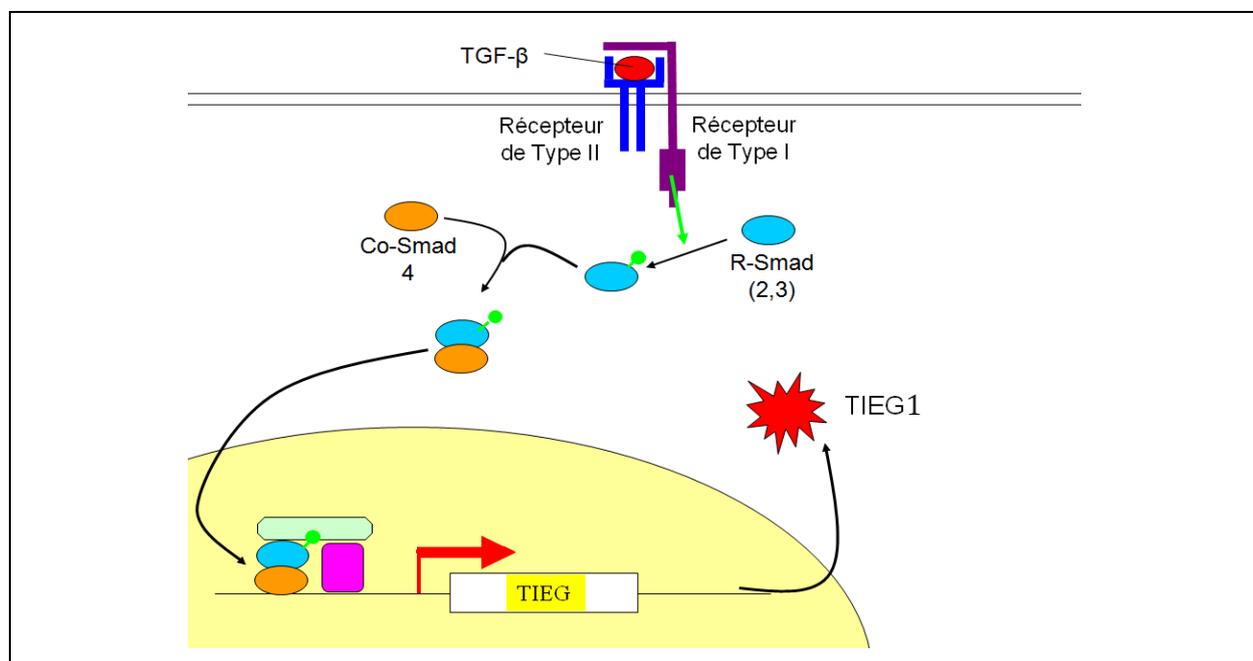


Par Laurie GUMEZ

Caractérisation des propriétés physico-chimique du tendon altéré par le facteur de croissance TIEG1 (TGF β Inducible Early Gene 1)

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenu le : 21 octobre 2010

Champ disciplinaire : Biomécanique et Bioingénierie

***Caractérisation des propriétés physico-chimique du
tendon altéré par le facteur de croissance TIEG1
(TGF β Inducible Early Gene 1)***

Soutenue le 21 octobre 2010 devant le jury composé de :

Rapporteurs :

MME D. DUPREZ

M. P. GILLET

Examineurs :

M. F. DELAUNAY

MME M.C. HO BA THO

Directeurs de Thèse :

MLLE S. BENSAMOUN

MME C. PICHON

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Sabine BENSAMOUN, Chercheur CNRS, qui m'a permis d'intégrer son équipe et m'a donné l'opportunité de réaliser ce travail de recherche au sein de l'UMR 6600. Ses conseils m'ont permis d'avancer sur le sujet et d'apprendre beaucoup tout au long de la thèse. Son aide lors des différentes expérimentations m'a permis d'avancer rapidement et de ne jamais me laisser dépasser par le travail. Je remercie également le professeur Chantal PICHON, pour son co-encadrement au cours de ces 3 ans de thèse. Je la remercie pour la confiance qu'elle a eue en me laissant une grande autonomie dans la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier les différents collaborateurs, Jean DOUCET, Jean-Michel BENY, Samuel GUILLOT et Roland BENOIT, qui, experts dans leur domaine, m'ont apporté des connaissances et des conseils pour me permettre d'avancer dans mes recherches. Je remercie également l'ensemble de l'équipe de la MAYO CLINIC pour m'avoir accueilli à trois reprises afin de faire de la culture cellulaire. Je remercie plus particulièrement le Dr SPELSBERG pour son accueil, sa gentillesse et ses explications lors de ces déplacements ainsi que John HAWSE et Malayannan SUBRAMANIAM pour leurs disponibilités par mail quand cela s'est avéré nécessaire.

Mes plus sincères remerciements aux membres du jury, pour avoir accepté d'y participer. Je remercie Delphine DUPREZ, directrice de recherche, et le professeur Pierre GILLET pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs. Je tiens également à remercier les professeurs Marie-Christine HO BA THO et Franck DELAUNAY pour leurs participations en tant qu'examineurs.

Merci aux étudiants rencontrés pendant ces trois années pour leurs bonnes humeurs et les bons moments passés ensemble. Un merci particulier à mes collègues de bureaux avec qui j'ai eu le grand plaisir de discuter et de partager, aussi bien scientifiquement que personnellement, et à toutes celles qui se reconnaîtront pour nos « sorties restau ».

Enfin, un grand merci à mes parents pour leur soutien au quotidien malgré la distance, à mes grands-parents qui ont toujours été présents dans mon cœur pour me soutenir malgré leur absence... et à Mathieu, pour m'avoir soutenu et aidé au quotidien quand le travail de thèse me prenait un peu plus de temps que prévu... Je vous aime.

Sommaire

<i>Liste des abréviations</i>	1
<i>Listes des figures et tableaux</i>	3
<i>Introduction générale</i>	7
<i>Chapitre 1 : Etude bibliographique</i>	11
I. Le tendon	13
I. 1. Structure et fonction des tendons	13
I. 2. Composition des tendons	14
I. 3. Les propriétés des tendons	16
II. TIEG	17
II. 1. La protéine TIEG	17
II. 2. Voie de signalisation des Smad.....	17
II. 3. Rôle de TIEG1 sur les différents tissus biologiques	21
a) L'os.....	22
b) Le tendon.....	23
c) Les poumons.....	23
d) Le pancréas.....	24
e) Le foie.....	24
f) Le sein	24
III. Caractérisation du tissu tendineux	25
III. 1. Technique d'analyses structurales et moléculaires	25
III. 2. Tests mécaniques.....	26
III. 3. Techniques d'imagerie	26
III. 4. Techniques physico-chimique.....	28
<i>Objectif de la thèse</i>	31

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes	35
I. Matériels.....	37
I. 1. Animaux	37
I. 2. Culture cellulaires	37
II. Méthodes	38
II. 1. Synchrotron	38
a) Présentation de la technique	38
b) Fonctionnement du synchrotron	38
c) Prélèvement des fibres tendineuses	43
d) Réalisation des tests au synchrotron.....	44
II. 2. Détermination de la quantité d'hydroxyproline	46
a) Présentation de la molécule	46
b) Préparation des échantillons	46
c) Mesure du contenu en hydroxyproline	47
d) Analyse statistiques	48
II. 3. Analyse des gènes par qRT-PCR	48
a) Principe de la technique.....	48
b) Analyse des gènes à partir des fibroblastes	50
c) Traitement des données	52
d) Analyse statistiques	54
II. 4. Microspectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (MIRTF).....	54
a) Présentation de la technique	54
b) Principe de l'analyse des spectres.....	55
c) Préparation des échantillons pour la mise en place du protocole	58
d) Les différentes étapes permettant le développement du protocole	58
e) Analyse des échantillons pour la comparaison de WT et TIEG1 KO	59
II. 5. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)	61
a) Présentation de la technique	61
b) Principe de l'analyse des spectres.....	63
c) Préparation et analyse des échantillons	64
d) Fonctionnement de l'appareil	65
II. 6. Spectrométrie des photoélectrons XPS	66
a) Présentation de la technique	66
b) Principe de la technique XPS	67
c) Préparation des échantillons	68

d) Analyse statistiques	70
Chapitre 3 : Résultats.....	71
I. Synchrotron	73
a) Analyse des spectres de diffraction aux rayons X.....	73
b) Analyse des spectres de diffraction le long du méridien	74
Le spectre est représenté en fonction du vecteur d'onde qui correspond à la valeur de 1/d, ou d est la distance de la loi de Bragg. On a ainsi : $S=2\sin(\theta)/\lambda$	45
c) Analyse des spectres de diffraction le long du profil latéral.....	75
II. Dosage hydroxyproline	75
III. Analyse de l'expression des gènes par qRT-PCR.....	78
IV. Microspectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (MIRTF)...	80
a) Détermination du protocole d'utilisation de la MIRTF.....	80
b) Comparaison entre le tendon d'Achille et de queue	83
c) Comparaison entre les souris WT et TIEG1 KO	85
d) Résumé des résultats de MIRTF.....	87
V. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)	88
a) Comparaison entre le tendon d'Achille et de queue	88
b) Comparaison entre les souris WT et TIEG1 KO	89
c) Résumé des résultats IRTF	91
VI. Composition chimique analysée par la technique XPS.....	92
a) Comparaison entre les souris WT et TIEG1 KO pour le tendon d'Achille.....	92
b) Comparaison entre les souris WT et TIEG1 KO pour le tendon de la queue.....	93
Chapitre 4 : Discussion.....	95
Conclusion et perspectives	103
Références.....	107

Annexe 117

Publications et communications..... 121

Formations..... 125

Résumés 127

Liste des abréviations

ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATR	Réflexion Totale Atténuée
BaF₂	Fluorure de baryum
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CCD	Charge-Coupled Device ou dispositif à transfert de charge
Col1a2	Collagène de type I alpha 2
Co-Smad	Common mediator Smad
Dcn	Décorine
EGF	Epidermal Growth Factor
EGR-α	Early Growth Response alpha
ESCA	Electron Spectroscopy for Chemical Analysis
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
FKLF	Krüppel-like transcription factor
Fmod	Fibromoduline
IRTF	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier ou FTIR
KBr	Bromure de potassium
KLF	Krüppel-Like Family
Lamb1-1	Laminine beta 1
Lox	Lysyl oxydase
Lum	Lumican
MEM-α	Minimum Essential Medium alpha
MIRTF	Microspectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier ou FTIRM
NaCl	Chlorure de sodium
PCR	Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne
qRT-PCR	Real time quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
R-Smad	Récepteur régulé Smad
RT	Reverse Transcription ou transcriptase inverse
SVF	Sérum de Veau Fœtal
SLRP	Small Leucine-Rich Proteoglycan
TGF-β	Transforming Growth Factor beta

