentation de la charge hydrique du tendon ?

Quels que soient leurs types, l'augmentation des GAGs sulfatés, qui sont pourvus de nombreuses charges anioniques rétentrices d'eau, devrait accroître la masse hydrique contenue dans le tissu. Cette surcharge hydrique pourrait contribuer, en modifiant la raideur tissulaire, à l'altération histologique du tendon.

Nous n'avons pas pu observer de changements de la masse hydrique mesurée par lyophilisation dans le tSE au cours de la sur-utilisation. Une étude sur des tendons patellaires

humains contrôles et pathologiques a montré une augmentation significative de la masse hydrique tissulaire dans le tendon pathologique en utilisant la même méthode de quantification (Samiric *et al.* 2009). Nous n'avons pas d'explication satisfaisante de ces différences. On ne peut pas exclure que la méthode de quantification de la masse hydrique ne soit pas assez sensible pour pouvoir détecter les différences infimes entre le tSE contrôle et sur-utilisé. Il serait important de trouver une autre méthode plus efficace et plus sensible. La méthode thermogravimétrique (Bihari-Varga *et al.* 1969; Bihari-Varga et Biro 1971) serait une alternative à la lyophilisation car elle permet de mesurer les variations infimes de masse en fonction de la température, lorsque des extraits de GAGs hydratés sont chauffés progressivement au-delà de 100°C, à des températures qui permettent l'évaporation totale de l'eau.

La teneur en GAGs d'un tendon est-elle représentative d'un état pathologique ?

La plupart des tendons humains atteints de tendinopathie présentent une forte augmentation du taux de GAGs. La question d'une relation existant entre le degré de pathologie et la quantité de GAGs se pose donc. Au cours de ce travail, nous avons tenté de corrélérer la quantité de GAGs totaux à un score de référence (VISA score) indiquant le stade d'avancement de la tendinopathie patellaire chez l'Homme. Le VISA score est basé principalement sur les réponses des patients à 10 questions portant sur l'intensité de la douleur ressentie dans différentes situations. Pour chaque question, l'intensité de la douleur est évaluée entre 10 (pas de douleur) et 0 (forte douleur) (Cf. annexe n°2).

Nous avons observé, lors d'une première expérience, une augmentation de l'ordre de 10 fois du marquage des GAGs sur des coupes de tendons patellaires humains dont le VISA score était de 20, comparé à des tendons au VISA score de 100. Ceci nous a conduit à évaluer la quantité de GAGs sur l'ensemble des échantillons de tendons patellaires dont nous disposions qui présentaient des scores allant de 100 à 4. Nos résultats n'ont pas montré une corrélation linéaire très importante entre la teneur de GAGs sulfatés et le VISA score. En effet, le coefficient de corrélation calculé n'était que de 0.11. Il est intéressant de noter cependant que pour les scores intermédiaires, entre 53 et 20, une corrélation forte ($R^2 = 0.69$) entre le score et la quantité de marquage des GAGs a pu être établie. Cette étude suggère que l'analyse histologique des GAGs peut présenter un intérêt diagnostique dans les cas pathologiques de sévérité moyenne.

Nous n'avons pas d'échantillons correspondant aux VISA scores associés à une faible pathologie (VISA score entre 53 et 100) probablement parce que les douleurs des patients à ces niveaux de VISA score ne justifiaient pas que l'on fasse des biopsies.

Pour le cas de pathologie très avancée (VISA score de 4 signifiant une très forte douleur), le tendon ne présentait pas plus de marquage de GAGs que les tendons témoins. Si on exclut une erreur d'échantillonnage, diverses raisons peuvent être évoquées dans le cas de la pathologie très avancée pour expliquer ce faible taux de GAGs :

- Le VISA score, basé sur une évaluation de la douleur dont la perception est éminemment subjective, ne permet pas une évaluation toujours pertinente de la pathologie. Il faut par ailleurs noter que des tendons asymptomatiques peuvent présenter un état structurel très détérioré et inversement.
- Le VISA score est pertinent mais la teneur en GAGs totaux dans les tendons très pathologiques diminue très fortement. Le nombre de ténocytes impliqués dans la synthèse des GAGs diminuerait, soit par une incapacité des cellules à pouvoir synthétiser ces GAGs dans les tendons très pathologiques, soit par la perte de cellules viables. On sait que l'apoptose devient très importante dans les tendons très pathologiques (Millar *et al.* 2009).
- Les enzymes de dégradation des GAGs augmenteraient fortement ou les enzymes de sulfatation diminueraient fortement dans les pathologies les plus avancées. Les GAGs seraient moins détectables par la technique de coloration au DMMB. Une analyse des variations possibles des enzymes impliquées dans la dégradation ou la sulfatation au cours de la pathologie serait nécessaire.

Cette étude suggère que l'analyse histologique des GAGs peut présenter un intérêt diagnostique dans les cas pathologiques de sévérité moyenne. Dans le cas de forte douleur, le diagnostic est facile à établir et ne nécessite pas d'investigation histologique supplémentaire pour le confirmer.

Le surentraînement modifie qualitativement les GAGs

Nous avons montré que l'augmentation des GAGs totaux sulfatés observée au cours de la surutilisation concernait principalement les DS et dans une moindre mesure les CS. L'augmentation des DS a été corroborée par celle de l'expression des transcrits d'une enzyme, la D4ST, appelée également la CHST14, spécifique de la synthèse des DS. Notons qu'il n'existe pas d'enzymes permettant de caractériser spécifiquement et simplement le niveau de synthèse des CS.

Nos analyses biochimiques et immunologiques ou histochimiques ont montré que le HS est peu représenté. Nous n'avons pas pu mettre en évidence un changement significatif du taux de cette famille de GAGs au cours du processus de sur-utilisation.

Ces analyses biochimiques ont été réalisées sur le tendon entier. La distribution des GAGs et les proportions de DS et de CS dans les différentes zones du tissu tendineux n'ont pas été étudiées faute de matériel suffisant. L'analyse histologique par immuno-marquage réalisée sur la zone médiane purement fibreuse du tSE a montré une augmentation significative des GAGs de type DS et CS à partir de 4 semaines de sur-utilisation. Cette zone du tendon subit principalement des contraintes en compression si elle vient au contact de l'acromion. Tout en restant le GAG majeur présent dans le tSE, le DS semble diminuer faiblement en proportion au profit d'une légère augmentation de CS à 2 semaines de sur-utilisation et plus encore à 4 semaines. Des travaux utilisant un modèle de sur-utilisation du tendon fléchisseur chez le lapin ont montré que les GAGs dans les zones de compression étaient majoritairement des CS, tandis que dans les zones de tension, on trouvait majoritairement des DS (Merrilees et Flint 1980). Ceci suggérerait que les forces agissant sur le tendon sur-utilisé dans notre modèle seraient en effet de nature compressive. Ces résultats diffèrent de ceux d'une étude réalisée sur des tSE humains contrôles et pathologiques qui a montré que le type de GAG dominant était le CS (Riley *et al.* 1994). Cette différence pourrait résulter d'un profil de contraintes *in situ* différent chez les deux espèces ou être due également à des variations dans la technique utilisée.

Par l'analyse biochimique des disaccharides constitutifs des GAGs de tendons extraits à différents temps de sur-utilisation, nous avons tenté de savoir si la composition des chaînes de GAGs était modifiée de façon perceptible. Cette analyse biochimique des disaccharides par HPLC ne nous a pas permis de montrer de différences significatives entre les échantillons.

Un test fonctionnel s'est avéré plus sensible pour détecter des changements qualitatifs dans la composition des GAGs. En effet, à l'aide d'un test ELISA compétiteur nous avons montré que les GAGs extraits des tSE à 4 semaines de sur-utilisation présentaient plus d'affinité pour le facteur de croissance HARP que les GAGs extraits des tSE contrôles. L'affinité de ces mêmes GAGs pour un autre facteur de croissance, le FGF-2, n'est pas modifiée avec la sur-utilisation. Cette augmentation d'affinité pour l'HARP et non pour FGF-2 pourrait être due à des changements subtils dans la séquences des GAGs, notamment celle des CS et des DS, vers une plus grande affinité pour le facteur de croissance HARP (Vacherot *et al.* 1999). Ces changements, non perceptibles à travers la seule analyse des disaccharides composant les

GAGs, contribueraient à une séquestration d'HARP dans la MEC. En effet, la teneur protéique et non transcriptionnelle d'HARP augmente dans les tSE à 2 et 4 semaines de sur-utilisation. Cette augmentation est probablement une réponse très localisée des ténocytes aux contraintes mécaniques subies au cours de la sur-utilisation puisque l'expression d'HARP n'augmente pas dans le plasma des rats entraînés. Cette séquestration du facteur de croissance HARP pourrait avoir à son tour des effets sur la composition de la MEC elle-même.

D'autres expériences pourraient attester des changements qualitatifs des GAGs. Par exemple, il se pourrait que les GAGs de tendon sur-utilisés protègent moins certains collagènes de la dégradation protéolytique, comme cela a été montré dans la tendinopathie chez le cheval (Dulce Papy, communication personnelle).

La sur-utilisation du tSE provoque une transformation phénotypique vers une chondrogenèse

Dans notre modèle, une différenciation chondroïde est indéniable.

La chondrogenèse est caractérisée par l'augmentation d'expression de certains composants spécifiques du tissu cartilagineux qui sont généralement peu ou pas exprimés dans les tendons sains. Nous avons ainsi montré que le niveau d'expression des grands PGs, comme le versicane et l'aggrécane, augmente dans les tSE à 2 et 4 semaines de sur-utilisation, ce que nous avons confirmé par l'analyse histologique. Nous avons également montré que les transcrits du collagène de type II et de type VI augmentent à partir de 2 semaines de sur-utilisation. L'ensemble de ces observations atteste que le tendon est le siège d'une différenciation chondroïde dans les phases précoces de la sur-utilisation, dont l'un des régulateurs en amont semble être le facteur de transcription SOX-9. Ce dernier est un marqueur connu de la chondrogenèse dont les transcrits augmentent en même temps que celle des composants protéiques matriciels.

L'expression du TGF β -1 totale augmente d'une façon très significative à 1 semaine de sur-utilisation dans les tSE et diminue ensuite à 2 et 4 semaines. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par d'autres avec le même modèle (Archambault *et al.* 2007) et suggèrent l'implication du TGF β -1 dans la chondrogenèse. En effet, il est connu que TGF β -1 possède une capacité inductrice de la fibrognèse, mais récemment sa capacité à promouvoir également la chondrogenèse a été mise en évidence au cours du développement (Quintana *et al.* 2009). De plus, le TGF β -1 a été identifié comme inducteur de SOX-9 au cours du développement (Lorda-Diez *et al.* 2009). Par conséquent, ces 2 facteurs constitueraient un duo régulateur de la différenciation chondroïde où SOX-9, induit en aval du TGF β -1, serait le signal qui

sélectionnerait l'effet pro-chondrogénique du TGF β -1 au détriment de son effet pro-fibrogénique. La chronologie de leur apparition dans les tSE sur-utilisés conforte cette possibilité.

Cette différenciation chondroïde est également associée à une diminution de marqueurs tendineux. Nous avons observé que la ténomoduline, un marqueur spécifique de la tendogénèse (Shukunami *et al.* 2006), diminue légèrement à 2 semaines puis fortement à 4 semaines de sur-utilisation dans le tSE.

Enfin, l'augmentation de l'activité de la MMP-2 et l'absence d'activation de la MMP-9 que nous avons constatés, vont aussi dans le sens d'une différenciation cellulaire comme observé au cours de la myogénèse avec un profil enzymatique proche (Attia *et al.* 2011).

Implication d'HARP dans la chondrogenèse

L'augmentation constatée de la teneur d'HARP avec la sur-utilisation suggèrent que ce dernier peut être impliqué dans le changement phénotypique chondrocytaire des ténocytes. En effet, HARP a été montrée comme étant impliquée dans la chondrogenèse au cours du développement (Dreyfus *et al.* 1998). Par ailleurs, la modification fonctionnelle des GAGs en termes d'affinité vis-à-vis d'HARP, par modulation de sa séquestration, pourrait renforcer son effet. Le rôle direct du facteur de croissance HARP dans la chondrogenèse suggéré par nos résultats mérite d'être approfondi. Il a été montré que HARP est un facteur autocrine des cellules cartilagineuses. Il serait donc intéressant de savoir si les ténocytes de tendon, mis en culture primaire, produiraient des quantités accrues d'HARP en fonction de la durée de sur-utilisation. D'autre part, il serait également intéressant de traiter une culture primaire de ténocytes avec du HARP recombinant et voir si l'expression des marqueurs chondroïdes est augmentée ou pas. Nous avons réalisé des expériences préliminaires où des cultures primaires de ténocytes de supra-épineux ont été traitées pendant quelques jours avec HARP. Ce traitement nous a permis de montrer que le collagène de type II, l'aggrécane et SOX-9 sont légèrement augmentés dans les ténocytes. Ces résultats doivent être confirmés.

Mettre en évidence directement le rôle du facteur de croissance HARP dans le modèle de sur-utilisation du rat est la continuation logique de l'investigation.

Conséquences des changements de composants matriciels collagéno-protéoglycaniques sur la biomécanique tendineuse

Au cours de la sur-utilisation, des changements d'expression des composants régulateurs biomécaniques majeurs du tissu tendineux que sont les collagènes, les PGs et les GAGs, ont été observés.

Nous avons montré qu'à partir de 2 semaines, les transcrits du collagène de type I diminuent dans le tSE sur-utilisé. Le collagène de type I, composant le plus abondant dans le tendon dont les fibres sont épaisses, est essentiel pour assurer la raideur de ce dernier sous la traction. Par conséquent, cette diminution permettra au tendon de s'étirer davantage quand il subit une contrainte tensile.

Simultanément nous avons observé que les transcrits et l'immuno-marquage du collagène de type III, qui est localisé dans l'endoténon inter-fasciculaire, augmentent. Ce collagène néo-synthétisé se dépose autour des fibres de collagène de type I et non au niveau de l'endoténon. Le collagène de type III semble contribuer à l'empaquetage et au maintien de la cohésion structurelle et mécanique des fibres de collagène de type I et II avec lesquelles il co-polymérise. Ses fibres fines et placées plus transversalement que celles du collagène de type I et II, le collagène de type III est moins raide en traction mais sa souplesse tridimensionnelle lui confère une certaine adaptation au cisaillement. Son augmentation pourrait être un événement associé au remodelage collagénique nécessaire à la transition vers un tissu fibro-cartilagineux où il serait alors exprimé de manière transitoire au cours de la différenciation chondroïde. Cependant, ce mécanisme n'a toujours pas été mis en évidence pour le moment. Par ailleurs, si le collagène de type III est présent dans le cartilage mature, il y serait plutôt le témoin d'un événement passé lésionnel qu'un caractère constitutif (Wu *et al.* 2010). C'est pourquoi, il est beaucoup plus probable que l'apparition du collagène de type III, dans cette zone péri-fibreuse, témoigne d'une réponse cicatricielle à caractère fibrotique développée par le tendon pendant la sur-utilisation, dont le pic du TGF β -1 serait le principal inducteur.

Une hausse du collagène II a été constatée à partir de 2 semaines de sur-utilisation. On sait que le collagène de type II possède des fibres de moindre diamètre que celles du collagène de type I. Ces fibres sont également différentes par une disposition tissulaire en diagonale par rapport à l'axe d'application de la contrainte en traction. L'augmentation constatée des transcrits du collagène de type II, contribue également à la baisse de raideur en traction du tendon sur-utilisé par rapport au tendon contrôle.

Ainsi, les changements collagéniques observés dans cette pathologie débutante, conduit à penser que l'on assiste à la fois à l'apparition de plages tissulaires chondroïdes et fibrotiques cicatricielles affaiblissant tout les deux la raideur tendineuse en traction.

Nous avons montré également que les petits PGs comme la décorine, le biglycan et la fibromoduline augmentent à partir de 2 semaines de sur-utilisation dans le tSE. Ces PGs interagissent avec les fibrilles des collagènes sur lesquelles ils retiennent l'eau et modifient ainsi la viscoélasticité. Les petits PGs interviennent également dans la fibrillogenèse au cours de laquelle ils régulent le diamètre des fibres. La décorine est connue pour favoriser la formation des fibres de collagène de petit diamètre (Dourte *et al.* 2012), alors que la fibromoduline entraîne la formation des fibres de collagène de gros diamètre. On peut supposer donc que les variations des petits PGs observées au cours de la sur-utilisation joueraient un rôle important dans la modulation du diamètre des fibres collagéniques. Ces variations conduiraient à la mise en place d'une population fibreuse hétérogène, enrichie en fibres de petit diamètre diminuant ainsi la raideur tendineuse. Ceci expliquerait dans ce même modèle de sur-utilisation, la baisse très importante du modulus en tension, qui perdure encore jusqu'à 16 semaines (elle atteint 60 %) (Soslowsky *et al.* 2000). Une analyse structurale matricielle plus poussée mériterait d'être conduite dans les phases précoces de sur-utilisation ainsi qu'un approfondissement de la relation entre l'assemblage des molécules de collagène avec les petits PGs et la mécanique tissulaire tendineuse.

Il a également été constaté que l'expression du collagène et la teneur en GAGs dans le tSE après entraînement étaient augmentées, cependant cette augmentation était annulée, pour les GAGs et non pour le collagène, une fois que les rats arrêtaient de courir pendant au moins 2 semaines (Jelinsky *et al.* 2008). Cette réversibilité différentielle, mécaniquement régulée, est sans doute due à la différence des vitesses de turn-over respectives des composantes glycaniques et collagéniques de la MEC.

III. Les MMPs acteurs majeurs du remaniement matriciel : processus inflammatoire ?

Nous avons constaté que des changements matriciels anaboliques importants surviennent à partir de 2 semaines en réponse à la sur-sollicitation mécanique. Il est souvent dit que les petites contraintes mécaniques répétitives du tendon, bien inférieures au seuil de rupture, provoquent des micro-déchirures à l'origine d'un processus inflammatoire (Wang 2006). Parallèlement, le catabolisme de la MEC contribue à son remodelage et il est principalement opéré par des enzymes qu'on appelle les MMPs. Nous nous sommes donc intéressés à identifier les acteurs métalloprotéasiques et à préciser les modalités de leur intervention. D'autre part, la protéolyse de la MEC pourrait être due aux ténocytes eux-mêmes en réaction

à la contrainte mécanique subie, ou bien provenir des cellules inflammatoires, également capables de produire et d'activer les MMPs. Nous nous sommes donc intéressés au rôle des médiateurs chimiques orchestrant le catabolisme et en particulier à rechercher la part des médiateurs pro-inflammatoires dans ce processus. L'inflammation et la dégénération pourraient ne pas s'exclure mutuellement dans la pathologie et pourraient dépendre aussi de l'évolution temporelle de cette dernière.

Quelles MMPs sont activées et à quel moment au cours de la sur-utilisation ?