TIEG	TGF- β inducible early gene
WT	Wild type ou contrôle
XPS	X-Ray Photoelectron Spectrometry
ZnSe	Séléniure de Zinc

Listes des figures et tableaux

Etude bibliographique

Figure 1 : Organisation structurale des tendons (Almeida-Silveira, 1998).....	13
Figure 2 : Triple hélice de collagène (www.techno-science.net).....	14
Figure 3 : Formation des fibrilles de collagène (Prévost, 2003).....	15
Figure 4 : Courbes moyennes des tests de traction en rampe réalisés sur des fascicules de 1 (M1), 3 (M3) et 15 mois (M15).....	16
Figure 5 : Régulation positive de la voie de signalisation.....	19
Figure 6 : Régulation négative de la voie de signalisation.....	20
Figure 7 : Régulation de la voie de signalisation par TIEG.....	21
Figure 8 : Augmentation de la taille des fibrilles pour les tendons TIEG1 KO de 3 mois (Bensamoun et al, 2006 (b)).....	23
Figure 9 : Analyse de la circularité et du diamètre des fibrilles de collagène sur une coupe transversale de tendon rotulien chez le rat (Muellner et al, 2001).....	27
Figure 10 : Spectre de diffraction aux rayons-X : (a) grand angle, (b) angle moyen, (c) petit angle (Hukins, 1977).....	28
Figure 11 : (a) Spectre d'absorbance d'une section longitudinale hautement minéralisée, (b) Spectre d'absorbance d'une section latérale hautement minéralisée.....	29

Matériels et Méthodes

Figure 12 : Les différents éléments du synchrotron.....	39
Figure 13 : Éléments de la ligne de lumière.....	40
Figure 14 : Cabine d'expérience de la ligne de lumière ID13, ESRF.....	41
Figure 15 : Station de travail de la ligne ID13, ESRF.....	41
Figure 16 : Ecran « détecteurs ».....	43
Figure 17 : Extraction d'une fibre du tendon dorsal de queue de souris (B) sous un vidéo microscope (A).....	43

Figure 18 : capillaire de 0,7 mm de diamètre.....	44
Figure 19 : Spectre de diffraction aux rayons X et profil d'intensité.....	44
Figure 20 : Période D sur le profil d'intensité.....	45
Figure 21 : Structure de l'hydroxyproline (O : oxygène, H : hydrogène, N : azote)	46
Figure 22 : Agents se liant à l'ADN double brin	49
Figure 23 : Hydrolyse de sondes (Taqman)	50
Figure 24 : Système de PCR en temps réel MiniOpticon (Bio-Rad) (http://www3.bio-rad.com/)	52
Figure 25 : Exemple de courbe de fluorescence par rapport au nombre de cycles afin de déterminer le C _T de la qRT-PCR.....	53
Figure 26 : Interférogramme en sortie du détecteur	55
Figure 27 : Exemple de spectre infrarouge représentant la transmittance	56
Figure 28 : Exemple de spectre infrarouge représentant l'absorbance	56
Figure 29 : Spectromètre Nicolet Magna-IR 760 à transformée de Fourier équipé d'un microscope Nicolet NicPlan et d'un détecteur MCT-A de l'Institut des Sciences de la Terre d'Orléans (ISTO).....	58
Figure 30 : Fenêtre BaF ₂	59
Figure 31 : Obtention d'un spectre infrarouge	60
Figure 32 : Elongation de la molécule de CO ₂	62
Figure 33 : Déformation de la molécule de CO ₂	62
Tableau 1 : Fréquences de vibrations des principales fonctions rencontrées dans les composés organiques (Biophyresearch).....	64
Figure 34 : A : Spectromètre Thermo Optek, Nicolet 710 du Centre de Recherche sur la Matière Divisée (CMRD) d'Orléans, B : Montage de réflexion totale atténuée (ATR) dans lequel les échantillons sont placés entre une presse et un support ZnSe.....	65
Figure 35 : Schéma du fonctionnement du Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier	66
Figure 36 : Principe de la technique XPS	67

Figure 37 : Exemple de spectre d'intensité des électrons en fonction de l'énergie.....	68
Figure 38 : Spectromètre XPS Thermo Electron du Centre de Recherche sur la Matière Divisée (CMRD) d'Orléans (http://www.sciencefrance.com).....	69
 <u>Résultats</u>	
Figure 39: Spectres de diffraction aux rayons X obtenus pour une fibre tendineuse WT (A) et TIEG1 KO (B). C: Profils placés le long du méridien et de la direction latérale. D: Ordre des pics représenté sur le profil d'intensité des rayons X le long du méridien.	73
Figure 40: Intensité des rayons X (I) le long du méridien pour les fibres tendineuses WT et TIEG1 KO, représenté en unités arbitraires (u.a.), en fonction du vecteur d'onde (S).....	74
Figure 41 : Spectres de diffraction aux rayons X.....	75
Figure 42 : Moyenne de la teneur en hydroxyproline (en µg/mg de tendon) contenu dans le tendon dorsal de la queue des souris WT ou TIEG1 KO femelle âgées de 1, 3 et 8 mois.....	76
Figure 43 : Moyenne de la teneur en hydroxyproline (en µg/mg de tendon) contenu dans le tendon d'Achille des souris WT ou TIEG1 KO femelle âgées de 1, 3 et 8 mois.....	76
Figure 44 : Moyenne de la teneur en hydroxyproline (en µg/mg de tendon) contenu dans le tendon de la queue et d'Achille des souris WT femelle âgées de 1, 3 et 8 mois.	77
Figure 45 : Moyenne de la teneur en hydroxyproline (en µg/mg de tendon) contenu dans le tendon de la queue et d'Achille des souris TIEG1 KO femelle âgées de 1, 3 et 8 mois.....	78
Figure 46 : Ratio d'expression des gènes entre les fibroblastes WT et TIEG1 KO analysés par qRT-PCR en temps réel calculé par la méthode de calcul $2^{-\Delta\Delta CT}$. Les gènes étudiés sont la fibromoduline (Fmod), le lumican (Lum), la laminine beta-1 (Lamb1-1), le collagène de type I (Col1a2), la décorine (Dcn) et la lysyl oxydase (Lox).....	79
Figure 47 : Distribution spectrale représentant la composition chimique de deux particules provenant de fibres de tendons de la queue à partir de deux souris WT obtenues par broyage des tissus.....	80
Figure 48 : Distribution spectrale des groupes fonctionnels pour les sections de fibres de tendon préparés en utilisant un microtome ou un cryostat.....	81
Figure 49 : Spectre représentatif de la résine Araldite	82

Figure 50 : Comparaison des spectres obtenus à partir d'échantillons de tendon de la queue frais ou congelé sectionné avec un cryostat. 83

Figure 51 : Comparaison de la composition moléculaire du tendon d'Achille et de la queue issus des souris WT et sectionné avec un cryostat. 84

Figure 52 : Comparaison de la composition moléculaire du tendon d'Achille et de la queue issus des souris TIEG1 KO et sectionné avec un cryostat. 85

Figure 53 : Comparaison de la composition moléculaire des tendons d'Achille issus des souris WT et TIEG1 KO et sectionnés avec un cryostat. 86

Figure 54 : Comparaison de la composition moléculaire des tendons de la queue issus des souris WT et TIEG1 KO et sectionnés avec un cryostat. 87

Tableau 2 : Résumé des résultats MIRTF 87

Figure 55 : Comparaison de la composition moléculaire entre le tendon d'Achille et tendon de la queue pour les souris WT analysé par la technique IRTF. 88

Figure 56 : Comparaison de la composition moléculaire entre le tendon d'Achille et tendon de la queue pour les souris TIEG1 KO analysé par la technique IRTF. 89

Figure 57 : Comparaison de la composition moléculaire entre WT et TIEG1 KO pour le tendon d'Achille analysé par la technique IRTF. 90

Figure 58 : Comparaison de la composition moléculaire entre WT et TIEG1 KO pour le tendon de la queue analysé par la technique IRTF. 91

Tableau 3 : Résumé des résultats IRTF. 91

Figure 59 : Composition chimique des tendons d'Achille des souris WT et TIEG1 KO. 92

Figure 60 : Composition chimique des tendons de la queue des souris WT et TIEG1 KO. 93

Introduction générale

Ce projet de thèse s'inscrit dans un contexte multi-disciplinaire en collaboration entre le laboratoire de Biomécanique et Bioingénierie (UMR CNRS 6600) de l'UTC Compiègne, le Centre de Biophysique Moléculaire (UPR CNRS 4301) de l'Université d'Orléans et le laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire du Dr Spelsberg de la Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA.

Une précédente étude a consisté à caractériser les propriétés mécaniques et morphologiques du tissu tendineux et osseux extrait de souris transgéniques TIEG1 KO sur lesquelles le gène TIEG1 a été invalidé (modèle de souris TIEG1 knock out). A l'échelle tissulaire, les propriétés mécaniques et morphologiques du tissu tendineux (tendon de la queue) et osseux (fémur, vertèbre) extrait de ces souris transgéniques ont été caractérisées. Ces études ont démontré l'influence de l'absence de l'expression de TIEG1 sur la structure du tissu tendineux avec une augmentation de la taille des fibres de collagène et sur la structure du tissu osseux avec un amincissement de l'os cortical et de l'os spongieux. De plus, une diminution de la résistance osseuse et tendineuse a été également observée. A l'échelle cellulaire, l'analyse des cellules osseuses a montré une diminution de la densité des ostéocytes chez les souris TIEG1 KO. L'étude réalisée au micro-array sur des fibroblastes de tendons a révélé des différences d'expression pour certains gènes important dans le développement du tendon.

Après cette étude, une collaboration entre le laboratoire de Biomécanique et Bioingénierie (UMR CNRS 6600) et le laboratoire du Dr Spelsberg a été établi afin de poursuivre la caractérisation du système musculo-squelettique chez ces souris TIEG1 KO. Le laboratoire du Dr Spelsberg a fourni les souris et différents outils moléculaires (tels que des anticorps et des plasmides).