Nos résultats ont montré une augmentation significative de l'activité gélatinolytique par zymographie *in situ* dans le tSE à partir de 2 semaines de sur-utilisation qui se maintient ensuite à un niveau élevé jusqu'à 4 semaines. Cette augmentation est probablement due à l'augmentation à partir d'1 semaine de l'activité de la MMP-2 observée par zymographie. En effet, il est peu probable que la majorité de l'activité gélatinolytique observée dans les tendons sur-utilisés soit due aux enzymes MMP-9, MMP-13 et MMP-3 compte tenu du fait que l'expression de leurs transcrits et/ou de leurs protéines n'est pas augmentée. De plus, l'expression de TIMP-1 et TIMP-3, respectivement les inhibiteurs de la MMP-13 et la MMP-3, augmente à 4 semaines de sur-utilisation par rapport au contrôle, ce qui va dans le sens d'une diminution de l'activité de ces enzymes. La MT1-MMP, étant par ailleurs dotée d'une activité gélatinolytique, pourrait contribuer à cette dégradation globale mais ce n'est pas le scénario enzymatique dominant, comme nous allons le développer dans le paragraphe suivant. Nos résultats ont également montré une augmentation corrélée significative de l'expression des transcrits de la MMP-2, de MT1-MMP et de TIMP-2. De plus, l'immuno-marquage a part ailleurs mis en évidence que l'activité de la MMP-2 est localisée à la périphérie des ténocytes disposés sur le pourtour des fibres de collagène de type I. Le dispositif enzymatique membranaire, MT1-MMP, MMP-2 et TIMP-2, participerait donc ici à la dégradation collagénique. Le mode de fonctionnement couramment admis de ce trio est une intervention en relais des 2 enzymes complexes, la MT1-MMP clivant le collagène en gélatine qui est ensuite dégradé par la MMP-2 (Ellerbroek *et al.* 2001). Rappelons que la MT1-MMP en association avec la TIMP-2 est connue par ailleurs pour activer la MMP-2. De plus, la diminution de TIMP-1 à 2 semaines de sur-utilisation pourrait aussi contribuer à l'augmentation de l'activité de la MMP-2. Notons qu'une controverse existe encore quant à la capacité collagénasique de la MMP-2. En effet, certains scientifiques soutiennent fermement et depuis toujours que la MMP-2 est une pure gélatinase, protéase opportuniste capable de

dégrader tout collagène dont l'hélicité serait altérée (Seltzre et Eisen 1999), et d'autres estiment que cette enzyme est aussi une collagénase (Aimes et Quigley 1995).

L'ensemble de nos résultats décrits ci-dessus, suggèrent de plus que la MMP-3 et la MMP-13 n'ont probablement pas un rôle initiateur de la tendinopathie.

En effet, nous avons montré que l'expression des transcrits de la MMP-3 diminue à partir de 2 semaines alors que la teneur de TIMP-3 augmente à 4 semaines de sur-utilisation. La MMP-3 exerce 2 rôles particulièrement importants pour notre étude à savoir la dégradation des PGs et l'activation des autres MMPs. La diminution de la MMP-3 pourrait contribuer de manière importante à l'accumulation des GAGs tissulaires associés aux PGs au cours des phases précoces de la tendinopathie et également à maintenir les MMPs inactives.

Une faible activité MMP-3 semble se poursuivre dans les phases tardives de la tendinopathie chez l'Homme, si l'on se base sur le fait bien établi que l'expression des transcrits (Ireland *et al.* 2001; Alfredson *et al.* 2003; Jones *et al.* 2006; de Mos *et al.* 2007) et des protéines (Ireland *et al.* 2001) de la MMP-3 continuent à diminuer. Cependant, une étude a montré une augmentation de l'expression et de l'activité de la MMP-3 dans la tendinopathie humaine (de Mos *et al.* 2007). Ainsi, l'évolution de l'activité de cette enzyme au cours de la pathologie installée comme de la pathologie au cours des phases précoces, est une question qui reste ouverte et mérite d'être approfondie.

La MMP-13 chez le Rat est l'homologue de la MMP-1 chez l'Homme. Les tendons humains atteints de tendinose chronique sont caractérisés, par rapport aux tendons sains, par une teneur accrue de MMP-1 et une réduction de TIMP-1, son inhibiteur spécifique. De plus, l'activité gélatinolytique tissulaire totale est supérieure dans les tendons atteints. Ceci suggère que l'activité de la MMP-1 y est probablement plus élevée (Fu *et al.* 2002).

Nos résultats suggèrent que la MT1-MMP et la MMP-2 sont responsables du catabolisme collagénique observé dans le tSE au cours des phases précoces de la sur-utilisation, l'une en tant que collagénase, l'autre en tant que gélatinase et la première activant la seconde. Si l'expression des transcrits de MT1-MMP et de MMP-2 augmente au cours des phases tardives de la tendinopathie humaine (Ireland *et al.* 2001; de Mos *et al.* 2007), l'activité spécifique de la MMP-2 n'a pas été suivie. Cependant, il a été mis en évidence que l'expression de la MMP-2 augmente dans les tendons asymptomatiques présentant une histologie pathologique dégénérative (Riley *et al.* 2002). Par ailleurs, il a été mis en évidence que l'expression des

transcrits de la MMP-9 augmente également dans les phases tardives de la tendinopathie humaine (de Mos *et al.* 2007).

Les résultats des études antérieures sur les tendons humains rapportent une sur-régulation à différents niveaux des enzymes MMP-1 et MMP-2. Cette différence constatée par rapport à nos résultats pourrait s'expliquer par un stade pathologique plus avancé des tendons humains. L'emballement de la machinerie protéasique extracellulaire, dont les enzymes MMP-13, MMP-3 et MMP-9 sont les représentants, pourrait se produire plus tardivement sous l'effet d'événements déclencheurs qu'il reste à déterminer. Sachant que les MMPs sont capables de s'activer les unes les autres, on peut penser par exemple que l'augmentation de la MMP-2 conditionne des changements plus tardifs dans l'expression et l'activation des autres MMPs.

En conclusion de cette partie, il est certain que toutes ces MMPs sont finement régulées temporellement non seulement dans leur expression, mais aussi dans leur activation notamment par l'équilibre des concentrations respectives de l'enzyme active et de son inhibiteur spécifique. Un déséquilibre transitoire entre les MMPs et les TIMPs représente l'une des premières conséquences de la sur-utilisation.

Le contexte du remaniement matriciel n'est pas inflammatoire

L'augmentation de l'expression et de l'activité de MMP-2 peut être due à la contrainte mécanique exercée sur les ténocytes ou à l'influence de cytokines inflammatoires sur ces cellules. Les cytokines sont des molécules pro- et anti-inflammatoires qui sont libérées principalement par les leucocytes infiltrants lors de l'inflammation. Il est bien acquis que ces cytokines peuvent être inductrices du catabolisme matriciel. Dans les tendinopathies humaines, peu de résultats ont été collectés sur la présence des cytokines pro-inflammatoires et de plus ces résultats se contredisent parfois. Une seule étude a montré que l'expression des transcrits de l'IL-6 en particulier se trouve augmentée d'une manière significative dans le tendon d'Achille atteint (Legerlotz *et al.* 2012). Cependant, une autre étude mentionne que l'expression des transcrits d'IL-1, d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-15 ne varie pas de manière significative (Alfredson *et al.* 2003).

Nos résultats ont montré l'absence d'un processus inflammatoire au cours des phases précoces de la tendinopathie. En effet, beaucoup de cytokines pro-inflammatoires de la famille des interleukines, en particulier IL-1 et IL-6, sont présentes à un taux très faible dans les tSE contrôles et sur-utilisés et il semble même qu'elles diminuent légèrement avec la sur-

utilisation. IL-13, aux propriétés anti-inflammatoires, se distingue par une très légère augmentation dans les tSE sur-utilisés. Nos résultats semblent ne pas aller dans le sens de ceux d'une autre étude utilisant le même modèle animal où il a été montré une augmentation progressive entre 1 et 8 semaines de l'expression des transcrits des marqueurs pro-inflammatoires comme FLAP et COX-2 (Perry *et al.* 2005). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que ces deux études s'intéressent à des médiateurs différents qui contrôlent des processus complexes dont la mise en place n'est pas obligatoirement en phase temporellement. Nos résultats ont montré également que les chémokines telles que MCP-1 (Macrophages Chemoattractant Protein-1), TCK-1 (Thymus ChemoKine-1) et MIP-3 α (Macrophage Inflammatory Protein-3 α), qui attirent les cellules inflammatoires macrophagiques, étaient diminuées légèrement à 4 semaines dans les tSE sur-utilisés. De plus, les macrophages identifiés par des anticorps ED1/CD-68 et ED2/CD-163, qui sont respectivement des macrophages pro- et anti-inflammatoires, n'augmentent pas au cours des phases précoces de la sur-utilisation. L'analyse de l'évolution au cours de la sur-utilisation des indicateurs cellulaires (macrophages) et moléculaires (cytokines et chémokines), permet d'affirmer que le mécanisme dans lequel se déroulent les changements précoces tissulaires liés à la tendinopathie n'est pas d'origine inflammatoire.

Nos résultats ont montré que les cytokines inflammatoires, principalement impliquées dans l'activation de la synthèse des MMPs, ne varient pas au cours de la sur-utilisation alors que le niveau d'expression et d'activité de la MMP-2 était fortement augmenté. Il est donc probable que cette famille de médiateurs chimiques soit impliquée dans la régulation de la MMP-2 et il faut donc faire appel à un autre facteur régulateur comme inducteur du couple MT1-MMP et MMP-2. EMMPRIN, qui est un inducteur des MMPs récemment mis en évidence (Huet *et al.* 2008), pourrait être responsable de l'augmentation du niveau d'expression de la MT1-MMP qui activerait alors la MMP-2. Cette hypothèse semble ici être confirmée, puisque la protéine d'EMMPRIN est exprimée dans le tissu tendineux et augmente à 2 semaines de sur-utilisation. Ce sont les ténocytes qui la produisent au vu de sa localisation sur leur membrane comme le montrent les expériences d'immuno-marquage fluorescent.

L'induction de l'expression d'EMMPRIN pourrait être mécanique. En effet, la contrainte mécanique peut induire l'expression d'EMMPRIN. Il a été montré que l'étirement des cellules endothéliales *in vitro* entraîne la production d'EMMPRIN (Haseneen *et al.* 2003). Il a été montré également que dans les cellules de drosophile, le cytosquelette semble être modifié par la présence d'EMMPRIN en liaison avec les intégrines (Curtin *et al.* 2005). D'autre part, il a

été largement prouvé que les contraintes mécaniques induisent *in vitro* la surexpression de la MMP-2 (Wang *et al.* 2010). Ainsi, il serait intéressant de faire une expérience complémentaire qui viserait à vérifier si la mise sous contrainte des ténocytes *in vitro* favoriserait la synthèse d'EMMPRIN et la production de la MMP-2. Par ailleurs, en bloquant EMMPRIN avec un anticorps spécifique, la relation de cause à effet reliant la contrainte mécanique, EMMPRIN et la MMP-2 serait ainsi démontrée. Sur la base de nos résultats, les stratégies thérapeutiques visant à prévenir la tendinopathie du supra-épineux au cours des phases précoces de la pathologie devraient cibler l'expression et l'activité de la MMP-2 ainsi que celle de ses inducteurs et activateurs, respectivement EMMPRIN et MT1-MMP.

IV.Scénarios possibles annonceurs d'une tendinopathie du tSE

Le scénario mécanobiologique tissulaire

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet de thèse ont montré que des changements moléculaires et cellulaires surviennent pendant les phases précoces (avant 4 semaines) dans le tSE suite aux contraintes mécaniques qu'il subit lors d'une sur-utilisation inappropriée de l'articulation de l'épaule.

Le facteur mécanique tissulaire, à l'origine de la différenciation du tendon en fibrocartilage, est la modification de la distribution et de l'intensité des contraintes compressives, tensiles et de cisaillement dans l'environnement ténocyttaire. Ce nouveau contexte de contraintes mécaniques pourrait, dès la première semaine, provoquer l'augmentation du TGF β -1 sans induire les cytokines pro-inflammatoires. Dans ce contexte, une ou plusieurs voies de signalisation anaboliques et cataboliques, conditionnées par la présence de SOX-9 dont le rôle nous apparaît ici primordial, induiraient la différenciation chondrocytaire des ténocytes. Ceci reste à mieux définir.

Sur le plan catabolique, EMMPRIN stimulerait le duo MT1-MMP et TIMP-2 qui démarrerait la protéolyse collagénique matricielle, les autres MMPs étant maintenues silencieuses. Sur le plan anabolique, SOX-9 induirait via le facteur de croissance HARP qui prendrait le relais, l'augmentation des collagènes, des PGs et des GAGs spécifiques du cartilage, à savoir les collagènes de type II et VI, le versicane, l'aggrécane et les CS.

L'augmentation significative des GAGs totaux et spécifiques, associés à leurs PGs, constitue la caractéristique la plus marquante de cette pathogenèse, elle pourrait être liée au maintien dans le tissu tendineux sur-utilisé d'un taux très faible de MMP-3. De plus, ces GAGs auraient plus d'affinité pour HARP et augmenteraient par conséquent sa biodisponibilité.

Le scénario biomécanique tissulaire

Cette adaptation chondroïde, processus pathologique menant à une dégénérescence tendineuse, aurait un effet de réduction des forces de friction subies par le tendon lors du contact répété avec l'acromion, en particulier si la bourse séreuse est défectueuse. L'augmentation des GAGs totaux jouerait également un rôle dans le maintien de l'hydratation tissulaire et de l'espacement inter-fibrillaire contribuant ainsi à l'amélioration des propriétés viscoélastiques du tendon. Cependant et c'est le point le plus important, la formation de ce tissu fibro-cartilagineux dans une région tendineuse soumise à des fortes tractions, dont la fonction physiologique biomécanique est la résistance à la déformation tensile, conduira à une baisse de la raideur en tension. Le tendon s'étirera donc davantage jusqu'à ce que surviennent des micro-déchirures. De plus, la faible capacité de régénération du tendon, due notamment à sa faible vascularisation, contribue à aggraver la situation et conduit à la dégénérescence partielle tendinopathique installée.

Quelle que soit l'origine de la pathologie, la conséquence est la même à savoir des micro-déchirures qui se transformeraient en déchirures partielles ou totales et qui pourraient être aggravées par l'effet de la MMP-2 et non par une réaction inflammatoire. Pour conforter ce scénario, de nombreuses expériences restent à accomplir et cela pourrait faire l'objet d'une nouvelle thèse.

Dans ces scénarios, il reste encore beaucoup d'inconnues qui appellent autant de questions dont voici quelques unes :

- Les augmentations des composants matriciels, comme le collagène de type II, III, VI, l'agrécan, la décorine, le versicane, le biglycan et la fibromoduline, sont-elles bien dues à HARP ?
- TGF β -1 est-il le seul facteur de croissance responsable de l'apparition du facteur chondrogénique SOX-9 ? Et quels sont les autres facteurs qui permettent d'orienter le choix de la métaplasie chondrocytaire ?
- Pourquoi y a-t-il une telle dominance du TGF β -1 dans ce modèle par rapport aux interleukines ?

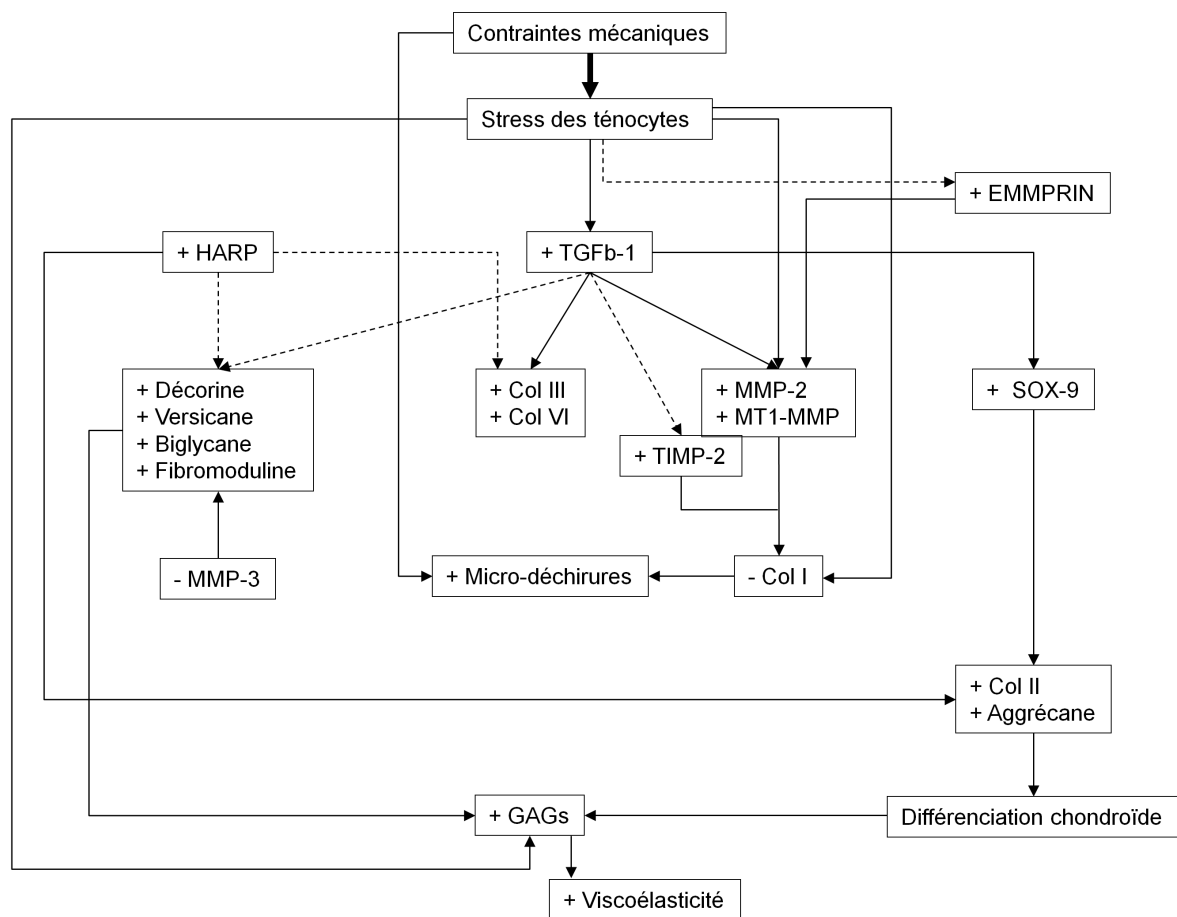


Figure 40. Schéma illustrant les liens entre les événements décrits, initiateurs ou annonciateurs d'une tendinopathie tSE au cours des phases précoces. Traits pointillés = lien hypothétique, traits pleins = lien relaté dans la littérature ou déduit de nos résultats.

Le scénario biomécanique articulaire

In fine, compte tenu des caractéristiques anatomiques de l'articulation de l'épaule, et de son utilisation si fréquemment inappropriée, l'origine de la modification de distribution et d'intensité des contraintes compressives, tensiles et de cisaillement dans l'environnement ténocyttaire est posée ici. On peut penser que le facteur mécanique articulaire serait le frottement sur la voûte acromiale du tendon. Ce frottement produirait, entre autres, une mise en contrainte compressive pathologique pour la zone concernée du tendon. Cette situation se traduirait par des modifications de contraintes dans l'épaisseur du tissu, dans l'environnement ténocyttaire et également au sein de l'espace inter-fibreux. Le frottement sur la voûte acromiale du tendon serait dû à l'excès de déplacement vertical du tendon. Cet excès est lié à un défaut de la cinématique articulaire associé à une problématique de déformation des tissus articulaires, en particulier des muscles.