Le travail de thèse a été réalisé sur ces souris transgéniques. Ce modèle a été créé par l'équipe du Dr Spelsberg. Ce projet est une continuation de la recherche que Sabine Bensamoun a effectuée lors de sa formation post-doctorale, de 2004 à 2006, au sein du laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire (Dr T. Spelsberg, Mayo Clinic, Rochester, USA) et au sein du laboratoire de Biomécanique (Dr KN An, Mayo Clinic, Rochester, USA).

Cette étude a pour but de déterminer le ou les mécanismes de régulation impliquant le gène TIEG1 (TGF β inducible early gene 1) sur les propriétés physico-chimique du tissu tendineux. Pour mener à bien ce projet, différentes analyses ont été effectuées afin de définir le rôle de TIEG1 à l'échelle moléculaire et cellulaire. L'ensemble de ces différentes analyses

permettra de déterminer le ou les mécanismes de régulation mis en jeu dans les modifications observées lors des études précédentes. Ce projet a été réalisé à l'aide de techniques expérimentales complémentaires de celles de la Mayo Clinic et permettra de caractériser le rôle de la protéine TIEG1 sur le tissu tendineux à différentes échelles.

Mon travail de thèse est situé à l'interface entre différents domaines. J'ai donc pu découvrir et approfondir ce sujet en étudiant le tendon par des techniques complémentaires. Tout d'abord, j'ai pu découvrir l'anatomie de ce tissu en pratiquant des dissections de fibres au niveau des tendons de la queue (tendons non contraints mécaniquement) et des tendons d'Achille (tendons contraints mécaniquement). Cela m'a permis d'approfondir mes connaissances anatomiques. Puis par une étude physico-chimique combinant différentes techniques (synchrotron, IRTF, XPS...), j'ai pu comprendre la morphologie de ces fibres et donc mieux appréhender les liens entre la structure et la fonction des tendons dans les différents types de souris. Enfin, par des dosages et une étude des gènes par qRT-PCR, j'ai pu observer des variations entre les différents types de tendons étudiés.

Après une présentation de l'étude bibliographique, puis des matériels et méthodes employées pour les différentes études, les résultats seront décrits et discutés. Une conclusion générale et des perspectives seront développées en dernière partie de ce mémoire.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

I. Le tendon

I. 1. *Structure et fonction des tendons*

Le tendon est un tissu conjonctif mou qui relie le muscle à l'os permettant le mouvement et la stabilisation des articulations du système musculo-squelettique. Le tendon sain est blanc, brillant et a une structure élastique. Il est composé de fibres de collagène, parallèles dans l'axe longitudinal du tendon, intégrées dans une matrice extracellulaire. Cette structure lui permet de transmettre des forces entre les os et les muscles et de résister aux forces qui s'exercent dans l'axe de ses fibres. C'est pour cela que les tendons possèdent l'une des forces de résistance les plus élevées de tous les tissus conjonctifs mous. Le tendon contient différentes structures : fascicules, fibrilles, sous-fibrilles, microfibrilles et tropocollagène (Figure 1) [Almeida-Silveira, 1998 ; Lin et al, 2004 ; Prévost, 2003].

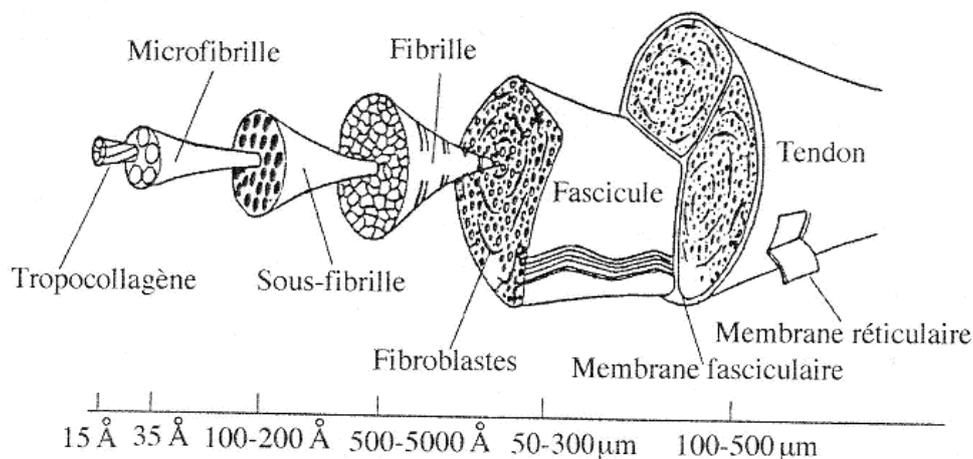


Figure 1 : Organisation structurale des tendons (Almeida-Silveira, 1998)

Cependant, les tendons sont sujets à des mouvements répétitifs et à une dégénération au cours du temps donc, ils sont fréquemment touchés par la douleur chronique ou la rupture. De nombreux facteurs ont été impliqués dans les pathologies. La plupart des pathologies du tendon (tendinopathie) est associée à une dégénérescence, impliquant le remodelage de la matrice extracellulaire du tendon. La dégradation de la matrice du tendon est induite par une variété d'enzymes : les métalloprotéinases, y compris les métalloprotéinases matricielles et

«aggrécans» qui sont des enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs tels que les tendons [Lin et al, 2004 ; Riley, 2005].

1. 2. Composition des tendons

Comme tous les tissus conjonctifs, le tendon comprend quelques cellules, les fibroblastes (environs 20%) et une abondante matrice extra-cellulaire (environ 80%). Cette matrice contient 70% d'eau et 30% de constituants solides synthétisés et sécrétés par les fibroblastes. Il existe trois composants moléculaires principaux dans les tissus conjonctifs. Les deux premiers sont des protéines fibreuses, le collagène (70 à 80%) et l'élastine (2%) et le troisième groupe est constitué de protéoglycanes (1 à 5%), qui sont une combinaison entre une protéine et un glycosaminoglycane [Almeida-Silvera, 1998 ; Jozsa et Kannus, 1997 ; Prévost, 2003].

Les tendons sont formés par le collagène de type I. Ce type de collagène est constitué de trois chaînes polypeptidiques, deux chaînes $\alpha 1$ et une chaîne $\alpha 2$, chacune formée d'acides aminés (Figure 2). Dans ces chaînes, la répétition de la séquence d'acides aminés glycine-proline-hydroxyproline est caractéristique du collagène de type I. Chaque chaîne est enroulée en forme d'hélice et les trois chaînes sont enroulées en une structure formant la triple hélice de collagène ou tropocollagène [Almeida-Silvera, 1998 ; Prévost, 2003].

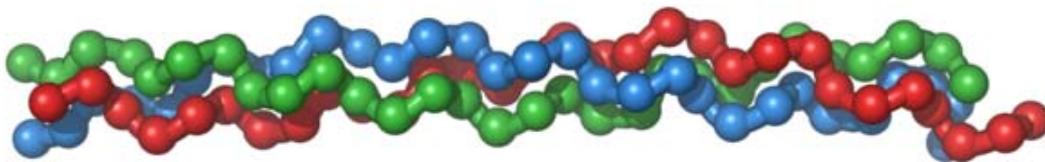


Figure 2 : Triple hélice de collagène (www.techno-science.net)

Ces tropocollagène s'assemblent grâce des ponts biochimiques (cross-link) formant des microfibrilles, puis les fibrilles de collagène (Figure 3). Ces liaisons intra- et extra-chaînes sont essentielles à la stabilité du collagène. Le nombre de cross-link a un effet important sur la résistance du tissu tendineux. En effet, plus ces liaisons sont nombreuses, plus le tendon est résistant [Bailey et al, 1974 ; Prévost, 2003].

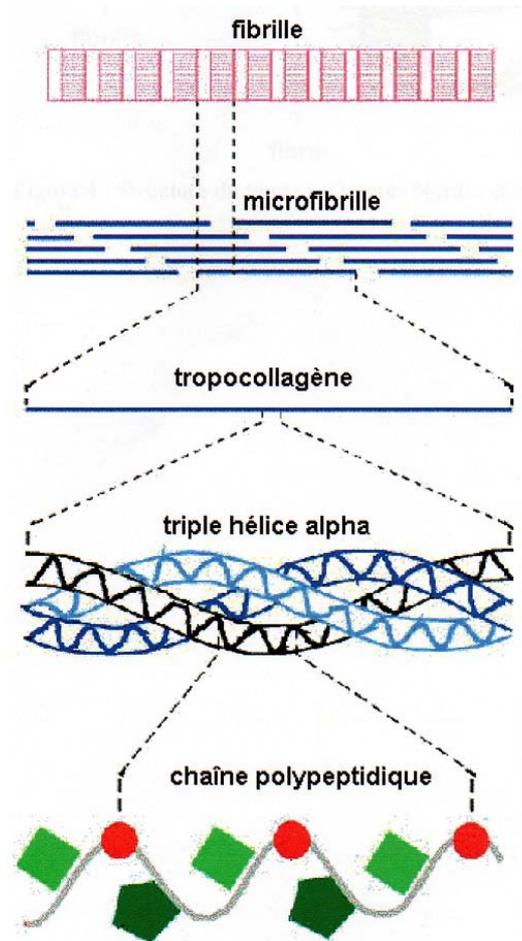


Figure 3 : Formation des fibrilles de collagène (Prévost, 2003)

La composition des tendons change en fonction du temps. En effet, le nombre de liaisons varie avec l'âge. Dans le collagène nouvellement formé, les liaisons sont relativement peu nombreuses et sont instables. A mesure que le collagène devient mature, le nombre de liaisons instables diminue et laisse place à un grand nombre de liaisons stables [Prévost, 2003]. De plus, l'article de Cetta et al (1982) a démontré une corrélation entre des modifications des protéoglycanes et la maturation et la croissance des fibres de collagène. Ils ont observés qu'en l'absence de différences significatives de la morphologie, seules de petites variations de la composition en protéoglycanes apparaissent alors qu'en présence de modifications de la taille des fibrilles de collagène, sur des animaux d'âges différents, de grandes variations dans la composition en protéoglycanes ont été observées. Il est donc possible que les changements observés avec le vieillissement de la glycosylation du collagène, de la teneur en glycoprotéine et de la concentration et de la composition en protéoglycanes

sont différents aspects d'un processus unique et complexe, entraînant des modifications morphologiques et physiques du tissu [Cetta et al, 1982].