Il apparait que l'une des solutions à la tendinopathie peut être d'avoir recours à la thérapie manuelle. Le dysfonctionnement articulaire étant à l'origine de la pathologie tissulaire, le rétablissement articulaire physiologique par des actions mécaniques appropriées permettra de ramener la contrainte tissulaire à la normalité et donc restaurer la physiologie tissulaire (Tassoni *et al.* 2006).

V. Conclusion

Cette thèse a permis de mettre en place un modèle animal de tendinopathie précoce du supra-épineux de la coiffe des rotateurs de l'épaule. Son but était de pouvoir développer à terme des outils technologiques préventifs permettant de détecter la pathologie avant l'apparition des symptômes douloureux.

En identifiant certains événements précoces associés à la tendinopathie du supra-épineux et en précisant leur chronologie relative, notre travail a permis d'améliorer les connaissances sur cette pathologie et de mettre en relation les résultats cellulaires et moléculaires obtenus avec certaines observations cliniques. Cependant, de nombreux points restent à élucider.

Nous avons montré *in vivo* que des changements matriciels importants survenaient suite aux contraintes mécaniques que subissait le tendon supra-épineux, la question des conséquences de certaines contraintes sur les changements observés *in vivo* pourrait être abordée *in vitro* sur des ténocytes en culture primaire. Il serait en effet intéressant d'appliquer des contraintes mécaniques de plusieurs types (compression et/ou tension et/ou cisaillement) et à différentes fréquences sur des cultures primaires de ténocytes et d'analyser par une approche transcriptomique, protéomique et glycomique les changements induits.

Nous avons montré par ailleurs qu'HARP pourrait jouer un rôle dans la chondrogenèse des cellules du tendon sans pour autant démontrer son implication directe dans ce processus. Il serait donc intéressant d'analyser ses effets chondromodulateurs sur les ténocytes dans ce modèle.

Nous avons montré une augmentation des GAGs totaux et spécifiques que nous n'avons pas pu associer à une augmentation de la masse hydrique. Il serait donc également important de pouvoir déterminer la quantité d'eau à l'aide d'autres méthodes ainsi que le flux d'eau dans le tSE au cours de la sur-utilisation.

En conclusion, d'importants efforts de recherche restent à accomplir en particulier dans la caractérisation du profil d'évolution des composants tissulaires du tendon et dans la

connaissance des contextes cellulaires, moléculaires et biomécanique qui sont à l'origine de la tendinopathie du supra-épineux. Cependant, les connaissances acquises peuvent être utilisées à des fins diagnostiques, dans des stratégies pédagogiques, thérapeutiques et surtout préventives.

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

--

Abrahamsson, S. O. et Lohmander, S.

Differential effects of insulin-like growth factor-I on matrix and DNA synthesis in various regions and types of rabbit tendons.

J Orthop Res, 1996, 14, 370-376.

Ahmed, I. M., Lagopoulos, M., McConnell, P., Soames, R. W. et Sefton, G. K.

Blood supply of the Achilles tendon.

J Orthop Res, 1998, 16, 591-596.

Aimes, R. T. et Quigley, J. P.

Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments.

J Biol Chem, 1995, 270, 5872-5876.

Alfredson, H., Lorentzon, M., Backman, S., Backman, A. et Lerner, U. H.

cDNA-arrays and real-time quantitative PCR techniques in the investigation of chronic Achilles tendinosis.

J Orthop Res, 2003, 21, 970-975.

Ameys, L., Aria, D., Jepsen, K., Oldberg, A., Xu, T. et Young, M. F.

Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis.

FASEB J, 2002, 16, 673-680.

Anaguchi, Y., Yasuda, K., Majima, T., Tohyama, H., Minami, A. et Hayashi, K.

The effect of transforming growth factor-beta on mechanical properties of the fibrous tissue regenerated in the patellar tendon after resecting the central portion.

Clin Biomech (Bristol, Avon), 2005, 20, 959-965.

Antonsson, P., Heinegard, D. et Oldberg, A.

Posttranslational modifications of fibromodulin.

J Biol Chem, 1991, 266, 16859-16861.

Apte, S. S., Fukai, N., Beier, D. R. et Olsen, B. R.

The matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) gene is structurally distinct from other MMP genes and is co-expressed with the TIMP-2 gene during mouse embryogenesis.

J Biol Chem, 1997, 272, 25511-25517.

Arai, K., Kasashima, Y., Kobayashi, A., Kuwano, A. et Yoshihara, T.

TGF-beta alters collagen XII and XIV mRNA levels in cultured equine tenocytes.

Matrix Biol, 2002, 21, 243-250.

Archambault, J. M., Hart, D. A. et Herzog, W.

Response of rabbit Achilles tendon to chronic repetitive loading.

Connect Tissue Res, 2001, 42, 13-23.

Archambault, J. M., Jelinsky, S. A., Lake, S. P., Hill, A. A., Glaser, D. L. et Soslowsky, L. J.

Rat supraspinatus tendon expresses cartilage markers with overuse.

J Orthop Res, 2007, 25, 617-624.

Attia, M., Huet, E., Delbe, J., Ledoux, D., Menashi, S. et Martelly, I.

Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN/CD147) as a novel regulator of myogenic cell differentiation.

J Cell Physiol, 2011, 226, 141-149.

Baker, A. H., Edwards, D. R. et Murphy, G.

Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities.

J Cell Sci, 2002, 115, 3719-3727.

Banes, A. J., Horesovsky, G., Larson, C., Tsuzaki, M., Judex, S., Archambault, J., Zernicke, R., Herzog, W., Kelley, S. et Miller, L.

Mechanical load stimulates expression of novel genes in vivo and in vitro in avian flexor tendon cells.

Osteoarthritis Cartilage, 1999, 7, 141-153.

Barbosa, I., Garcia, S., Barbier-Chassefiere, V., Caruelle, J. P., Martelly, I. et Papy-Garcia, D.

Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies.

Glycobiology, 2003, 13, 647-653.

Baron, S., Milliron, M., Habes, D. et Fidler, A.

Shoprite supermarkets New Jersey-New York.

New Jersey: National Institute for Occupational Safety and Health, year.

Beck, K., Boswell, B. A., Ridgway, C. C. et Bachinger, H. P.

Triple helix formation of procollagen type I can occur at the rough endoplasmic reticulum membrane.

J Biol Chem, 1996, 271, 21566-21573.

Bedi, A., Fox, A. J., Kovacevic, D., Deng, X. H., Warren, R. F. et Rodeo, S. A.

Doxycycline-mediated inhibition of matrix metalloproteinases improves healing after rotator cuff repair.

Am J Sports Med, 2010, 38, 308-317.

Benjamin, M., Qin, S. et Ralphs, J. R.

Fibrocartilage associated with human tendons and their pulleys.

J Anat, 1995, 187 (Pt 3), 625-633.

Benjamin, M. et Ralphs, J. R.

Fibrocartilage in tendons and ligaments--an adaptation to compressive load.

J Anat, 1998, 193 (Pt 4), 481-494.

Bianco, P., Fisher, L. W., Young, M. F., Termine, J. D. et Robey, P. G.

Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues.

J Histochem Cytochem, 1990, 38, 1549-1563.

Bihari-Varga, M. et Biro, T.

Thermoanalytical investigations on the age-related changes in articular cartilage, meniscus and tendon.

Gerontologia, 1971, 17, 2-15.

Bihari-Varga, M., Simon, J., Feher, J. et Gero, S.

Thermal investigations on structural glycosaminoglycans and proteins. 2. The influence of atherosclerosis on the thermal decomposition of aortic intima.

Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung, 1969, 4, 279-285.

Birk, D. E., Fitch, J. M., Babiarz, J. P., Doane, K. J. et Linsenmayer, T. F.

Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter.

J Cell Sci, 1990, 95 (Pt 4), 649-657.

Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. et Engler, J. A.

Matrix metalloproteinases: a review.

Crit Rev Oral Biol Med, 1993, 4, 197-250.

Bishop, J. E., Butt, R., Dawes, K. et Laurent, G.

Mechanical load enhances the stimulatory effect of PDGF on pulmonary artery fibroblast procollagen synthesis.

Chest, 1998, 114, 25S.

Blaschke, U. K., Hedbom, E. et Bruckner, P.

Distinct isoforms of chicken decorin contain either one or two dermatan sulfate chains.

J Biol Chem, 1996, 271, 30347-30353.

Blochberger, T. C., Cornuet, P. K. et Hassell, J. R.

Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated.

J Biol Chem, 1992, 267, 20613-20619.

Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Grams, F., Gomis-Ruth, F. X., Nagase, H., Tschesche, H. et Maskos, K.

Insights into MMP-TIMP interactions.

Ann N Y Acad Sci, 1999, 878, 73-91.

Boushel, R., Langberg, H., Green, S., Skovgaard, D., Bulow, J. et Kjaer, M.

Blood flow and oxygenation in peritendinous tissue and calf muscle during dynamic exercise in humans.

J Physiol, 2000, 524 Pt 1, 305-313.

Brent, A. E., Braun, T. et Tabin, C. J.

Genetic analysis of interactions between the somitic muscle, cartilage and tendon cell lineages during mouse development.

Development, 2005, 132, 515-528.

Brent, A. E., Schweitzer, R. et Tabin, C. J.

A somitic compartment of tendon progenitors.

Cell, 2003, 113, 235-248.

Brent, A. E. et Tabin, C. J.

FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the Ets transcription factors Pea3 and Erm to regulate scleraxis expression.

Development, 2004, 131, 3885-3896.

Butler, D. L., Grood, E. S., Noyes, F. R. et Zernicke, R. F.

Biomechanics of ligaments and tendons.

Exerc Sport Sci Rev, 1978, 6, 125-181.

Butler, G. S., Butler, M. J., Atkinson, S. J., Will, H., Tamura, T., Schade van Westrum, S., Crabbe, T., Clements, J., d'Ortho, M. P. et Murphy, G.

The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study.

J Biol Chem, 1998, 273, 871-880.

Carmeliet, P., Moons, L., Lijnen, R., Baes, M., Lemaitre, V., Tipping, P., Drew, A., Eeckhout, Y., Shapiro, S., Lupu, F. et Collen, D.

Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation.
Nat Genet, 1997, 17, 439-444.

Carr, A. J. et Norris, S. H.

The blood supply of the calcaneal tendon.
J Bone Joint Surg Br, 1989, 71, 100-101.

Caruelle, D., Mazouzi, Z., Husmann, I., Delbe, J., Duchesnay, A., Gautron, J., Martelly, I. et Courty, J.

Upregulation of HARP during in vitro myogenesis and rat soleus muscle regeneration.
J Muscle Res Cell Motil, 2004, 25, 45-53.

Cawston, T. E., Riley, G. P. et Hazleman, B. L.

Tendon lesions and soft tissue rheumatism--great outback or great opportunity?
Ann Rheum Dis, 1996, 55, 1-3.

Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A. et Chakraborti, T.

Regulation of matrix metalloproteinases: an overview.
Mol Cell Biochem, 2003, 253, 269-285.

Chan, B. P., Chan, K. M., Maffulli, N., Webb, S. et Lee, K. K.

Effect of basic fibroblast growth factor. An in vitro study of tendon healing.
Clin Orthop Relat Res, 1997, 239-247.

Chansky, H. A. et Iannotti, J. P.

The vascularity of the rotator cuff.
Clin Sports Med, 1991, 10, 807-822.

Chen, S. J., Yuan, W., Mori, Y., Levenson, A., Trojanowska, M. et Varga, J.

Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3.
J Invest Dermatol, 1999, 112, 49-57.

Choi, H. R., Kondo, S., Hirose, K., Ishiguro, N., Hasegawa, Y. et Iwata, H.

Expression and enzymatic activity of MMP-2 during healing process of the acute supraspinatus tendon tear in rabbits.

J Orthop Res, 2002, 20, 927-933.

Clancy, B. M., Johnson, J. D., Lambert, A. J., Rezvankhah, S., Wong, A., Resmini, C., Feldman, J. L., Leppanen, S. et Pittman, D. D.

A gene expression profile for endochondral bone formation: oligonucleotide microarrays establish novel connections between known genes and BMP-2-induced bone formation in mouse quadriceps.

Bone, 2003, 33, 46-63.

Courty, J., Dauchel, M. C., Caruelle, D., Perderiset, M. et Barritault, D.

Mitogenic properties of a new endothelial cell growth factor related to pleiotrophin.

Biochem Biophys Res Commun, 1991, 180, 145-151.

Curtin, K. D., Meinertzhagen, I. A. et Wyman, R. J.

Basigin (EMMPRIN/CD147) interacts with integrin to affect cellular architecture.

J Cell Sci, 2005, 118, 2649-2660.

Czubayko, F., Schulte, A. M., Berchem, G. J. et Wellstein, A.

Melanoma angiogenesis and metastasis modulated by ribozyme targeting of the secreted growth factor pleiotrophin.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93, 14753-14758.

Dahlgren, L. A., Mohammed, H. O. et Nixon, A. J.

Expression of insulin-like growth factor binding proteins in healing tendon lesions.

J Orthop Res, 2006, 24, 183-192.

Danielson, K. G., Baribault, H., Holmes, D. F., Graham, H., Kadler, K. E. et Iozzo, R. V.

Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility.

J Cell Biol, 1997, 136, 729-743.

de Mos, M., van El, B., DeGroot, J., Jahr, H., van Schie, H. T., van Arkel, E. R., Tol, H., Heijboer, R., van Osch, G. J. et Verhaar, J. A.

Achilles tendinosis: changes in biochemical composition and collagen turnover rate.

Am J Sports Med, 2007, 35, 1549-1556.

DeClerck, Y. A.

Purification and characterization of a collagenase inhibitor produced by bovine vascular smooth muscle cells.

Arch Biochem Biophys, 1988, 265, 28-37.

Delbe, J., Vacherot, F., Laaroubi, K., Barritault, D. et Courty, J.

Effect of heparin on bovine epithelial lens cell proliferation induced by heparin affinity regulatory peptide.

J Cell Physiol, 1995, 164, 47-54.

Devkota, A. C., Tsuzaki, M., Almekinders, L. C., Banes, A. J. et Weinhold, P. S.

Distributing a fixed amount of cyclic loading to tendon explants over longer periods induces greater cellular and mechanical responses.

J Orthop Res, 2007, 25, 1078-1086.

Doble, B. W. et Kardami, E.

Basic fibroblast growth factor stimulates connexin-43 expression and intercellular communication of cardiac fibroblasts.

Mol Cell Biochem, 1995, 143, 81-87.

Dollery, C. M. et Libby, P.

Atherosclerosis and proteinase activation.

Cardiovasc Res, 2006, 69, 625-635.

Dourte, L. M., Pathmanathan, L., Jawad, A. F., Iozzo, R. V., Mienaltowski, M. J., Birk, D. E. et Soslowky, L. J.

Influence of decorin on the mechanical, compositional, and structural properties of the mouse patellar tendon.

J Biomech Eng, 2012, 134, 031005.

Dreyfus, J., Brunet-de Carvalho, N., Duprez, D., Raulais, D. et Vigny, M.

HB-GAM/pleiotrophin: localization of mRNA and protein in the chicken developing leg.

Int J Dev Biol, 1998, 42, 189-198.

Drummond, A. H., Beckett, P., Brown, P. D., Bone, E. A., Davidson, A. H., Galloway, W. A., Gearing, A. J., Huxley, P., Laber, D., McCourt, M., Whittaker, M., Wood, L. M. et Wright, A.

Preclinical and clinical studies of MMP inhibitors in cancer.

Ann N Y Acad Sci, 1999, 878, 228-235.

Duance, V. C., Restall, D. J., Beard, H., Bourne, F. J. et Bailey, A. J.

The location of three collagen types in skeletal muscle.

FEBS Lett, 1977, 79, 248-252.

Duncan, M. R. et Berman, B.

Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6.

J Invest Dermatol, 1991, 97, 686-692.

Ellerbroek, S. M., Wu, Y. I., Overall, C. M. et Stack, M. S.

Functional interplay between type I collagen and cell surface matrix metalloproteinase activity.

J Biol Chem, 2001, 276, 24833-24842.

Eriksen, H. A., Pajala, A., Leppilahti, J. et Risteli, J.

Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon.

J Orthop Res, 2002, 20, 1352-1357.

Esko, J. D. et Lindahl, U.

Molecular diversity of heparan sulfate.

J Clin Invest, 2001, 108, 169-173.

Evans, J. H. et Barbenel, J. C.

Structural and mechanical properties of tendon related to function.

Equine Vet J, 1975, 7, 1-8.

Ezura, Y., Chakravarti, S., Oldberg, A., Chervoneva, I. et Birk, D. E.

Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons.

J Cell Biol, 2000, 151, 779-788.

Farndale, R. W., Sayers, C. A. et Barrett, A. J.

A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures.

Connect Tissue Res, 1982, 9, 247-248.

Fu, S. C., Chan, B. P., Wang, W., Pau, H. M., Chan, K. M. et Rolf, C. G.

Increased expression of matrix metalloproteinase 1 (MMP1) in 11 patients with patellar tendinosis.

Acta Orthop Scand, 2002, 73, 658-662.

Fu, S. C., Wong, Y. P., Chan, B. P., Pau, H. M., Cheuk, Y. C., Lee, K. M. et Chan, K. M.

The roles of bone morphogenetic protein (BMP) 12 in stimulating the proliferation and matrix production of human patellar tendon fibroblasts.

Life Sci, 2003, 72, 2965-2974.

Fukunaga, T., Yamashiro, T., Oya, S., Takeshita, N., Takigawa, M. et Takano-Yamamoto, T.

Connective tissue growth factor mRNA expression pattern in cartilages is associated with their type I collagen expression.

Bone, 2003, 33, 911-918.

Fyfe, I. et Stanish, W. D.

The use of eccentric training and stretching in the treatment and prevention of tendon injuries.

Clin Sports Med, 1992, 11, 601-624.

Galatz, L. M., Sandell, L. J., Rothermich, S. Y., Das, R., Mastny, A., Havlioglu, N., Silva, M. J. et Thomopoulos, S.

Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury.

J Orthop Res, 2006, 24, 541-550.

Gallagher, J. T.

Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu.

J Clin Invest, 2001, 108, 357-361.

Gelse, K., Poschl, E. et Aigner, T.

Collagens--structure, function, and biosynthesis.

Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55, 1531-1546.

Gibbon, W. W., Cooper, J. R. et Radcliffe, G. S.

Sonographic incidence of tendon microtears in athletes with chronic Achilles tendinosis.

Br J Sports Med, 1999, 33, 129-130.

Gieffers, C., Engelhardt, W., Brenzel, G., Matsuishi, T. et Frey, J.

Receptor binding of osteoblast-specific factor 1 (OSF-1/HB-GAM) to human osteosarcoma cells promotes cell attachment.

Eur J Cell Biol, 1993, 62, 352-361.

Glazebrook, M. A., Wright, J. R., Jr., Langman, M., Stanish, W. D. et Lee, J. M.

Histological analysis of achilles tendons in an overuse rat model.

J Orthop Res, 2008, 26, 840-846.

Goldberg, G. I., Marmer, B. L., Grant, G. A., Eisen, A. Z., Wilhelm, S. et He, C. S.

Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86, 8207-8211.

Gospodarowicz, D. et Moran, J. S.

Growth factors in mammalian cell culture.

Annu Rev Biochem, 1976, 45, 531-558.

Goutallier, D., Postel, J. M., Zilber, S. et Van Driessche, S.

Shoulder surgery: from cuff repair to joint replacement. An update.

Joint Bone Spine, 2003, 70, 422-432.

Greenfield, E. M., Bi, Y. et Miyauchi, A.

Regulation of osteoclast activity.

Life Sci, 1999, 65, 1087-1102.

Greiling, H.

Structure and biological functions of keratan sulfate proteoglycans.

EXS, 1994, 70, 101-122.

Gross, J. et Lapiere, C. M.

Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1962, 48, 1014-1022.

Gulotta, L. V., Kovacevic, D., Montgomery, S., Ehteshami, J. R., Packer, J. D. et Rodeo, S. A.

Stem cells genetically modified with the developmental gene MT1-MMP improve regeneration of the supraspinatus tendon-to-bone insertion site.

Am J Sports Med, 2010, 38, 1429-1437.

Hampton, B. S., Marshak, D. R. et Burgess, W. H.

Structural and functional characterization of full-length heparin-binding growth associated molecule.

Mol Biol Cell, 1992, 3, 85-93.

Hansen, M., Boesen, A., Holm, L., Flyvbjerg, A., Langberg, H. et Kjaer, M.

Local administration of insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates tendon collagen synthesis in humans.

Scand J Med Sci Sports, 2012,

Haseneen, N. A., Vaday, G. G., Zucker, S. et Foda, H. D.

Mechanical stretch induces MMP-2 release and activation in lung endothelium: role of EMMPRIN.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284, L541-547.

Heinemeier, K., Langberg, H. et Kjaer, M.

Exercise-induced changes in circulating levels of transforming growth factor-beta-1 in humans: methodological considerations.

Eur J Appl Physiol, 2003, 90, 171-177.

Heinemeier, K., Langberg, H., Olesen, J. L. et Kjaer, M.

Role of TGF-beta1 in relation to exercise-induced type I collagen synthesis in human tendinous tissue.

J Appl Physiol, 2003, 95, 2390-2397.

Herberts, P., Kadefors, R., Hogfors, C. et Sigholm, G.

Shoulder pain and heavy manual labor.

Clin Orthop Relat Res, 1984, 166-178.

Hernandez-Barrantes, S., Shimura, Y., Soloway, P. D., Sang, Q. A. et Fridman, R.

Differential roles of TIMP-4 and TIMP-2 in pro-MMP-2 activation by MT1-MMP.

Biochem Biophys Res Commun, 2001, 281, 126-130.

Herradon, G., Ezquerra, L., Nguyen, T., Vogt, T. F., Bronson, R., Silos-Santiago, I. et Deuel, T. F.

Pleiotrophin is an important regulator of the renin-angiotensin system in mouse aorta.

Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324, 1041-1047.

Hou, Y., Mao, Z., Wei, X., Lin, L., Chen, L., Wang, H., Fu, X., Zhang, J. et Yu, C.

Effects of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor 165 gene transfer on Achilles tendon healing.

Matrix Biol, 2009, 28, 324-335.

Huang, T. F., Perry, S. M. et Soslowsky, L. J.

The effect of overuse activity on Achilles tendon in an animal model: a biomechanical study.
Ann Biomed Eng, 2004, 32, 336-341.

Huber, D., Gautschi-Sova, P. et Bohlen, P.

Amino-terminal sequences of a novel heparin-binding protein from human, bovine, rat, and chick brain: high interspecies homology.
Neurochem Res, 1990, 15, 435-439.

Huet, E., Gabison, E. E., Mourah, S. et Menashi, S.

Role of emmprin/CD147 in tissue remodeling.
Connect Tissue Res, 2008, 49, 175-179.

Huet, E., Vallee, B., Szul, D., Verrecchia, F., Mourah, S., Jester, J. V., Hoang-Xuan, T., Menashi, S. et Gabison, E. E.

Extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 promotes myofibroblast differentiation by inducing alpha-smooth muscle actin expression and collagen gel contraction: implications in tissue remodeling.
FASEB J, 2008, 22, 1144-1154.

Inman, V. T., Saunders, J. B. et Abbott, L. C.

Observations of the function of the shoulder joint. 1944.
Clin Orthop Relat Res, 1996, 3-12.

Iozzo, R. V., Moscatello, D. K., McQuillan, D. J. et Eichstetter, I.

Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor.
J Biol Chem, 1999, 274, 4489-4492.

Iozzo, R. V. et Murdoch, A. D.

Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function.
FASEB J, 1996, 10, 598-614.

Ireland, D., Harrall, R., Curry, V., Holloway, G., Hackney, R., Hazleman, B. et Riley, G.
Multiple changes in gene expression in chronic human Achilles tendinopathy.
Matrix Biol, 2001, 20, 159-169.

Jager, R., Noll, K., Havemann, K., Pfluger, K. H., Knabbe, C., Rauvala, H. et Zugmaier, G.
Differential expression and biological activity of the heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in lung cancer cell lines.
Int J Cancer, 1997, 73, 537-543.

Jarvinen, M., Kannus, P., Kvist, M., Isola, J., Lehto, M. et Jozsa, L.
Macromolecular composition of the myotendinous junction.
Exp Mol Pathol, 1991, 55, 230-237.

Jelinsky, S. A., Lake, S. P., Archambault, J. M. et Soslowsky, L. J.
Gene expression in rat supraspinatus tendon recovers from overuse with rest.
Clin Orthop Relat Res, 2008, 466, 1612-1617.

Jenniskens, G. J., Oosterhof, A., Brandwijk, R., Veerkamp, J. H. et van Kuppevelt, T. H.
Heparan sulfate heterogeneity in skeletal muscle basal lamina: demonstration by phage display-derived antibodies.
J Neurosci, 2000, 20, 4099-4111.

Jepsen, K. J., Wu, F., Peragallo, J. H., Paul, J., Roberts, L., Ezura, Y., Oldberg, A., Birk, D. E. et Chakravarti, S.
A syndrome of joint laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice.
J Biol Chem, 2002, 277, 35532-35540.

Jones, G. C., Corps, A. N., Pennington, C. J., Clark, I. M., Edwards, D. R., Bradley, M. M., Hazleman, B. L. et Riley, G. P.
Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human achilles tendon.
Arthritis Rheum, 2006, 54, 832-842.

Jozsa, L. et Kannus, P.

Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures.
Scand J Med Sci Sports, 1997, 7, 113-118.

Jozsa, L., Kannus, P., Balint, J. B. et Reffy, A.

Three-dimensional ultrastructure of human tendons.
Acta Anat (Basel), 1991, 142, 306-312.

Kastelic, J., Galeski, A. et Baer, E.

The multicomposite structure of tendon.
Connect Tissue Res, 1978, 6, 11-23.

Kataoka, H., DeCastro, R., Zucker, S. et Biswas, C.

Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase.
Cancer Res, 1993, 53, 3154-3158.

Keene, D. R., San Antonio, J. D., Mayne, R., McQuillan, D. J., Sarris, G., Santoro, S. A. et Iozzo, R. V.

Decorin binds near the C terminus of type I collagen.
J Biol Chem, 2000, 275, 21801-21804.

Khan, K. M., Cook, J. L., Kannus, P., Maffulli, N. et Bonar, S. F.

Time to abandon the "tendinitis" myth.
BMJ, 2002, 324, 626-627.

Khan, K. M. et Scott, A.

Mechanotherapy: how physical therapists' prescription of exercise promotes tissue repair.
Br J Sports Med, 2009, 43, 247-252.

Kieny, M. et Chevallier, A.

Autonomy of tendon development in the embryonic chick wing.
J Embryol Exp Morphol, 1979, 49, 153-165.

Kilpelainen, I., Kaksonen, M., Kinnunen, T., Avikainen, H., Fath, M., Linhardt, R. J., Raulo, E. et Rauvala, H.

Heparin-binding growth-associated molecule contains two heparin-binding beta -sheet domains that are homologous to the thrombospondin type I repeat.

J Biol Chem, 2000, 275, 13564-13570.

Kilts, T., Ameye, L., Syed-Picard, F., Ono, M., Berendsen, A. D., Oldberg, A., Heegaard, A. M., Bi, Y. et Young, M. F.

Potential roles for the small leucine-rich proteoglycans biglycan and fibromodulin in ectopic ossification of tendon induced by exercise and in modulating rotarod performance.

Scand J Med Sci Sports, 2009, 19, 536-546.

Kivirikko, K. I., Myllyla, R. et Pihlajaniemi, T.

Protein hydroxylation: prolyl 4-hydroxylase, an enzyme with four cosubstrates and a multifunctional subunit.

FASEB J, 1989, 3, 1609-1617.

Kjaer, M.

Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading.

Physiol Rev, 2004, 84, 649-698.

Klein, M. B., Yalamanchi, N., Pham, H., Longaker, M. T. et Chang, J.

Flexor tendon healing in vitro: effects of TGF-beta on tendon cell collagen production.

J Hand Surg Am, 2002, 27, 615-620.

Kleiner, D. E. et Stetler-Stevenson, W. G.

Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases.

Anal Biochem, 1994, 218, 325-329.

Knobloch, K.

The role of tendon microcirculation in Achilles and patellar tendinopathy.

J Orthop Surg Res, 2008, 3, 18.

Kobayashi, M., Itoi, E., Minagawa, H., Miyakoshi, N., Takahashi, S., Tuoheti, Y., Okada, K. et Shimada, Y.

Expression of growth factors in the early phase of supraspinatus tendon healing in rabbits.

J Shoulder Elbow Surg, 2006, 15, 371-377.

Kovacevic, D. et Rodeo, S. A.

Biological augmentation of rotator cuff tendon repair.

Clin Orthop Relat Res, 2008, 466, 622-633.

Kovesdi, I., Fairhurst, J. L., Kretschmer, P. J. et Bohlen, P.

Heparin-binding neurotrophic factor (HBNF) and MK, members of a new family of homologous, developmentally regulated proteins.

Biochem Biophys Res Commun, 1990, 172, 850-854.

Kraushaar, B. S. et Nirschl, R. P.

Tendinosis of the elbow (tennis elbow). Clinical features and findings of histological, immunohistochemical, and electron microscopy studies.

J Bone Joint Surg Am, 1999, 81, 259-278.

Kretschmer, P. J., Fairhurst, J. L., Hulmes, J. D., Popjes, M. L., Bohlen, P. et Kovesdi, I.

Genomic organization of the human HBNF gene and characterization of an HBNF variant protein as a splice mutant.

Biochem Biophys Res Commun, 1993, 192, 420-429.

Kuc, I. M. et Scott, P. G.

Increased diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissues.

Connect Tissue Res, 1997, 36, 287-296.

Kuo, M. D., Oda, Y., Huang, J. S. et Huang, S. S.

Amino acid sequence and characterization of a heparin-binding neurite-promoting factor (p18) from bovine brain.

J Biol Chem, 1990, 265, 18749-18752.

Kurtz, C. A., Loebig, T. G., Anderson, D. D., DeMeo, P. J. et Campbell, P. G.

Insulin-like growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model.

Am J Sports Med, 1999, 27, 363-369.

Laaroubi, K., Delbe, J., Vacherot, F., Desgranges, P., Tardieu, M., Jaye, M., Barritault, D. et Courty, J.

Mitogenic and in vitro angiogenic activity of human recombinant heparin affn regulatory peptide.

Growth Factors, 1994, 10, 89-98.

Laemmli, U. K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature, 1970, 227, 680-685.

Lambert, E., Dasse, E., Haye, B. et Petitfrere, E.

TIMPs as multifacial proteins.

Crit Rev Oncol Hematol, 2004, 49, 187-198.

Langberg, H., Olesen, J. L., Gemmer, C. et Kjaer, M.

Substantial elevation of interleukin-6 concentration in peritendinous tissue, in contrast to muscle, following prolonged exercise in humans.

J Physiol, 2002, 542, 985-990.

Lapiere, C. M., Nusgens, B. et Pierard, G. E.

Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization.

Connect Tissue Res, 1977, 5, 21-29.

Leadbetter, W. B.

Cell-matrix response in tendon injury.

Clin Sports Med, 1992, 11, 533-578.

Legerlotz, K., Jones, E. R., Screen, H. R. et Riley, G. P.

Increased expression of IL-6 family members in tendon pathology.

Rheumatology (Oxford), 2012,

Lejard, V., Brideau, G., Blais, F., Salingcarnboriboon, R., Wagner, G., Roehrl, M. H., Noda, M., Duprez, D., Houillier, P. et Rossert, J.

Scleraxis and NFATc regulate the expression of the pro-alpha1(I) collagen gene in tendon fibroblasts.

J Biol Chem, 2007, 282, 17665-17675.

Lensen, J. F., Wijnhoven, T. J., Kuik, L. H., Versteeg, E. M., Hafmans, T., Rops, A. L., Pavao, M. S., van der Vlag, J., van den Heuvel, L. P., Berden, J. H. et van Kuppevelt, T. H.

Selection and characterization of a unique phage display-derived antibody against dermatan sulfate.

Matrix Biol, 2006, 25, 457-461.

Li, R., Huang, L., Guo, H. et Toole, B. P.

Basigin (murine EMMPRIN) stimulates matrix metalloproteinase production by fibroblasts.

J Cell Physiol, 2001, 186, 371-379.

Li, Y. S., Milner, P. G., Chauhan, A. K., Watson, M. A., Hoffman, R. M., Kodner, C. M., Milbrandt, J. et Deuel, T. F.

Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity.

Science, 1990, 250, 1690-1694.

Lindahl, G. E., Chambers, R. C., Papakrivopoulou, J., Dawson, S. J., Jacobsen, M. C., Bishop, J. E. et Laurent, G. J.

Activation of fibroblast procollagen alpha 1(I) transcription by mechanical strain is transforming growth factor-beta-dependent and involves increased binding of CCAAT-binding factor (CBF/NF-Y) at the proximal promoter.

J Biol Chem, 2002, 277, 6153-6161.

Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M. et Kjellen, L.

Regulated diversity of heparan sulfate.

J Biol Chem, 1998, 273, 24979-24982.

Lo, I. K., Marchuk, L. L., Hollinshead, R., Hart, D. A. et Frank, C. B.

Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase mRNA levels are specifically altered in torn rotator cuff tendons.

Am J Sports Med, 2004, 32, 1223-1229.

Longo, U. G., Berton, A., Khan, W. S., Maffulli, N. et Denaro, V.

Histopathology of rotator cuff tears.

Sports Med Arthrosc, 2011, 19, 227-236.

Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Martinez-Cue, C., Garcia-Porrero, J. A. et Hurle, J. M.

Transforming growth factors beta coordinate cartilage and tendon differentiation in the developing limb mesenchyme.

J Biol Chem, 2009, 284, 29988-29996.

Lorenzo, P., Aspberg, A., Onnerfjord, P., Bayliss, M. T., Neame, P. J. et Heinegard, D.

Identification and characterization of asporin. a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan.

J Biol Chem, 2001, 276, 12201-12211.

Mascellani, G., Liverani, L., Bianchini, P., Parma, B., Torri, G., Bisio, A., Guerrini, M. et Casu, B.

Structure and contribution to the heparin cofactor II-mediated inhibition of thrombin of naturally oversulphated sequences of dermatan sulphate.

Biochem J, 1993, 296 (Pt 3), 639-648.

McCormick, R. J.

Extracellular modifications to muscle collagen: implications for meat quality.

Poult Sci, 1999, 78, 785-791.

Mehta, V. et Mass, D.

The use of growth factors on tendon injuries.

J Hand Ther, 2005, 18, 87-92; quiz 93.

Merenmies, J. et Rauvala, H.

Molecular cloning of the 18-kDa growth-associated protein of developing brain.

J Biol Chem, 1990, 265, 16721-16724.

Merrilees, M. J. et Flint, M. H.

Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon.

Am J Anat, 1980, 157, 87-106.

Meyer, K., Linker, A., Davidson, E. A. et Weissmann, B.

The mucopolysaccharides of bovine cornea.

J Biol Chem, 1953, 205, 611-616.

Millar, N. L., Wei, A. Q., Molloy, T. J., Bonar, F. et Murrell, G. A.

Heat shock protein and apoptosis in supraspinatus tendinopathy.

Clin Orthop Relat Res, 2008, 466, 1569-1576.

Millar, N. L., Wei, A. Q., Molloy, T. J., Bonar, F. et Murrell, G. A.

Cytokines and apoptosis in supraspinatus tendinopathy.

J Bone Joint Surg Br, 2009, 91, 417-424.

Milner, P. G., Li, Y. S., Hoffman, R. M., Kodner, C. M., Siegel, N. R. et Deuel, T. F.

A novel 17 kD heparin-binding growth factor (HBGF-8) in bovine uterus: purification and N-terminal amino acid sequence.

Biochem Biophys Res Commun, 1989, 165, 1096-1103.

Molloy, T. J., Kemp, M. W., Wang, Y. et Murrell, G. A.

Microarray analysis of the tendinopathic rat supraspinatus tendon: glutamate signaling and its potential role in tendon degeneration.

J Appl Physiol, 2006, 101, 1702-1709.

Muramatsu, T. et Miyauchi, T.

Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion.

Histol Histopathol, 2003, 18, 981-987.

Nagase, H., Visse, R. et Murphy, G.

Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.

Cardiovasc Res, 2006, 69, 562-573.

Najjam, S., Gibbs, R. V., Gordon, M. Y. et Rider, C. C.

Characterization of human recombinant interleukin 2 binding to heparin and heparan sulfate using an ELISA approach.

Cytokine, 1997, 9, 1013-1022.

Nakase, T., Sugamoto, K., Miyamoto, T., Tsumaki, N., Luyten, F. P., Inui, H., Myoui, A., Tomita, T. et Yoshikawa, H.

Activation of cartilage-derived morphogenetic protein-1 in torn rotator cuff.

Clin Orthop Relat Res, 2002, 140-145.

Neame, P. J., Young, C. N., Brock, C. W., Treep, J. T., Ganey, T. M., Sasse, J. et Rosenberg, L. C.

Pleiotrophin is an abundant protein in dissociative extracts of bovine fetal epiphyseal cartilage and nasal cartilage from newborns.

J Orthop Res, 1993, 11, 479-491.

Neer, C. S., 2nd

Anterior acromioplasty for the chronic impingement syndrome in the shoulder. 1972.

J Bone Joint Surg Am, 2005, 87, 1399.

Noble, P. W.

Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair.

Matrix Biol, 2002, 21, 25-29.

O'Brien, M.

Structure and metabolism of tendons.
Scand J Med Sci Sports, 1997, 7, 55-61.

O'Callaghan, C. J. et Williams, B.

Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta(1).
Hypertension, 2000, 36, 319-324.

Oldberg, A., Antonsson, P., Hedbom, E. et Heinegard, D.

Structure and function of extracellular matrix proteoglycans.
Biochem Soc Trans, 1990, 18, 789-792.

Oliver, G. W., Leferson, J. D., Stetler-Stevenson, W. G. et Kleiner, D. E.

Quantitative reverse zymography: analysis of picogram amounts of metalloproteinase inhibitors using gelatinase A and B reverse zymograms.
Anal Biochem, 1997, 244, 161-166.

Overall, C. M. et Limeback, H.

Identification and characterization of enamel proteinases isolated from developing enamel. Amelogeninolytic serine proteinases are associated with enamel maturation in pig.
Biochem J, 1988, 256, 965-972.

Page-McCaw, A., Ewald, A. J. et Werb, Z.

Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling.
Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8, 221-233.

Pavloff, N., Staskus, P. W., Kishnani, N. S. et Hawkes, S. P.

A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family.
J Biol Chem, 1992, 267, 17321-17326.

Penc, S. F., Pomahac, B., Eriksson, E., Detmar, M. et Gallo, R. L.