1. 3. Les propriétés mécaniques des tendons

La fibre de collagène (ou fibre de tendon) est la plus petite structure tendineuse pouvant être testée mécaniquement. Une fibre, étant composée de plusieurs fibrilles, a un diamètre compris entre 20 et 150 nm mais qui varie en fonction des différents types de tendon [Kannus, 2000]. Les différents tendons possèdent donc des caractéristiques mécaniques différentes. Le comportement mécanique de collagène dépend donc du nombre et des types de liaisons intramoléculaires. Il a été également constaté que les propriétés mécaniques étaient modifiées en fonction de l'âge. En effet, Derwin et Soslowky, 1999 ont montré que les fascicules isolés du tendon de queue de souris, avec un volume fonctionnel et homogène de matrice extracellulaire, peuvent être utilisés comme un système expérimental pour étudier les relations structure-fonction dans le tendon. Leurs travaux ont démontré des relations entre la moyenne du diamètre des fibrilles de collagène et les propriétés mécaniques des fascicules isolés du tendon de queue de différents groupes de souris âgés de 3 semaines et de 8 semaines. De plus Bensamoun et al, 2006 (b), ont étudiés les propriétés mécaniques des tendons de queue isolés de souris en utilisant des tests de traction en rampe (0,05 mm/s) et de relaxation (5 mm/s). Ils ont montré une augmentation significative des propriétés mécaniques entre 1 et 3 mois et également entre 3 et 15 mois (Figure 4).

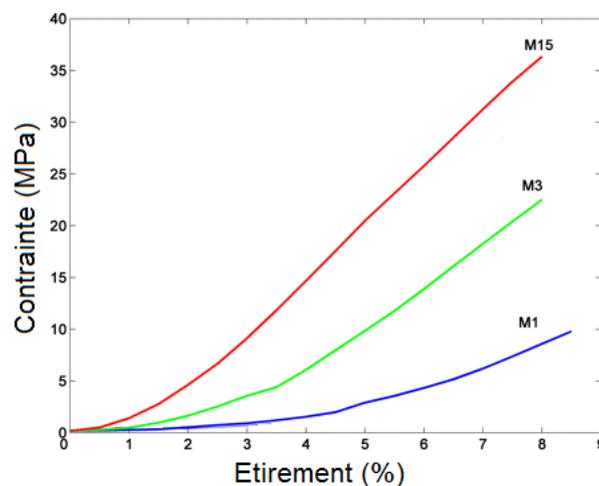


Figure 4 : Courbes moyennes des tests de traction en rampe réalisés sur des fascicules de 1 (M1), 3 (M3) et 15 mois (M15)

Les tendons ont donc une capacité d'adaptation morphologique et fonctionnelle selon l'âge et les conditions de sollicitation mécanique auxquelles ils sont soumis.

II. TIEG (TGF- β Inducible Early Gene)

II. 1. *La protéine TIEG*

TIEG (TGF- β Inducible Early Gene) est un facteur de croissance qui a été identifié par Subramaniam et al (1995) dans les ostéoblastes humains. Ce facteur a été désigné comme TIEG1 (TGF- β Inducible Early Gene-1), suite à l'identification d'un autre facteur apparenté, nommé TIEG2 (TGF- β Inducible Early Gene-2) [Cook et al, 1998]. TIEG3 (TGF- β Inducible Early Gene-3) a ensuite été découvert par Wang et al (2004). Il est identique à TIEG2 à 96% et à TIEG1 à 86%. Les trois protéines sont codées par des gènes exprimés en réponse au facteur de croissance TGF- β (Transforming growth factor beta) [Dang et al, 2000]. Ces protéines appartiennent à une famille de facteurs de transcription en doigt de zinc : les membres de la famille KLF (Krüppel-like family). TIEG1 est également désigné par l'appellation KLF10 (Krüppel-like factor 10). TIEG-2 est désigné par KLF11 (Krüppel-like factor 11) et également par FKLF (Krüppel-like transcription factor) [Asano et al, 1999].

TIEG1 a un ARNm (Acide ribonucléique messenger) codant pour une protéine de 480 acides aminés et de 72 kDa [Subramaniam et al, 1995]. Il a été localisé sur le chromosome 8 au niveau du locus 8q22.2 [Subramaniam et al, 1998 ; Fautsch et al, 1998 (a)]. L'expression de TIEG1 est induite par la voie de signalisation de TGF- β mais également par d'autres facteurs de transcription tels que BMP-2 (bone morphogenetic factor 2) et EGF (Epidermal growth factor) [Subramaniam et al, 1995].

II. 2. *Voie de signalisation des Smads*

TGF- β a été initialement identifié dans le milieu de plusieurs lignées de cellules transformées et non transformées [Mose et al, 1981 ; Roberts et al, 1981]. Il existe 3 précurseurs de TGF- β : TGF- β 1 qui a été extrait et purifié à partir de plaquettes dans le sang humain [Assoian et al, 1983], TGF- β 2 à partir de plaquettes dans le sang porcin [Cheifetz et

al, 1987] et TGF- β 3 qui a été isolé à partir de l'ADNc (Acide désoxyribonucléique complémentaire) porcin et humain [Derynk et al, 1988]. TGF- β a des effets sur la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire et l'apoptose. En effet, il inhibe la croissance de nombreux types cellulaires, comme par exemple pour les cellules épithéliales, mais peut aussi stimuler la croissance dans d'autres types cellulaires, comme pour les cellules mésenchymateuses, lorsque ces cellules sont traitées par le TGF- β . Il a donc un rôle antagoniste en fonction des cellules avec lesquelles il est en présence [Derynck et Feng, 1997].

TGF- β interagit avec des récepteurs situés en surface des cellules (Figure 5, A). Il existe 3 types de récepteurs nommés récepteurs de type I, II et III [Cheifetz et al, 1986 et 1987]. Les récepteurs de type I et de type II permettent la transduction du signal mais seul le complexe entre ces deux récepteurs est connu pour servir de médiateur du TGF- β [Derynck et Feng, 1997].

Lorsque TGF- β est attaché au récepteur de type II (Figure 5, B), le récepteur de type II se déplace et vient s'accoler au récepteur de type I (Figure 5, C). Cet assemblage de récepteurs initie la signalisation intracellulaire par l'activation de la voie de signalisation des Smad. Le récepteur de type I est alors phosphorylé (Figure 5, C), ce qui entraîne la phosphorylation de la protéine R-Smad (récepteur régulé Smad) (Figure 5, D). Cette phosphorylation est essentielle à l'activation de la voie de signalisation.

BMP-2 et BMP-4, appartenant à la famille des TGF- β , peuvent également activer cette voie de signalisation en se fixant sur leur récepteur associé en surface de la cellule [Hefferan et al, 2000 (b)].

Les protéines R-Smad sont les protéines Smad2 ou Smad3 pour la signalisation TGF- β et Smad1, Smad5 ou Smad8 pour la signalisation BMP. En présence de Co-Smad4 (common mediator Smad4) dans le milieu intracellulaire (Figure 5, E), un complexe va se former entre le R-Smad phosphorylé et le Co-Smad (Figure 5, F). Ce complexe va ensuite se déplacer dans le noyau de la cellule (Figure 5, G et H), se fixer à l'ADN et moduler la transcription des gènes cibles (Figure 5, I) [Johnsen et al, 2002].

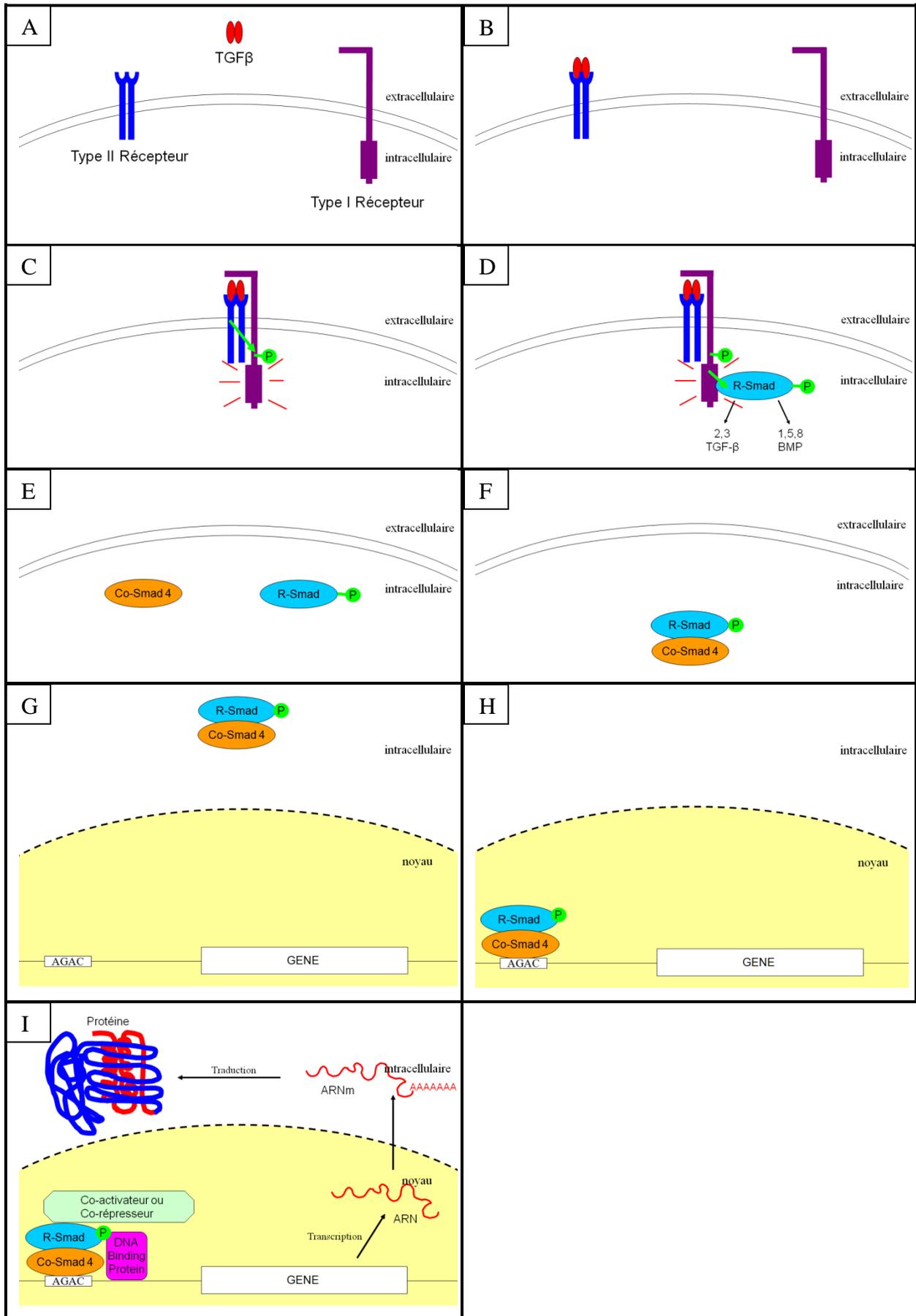


Figure 5 : Régulation positive de la voie de signalisation

Il existe une régulation négative de cette voie de signalisation en présence de I-Smad (Inhibiteur) dans le milieu intracellulaire (Figure 6, A). Cette protéine va alors se fixer au niveau du complexe formé par le récepteur II et le récepteur I phosphorylé et ainsi inhiber la voie de signalisation en empêchant la phosphorylation du R-Smad (Figure 6, B). Les protéines I-Smad sont les protéines Smad6 ou Smad7 qui régulent les voies de signalisation BMP et TGF- β [Johnsen et al, 2002].