Dermatan sulfate activates nuclear factor-kappaB and induces endothelial and circulating intercellular adhesion molecule-1.

J Clin Invest, 1999, 103, 1329-1335.

Peng, H. B., Ali, A. A., Dai, Z., Daggett, D. F., Raulo, E. et Rauvala, H.

The role of heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in the postsynaptic induction in cultured muscle cells.

J Neurosci, 1995, 15, 3027-3038.

Perry, S. M., McIlhenny, S. E., Hoffman, M. C. et Soslowsky, L. J.

Inflammatory and angiogenic mRNA levels are altered in a supraspinatus tendon overuse animal model.

J Shoulder Elbow Surg, 2005, 14, 79S-83S.

Quintana, L., zur Nieden, N. I. et Semino, C. E.

Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering.

Tissue Eng Part B Rev, 2009, 15, 29-41.

Rabenstein, D. L.

Heparin and heparan sulfate: structure and function.

Nat Prod Rep, 2002, 19, 312-331.

Rasband, W.

Image J.

U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2009,
<http://rsb.info.nih.gov/ij/>,

Raulo, E., Tumova, S., Pavlov, I., Hienola, A., Lauri, S., Taira, T. et Rauvala, H.

The two thrombospondin type I repeat domains of HB-GAM display a cooperative function in N-syndecan binding and regulation of synaptic plasticity.

ScientificWorldJournal, 2006, 6, 406-409.

Rauvala, H.

An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors.

EMBO J, 1989, 8, 2933-2941.

Recklies, A. D., Baillargeon, L. et White, C.

Regulation of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovial cells and articular chondrocytes.

Arthritis Rheum, 1998, 41, 997-1006.

Ricard-Blum, S. et Ruggiero, F.

The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane.

Pathol Biol (Paris), 2005, 53, 430-442.

Riley, G.

The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective.

Rheumatology (Oxford), 2004, 43, 131-142.

Riley, G.

Chronic tendon pathology: molecular basis and therapeutic implications.

Expert Rev Mol Med, 2005, 7, 1-25.

Riley, G. P., Curry, V., DeGroot, J., van El, B., Verzijl, N., Hazleman, B. L. et Bank, R. A.

Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology.

Matrix Biol, 2002, 21, 185-195.

Riley, G. P., Harrall, R. L., Constant, C. R., Chard, M. D., Cawston, T. E. et Hazleman, B. L.

Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis.

Ann Rheum Dis, 1994, 53, 367-376.

Robbins, J. R., Evanko, S. P. et Vogel, K. G.

Mechanical loading and TGF-beta regulate proteoglycan synthesis in tendon.

Arch Biochem Biophys, 1997, 342, 203-211.

Robbins, J. R. et Vogel, K. G.

Regional expression of mRNA for proteoglycans and collagen in tendon.

Eur J Cell Biol, 1994, 64, 264-270.

Rumsby, M., Suggitt, F., Haynes, L., Hughson, E., Kidd, D. et McNulty, S.

Substratum of pleiotrophin (HB-GAM) stimulates rat CG-4 line oligodendrocytes to adopt a bipolar morphology and disperse: primary O-2A progenitor glial cells disperse similarly on pleiotrophin.

Glia, 1999, 26, 361-367.

Ruoslahti, E.

Proteoglycans in cell regulation.

J Biol Chem, 1989, 264, 13369-13372.

Ruoslahti, E. et Yamaguchi, Y.

Proteoglycans as modulators of growth factor activities.

Cell, 1991, 64, 867-869.

Sakai, H., Fujita, K., Sakai, Y. et Mizuno, K.

Immunolocalization of cytokines and growth factors in subacromial bursa of rotator cuff tear patients.

Kobe J Med Sci, 2001, 47, 25-34.

Samiric, T., Parkinson, J., Ilic, M. Z., Cook, J., Feller, J. A. et Handley, C. J.

Changes in the composition of the extracellular matrix in patellar tendinopathy.

Matrix Biol, 2009, 28, 230-236.

Sasisekharan, R., Raman, R. et Prabhakar, V.

Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans.

Annu Rev Biomed Eng, 2006, 8, 181-231.

Sato, H., Funahashi, M., Kristensen, D. B., Tateno, C. et Yoshizato, K.

Pleiotrophin as a Swiss 3T3 cell-derived potent mitogen for adult rat hepatocytes.

Exp Cell Res, 1999, 246, 152-164.

Schild, C. et Trueb, B.

Mechanical stress is required for high-level expression of connective tissue growth factor.

Exp Cell Res, 2002, 274, 83-91.

Schonherr, E., Witsch-Prehm, P., Harrach, B., Robenek, H., Rauterberg, J. et Kresse, H.

Interaction of biglycan with type I collagen.

J Biol Chem, 1995, 270, 2776-2783.

Schweitzer, R., Zelzer, E. et Volk, T.

Connecting muscles to tendons: tendons and musculoskeletal development in flies and vertebrates.

Development, 2010, 137, 2807-2817.

Scott, A., Cook, J. L., Hart, D. A., Walker, D. C., Duronio, V. et Khan, K. M.

Tenocyte responses to mechanical loading in vivo: a role for local insulin-like growth factor 1 signaling in early tendinosis in rats.

Arthritis Rheum, 2007, 56, 871-881.

Scott, J. E.

Proteoglycan-fibrillar collagen interactions.

Biochem J, 1988, 252, 313-323.

Seddon, A. P., Hulmes, J. D., Decker, M. M., Kovesdi, I., Fairhurst, J. L., Backer, J., Dougher-Vermazen, M. et Bohlen, P.

Refolding and characterization of human recombinant heparin-binding neurite-promoting factor.

Protein Expr Purif, 1994, 5, 14-21.

Seltzre, J. L. et Eisen, A. Z.

Native type I collagen is not a substrate for MMP2 (gelatinase A).

J Invest Dermatol, 1999, 112, 993-994.

Shapiro, S. D.

Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences.

Curr Opin Cell Biol, 1998, 10, 602-608.

Shindle, M. K., Chen, C. C., Robertson, C., DiTullio, A. E., Paulus, M. C., Clinton, C. M., Cordasco, F. A., Rodeo, S. A. et Warren, R. F.

Full-thickness supraspinatus tears are associated with more synovial inflammation and tissue degeneration than partial-thickness tears.

J Shoulder Elbow Surg, 2011, 20, 917-927.

Shukunami, C., Takimoto, A., Oro, M. et Hiraki, Y.

Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes.

Dev Biol, 2006, 298, 234-247.

Silva, R. D., Glazebrook, M. A., Campos, V. C. et Vasconcelos, A. C.

Achilles tendinosis: a morphometrical study in a rat model.

Int J Clin Exp Pathol, 2011, 4, 683-691.

Skutek, M., van Griensven, M., Zeichen, J., Brauer, N. et Bosch, U.

Cyclic mechanical stretching modulates secretion pattern of growth factors in human tendon fibroblasts.

Eur J Appl Physiol, 2001, 86, 48-52.

Smetsers, T. F., van de Westerlo, E. M., ten Dam, G. B., Overes, I. M., Schalkwijk, J., van Muijen, G. N. et van Kuppevelt, T. H.

Human single-chain antibodies reactive with native chondroitin sulfate detect chondroitin sulfate alterations in melanoma and psoriasis.

J Invest Dermatol, 2004, 122, 707-716.

Smith, R. K., Gerard, M., Dowling, B., Dart, A. J., Birch, H. L. et Goodship, A. E.

Correlation of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in equine tendon with mechanical properties: a proposed role for COMP in determining function-specific mechanical characteristics of locomotor tendons.

Equine Vet J Suppl, 2002, 241-244.

Sodersten, F., Ekman, S., Eloranta, M. L., Heinegard, D., Dudhia, J. et Hultenby, K.

Ultrastructural immunolocalization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in relation to collagen fibrils in the equine tendon.

Matrix Biol, 2005, 24, 376-385.

Sonal, D.

Prevention of IGF-1 and TGFbeta stimulated type II collagen and decorin expression by bFGF and identification of IGF-1 mRNA transcripts in articular chondrocytes.

Matrix Biol, 2001, 20, 233-242.

Soslowsky, L. J., Carpenter, J. E., DeBano, C. M., Banerji, I. et Moalli, M. R.

Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease.

J Shoulder Elbow Surg, 1996, 5, 383-392.

Soslowsky, L. J., Thomopoulos, S., Tun, S., Flanagan, C. L., Keefer, C. C., Mastaw, J. et Carpenter, J. E.

Neer Award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study.

J Shoulder Elbow Surg, 2000, 9, 79-84.

Souttou, B., Raulais, D. et Vigny, M.

Pleiotrophin induces angiogenesis: involvement of the phosphoinositide-3 kinase but not the nitric oxide synthase pathways.

J Cell Physiol, 2001, 187, 59-64.

Spindler, K. P., Murray, M. M., Detwiler, K. B., Tarter, J. T., Dawson, J. M., Nanney, L. B. et Davidson, J. M.

The biomechanical response to doses of TGF-beta 2 in the healing rabbit medial collateral ligament.

J Orthop Res, 2003, 21, 245-249.

Sternlicht, M. D. et Werb, Z.

How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.

Annu Rev Cell Dev Biol, 2001, 17, 463-516.

Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A. et Goldberg, G. I.

Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease.

J Biol Chem, 1995, 270, 5331-5338.

Strutz, F., Zeisberg, M., Renziehausen, A., Raschke, B., Becker, V., van Kooten, C. et Muller, G.

TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2).

Kidney Int, 2001, 59, 579-592.

Svensson, L., Heinegard, D. et Oldberg, A.

Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4-5.

J Biol Chem, 1995, 270, 20712-20716.

Szomor, Z. L., Appleyard, R. C. et Murrell, G. A.

Overexpression of nitric oxide synthases in tendon overuse.

J Orthop Res, 2006, 24, 80-86.

Takahasih, S., Nakajima, M., Kobayashi, M., Wakabayashi, I., Miyakoshi, N., Minagawa, H. et Itoi, E.

Effect of recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) on fibroblast-like cells from human rotator cuff tendon.

Tohoku J Exp Med, 2002, 198, 207-214.

Tapp, H., Hernandez, D. J., Neame, P. J. et Koob, T. J.

Pleiotrophin inhibits chondrocyte proliferation and stimulates proteoglycan synthesis in mature bovine cartilage.

Matrix Biol, 1999, 18, 543-556.

Tassoni, M. C., P., L., D., D. et Gossard, C.

Numéro spécial colloque MECABIO 2005.

ITBM-RBM, 2006, 27, 91-148.

Tezuka, K., Takeshita, S., Hakeda, Y., Kumegawa, M., Kikuno, R. et Hashimoto-Gotoh, T.

Isolation of mouse and human cDNA clones encoding a protein expressed specifically in osteoblasts and brain tissues.

Biochem Biophys Res Commun, 1990, 173, 246-251.

Thomopoulos, S., Williams, G. R. et Soslowky, L. J.

Tendon to bone healing: differences in biomechanical, structural, and compositional properties due to a range of activity levels.

J Biomech Eng, 2003, 125, 106-113.

Toole, B. P.

Emmprin (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function.

Curr Top Dev Biol, 2003, 54, 371-389.

Tozer, S. et Duprez, D.

Tendon and ligament: development, repair and disease.

Birth Defects Res C Embryo Today, 2005, 75, 226-236.

Trippel, S. B., Wroblewski, J., Makower, A. M., Whelan, M. C., Schoenfeld, D. et Doctrow, S. R.

Regulation of growth-plate chondrocytes by insulin-like growth-factor I and basic fibroblast growth factor.

J Bone Joint Surg Am, 1993, 75, 177-189.

Tsuzaki, M., Bynum, D., Almekinders, L., Yang, X., Faber, J. et Banes, A. J.

ATP modulates load-inducible IL-1beta, COX 2, and MMP-3 gene expression in human tendon cells.

J Cell Biochem, 2003, 89, 556-562.

Tsuzaki, M., Guyton, G., Garrett, W., Archambault, J. M., Herzog, W., Almekinders, L., Bynum, D., Yang, X. et Banes, A. J.

IL-1 beta induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 beta and IL-6 in human tendon cells.

J Orthop Res, 2003, 21, 256-264.

Turino, G. M. et Cantor, J. O.

Hyaluronan in respiratory injury and repair.

Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167, 1169-1175.

Vacherot, F., Delbe, J., Heroult, M., Barritault, D., Fernig, D. G. et Courty, J.

Glycosaminoglycans differentially bind HARP and modulate its biological activity.

J Biol Chem, 1999, 274, 7741-7747.

Valhmu, W. B., Stazzone, E. J., Bachrach, N. M., Saed-Nejad, F., Fischer, S. G., Mow, V. C. et Ratcliffe, A.

Load-controlled compression of articular cartilage induces a transient stimulation of aggrecan gene expression.

Arch Biochem Biophys, 1998, 353, 29-36.

Van Snick, J.

Interleukin-6: an overview.

Annu Rev Immunol, 1990, 8, 253-278.

Vertel, B. M. et Ratcliffe, A.

Proteoglycan, the aggrecan. year.

Vincenti, M. P.

The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression.

Methods Mol Biol, 2001, 151, 121-148.

Vincenti, M. P., Coon, C. I., White, L. A., Barchowsky, A. et Brinckerhoff, C. E.

src-related tyrosine kinases regulate transcriptional activation of the interstitial collagenase gene, MMP-1, in interleukin-1-stimulated synovial fibroblasts.

Arthritis Rheum, 1996, 39, 574-582.

Visse, R. et Nagase, H.

Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.

Circ Res, 2003, 92, 827-839.

Vogel, K. G. et Evanko, S. P.

Proteoglycans of fetal bovine tendon.

J Biol Chem, 1987, 262, 13607-13613.

Vogel, K. G. et Heinegard, D.

Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon.

J Biol Chem, 1985, 260, 9298-9306.

Vogel, K. G. et Hernandez, D. J.

The effects of transforming growth factor-beta and serum on proteoglycan synthesis by tendon fibrocartilage.

Eur J Cell Biol, 1992, 59, 304-313.

Vogel, K. G., Sandy, J. D., Pogany, G. et Robbins, J. R.

Aggrecan in bovine tendon.

Matrix Biol, 1994, 14, 171-179.

Waggett, A. D., Benjamin, M. et Ralphs, J. R.

Connexin 32 and 43 gap junctions differentially modulate tenocyte response to cyclic mechanical load.

Eur J Cell Biol, 2006, 85, 1145-1154.

Wang, J. H.

Mechanobiology of tendon.

J Biomech, 2006, 39, 1563-1582.

Wang, X. T., Liu, P. Y. et Tang, J. B.

Tendon healing in vitro: genetic modification of tenocytes with exogenous PDGF gene and promotion of collagen gene expression.

J Hand Surg Am, 2004, 29, 884-890.

Wang, Y., Yang, L., Zhang, J., Xue, R., Tang, Z., Huang, W., Jiang, D., Tang, X., Chen, P. et Sung, K. L.

Differential MMP-2 activity induced by mechanical compression and inflammatory factors in human synoviocytes.

Mol Cell Biomech, 2010, 7, 105-114.

Weigel, P. H., Hascall, V. C. et Tammi, M.

Hyaluronan synthases.

J Biol Chem, 1997, 272, 13997-14000.

Wellstein, A., Fang, W. J., Khatri, A., Lu, Y., Swain, S. S., Dickson, R. B., Sasse, J., Riegel, A. T. et Lippman, M. E.

A heparin-binding growth factor secreted from breast cancer cells homologous to a developmentally regulated cytokine.

J Biol Chem, 1992, 267, 2582-2587.

Wight, T. N.

Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology.

Curr Opin Cell Biol, 2002, 14, 617-623.

Willenbrock, F. et Murphy, G.

Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases.

Am J Respir Crit Care Med, 1994, 150, S165-170.

Wojciak, B. et Crossan, J. F.

The effects of T cells and their products on in vitro healing of epitenon cell microwounds.

Immunology, 1994, 83, 93-98.

Wolfman, N. M., Hattersley, G., Cox, K., Celeste, A. J., Nelson, R., Yamaji, N., Dube, J. L., DiBlasio-Smith, E., Nove, J., Song, J. J., Wozney, J. M. et Rosen, V.

Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family.

J Clin Invest, 1997, 100, 321-330.

Woo, S. L., Debski, R. E., Zeminski, J., Abramowitch, S. D., Saw, S. S. et Fenwick, J. A.

Injury and repair of ligaments and tendons.

Annu Rev Biomed Eng, 2000, 2, 83-118.

Woo, S. L., Smith, D. W., Hildebrand, K. A., Zeminski, J. A. et Johnson, L. A.

Engineering the healing of the rabbit medial collateral ligament.

Med Biol Eng Comput, 1998, 36, 359-364.

Wu, J. J., Weis, M. A., Kim, L. S. et Eyre, D. R.

Type III collagen, a fibril network modifier in articular cartilage.

J Biol Chem, 2010, 285, 18537-18544.

Wurgler-Hauri, C. C., Dourte, L. M., Baradet, T. C., Williams, G. R. et Soslowsky, L. J.

Temporal expression of 8 growth factors in tendon-to-bone healing in a rat supraspinatus model.

J Shoulder Elbow Surg, 2007, 16, S198-203.

Yang, T. T. et Hawkes, S. P.

Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89, 10676-10680.

Yoon, J. H. et Halper, J.

Tendon proteoglycans: biochemistry and function.

J Musculoskelet Neuronal Interact, 2005, 5, 22-34.

Yoshida, S., Shibata, M., Yamamoto, S., Hagihara, M., Asai, N., Takahashi, M., Mizutani, S., Muramatsu, T. et Kadomatsu, K.

Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain.

Eur J Biochem, 2000, 267, 4372-4380.

Yu, W. H., Yu, S., Meng, Q., Brew, K. et Woessner, J. F., Jr.

TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix.

J Biol Chem, 2000, 275, 31226-31232.

ANNEXES



Annexe 1 : Questions d'évaluation du VISA Score

The VISA score - an index of severity of jumper's knee

VICTORIAN INSTITUTE OF SPORT

ASSESSMENT SCALE

1. For how many minutes can you sit pain free?

0 mins

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

 100 mins

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

POINTS

2. Do you have pain walking downstairs with a normal gait cycle?

strong severe pain

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

 no pain

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

POINTS

3. Do you have pain at the knee with full active nonweightbearing knee extension?

strong severe pain

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

 no pain

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

POINTS

4. Do you have pain when doing a full weight bearing lunge?

strong severe pain no pain

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

POINTS

5. Do you have problems squatting?

POINTS

unable no problems

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

6. Do you have pain during or immediately after doing 10 single leg hops?

POINTS

strong severe pain/unable no pain

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

7. Are you currently undertaking sport or other physical activity?

0 Not at all

4 Modified training ± modified competition

7 Full training ± competition but not at same level as when symptoms began

10 Competing at the same or higher level as when symptoms began

8. Please complete **EITHER A, B or C** in this question.

- If you have **no pain** while undertaking sport please complete **Q8a only**.
- If you have **pain while undertaking sport but it does not stop you** from completing the activity, please complete **Q8b only**.
- If you have **pain that stops you from completing sporting activities**, please complete **Q8c only**.

8a. If you have **no pain** while undertaking sport, for how long can you train/practise?

POINTS

NIL	1-5 mins	6-10 mins	7-15 mins	>15 mins
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0	7	14	21	30

OR

8b. If you have some pain while undertaking sport, but it does not stop you from completing your training/practice for how long can you train/practise?

POINTS

NIL	1-5 mins	6-10 mins	7-15 mins	>15 mins
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0	4	10	14	20

OR

8c. If you have **pain which stops you** from completing your training/practice for how long can you train/practise?

	NIL	1-5 mins	6-10 mins	7-15 mins	>15 mins	POINTS
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	0	2	5	7	10	

TOTAL VISA SCORE

Annexe 2 : Article Master 2

Titre : Extracellular Matrix MetalloPRoteinanses Inducer (EMMPRIN/CD-147) as a novel regulator of myogenic cell differentiation

Auteurs : Mohamed Attia, Eric Huet, Jean Delbé, Dominique Ledoux, Suzanne Menashi and Isabelle Martelly.

Date : June 2010

Journal : Journal of Cellular Physiology

Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN/CD147) as a Novel Regulator of Myogenic Cell Differentiation

ATTIA MOHAMED,¹ HUET ERIC,¹ DELBÉ JEAN,¹ LEDOUX DOMINIQUE,² MENASHI SUZANNE,¹ AND MARTELLY ISABELLE^{1,*}

¹Laboratoire CRRET, CNRS EAC 7149, Université Paris-Est Créteil, Créteil, France

²Laboratoire de Pharmacologie EA3406, Université Paris-Nord, Bobigny, France

Matrix metalloproteinases (MMPs) are thought to play an important role in skeletal muscle cell growth and differentiation. In view of the MMP inducing function of EMMPRIN/CD147, its role in myogenic cell differentiation was investigated. EMMPRIN level increased during differentiation of both rat primary myoblasts derived from satellite cells and mouse C2.7 myogenic cells and was associated with an alteration in its molecular forms. In parallel, expression of pro-MMP-9 gradually decreased and that of pro-MMP-2 and active MMP-2 increased. While small interfering RNA (siRNA) inhibition of EMMPRIN expression accelerated cell differentiation, exogenously added recombinant EMMPRIN inhibited differentiation by an MMP-mediated mechanism, as the MMP inhibitor marimastat abrogated EMMPRIN's effect. Our results further suggest that EMMPRIN regulates differentiation through an MMP activation of transforming growth factor beta (TGF β), a known inhibitor of myoblast's differentiation, as the increased activation and signaling of TGF β by EMMPRIN was attenuated in the presence of marimastat. EMMPRIN inhibition may thus represent a novel strategy in the treatment of muscular degenerative disorders.

J. Cell. Physiol. 226: 141–149, 2010. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

Muscle fibers are surrounded by an extracellular matrix (ECM) forming a basement membrane in contact with the myogenic cell, also referred to as satellite cells, and playing a major role in muscle fiber homeostasis (Sanes, 2003). Besides, the physiological turnover of the ECM in uninjured skeletal muscle, extensive ECM degradation, and remodeling occurs in pathological situations such as muscle injury (Rao et al., 1985; Melo et al., 1996; Huijbregts et al., 2001; Alexakis et al., 2007). A number of studies have underscored the implication of proteinases such as matrix metalloproteinases (MMPs) in the integrity and the maintenance of the ECM and muscle fibers (see Carmeli et al., 2004 as a review; Guerin and Holland, 1995; Bani et al., 2008). The main MMPs known to be associated with skeletal muscle regeneration are the gelatinases MMP-2 and MMP-9 (Kherif et al., 1999; Zimowska et al., 2008) although other members of the MMP family such as MMP-1 were also suggested to participate in muscle cell myogenesis (Kaar et al., 2008; Wang et al., 2009). Myogenic cells are involved in muscle repair and have already been shown to synthesize and secrete MMP-2 and MMP-9 (Guerin and Holland, 1995), thus suggesting that these cells participate directly in the remodeling of ECM during myogenesis and regeneration of skeletal muscle.

Among their proposed effects on matrix proteins, MMPs can contribute to liberate and activate cytokines such as members of the transforming growth factor beta (TGF β) family (Dangelo et al., 2001; Karsdal et al., 2002; Wang et al., 2006). TGF β is part of a complex network that regulates muscle development and differentiation (McLennan and Koishi, 2002). It is generally known as a potent inhibitor of the fusion of myogenic cell (Massague et al., 1986; Olson et al., 1986) and was also shown to delay myoblast differentiation into myotubes, probably by acting on an early step of this process (Florini and Ewton, 1988; Schabort et al., 2009). Indeed, TGF β blocking antibodies improved skeletal muscle regeneration and accelerated myoblast differentiation *in vitro* (Zimowska et al., 2009). TGF β

is also known to regulate MMP-2 activity in these cells and to favor their transdifferentiation into myofibroblasts in skeletal muscle (Zanotti et al., 2007, 2009), thereby increasing the fibrotic feature of regenerated muscle. Therefore, the activation of TGF β by MMPs may play an important role in regulating myogenesis.

It has been shown that the expression of MMP-2 and MMP-9 can be regulated by a cell surface glycoprotein called extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (Biswas et al., 1995; Toole, 2003), also called CD147 or basigin, a member of the immunoglobulin super family (Iacono et al., 2007). Although the role of EMMPRIN in tumor invasion (Gabison et al., 2005a) through its MMP inducing ability has been the most extensively studied, it is becoming increasingly clear that it has additional functions. EMMPRIN was found, for example, to increase the synthesis of hyaluronan (Marieb et al., 2004) and vascular endothelial growth factor (VEGF) (Tang et al., 2005; Bougatef et al., 2009) in tumor cells and thus was implicated in tumor survival and angiogenesis. EMMPRIN was also shown to play a role in wound healing, through the regulation of MMPs (Gabison et al., 2005b), thus suggesting a

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Contract grant sponsor: Fondation de l'Avenir.

*Correspondence to: Martelly Isabelle, Laboratoire CRRET, CNRS EAC 7149, Université Paris-Est Créteil, 61 Av du Général de Gaulle, 94010 Créteil Cedex, France. E-mail: martelly@u-pec.fr

Received 22 April 2010; Accepted 29 June 2010

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com), 20 July 2010.
DOI: 10.1002/jcp.22315

regulatory effect of EMMPRIN in tissue remodeling (Huet et al., 2008a). A role for EMMPRIN in differentiation also was evoked based on its localization in the basal layers of the epithelia of dermis (DeCastro et al., 1996) and cornea (Gabison et al., 2005b), and its ability to promote myofibroblasts differentiation (Huet et al., 2008b). Furthermore, in skeletal muscle, EMMPRIN has already been described as a chaperone for the translocation of monocarboxylate transporters (MCT) to the plasma membrane, another well-demonstrated function of EMMPRIN (Juel and Halestrap, 1999; Kirk et al., 2000; Nakai et al., 2006). However, its role in regulating the expression of MMPs during myogenesis has not yet been explored. This prompted us to analyze the role of EMMPRIN in myogenesis in an *in vitro* approach.

Our results suggest that EMMPRIN inhibits the differentiation of myogenic cell by an MMP-dependent activation of TGF β . These results that emphasize a regulatory role of EMMPRIN in myogenesis may have important applications in therapeutic strategies for promoting skeletal muscle rehabilitation and preventing muscle disorders.

Materials and Methods

Cell cultures and treatments

C2.7 cells (a kind gift from D. Montarras, Institut Pasteur, France), a subclone of the mouse C2C12 myogenic cell line, were cultured in proliferation medium: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with 20% fetal calf serum (FCS; PAA Laboratories, Les Mureaux, France) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 10 μ g/ml streptomycin; Invitrogen). For differentiation experiment, C2.7 cells were seeded at 5,000 cells/cm² on 60-mm diameter dishes. When cultures reached about 90–95% of confluence, proliferation medium was shifted to differentiation medium: DMEM containing 4% horse serum (HS; PAA Laboratories), 0.5% Ultrosor-G (Pall Biosepra, Villeneuve-La Garenne, France) and antibiotics. In some experiments, cells were treated with 20 μ g/ml of recombinant EMMPRIN (recEMMPRIN), an affinity-purified Flag-tag protein consisting of the extracellular domain of human EMMPRIN expressed in mammalian cells (Gabison et al., 2005b) and/or with 5 μ M of the broad-spectrum MMP inhibitor marimastat (generous gift from British Biotech, Oxford, UK) as specified in figure legends. Cultures were continued in differentiation medium for 48 h before protein extraction. Differentiation was followed morphologically using phase-contrast microscopy.

Primary cultures of myoblasts derived from satellite cells of adult rat skeletal muscles were obtained as previously described (Lagord et al., 1993). Briefly, satellite cells were dissociated with pronase (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) from limb muscles of 8-week-old Wistar rats. Cells were seeded at 2,000 cells/cm² in DMEM supplemented with 10% FCS, 10% HS, and antibiotics on gelatin-coated Petri dishes (Iwaki, ATGC, Marne la Vallée, France). Medium was renewed every 3 days. After 6–7 days of culture in this medium cells started to differentiate into myotube phenotype.

Small interfering RNA transfection

The day before transfection, C2.7 cells were seeded in 6-well plates at 20,000 cells/cm² in proliferation medium. Then, cells were transfected with 100 nM of EMMPRIN small interfering RNA (siRNA; Applied Biosystems, Courtaboeuf, France, ID #: 160898 and 160899) or scramble siRNA (BLOCK-iT fluorescent oligo; Invitrogen) using oligofectamine transfection reagent in OptiMEM 1 (Invitrogen) in the absence of FCS and antibiotics according to the manufacturer's instructions. Five hours after transfection, the cells were transferred to DMEM 20% FCS and incubated for a further 18 h and then maintained in differentiation medium for 48 h prior to protein and mRNA analysis.

Cell proliferation

Proliferation was assayed using a colorimetric test with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, Lyon, France). Cells were plated at a density of 2,000 cells/cm² in 96-well flat-bottomed plate. After siRNA transfection as described above, proliferation was measured at 24 and 48 h. MTT solution was added to each well and plates were incubated at 37°C for further 3 h. Then cells were lysed and the formazan product was dissolved for 5 min in isopropyl alcohol and the absorbance was determined at 570 nm using a plate reader.

mRNA isolation and RT-PCR

Total mRNA was extracted from the cells with Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 μ g of total mRNA using random hexamer primers and reverse transcriptase (SuperScript II RNase H; Invitrogen) in a final volume of 20 μ l. Three microliters of the resulting cDNA was submitted to PCR amplification using a Gene Amp 9600 system (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Les Ulis, France) in a final volume of 50 μ l. Primers were as follows: EMMPRIN detection, 5'-CGCTGGCCTTCACGCTCTTGA-3' (forward) and 5'-TTGCGGTCTGGGTCAGTCTGCT-3' (reverse); troponin T detection, 5'-GGCAGAAGATGAGGAAGCGG-3' (forward) and 5'-TTGCTCAGCTCTCTCTGCGC-3' (reverse); and TFIIID detection, 5'-AGTGAAGAACAGTCCAGACTG-3' (forward) and 5'-CCAGGAAATAACTCGGCTCAT-3' (reverse). After 5 min at 94°C, the following number of cycles was used: 37 cycles for EMMPRIN, 30 cycles for troponin T and TFIIID. Each cycle included denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 66°C (for EMMPRIN) or at 62°C (for troponin T) or at 60°C (TFIIID) for 1 min, and primer extension at 72°C for 1 min. RT-PCR products were subjected to electrophoresis on 2% (w/v) agarose gels containing 0.5 mg/ml ethidium bromide. Gels were photographed using a Chimigenius system (Syngene, Cambridge, UK) and band intensities were quantified by densitometry analysis using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

Protein extraction

Cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate), supplemented with 1/100 Protease Inhibitor Cocktail Set V (Calbiochem, VWR International, Strasbourg, France). After centrifugation at 13,000g for 5 min at 4°C and protein determination using the Pierce BCA Protein Assay kit (Perbio Science, Brebières, France), protein extracts were analyzed by Western blot and gelatin zymography or for TGF β quantification.

Western blot analysis

Protein extracts were analyzed by Laemmli SDS-PAGE (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) on 10% gels and then transferred to Immobilon-P PVDF membrane (Millipore, Guyancourt, France). Membranes were immunoblotted with either anti-EMMPRIN pAb (1/3,000, Ref. G-19; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-troponin T mAb (1/1,000, clone JLT-12; Sigma-Aldrich), anti-phospho-Smad2 pAb (1/1,000, Ref. AB3849; Millipore), or anti-Smad2/3 pAb (1/1,000, Ref. 07-408; Millipore) overnight at 4°C, followed by 1 h incubation at room temperature with horseradish-peroxidase-conjugated anti-mouse, anti-rabbit, or anti-goat antibody and visualized with BM Chemiluminescence Substrate (Roche Diagnostics, Meylan, France). Protein loading was verified by Ponceau S staining since the classical housekeeping proteins like α -tubulin, GAPDH, or β -actin co-migrate with our proteins of interest.

Gelatin zymography

MMP-2 and MMP-9 were evaluated by zymography analysis of the protein extracts in 10% polyacrylamide gels containing 1 mg/ml

gelatin, as previously described (Fridman et al., 1995). Band intensities were quantified by densitometry analysis using ImageJ software.

TGF β quantification

Total and active TGF β contents in the conditioned medium recovered at different times of differentiation (indicated in figure legends) were measured by ELISA kits (R&D Systems Europe, Lille, France) according to the manufacturer's protocol. Total TGF β was evaluated after acidic treatment of the extract. TGF β values in each medium sample were expressed relative to the protein content of the corresponding cells.

Luciferase assay

C2.7 cells were transfected in 6-well plates using Fugene 6 reagent (Roche Diagnostics) with 1 μ g of the pGL-(CAGA)₃ reporter construct (Dennler et al., 1998) which contains SMAD binding elements. Twenty-four hours after transfection, luciferase activity was determined with the luciferase assay system kit (Promega, Charbonnières-les-bains, France) using a Wallac microbeta counter (Perkin-Elmer). Promoter activity is expressed as relative luminescence units (RLU) per milligram of protein.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation and were statistically compared with Student's t-test using GraphPad software (San Diego, CA). Significant differences were determined at *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, and * $P < 0.05$.

Results

EMMPRIN and MMPs expression during myoblast differentiation

The mouse C2.7 myogenic cell line was made to differentiate and fuse into multinucleated myotubes by shifting the cell cultures to low serum-containing medium (Fig. 1A, upper part). Using immunofluorescence labeling, EMMPRIN could be observed both in myoblasts and myotubes (Fig. 1A, lower part). However, Western blot analyses have shown changes in both its level and molecular forms during differentiation. At day 0, prior to differentiation, EMMPRIN appeared as a doublet at approximately 45 kDa, representing a higher glycosylated forms (Fig. 1B). This is somewhat smaller than the 50–60 kDa generally reported for other tissues. The smaller molecular weight of EMMPRIN observed in C2.7 cells seems to represent a specificity of the muscle tissue as was shown by comparing the electrophoretic migration of EMMPRIN derived from different cell types and tissues (see Supplementary Data). The differences often observed in EMMPRIN molecular weight is generally thought to reflect different levels of glycosylation (Riethdorf et al., 2006; Zheng et al., 2006) and/or protein structure (Kanekura et al., 1991). During C2.7 differentiation, the 45 kDa EMMPRIN band observed by Western blot progressively decreased with the gradual appearance of intense bands of smaller molecular weight forms (days 2 and 3). These bands which became predominant are thought to be the hypo- or non-glycosylated forms of EMMPRIN (Yu et al., 2006). EMMPRIN mRNA measurements revealed an initial decrease at day 1, followed by a gradual increase reaching at day 3 a level approximately eight times that of day 1, although only slightly higher than at day 0 (Fig. 1C). It is not clear why EMMPRIN mRNA decreases after the medium shift at day 1. It may represent a response to serum depletion, as serum was shown to stimulate EMMPRIN expression (Huet et al., 2008b). Zymography analysis of the cellular extracts shows that while pro-MMP-9 was the predominant gelatinase in proliferating myoblasts (day 0), its level diminished after medium shift (day 1) with a parallel increase in both pro-MMP-2 and active MMP-2

(Fig. 1B). Cell differentiation was attested in these experiments by morphological observations and by the increase at both protein (Fig. 1B) and mRNA (Fig. 1C) levels of troponin T, a late marker of myoblast differentiation. The different bands of troponin T evidenced after RT-PCR by agarose gel electrophoresis represent the different isoforms of the protein.

In order to confirm that the regulation of EMMPRIN and MMPs observed in the mouse C2.7 cell line, which are immortalized cells, is representative of myogenic differentiation, we conducted similar experiments on rat primary myoblasts derived from satellite cells (Fig. 2). These primary cultures were allowed to differentiate in the regular culture medium used (10% FCS and 10% HS). First myotubes appeared at day 6 after seeding and the progression of the differentiation was attested by the increase in troponin T expression. After 10 days in culture, numerous myotubes could be seen (Fig. 2A, upper part), which at this point contracted spontaneously. As was observed for C2.7 cells, EMMPRIN expression increased in rat primary myoblasts upon differentiation. This increase was more particularly noted with the low molecular forms of the protein (Fig. 2B). Also, similar to the C2.7 cells, pro-MMP-9 decreased upon differentiation of rat myoblasts whereas both pro-MMP-2 and MMP-2 increased (Fig. 2B). The similar regulation observed for EMMPRIN and MMPs in both mouse cell line and rat primary cells suggests a common pattern that characterizes the myogenic process. The following experiments were performed using the mouse C2.7 myogenic cell line.

EMMPRIN regulates myogenic cell differentiation in an MMP-dependent mechanism

In order to determine EMMPRIN's function in cell differentiation, its expression was first down-regulated using siRNA strategy (Fig. 3). Two different siRNAs were used and both reduced EMMPRIN protein (Fig. 3A) and mRNA (Fig. 3B) levels to about 40% and 80%, respectively. The difference in down-regulation of the protein relative to the mRNA may reflect a slow turnover of this protein in muscle cells as was already shown with other muscle proteins (Pietri-Rouxel et al., 2010). Gelatin zymography analysis showed a reduced level of both pro-MMP-9 and MMP-2 in the siRNA-treated cells (Fig. 3A). EMMPRIN down-regulation resulted in an accelerated cell differentiation (Fig. 3C). Morphologically, 48 h after medium shift, more myotubes were seen in the siRNA-treated cultures compared to control. This increased differentiation was also confirmed by the higher levels of both the protein (Fig. 3A) and the mRNA of troponin T (Fig. 3B). Interestingly, down-regulation of EMMPRIN by siRNA transfection resulted, after 48 h, in a 15–25% inhibition in cell proliferation compared to controls (Fig. 3D). This may suggest that EMMPRIN down-regulation favors cell cycle withdrawal, a necessary step to fusion and differentiation of myoblasts.

Reciprocally, myoblast differentiation was delayed when cells were treated with recombinant EMMPRIN (recEMMPRIN) (Fig. 4, see control vs. recEMMPRIN-treated cells). As a control, the activity of the recEMMPRIN was checked by its effect on MMPs by zymography and revealed a greater increase of MMP-2 in these cells (not shown).

Altogether these results suggest that EMMPRIN acts as a negative regulator of myogenesis.