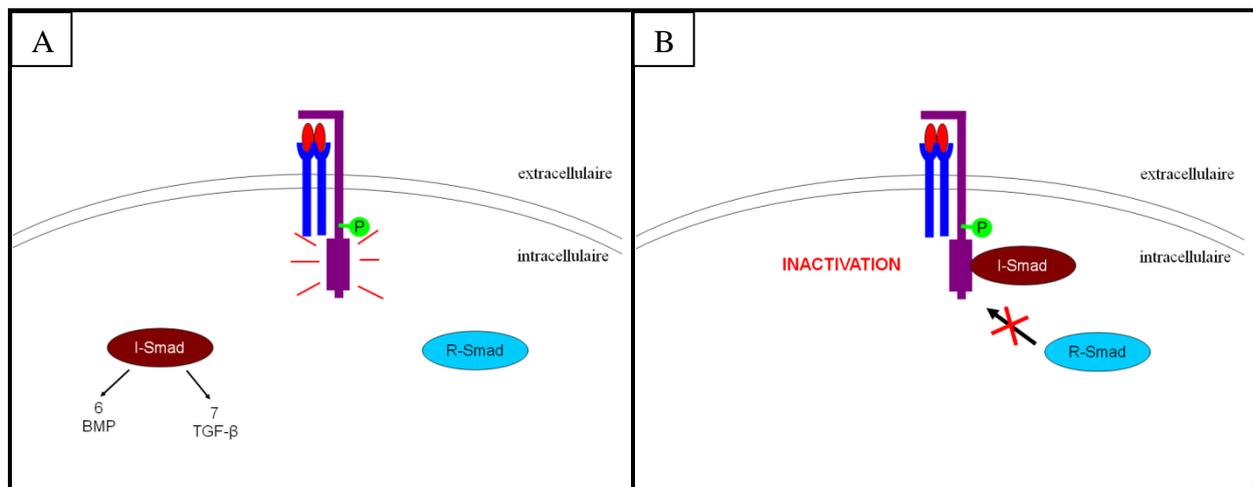


Figure 6 : Régulation négative de la voie de signalisation

TIEG1 est induit par plusieurs membres de la famille des TGF- β [Hefferan et al, 2000 (b); Subramaniam et al, 1995] dont BMP-2 et TGF- β (Figure 7, A). Il a été montré que TIEG1 était un médiateur essentiel de l'activité de TGF- β en induisant l'expression de Smad2 et inhibant l'expression de Smad7 [Johnsen et al, 2002] (Figure 7, B). L'activation de l'expression de Smad2 et l'inhibition de Smad7 entraîne l'augmentation de l'expression de la protéine Smad2 dans le milieu intracellulaire (Figure 7, C) et donc augmente l'expression des gènes exprimés par la cellule (Figure 7, D).

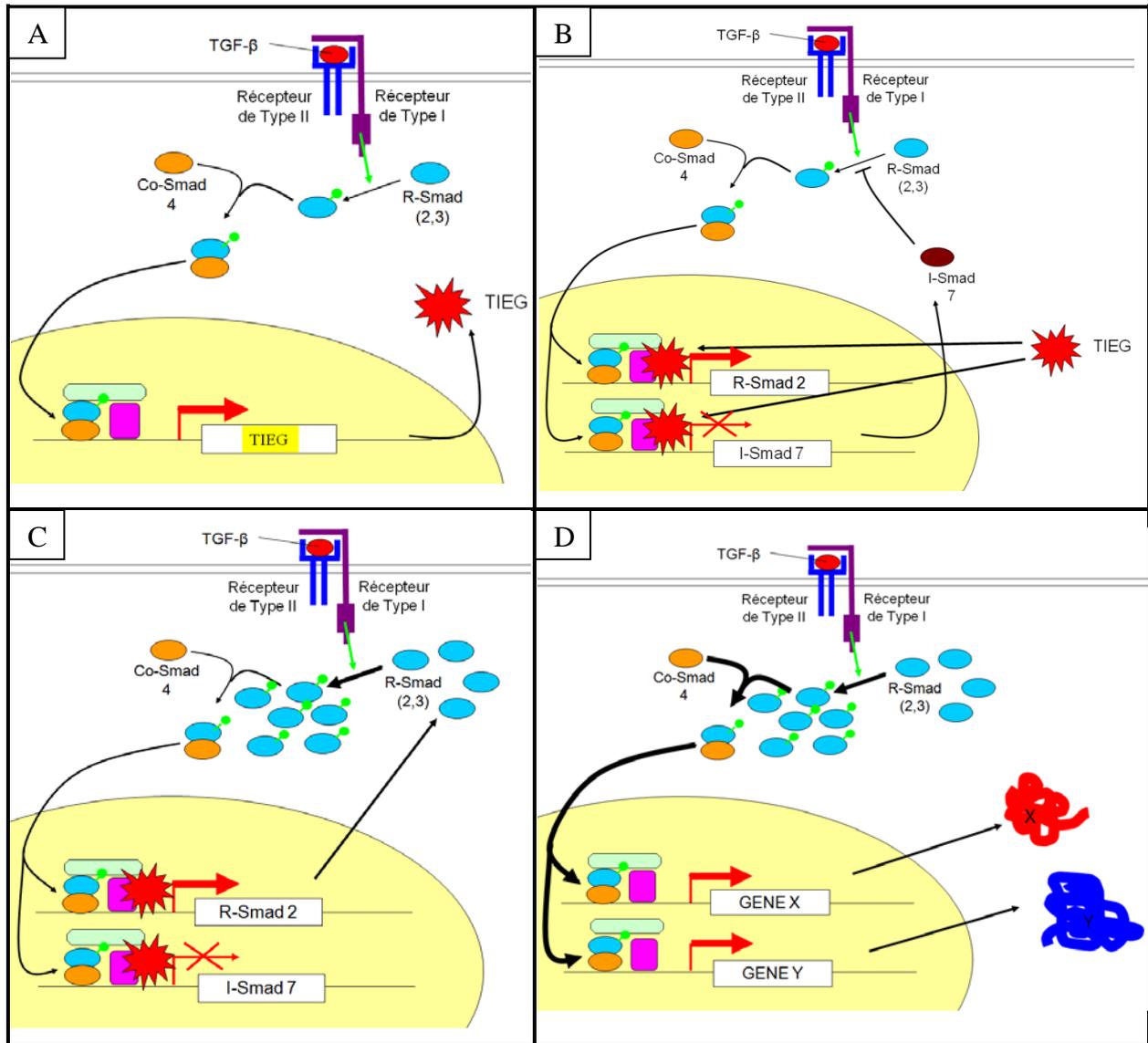


Figure 7 : Régulation de la voie de signalisation par TIEG

Il est donc intéressant d'étudier comment fonctionne la protéine TIEG1 et également de découvrir les répercussions que pourrait engendrer la suppression de cette protéine sur la production d'autres protéines dans un modèle de souris knock-out.

II. 3. Rôle de TIEG1 sur les différents tissus biologiques

La protéine TIEG1 est exprimée dans plusieurs types cellulaires, y compris les ostéoblastes, les fibroblastes, les cellules épithéliales pulmonaires, les cellules de placenta, cardiaques, cérébrales, myéloïdes... ainsi que dans de nombreux tissus comme le pancréas, le

foie et le sein [Chaloux et al, 1999 ; Hawse et al, 2008 ; Hefferan et al, 2000 (a) ; Ribeiro et al, 1999 ; Subramaniam et al, 1995, 1998 et 2007 ; Tachibana et al, 1997 ; Tau et al, 1998]. Les principaux comportements de TIEG1 seront décrits dans les parties suivantes.

a) *Le tissu osseux*

De nombreuses études ont été effectuées sur l'os, plus particulièrement sur les ostéoblastes mais également sur les ostéoclastes. C'est d'ailleurs dans les ostéoblastes que TIEG1 a été découvert par Subramaniam et al (1995). Cette même étude a montré que TIEG1 était présent dans différents tissus comme le muscle, le cœur, le placenta et le pancréas.

L'isolation et la caractérisation de TIEG1 a montré que la protéine TIEG1 et qu'une autre protéine nommée EGR- α (early growth response alpha) sont produits par le même gène localisé sur le chromosome 8q22.2 [Fautsch et al, 1998 (b)]. Ces deux protéines sont régulées par différents facteurs de croissance (comme TGF- β et BMP) mais également par certaines hormones. En effet, l'œstrogène 17 β -œstradiol engendre une augmentation rapide de l'expression de TIEG1/EGR α sur le récepteur d'œstrogène des cellules ostéoblastiques foétale humaine [Tau et al, 1998].

Des souris TIEG1 KO (ou TIEG1^{-/-}) ont été développées afin d'étudier le rôle de TIEG1. Une augmentation du nombre d'ostéoblastes a été décelée *in vivo* chez ces souris mais sans augmentation de la formation de l'os. Une étude a été menée sur les ostéoblastes issus de souris TIEG1^{-/-} et TIEG1^{+/+} (ou WT) cultivés *in vitro*. Les cellules TIEG1^{-/-} révèlent une diminution de l'expression des marqueurs de différenciation des ostéoblastes comparé aux cellules TIEG1^{+/+}. Il a également été montré qu'il y avait significativement moins d'ostéoclastes chez les souris TIEG1^{-/-} que chez les souris TIEG1^{+/+} dû à l'incapacité des ostéoblastes TIEG1^{-/-} à se différencier en ostéoclastes. TIEG1 est donc impliquée dans la régulation des gènes important pour les ostéoclastes et les ostéoblastes isolés de souris TIEG1^{-/-} présentant de graves défauts dans leur capacité à se différencier et à se minéraliser en culture [Subramaniam et al, 2005].