The implication of MMPs in the regulation of myogenesis by EMMPRIN was examined by adding to these cultures marimastat, a broad-spectrum MMP inhibitor. When myoblasts were treated with marimastat alone, their differentiation was greatly accelerated as evidenced both morphologically and by the increased troponin T levels (Fig. 4A,B). When marimastat was added to the recEMMPRIN-treated cells, it abrogated EMMPRIN's effect and allowed an enhancement of cell

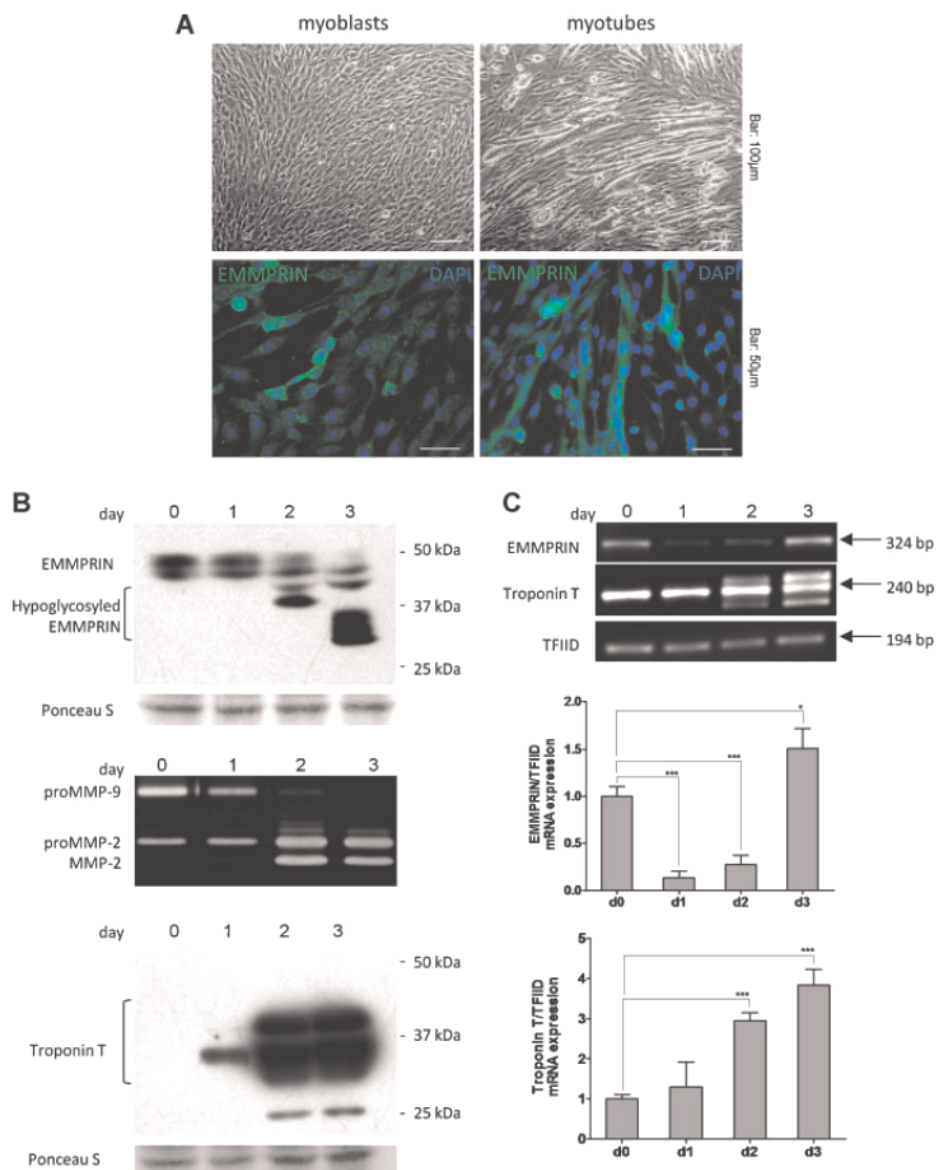


Fig. 1. EMMPRIN and MMPs expression during myogenic cell differentiation. Sub-confluent cultures of the mouse C2.7 myoblast cell line (day 0) were allowed to differentiate for 3 days (days 1, 2, and 3) in DMEM supplemented with 4% HS and 0.5% Ultrosor-G. **A:** Upper part: Phase-contrast microscopy of myoblasts (day 0) and myotubes (day 3) cultures. Lower part: EMMPRIN was evidenced by immunofluorescence at the same time points. **B:** EMMPRIN and MMPs expressions were determined by Western blot and zymography analysis, respectively, from day 0 (myoblasts) to day 3 after the medium was shifted to differentiation medium. Differentiation was demonstrated by troponin T expression. Ponceau S was used as the loading control. **C:** RT-PCR analysis for EMMPRIN and troponin T mRNA levels during differentiation. TFIID was used as an internal control. Columns represent mean of quantitative change expressed relatively to TFIID \pm SD ($n = 3$). *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$, significant difference. Results are from at least three different experiments. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

differentiation, like in the marimastat alone treated cells (Fig. 4A). This underscores the role of MMP activity in EMMPRIN's effect on cell differentiation. Hence, EMMPRIN appears to act as a negative regulator of myogenesis through an MMP-dependent mechanism.

EMMPRIN modulates myogenesis through an MMP-dependent TGF β activation

In order to define the mechanism by which EMMPRIN controls myogenesis, we next examined the effect of EMMPRIN on

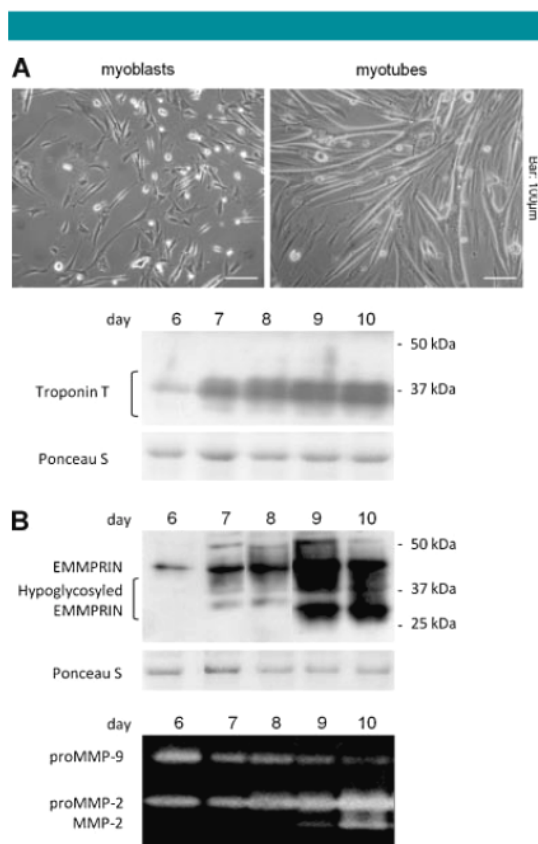


Fig. 2. EMMPRIN and MMPs expression during differentiation of rat primary myoblasts. Rat satellite cells were dissociated from limb muscles of 8-week-old Wistar rat. Cells were grown continuously in DMEM containing 10% FCS and 10% HS. In this medium, myoblasts started to differentiate after day 6 of culture. Cultures showing increasing amount of myotubes were maintained up to day 10 after seeding. **A:** Upper part: phase-contrast microscopy views at day 4 (myoblasts) and day 10 after seeding (myotubes). Lower part: Western blot analysis of troponin T from day 6 to day 10 after seeding. Ponceau S was used as the loading control. **B:** EMMPRIN and MMPs expressions were determined by Western blot and zymography analysis, respectively, from day 6 to day 10 after seeding. Ponceau S was used as the loading control. Results are from at least three different experiments.

TGF β activation since it is a well-known inhibitor of myogenic differentiation and it can be activated by MMPs (Dangelo et al., 2001; Karsdal et al., 2002; Wang et al., 2006). For this, cells were treated with recEMMPRIN in the absence or presence of marimastat. Activation of TGF β was determined by ELISA measurements and by following downstream TGF β signaling events: namely, Smad2 phosphorylation and luciferase TGF β -Smad-driven gene transactivation.

ELISA measurements show that the presence of recEMMPRIN, which inhibits myoblast differentiation, lead to a more than twofold increase in the percentage of activated TGF β in the culture medium compared to untreated cells (Fig. 5A). By contrast, the presence of marimastat, which inhibits MMPs activity and stimulates cell differentiation, reduced significantly the proportion of activated TGF β (Fig. 5A). Furthermore, the presence of marimastat

simultaneously with recEMMPRIN, which alone induced MMPs expression and inhibited cell differentiation, abrogated recEMMPRIN-enhanced TGF β activation.

Accordingly, TGF β activation shown by the above ELISA measurements resulted in a modification in TGF β downstream signaling pathway. RecEMMPRIN treatment of the cells induced an increase in Smad2 phosphorylation, which was prevented by the simultaneous presence of marimastat (Fig. 5B). As a second approach, we determined the effect of recEMMPRIN and/or marimastat on TGF β -Smad-driven gene transactivation in cells transfected with the artificial (CAGA)₃-lux reporter construct. This construct allows monitoring Smad3/Smad4-specific transcription of the luciferase reporter gene in response to active TGF β . RecEMMPRIN treatment alone increased luciferase activity. This effect was abrogated by the simultaneous presence of marimastat (Fig. 5C). Altogether, these results suggest that EMMPRIN regulates myogenic differentiation through an MMP-dependent activation of TGF β .

Discussion

Although the implication of EMMPRIN/CD147 as a chaperone for MCT in skeletal muscle cells has been already reported (Juel and Halestrap, 1999; Kirk et al., 2000; Nakai et al., 2006), curiously the most studied function of EMMPRIN as an MMP inducer has not yet been explored in muscle cells. The present study demonstrates a role for EMMPRIN in the control of myogenesis through the regulation of MMPs.

The results presented suggest that EMMPRIN inhibits myoblast differentiation by a mechanism involving MMP-dependent TGF β activation. TGF β members are generally taken as potent inhibitors of myogenic cells fusion (Massague et al., 1986; Olson et al., 1986). TGF β which is synthesized and secreted as a latent cytokine can be activated by several MMPs, thus suggesting a negative effect of MMPs in myoblasts differentiation. Increased expression of MMPs, in particular MMP-9, in skeletal muscle has been demonstrated in patients and animal models of muscle wasting diseases such as Duchenne muscular dystrophy (Carmeli et al., 2004). Furthermore, inhibition of MMP-9 was shown to improve skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy (Li et al., 2009). By inducing MMP production, our results place EMMPRIN upstream of MMP action which in turn represents a key actor in the regulation of myogenesis. We cannot exclude, however, an additional effect of EMMPRIN-induced MMPs on other regulators of myoblasts differentiation.

EMMPRIN expression was similarly regulated during myogenesis of both rat primary myoblasts and mouse C2.7 cells, reinforcing the role of this protein in the regulation of the myogenic process. The most striking change during differentiation was noted in the molecular forms of EMMPRIN, gradually shifting from high molecular of about 45 kDa before differentiation to around 30 kDa in myotubes. Different molecular forms of EMMPRIN have already been described in various types of cells including tumor cells and were shown to result from different extent of glycosylation of the molecule (Riethdorf et al., 2006; Zheng et al., 2006). The higher glycosylated forms have been largely attributed to a greater ability to induce MMPs (Sun and Hemler, 2001; Sluiter et al., 2006) although this was disputed recently (Belton et al., 2008). The similar changes in the molecular forms of EMMPRIN observed in both myogenic cell types during the *in vitro* myoblast differentiation suggest an additional post-transcriptional level of regulation of the protein during this physiological process. Low glycosylated molecular form of EMMPRIN may result from its association with caveolin-1 as the localization of EMMPRIN in the caveolae was shown to inhibit EMMPRIN glycosylation (Tang et al., 2004). Interestingly, the expression of caveolin-1 which is low in growing myoblasts is

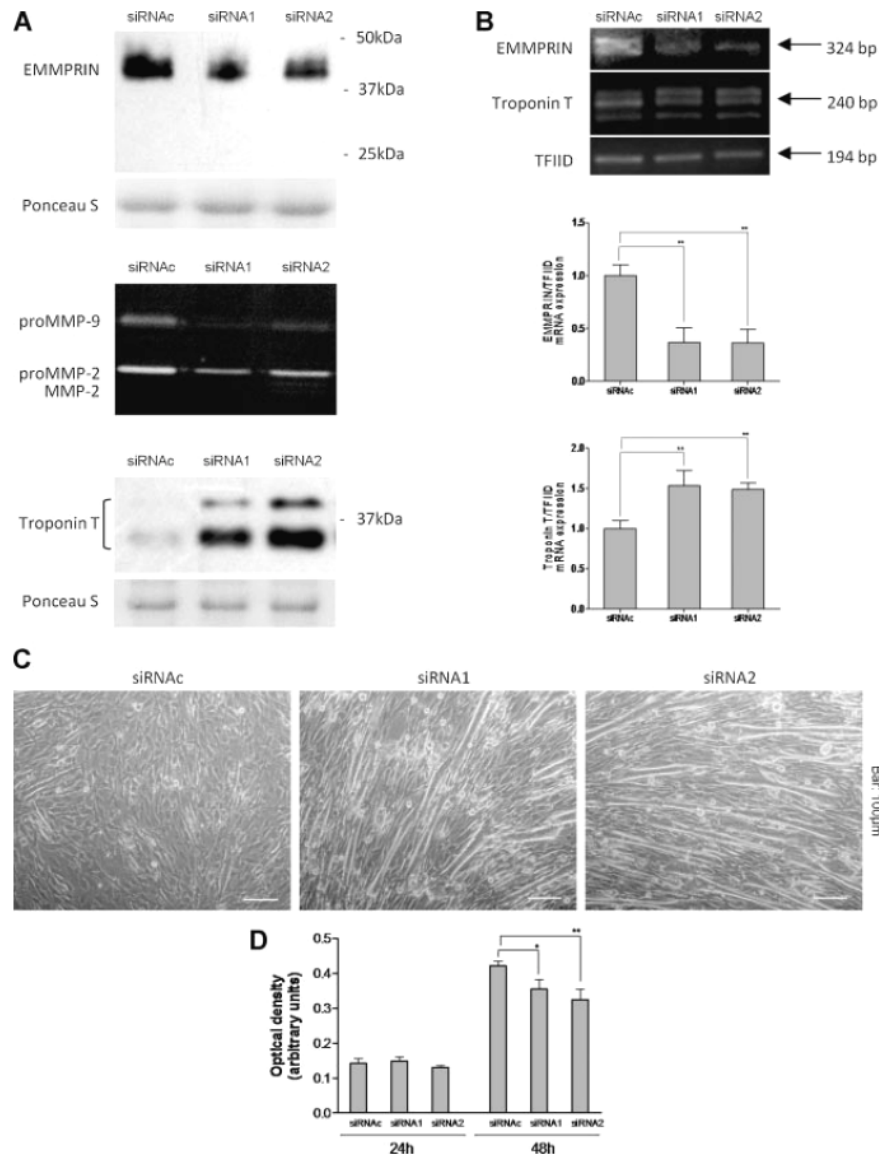


Fig. 3. Silencing EMMPRIN expression by siRNA accelerates myogenic cell differentiation. Mouse C2.7 cells were transfected with two different EMMPRIN siRNA (siRNA1 and siRNA2) or scrambled siRNA (siRNAc), at 100 nmol/L concentration as described in the Materials and Methods Section. DMEM supplemented with 4% HS and 0.5% Ultrosor-G was used to induce differentiation. Cultures were analyzed 48 h after. **A:** Expression levels for EMMPRIN and MMPs determined by Western blot and zymography analysis, respectively. Differentiation was demonstrated by troponin T expression. Ponceau S was used as the loading control. Representative blots of several different experiments are shown. **B:** RT-PCR analysis for EMMPRIN and troponin T mRNA levels in differentiated cells. TFIID was used as an internal control. Columns represent mean of quantitative change expressed relatively to TFIID \pm SD ($n = 3$). **C:** Phase-contrast microscopy views of control and C2.7 transfected with siRNAs. Results are representative of at least three different experiments. **D:** Effect of EMMPRIN siRNA on C2.7 myoblast proliferation. Cells were seeded at low density (2,000 cells/cm²) on day 0 and at day 1, cultures were transfected with siRNA for 24 and 48 h. Cell growth was measured using the MTT test. Results are mean \pm SD ($n = 8$). Statistical analysis: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, significant difference.

up-regulated in differentiated myotubes and parallels the appearance of the low molecular weight EMMPRIN forms (Volonte et al., 2005). Although the functional significance of these changes in molecular forms is difficult to interpret, it is

tempting to speculate that different forms may regulate different MMPs. Indeed, while both MMP-9 and MMP-2 are known to be regulated by EMMPRIN, the appearance of lower molecular forms paralleled an increase in MMP-2 but a decrease

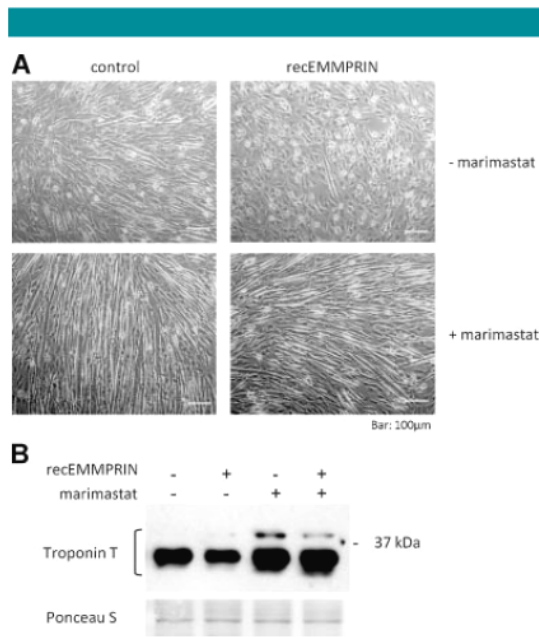


Fig. 4. Myoblast differentiation is inhibited by recombinant EMMPRIN in an MMP-dependent manner. Sub-confluent cultures of the mouse C2.7 myogenic cell line were allowed to differentiate for 3 days in DMEM supplemented with 4% HS and 0.5% Ultrosor-G in the absence or presence of 20 $\mu\text{g/ml}$ recombinant EMMPRIN (recEMMPRIN) and/or 5 μM marimastat. **A:** Effect of treatments on cell differentiation was evidenced morphologically by phase-contrast microscopy. **B:** Western blot analysis for troponin T expression. Ponceau S was used as the loading control. Results are representative of at least three different experiments.

in MMP-9. Such a correlation between high and low EMMPRIN molecular weight species and MMP-9 and MMP-2 up-regulation, respectively, has been previously suggested in a study on the carotid with atherosclerosis lesions (Sluijter et al., 2006). Our observations are in accord with the notion that the non- or hypo-glycosylated EMMPRIN can also induce MMPs expression or other regulators of myogenesis (Belton et al., 2008; Chen et al., 2009). However, the relationship between low or non-glycosylated forms of EMMPRIN and control of myogenesis is not yet fully understood and needs further studies.