Une autre étude a été effectuée sur ces souris TIEG1^{-/-} et ^{+/+}. Les fémurs issus des souris KO ont montrés des propriétés mécaniques plus faibles comparées aux souris WT. Les analyses des tibias ont révélé une diminution du contenu, de la densité et de la taille de l'os pour les souris KO [Hawse et al, 2008]. L'analyse des têtes fémorales et des vertèbres a montré une augmentation de l'épaisseur de l'os trabéculaire de la tête fémorale et une

diminution de l'épaisseur de l'os cortical et du volume osseux des vertèbres chez les souris KO par rapport aux WT. Une diminution du nombre d'ostéocytes dans les fémurs des souris TIEG1^{-/-} a également été trouvé. Les os de ces souris transgéniques ont donc un phénotype ostéopénique (ou ostéoporotiques) avec une diminution des propriétés mécaniques de l'os et une diminution de la quantité de l'os cortical et trabéculaire [Bensamoun et al, 2006 (a)].

b) Le tissu tendineux

Une étude de la structure et des propriétés mécaniques des tendons à été effectuée sur les souris TIEG1 KO à l'âge de 1, 3 et 15 mois. Les propriétés mécaniques des tendons de queue de souris ont été déterminées et aucune différence n'a été montrée à l'âge de 1 et 15 mois mais une diminution significative a été trouvée pour les souris TIEG1 KO âgées de 3 mois. L'analyse de la structure tendineuse a révélé une augmentation de la taille des fibrilles pour les souris TIEG1 KO âgées de 1 et 3 mois (Figure 8). TIEG1 a donc un rôle important dans les propriétés morphologiques et les mécaniques des tendons [Bensamoun et al, 2006 (b)].

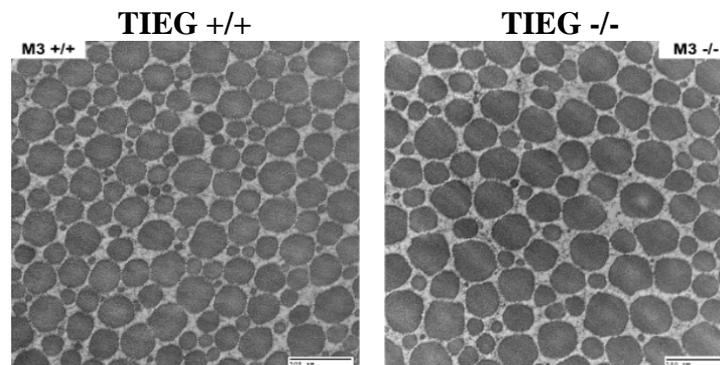


Figure 8 : Augmentation de la taille des fibrilles pour les tendons TIEG1 KO de 3 mois
(Bensamoun et al, 2006 (b))

c) Le tissu pulmonaire

Chaloux et al, (1999) a montré que le facteur de transcription TIEG1 est induit par le TGF- β dans la lignée cellulaire Mv1Lu de cellules épithéliales de poumon et également que la surexpression de TIEG1 dans ces cellules peut déclencher l'apoptose. Les résultats de cette

étude suggèrent que l'induction de l'expression TIEG a un rôle dans les propriétés pro-apoptotiques de TGF- β .

d) Le tissu pancréatique

Une étude de Tachibana et al, (1997) a caractérisé l'expression et la fonction de TIEG1 dans les cellules épithéliales pancréatique exocrine. Il a été démontré que ce gène est exprimé dans les différentes populations de cellules épithéliales du pancréas et que son expression est régulée par TGF- β 1 comme un gène de réponse précoce dans les lignées de cellules épithéliales du pancréas. De plus, la surexpression de TIEG1 dans une lignée de cellules épithéliales sensibles à TGF- β est suffisante pour induire l'apoptose de ces cellules. TIEG1 a donc un rôle dans la régulation de la croissance des cellules pancréatiques épithéliales en lien avec la voie de signalisation TGF- β . TIEG1 et TIEG2 ont également été étudié par Cook et Urrutia (2000) sur des cellules épithéliales pancréatiques. Ils ont montrés que ces protéines pouvaient inhiber la prolifération de ces cellules épithéliales.

e) Le tissu hépatique

Ribeiro et al (1999), a étudié une lignée cellulaire d'hépatocytes sensible au TGF- β 1 : Hep 3B. Il a caractérisé une séquence d'événements qui caractérisent l'apoptose induite par TIEG1 et comparé ces événements avec les changements observés au cours de l'apoptose induite par TGF- β 1. La mort cellulaire des cellules induites par TGF- β 1 et par TIEG1 sont toutes les deux accompagnées par une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène et une perte du potentiel de la membrane mitochondriale précédant les changements morphologiques induits par l'apoptose. Ces résultats démontrent que TGF- β 1 et TIEG1 induisent l'apoptose par un mécanisme impliquant la formation d'espèces réactives de l'oxygène.

f) Le tissu mammaire

Il a été montré que TIEG1 pouvait jouer un rôle dans le développement des cancers du sein. En effet, le niveau de protéine TIEG1 baisse tout au long de la progression des cancers du sein et les stades avancés de cancer ne présentent aucune expression de cette protéine

[Subramaniam et al, 1998]. De plus, la perte de TIEG joue un rôle important dans la perte des propriétés d'inhibiteur de croissance TGF- β au cours de la progression du cancer et peut entraîner ou réduire le développement des cancers du sein et d'autres cancers [Johnsen et al, 2004].

III. Caractérisation des propriétés du tissu tendineux

De nombreuses études ont caractérisées les relations structure-fonction du tendon en effectuant des tests mécaniques sur des faisceaux issus de tendon de queue des souris TIEG1 KO pour étudier des protéines modifiées de la matrice extracellulaire (protéoglycanes).

III. 1. *Technique d'analyses structurales et moléculaires*

Les techniques d'immunohistochimie [Nowack et al, 1976] et d'histologie [Benjamin et al, 1986] ont été fréquemment utilisées pour analyser la structure et la composition des tendons et également pour identifier les changements de niveaux et/ou de localisation de protéines spécifiques qui se produisent dans le tendon. D'autres méthodes telles que l'hybridation in situ et PCR (polymerase chain reaction) en temps réel sont utilisées pour l'identification des différents types de collagène qui sont exprimés par les fibroblastes dans le tissu tendineux et la présence de gènes spécifiques qui ont été impliqués dans la formation de la matrice du collagène [Zhang et al, 2003]. De plus, le rôle des protéines non collagéniques, tels que les protéoglycanes, ont été analysés pour tenter de déterminer leurs effets sur la structure et la fonction du tendon. L'article de Yoon and Halper, (2005) fait un état de l'art des différents protéoglycanes qui régissent la fibrillogénèse du collagène et donc, indirectement, les fonctions du tendon. En effet, la décorine, le biglycan, la fibromoduline et le lumican, membres de la famille des petites protéoglycanes riches en leucine (SLRP), se lient aux fibrilles de collagène et participent à la fibrillogénèse. L'aggrecan et le versican, membres des grands protéoglycanes, permettent au tendon d'avoir une grande capacité à résister à la compression et aux forces de traction.

III. 2. Tests mécaniques

Elliott et al (2003) ont quantifié les comportements mécaniques des tendons, y compris la viscoélasticité et la non-linéarité, pour des groupes de souris qui ont été génétiquement modifiées pour certaines protéines de la matrice extracellulaire. Une étude de Robinson et al, (2004) (b) a permis de quantifier les relations structure-fonction en comparant les propriétés mécaniques de tendons issus de souris normales et de souris génétiquement modifiées en collagène I et décorine. Des tests mécaniques en rampe et des expériences de rupture ont été effectuées sur des fascicules de tendon de queue à des vitesses de déformation de 0,5%/s et 50%/s. Les résultats montrent que la viscoélasticité des tendons est modifiée par le contenu en décorine mais pas par des modifications en collagène. Ces deux études ont fourni des données quantitatives concernant les relations structure-fonction dans le tendon, y compris un rôle des protéoglycanes dans la viscoélasticité.

Dans une précédente étude [Bensamoun et al, 2006 (b)], des essais mécaniques ont été effectués sur des fibres de tendon, afin de caractériser les effets de TIEG1 sur leurs propriétés mécaniques. Les propriétés mécaniques des tendons de queue isolés de ces souris ont été déterminées en utilisant des tests d'étirement en rampe avec une vitesse de 0,05 mm/s, des tests de relaxation avec une vitesse de 5 mm/s. Les tendons de souris TIEG1 KO ont une résistance mécanique réduite avec une densité de fibrilles plus faible que celle du groupe contrôle composé de souris âgées de 3 mois.

III. 3. Techniques d'imagerie

Pour compléter ces analyses, des techniques d'imagerie telles que la microscopie optique et microscopie électronique à transmission ont également été utilisées pour analyser la structure du tendon. Ces analyses ont permis de mesurer l'espace interfibrillaire, et d'évaluer la dissociation des fibrilles de collagène, la cellularité, la vascularisation, la morphométrie ultrastructurale avec la mesure du diamètre des fibrilles de collagène (Figure 9). Elles ont également permis de déterminer que des modifications génétiques sur les animaux ne provoquent pas seulement des modifications biomécaniques, mais également un remodelage tissulaire intense avec des changements morphologiques dans les fibrilles de collagène des tendons [Leonardi et al, 1983 ; Muellner et al, 2001].