Both MMP-9 and MMP-2 have been already observed in regenerating muscles *in vivo* (Kherif et al., 1999; Zimowska et al., 2008), but their precise role is still controversial. MMP-9 was generally associated with myoblast migration and proliferation (El Fahime et al., 2000; Lewis et al., 2000; Allen et al., 2003; Fukushima et al., 2007; Yanagiuchi et al., 2009), whereas MMP-2 is thought to play a role in the differentiation of myoblast (Lluri and Jaworski, 2005). The role of these MMPs in muscle formation and in regenerating muscles was assumed mainly on the basis of their expression or activity in myoblast (Couch and Strittmatter, 1983; Guerin and Holland, 1995; Kherif et al., 1999; Carmeli et al., 2004). Our results showing that the addition of the broad-spectrum MMP inhibitor marimastat accelerated myotube formation seems to contradict those observations. Nevertheless, our results are in accord with the published observation showing that MMP-9 inhibition improved skeletal muscle regeneration (Li et al., 2009). However, myoblasts isolated from TIMP-2 knockout mice and differentiating in HS containing medium were shown

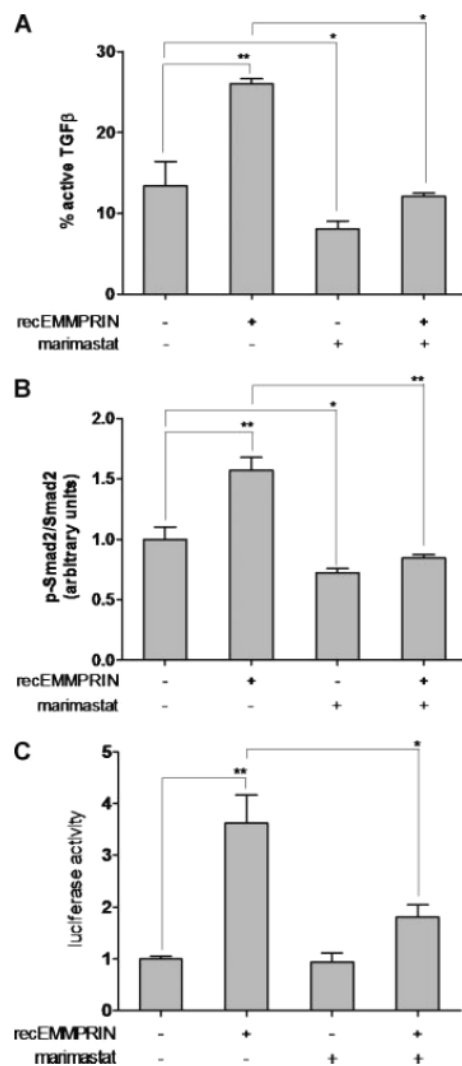


Fig. 5. EMMPRIN increase TGF β activation during myogenic cell differentiation through an MMP-dependent mechanism. Sub-confluent cultures of the mouse C2.7 myogenic cell line were allowed to differentiate for 3 days in DMEM supplemented with 4% HS and 0.5% Ultrosor-G in the absence or presence of 20 $\mu\text{g/ml}$ recombinant EMMPRIN (recEMMPRIN) and/or 5 μM marimastat. **A:** Activation of TGF β was determined in conditioned medium by ELISA measurements as described in the Materials and Methods Section. Columns represent percentage mean of active TGF β expressed relatively to total TGF β \pm SD ($n = 3$). $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$, significant difference. **B:** Smad2 phosphorylation (p-Smad2), due to a TGF β signaling activity, was evidenced by Western blot analysis. Smad2 was used as the loading control. Columns represent mean of p-Smad2 quantitative change expressed relatively to total Smad2 \pm SD ($n = 3$). $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$, significant difference. **C:** Prior to treatment with recEMMPRIN and/or marimastat, cells were transfected with the artificial (CAGA) $_3$ -lux reporter construct. Smad3/Smad4-specific transcription of the luciferase reporter gene in response to active TGF β was monitored by measurement of luciferase activity as described in the Materials and Methods Section. Data were normalized to untreated cells and results are given as the mean \pm SD ($n = 3$). $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$, significant difference.

to form larger myotubes than the wild-type cells (Lluri et al., 2008). This apparent contradiction could be reconciled with the complex role of TIMP-2 in the regulation of MMP activity and in particular in that of MMP-2. Indeed, TIMP-2 serves both as an inhibitor of MMP-2 and as its activator by forming a functional part of the pro-MMP-2/MT1-MMP/TIMP-2 activating complex (Goldberg et al., 2003; Visse and Nagase, 2003).

These novel findings demonstrating an MMP-dependent negative regulation of EMMPRIN on myogenesis may have practical implications. In several neuromuscular disorders, MMPs have a deleterious role. In Duchenne muscular dystrophy, accumulating evidence suggests that ECM degradation and fibrosis, both physiological processes involving MMPs and TGF β , are implicated and aggravate disease progression. MMPs have been also implicated in the pathogenesis of other diseases such as inflammatory myopathies or congenital dystrophies. EMMPRIN inhibition which would reduce MMP production and inhibit TGF β activation may thus represent promising new therapeutic approaches in these pathologies.

Acknowledgments

We thank Arlette Duchesnay and Benoit Vallée for their valuable technical help. We also thank the Fondation de l'Avenir (study ET8-489) for partial financial support.

Literature Cited

- Alexakis C, Partridge T, Bou-Gharios G. 2007. Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: A self-perpetuating mechanism of collagen overproduction. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C661–C669.
- Allen DL, Teitelbaum DH, Kurachi K. 2003. Growth factor stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C805–C815.
- Bani C, Lagrota-Candido J, Pinheiro DF, Leite PE, Salimena MC, Henriques-Pons A, Quirico-Santos T. 2008. Pattern of metalloproteinase activity and myofiber regeneration in skeletal muscles of mdx mice. *Muscle Nerve* 37:583–592.
- Belton RJ, Jr., Chen L, Mesquita FS, Nowak RA. 2008. Basigin-2 is a cell surface receptor for soluble basigin ligand. *J Biol Chem* 283:17805–17814.
- Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, Nabeshima K. 1995. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 55:434–439.
- Bougatier F, Quemener C, Kellouche S, Naimi B, Podgorniak MP, Millot G, Gabison EE, Calvo F, Dosquet C, Lebbe C, Menashi S, Mourah S. 2009. EMMPRIN promotes angiogenesis through hypoxia-inducible factor-2 α -mediated regulation of soluble VEGF isoforms and their receptor VEGFR-2. *Blood* 114:5547–5556.
- Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. 2004. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: A brief review. *Muscle Nerve* 29:191–197.
- Chen L, Belton RJ, Jr., Nowak RA. 2009. Basigin-mediated gene expression changes in mouse uterine stromal cells during implantation. *Endocrinology* 150:966–976.
- Couch CB, Strittmatter WJ. 1983. Rat myoblast fusion requires metalloendoprotease activity. *Cell* 32:257–265.
- Dangelo M, Sarment DP, Billings PC, Pacifici M. 2001. Activation of transforming growth factor beta in chondrocytes undergoing endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 16:2339–2347.
- DeCastro R, Zhang Y, Guo H, Kataoka H, Gordon MK, Toole B, Biswas G. 1996. Human keratinocytes express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer. *J Invest Dermatol* 106:1260–1265.
- Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. 1998. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF β beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 17:3091–3100.
- El Fahime E, Torreente Y, Caron NJ, Bresolin MD, Tremblay JP. 2000. In vivo migration of transplanted myoblasts requires matrix metalloproteinase activity. *Exp Cell Res* 258:279–287.
- Florini JR, Ewton DZ. 1988. Actions of transforming growth factor-beta on muscle cells. *J Cell Physiol* 135:301–308.
- Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S. 1995. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res* 55:2548–2555.
- Fukushima K, Nakamura A, Ueda H, Yuasa K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda S. 2007. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CKMDJ). *BMC Musculoskelet Disord* 8:54.
- Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S. 2005a. EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie* 87:361–368.
- Gabison EE, Mourah S, Steinfelds E, Yan L, Hoang-Xuan T, Watsky MA, De Wever B, Calvo F, Mauviel A, Menashi S. 2005b. Differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) in normal and ulcerated corneas: Role in epithelial-stromal interactions and matrix metalloproteinase induction. *Am J Pathol* 166:209–219.
- Goldberg M, Sepier D, Bourd K, Hall R, George A, Goldberg H, Menashi S. 2003. Immunohistochemical localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in the forming rat incisor. *Connect Tissue Res* 44:143–153.
- Guerni CW, Holland PC. 1995. Synthesis and secretion of matrix-degrading metalloproteinases by human skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn* 202:91–99.
- Huet E, Gabison EE, Mourah S, Menashi S. 2008a. Role of emmprin/CD147 in tissue remodeling. *Connect Tissue Res* 49:175–179.
- Huet E, Vallee B, Szul D, Verrecchia F, Mourah S, Jester JV, Hoang-Xuan T, Menashi S, Gabison EE. 2008b. Extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 promotes myofibroblast differentiation by inducing alpha-smooth muscle actin expression and collagen gel contraction: Implications in tissue remodeling. *FASEB J* 22:1144–1154.
- Huijbregts J, White JD, Grounds MD. 2001. The absence of MyoD in regenerating skeletal muscle affects the expression pattern of basement membrane, interstitial matrix and integrin molecules that is consistent with delayed myotube formation. *Acta Histochem* 103:379–396.
- Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ. 2007. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol* 83:283–295.
- Juel C, Halestrap AP. 1999. Lactate transport in skeletal muscle—Role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J Physiol* 517:633–642.
- Kaar JL, Li Y, Blair HC, Asche G, Koepsel RR, Huard J, Russell AJ. 2008. Matrix metalloproteinase-1 treatment of muscle fibrosis. *Acta Biomater* 4:1411–1420.
- Kanekura T, Miyauchi T, Tashiro M, Muramatsu T. 1991. Basigin, a new member of the immunoglobulin superfamily: Genes in different mammalian species, glycosylation changes in the molecule from adult organs and possible variation in the N-terminal sequences. *Cell Struct Funct* 16:23–30.
- Karsdal MA, Larsen L, Engsig MT, Lou H, Ferreras M, Lochter A, Delaise JM, Foged NT. 2002. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem* 277:44061–44067.
- Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier JG, Verdier-Sahuque M, Fardeau M, Alameddine HS. 1999. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: A study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev Biol* 205:158–170.
- Kirk P, Wilson MC, Hedde C, Brown MH, Barclay AN, Halestrap AP. 2000. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* 19:3896–3904.
- Lagord C, Carpentier G, Leibovitch MP, Gautron J, Martelly I. 1993. Stimulation of rat satellite cell myogenesis by inhibitors of ser/thr protein kinases. *Neuromuscul Disord* 3:379–383.
- Lewis MP, Tippett HL, Sinanan AC, Morgan MJ, Hunt NP. 2000. Gelatinase-B (matrix metalloproteinase-9; MMP-9) secretion is involved in the migratory phase of human and murine muscle cell cultures. *J Muscle Res Cell Motil* 21:223–233.
- Li H, Miztal A, Makonchuk DY, Bhatnagar S, Kumar A. 2009. Matrix metalloproteinase-9 inhibition ameliorates pathogenesis and improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 18:2584–2598.
- Lluri G, Jaworski DM. 2005. Regulation of TIMP-2, MT1-MMP, and MMP-2 expression during C2C12 differentiation. *Muscle Nerve* 32:492–499.
- Lluri G, Langlois GD, Soloway PD, Jaworski DM. 2008. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) regulates myogenesis and beta1 integrin expression in vitro. *Exp Cell Res* 314:11–24.
- Marie EA, Zoltan-Jones A, Li R, Misra S, Ghatak S, Cao J, Zucker S, Toole BP. 2004. Emmprin promotes anchorage-independent growth in human mammary carcinoma cells by stimulating hyaluronan production. *Cancer Res* 64:1229–1232.
- Massague J, Cheifetz S, Endo T, Nadal-Ginard B. 1986. Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8206–8210.
- McLennan IS, Koishi K. 2002. The transforming growth factor-beta: Multifaceted regulators of the development and maintenance of skeletal muscles, motoneurons and Schwann cells. *Int J Dev Biol* 46:559–567.
- Melo F, Carey DJ, Brandon E. 1996. Extracellular matrix is required for skeletal muscle differentiation but not myogenin expression. *J Cell Biochem* 62:227–239.
- Nakai M, Chen L, Nowak RA. 2006. Tissue distribution of basigin and monocarboxylate transporter 1 in the adult male mouse: A study using the wild-type and basigin gene knockout mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288:527–535.
- Olson EN, Sternberg E, Hu JS, Spizz G, Wilcox C. 1986. Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor. *J Cell Biol* 103:1799–1805.
- Pietri-Rouxel F, Gentil C, Vassilopoulos S, Baas D, Mouisel E, Ferry A, Vignaud A, Hourde C, Marty I, Schaeffer L, Voit T, Garcia L. 2010. DHPRI alpha1S subunit controls skeletal muscle mass and morphogenesis. *EMBO J* 29:643–654.
- Rao JS, Beach RL, Festoff BV. 1985. Extracellular matrix (ECM) synthesis in muscle cell cultures: Quantitative and qualitative studies during myogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 130:440–446.
- Riethdorf S, Reimers N, Assmann V, Kornfeld JW, Terracciano L, Sauter G, Pantel K. 2006. High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. *Int J Cancer* 119:1800–1810.
- Sanes JR. 2003. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem* 278:12601–12604.
- Schabott EJ, van der Merwe M, Loos B, Moore FP, Niesler CU. 2009. TGF-beta's delay skeletal muscle progenitor cell differentiation in an isoform-independent manner. *Exp Cell Res* 315:373–384.
- Sluijter JP, Pulsken W, Schoneveld AH, Velema E, Strijder CF, Moll F, de Vries JP, Verheijen J, Hanemaaijer R, de Kleijn DP, Pasterkamp G. 2006. Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions: A study in human endarterectomy specimen pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms. *Stroke* 37:235–239.
- Sun J, Hemler ME. 2001. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* 61:2276–2281.
- Tang W, Chang SB, Hemler ME. 2004. Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Mol Biol Cell* 15:4043–4050.
- Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, McCabe F, Millar H, Rafferty P, Bugelski P, Yan L. 2005. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 65:3193–3199.
- Toole BP. 2003. EMMPRIN (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function. *Curr Top Dev Biol* 54:371–389.
- Visse R, Nagase H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92:827–839.
- Volontis D, Liu Y, Galbati F. 2005. The modulation of caveolin-1 expression controls satellite cell activation during muscle repair. *FASEB J* 19:237–239.
- Wang M, Zhao D, Spinetti G, Zhang J, Jiang LQ, Pintus G, Monticone R, Lakatta EG. 2006. Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta1 type II receptor signaling within the aged arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1503–1509.
- Wang W, Pan H, Murray K, Jefferson BS, Li Y. 2009. Matrix metalloproteinase-1 promotes muscle cell migration and differentiation. *Am J Pathol* 174:541–549.
- Yangguchi A, Miyake H, Nomi M, Takenaka A, Fujisawa M. 2009. Modulation of the microenvironment by growth factors regulates the in vivo growth of skeletal myoblasts. *BJU Int* 103:1569–1573.

- Yu XL, Jiang JL, Li L, Feng Q, Xu J, Chen ZN. 2006. The glycosylation characteristic of hepatoma-associated antigen HAb18G/CD147 in human hepatoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1939–1945.
- Zanotti S, Saredi S, Ruggieri A, Fabbri M, Blasevich F, Romaggi S, Morandi L, Mora M. 2007. Altered extracellular matrix transcript expression and protein modulation in primary Duchenne muscular dystrophy myotubes. *Matrix Biol* 26:615–624.
- Zanotti S, Gibertini S, Mora M. 2009. Altered production of extra-cellular matrix components by muscle-derived Duchenne muscular dystrophy fibroblasts before and after TGF-beta1 treatment. *Cell Tissue Res* 339:397–410.
- Zheng HC, Takahashi H, Murai Y, Cui ZG, Nomoto K, Miwa S, Tsuneyama K, Takano Y. 2006. Upregulated EMMPRIN/CD147 might contribute to growth and angiogenesis of gastric carcinoma: A good marker for local invasion and prognosis. *Br J Cancer* 95:1371–1378.
- Zimowska M, Brzoska E, Swierczynska M, Streminska W, Moraczewski J. 2008. Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo. *Int J Dev Biol* 52:307–314.
- Zimowska M, Duchesnay A, Dragun P, Oberbek A, Moraczewski J, Martelly I. 2009. Immunoneutralization of TGFbeta1 improves skeletal muscle regeneration: Effects on myoblast differentiation and glycosaminoglycan content. *Int J Cell Biol* 2009:659372.

Résumé de la thèse

A large, empty rectangular box with a thin black border, intended for the user to write the summary of the thesis.

Mise en place d'un modèle animal de tendinopathie précoce du supra-épineux en vue de développer et valider des outils technologiques préventifs et thérapeutiques

Les tendinopathies sont la première cause de maladie professionnelle en France. Elles sont devenues une préoccupation majeure de santé publique. Cependant, leurs mécanismes physiopathologiques restent encore mal définis. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux phases précoces de la tendinopathie engendrées par une sur-utilisation du tendon supra-épineux (tSE) de la coiffe de rotateurs de l'épaule chez le rat. Nous avons tenté de comprendre les mécanismes à l'origine de cette pathologie afin de pouvoir agir et la traiter en amont de l'apparition des symptômes.

Nous montrons que le profil d'évolution moléculaire des collagènes, des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes (GAGs) associé aux phases précoces de la sur-utilisation, témoigne d'un profond remaniement matriciel et d'une différenciation chondroïde des fibroblastes tendineux. Nous avons identifié les métalloprotéinases (MMPs) majeures et leurs inhibiteurs (TIMPs) susceptibles d'être impliqués dans ce remaniement. Nos résultats suggèrent que le mécanisme lésionnel initial et les changements matriciels observés sont dus à un processus induit par des médiateurs locaux libérés par les ténocytes et non à une réaction inflammatoire. Enfin, nous avons cherché à établir une corrélation entre les changements moléculaires observés et le degré de sévérité d'une tendinopathie diagnostiquée chez l'Homme. Nous avons montré, sur des échantillons de tendon patellaire humain une relation entre la quantité des GAGs et le score (VISA score) reflétant le degré pathologique du tendon.

Cette étude nous a donc permis d'améliorer nos connaissances des phases précoces du processus d'altération du tSE. Cependant, d'importants efforts restent néanmoins à accomplir dans la caractérisation de la pathogenèse précoce notamment pour préciser le contexte biomécanique qui la génère.

Mots clés : tendon supra-épineux, tendinopathie précoce, GAGs, PGs, collagènes, chondrogenèse, HARP, MMPs, inflammation.

Establishing an animal model of early supraspinatus tendinopathy in order to develop and validate technological, preventive and therapeutic tools.

Tendinopathies are the first cause of professional diseases in France. They are a major public health concern. However, their physiopathological mechanisms remain poorly understood. This project aimed at investigating the early stages of supraspinatus tendinopathy caused by overuse. Using a rat animal model, we attempted to understand the mechanisms behind this disease in order to act and treat the symptoms upstream of their onset.

We have shown that the molecular changes of collagens, proteoglycans and glycosaminoglycans (GAGs) associated with the early events of overuse attest a major matrix remodeling and chondrogenic differentiation of tendon cells. We identified the main metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) that may be involved in this remodeling. Our results further suggest that the initial mechanisms linked to the observed matrix changes are due to local mediators release by tenocytes rather than an inflammatory process. Finally, we attempted to correlate molecular changes observed during overuse with the severity of the tendinopathy diagnosed in humans. We have shown a relationship between the amount of GAGs and the pathological score (VISA score) on human patellar tendons.

This study improved our knowledge of the early pathological events of the supraspinatus tendon. However, more remains to be done for characterizing the early stages of tendinopathy especially to clarify the biomechanical context up-stream.

Keywords : supraspinatus tendon, early tendinopathy, GAGs, PGs, collagens, chondrogenesis, HARP, MMPs, inflammation.