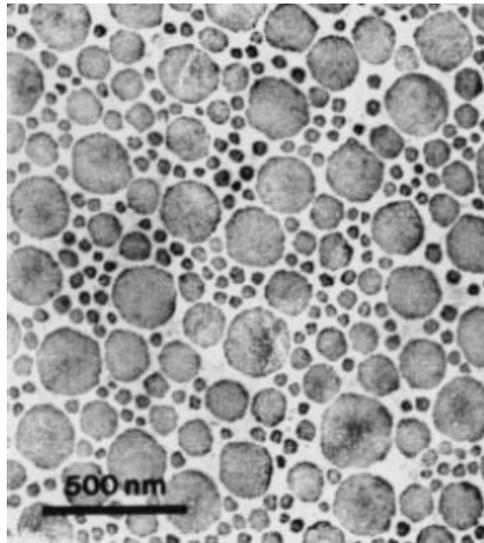


Figure 9 : Analyse de la circularité et du diamètre des fibrilles de collagène sur une coupe transversale de tendon rotulien chez le rat (Muellner et al, 2001)

Des acquisitions en microscopie électronique ont permis de caractériser la structure du collagène du tendon, composée de bandes alternées, sombres et claires, définies par une période (D) de 67nm (670A) [Bruns, 1976 ; Hodge et Petruska, 1963] qui peuvent varier selon le type de tissu ($D_{\text{tendon}} = 67\text{nm}$, $D_{\text{ligament}} = 65\text{nm}$). Ils ont déterminé que la période D peut être dû à l'angle entre les molécules et/ou l'inclinaison moléculaire par rapport à celle du tendon et que l'arrangement moléculaire au sein des fibrilles de collagène a un effet significatif sur les propriétés de mécaniques des tissus [Bigi et al 1991 ; Cameron et al, 2002]. Des études de diffraction des rayons X utilisant le rayonnement synchrotron (Figure 10) ont permis d'étudier la microstructure de la matrice de collagène dans le tendon [Bigi et al 1991 ; Hukins, 1977].

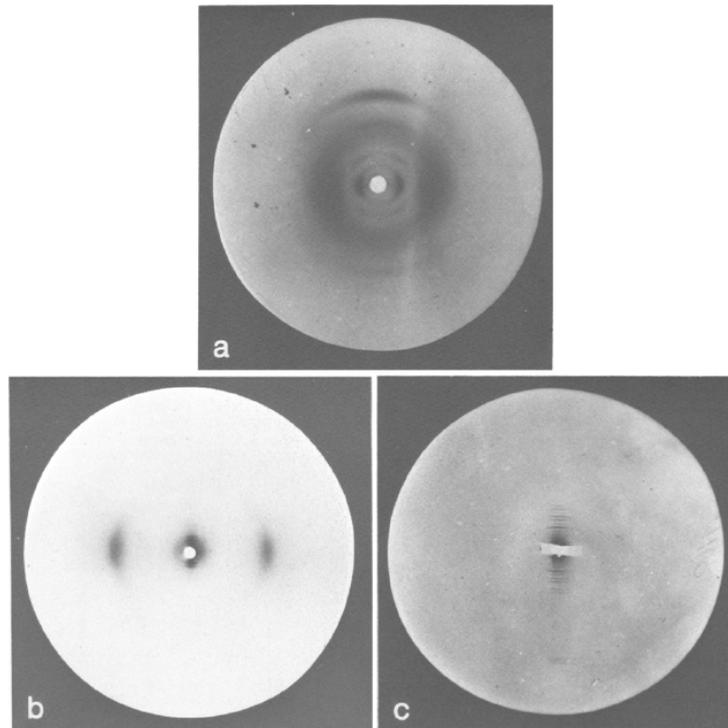


Figure 10 : Spectre de diffraction aux rayons-X : (a) grand angle, (b) angle moyen, (c) petit angle (Hukins, 1977)

III. 4. *Techniques physico-chimique*

De nombreuses études ont combiné des essais mécaniques in situ et des expérimentations de diffraction aux rayons X en parallèle afin de corréler les mécanismes moléculaires avec la structure du collagène. Ces études ont montré qu'il y a deux mécanismes qui contribuent à l'allongement de fibrilles : l'allongement des triples hélices de collagène et le glissement relatif des hélices l'une par rapport à l'autre, avec une augmentation de la période D. De plus, ils ont déterminés que ces deux processus ne se déroulaient pas simultanément [Bigi et al 1991 ; Folkhard et al, 1986 ; Mosler et al, 1985]. Des modèles numériques ont également été développés, en parallèle des expérimentations, pour simuler le comportement des changements moléculaires sous différentes contraintes. Ces modèles ont permis une meilleure compréhension de l'interaction entre la structure interne de collagène au sein d'un tendon et sa matrice extracellulaire en mesurant simultanément l'allongement des fibrilles de collagène à l'intérieur du tendon et dans son ensemble ainsi qu'en décrivant la déformation

des fibrilles de collagène au niveau des changements moléculaires [Puxkandl et al, 2002 ; Robinson et al, 2004 (a) ; Sasaki et al, 1999 ; Wess et Cairns, 2005].

L'utilisation de la spectroscopie vibrationnelle, comme la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) ont permis la détermination de la composition moléculaire en surfaces des tissus (sur une profondeur de 4 μ m). Par exemple, Gadaleta et al (1995) ont caractérisés les variations de la phase minérale des tissus calcifiés isolés des tendons de cuisse de dinde (Figure 11) par microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (MIRTF). De plus, les comportements anisotropes du tendon et du cartilage ont également été analysés par MIRTF afin de déterminer l'orientation des fibrilles de collagène à la surface des différents tissus. Ces analyses ont permis une analyse des composants amide situés à l'intérieur des tendons [Ramakrishnan et al, 2008].

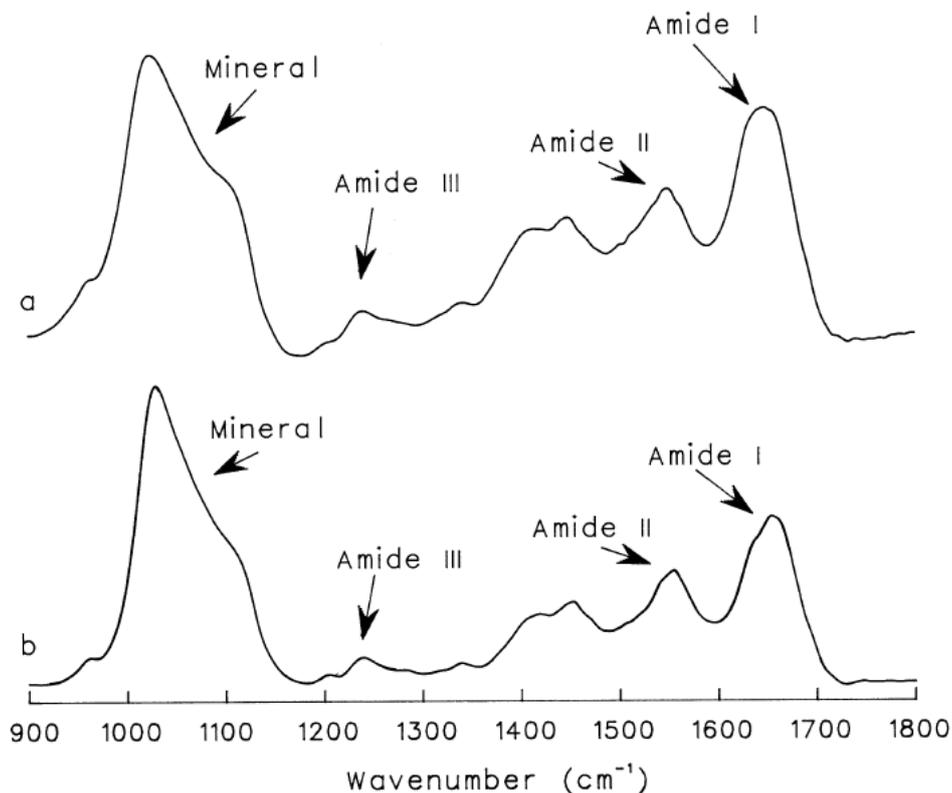


Figure 11 : (a) Spectre d'absorbance d'une section longitudinale hautement minéralisée, (b) Spectre d'absorbance d'une section latérale hautement minéralisée

Objectif de la thèse

Cette étude a pour but de déterminer le ou les mécanismes de régulation impliquant le gène TIEG1 (TGF β inducible early gene 1) sur les propriétés physico-chimique du tissu tendineux.

L'objectif de ce travail est donc de caractériser les effets du gène TIEG1 sur le système musculo-squelettique, en particulier sur le tendon, par différentes techniques (physico-chimique, biologique, biochimique). En étudiant les différences observées sur ce tissus entre les souris TIEG1 KO et les souris contrôles, cela permet de déterminer le rôle de TIEG1 sur la structure et les fonctions du tendon.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

I. Matériels

I. 1. Animaux

Un modèle de souris transgénique TIEG1 KO (TGF- β Inducible Early Gene 1) a été développé sur un fond génétique C57Black/6 à la Mayo Clinic par l'équipe du Dr Spelsberg [Subramaniam et al, 2005]. L'ensemble des souris contrôles (WT) et transgéniques (TIEG1 KO ou TIEG1 -/-) ont été logées dans une pièce régulée en température ($22\pm 2^\circ\text{C}$) et en lumière (cycle jour/nuit de 12h) avec accès libre à l'eau et à la nourriture (granulés « Laboratory Rodent Diet 5001 »). Afin de réduire la variabilité entre les souris WT et TIEG1 KO, tous les animaux ont été élevés dans les mêmes conditions pour l'ensemble des expérimentations détaillées dans ce rapport. Les souris sont sacrifiées à l'aide de CO_2 et peuvent être stockées, préalablement à leur utilisation, dans un congélateur, à -80°C . Les animaux utilisés pour cette étude sont des souris femelles WT et TIEG1 KO âgées de 1 (jeunes), 3 (adultes) et 8 mois (âgées).

I. 2. Culture cellulaires

Les tendons fléchisseurs ont été prélevés à partir des pattes de chacune des souris WT et TIEG1 KO femelle et les fibroblastes ont été isolés. Pour cela, les tendons ont été placés dans une solution de collagénase de type I à 0,5 mg/mL pendant une nuit et les fibroblastes isolés ont été cultivés dans un milieu MEM- α (Minimum Essential Medium Alpha, Invitrogen, France) contenant 10% sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen, France), 100 U/ml de pénicilline, 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine et 0,25 $\mu\text{g/ml}$ Amphotéricine B (Invitrogen, France). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO_2 humidifié.

II. Méthodes

II. 1. *Synchrotron*

a) *Présentation de la technique*

Le synchrotron est un instrument qui permet l'analyse de différents types de matériaux dans des domaines très variés tel que la chimie, la physique, la biologie ou l'archéologie... Cela est possible grâce à un spectre d'émission qui s'étend de l'infrarouge aux rayons X. Ce rayonnement peut-être comparé à un laser sur une grande gamme de fréquences spectrales depuis l'infrarouge lointain jusqu'aux rayons X durs pour les synchrotrons de 3^{ème} génération tel que celui de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble). Ce synchrotron, de par ses propriétés, permet d'effectuer de nombreuses expériences mises en œuvre sur les différentes « lignes de lumière » existante au sein de ces installations. Chaque ligne de lumière est un laboratoire d'une vingtaine de mètres de long, instrumenté pour analyser des échantillons, en utilisant des techniques spécifiques aux informations recherchées, et traiter les données recueillies. Des expériences dans les rayons X permettent d'étudier la fluorescence, pour la détermination de la composition élémentaire des matériaux étudiés, l'absorption, pour les études de cinétiques chimiques, la diffraction, pour la cristallographie de protéines, la microtomographie et la spectroscopie de photoémission. Des études dans les ultraviolets permettent d'effectuer de la spectroscopie. Les expérimentations dans l'infrarouge permettent d'étudier la microspectrométrie à transformée de Fourier.

b) *Fonctionnement du synchrotron*

Le synchrotron est un instrument permettant l'accélération à haute énergie de particules stables chargées. Un paquet d'électrons, formant un faisceau fin comme un cheveu, est d'abord accéléré dans un accélérateur linéaire (Linac, Figure 12 : ①) jusqu'à une vitesse très proche de celle de la lumière. Puis le faisceau d'électrons passe dans un accélérateur circulaire appelé anneau d'accélération (Figure 12 : ②) : le but de cet anneau est d'augmenter l'énergie des électrons jusqu'à atteindre environ 2 GeV. Une fois que les électrons ont atteint l'énergie voulue, ils sont injectés dans le grand anneau appelé anneau de stockage (Figure 12 : ③), où ils tournent pendant des heures en faisant des centaines de milliers de tours à chaque

seconde. L'anneau de stockage n'étant pas parfaitement circulaire et étant constitué d'une trentaine de segments rectilignes, il est nécessaire de trouver un aimant de courbure (Figure 12 : ④) à la jonction entre deux segments. C'est un gros électro-aimant générant un champ magnétique entre 1 et 2 Tesla orienté perpendiculairement à la trajectoire des électrons. Ce champ dévie les électrons et les aligne dans l'axe du segment suivant. Ainsi, la trajectoire des électrons est un polygone de forme quasiment circulaire. Au niveau de ces aimants de courbure, les électrons subissent une accélération ce qui entraîne la production d'un rayonnement : le rayonnement synchrotron. Ce rayonnement de photons est émis tangentiellement à la trajectoire des électrons et est envoyé dans les lignes de lumière...

Les synchrotrons de troisième génération contiennent ce que l'on appelle des «éléments d'insertion ». Ce sont des aimants situés au milieu de chaque segment, en plus des aimants de courbure habituels. Il en existe deux types les wigglers, et les onduleurs (Figure 12 : ⑥). Les deux sont des aimants fournissant un champ magnétique alternatif et la différence entre un wiggler et un onduleur réside simplement dans la période d'oscillation du champ alternatif. Au niveau de ces éléments, les électrons subissent de nombreuses accélérations successives, ce qui crée un rayonnement synchrotron bien plus intense que celui créé par un simple aimant de courbure. On place évidemment une ligne de lumière (Figure 12 : ⑦) au niveau de chaque élément d'insertion.

Les figures 12 et 13 résument les principaux éléments qui composent le synchrotron:

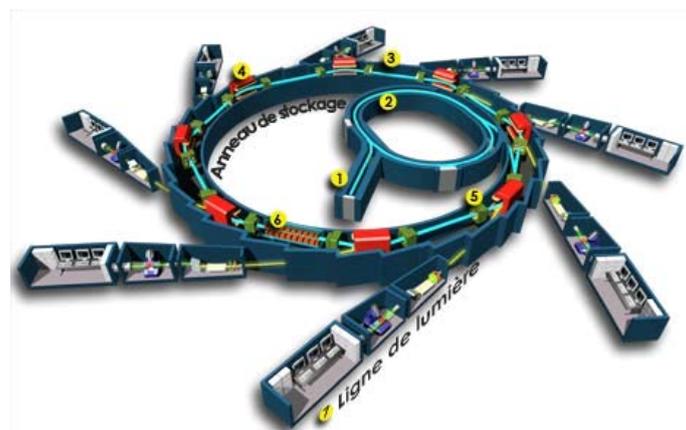


Figure 12 : Les différents éléments du synchrotron

- | | |
|--|---------------------------------|
| ① Un injecteur avec accélérateur linéaire (le Linac) | ⑤ Des quadrupôles et sextupôles |
| ② Un booster (accélérateur circulaire) | ⑥ Des wigglers et onduleurs |
| ③ Un anneau de stockage | ⑦ Des lignes de lumière |
| ④ Des aimants de courbure | |

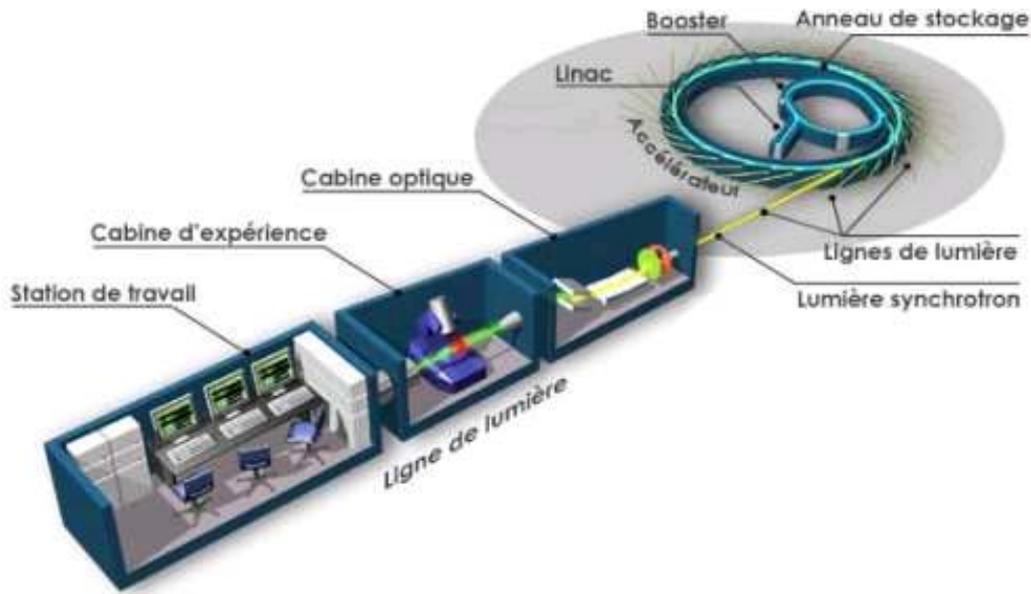


Figure 13 : Éléments de la ligne de lumière

La ligne de lumière (Figure 13) est composée d'une cabine optique, d'une cabine d'expérience (Figure 14) et d'une station de travail (Figure 15).

La cabine optique contient les dispositifs optiques (un long miroir, des caches et un monochromateur) qui sélectionnent les caractéristiques de la lumière synchrotron recherchées pour mener à bien l'expérience comme par exemple le choix de la longueur d'onde ou la gamme de longueur d'onde, de la taille du faisceau, de la polarisation... qui sont déterminés par l'utilisateur au niveau de la station de travail.

Le rayonnement synchrotron est ensuite dirigé vers la cabine d'expérience où se trouve l'échantillon à analyser. Cet échantillon est entouré d'un ensemble d'éléments : un microscope qui permet de localiser la position du faisceau sur l'échantillon, un détecteur, une caméra CCD (Charge-Coupled Device, ou dispositif à transfert de charge) qui permet d'enregistrer les données, et un « beam stop » qui permet d'arrêter le faisceau de rayons X pour ne pas dégrader l'échantillon entre deux analyses.

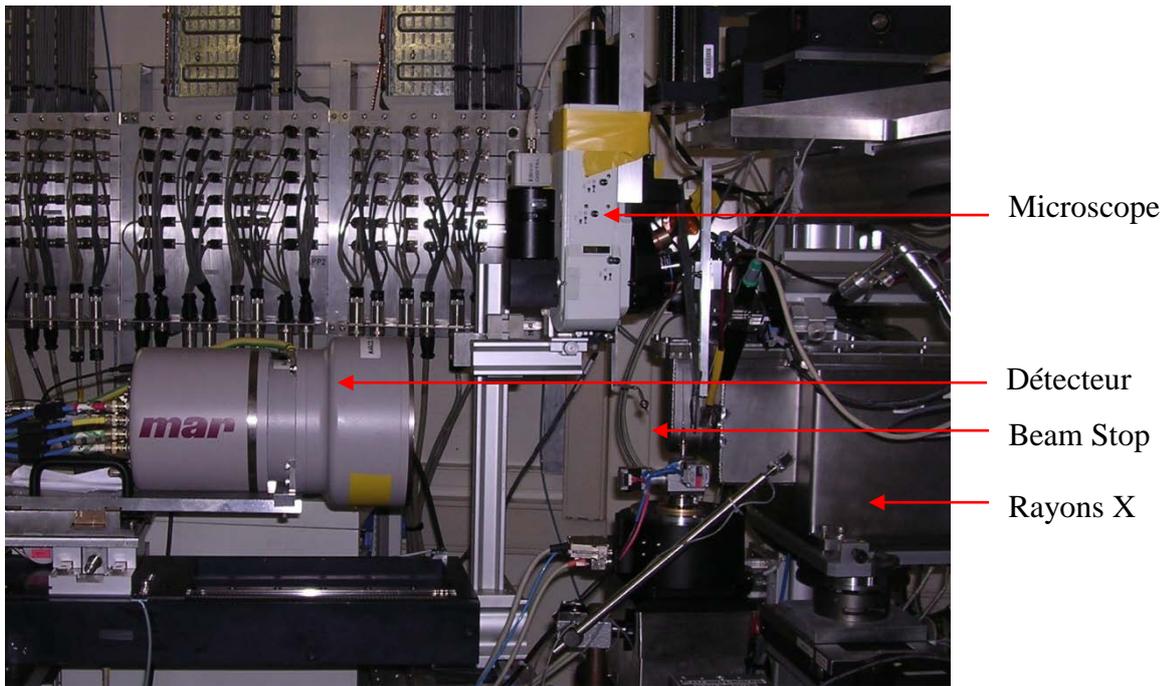


Figure 14 : Cabine d'expérience de la ligne de lumière ID13, ESRF

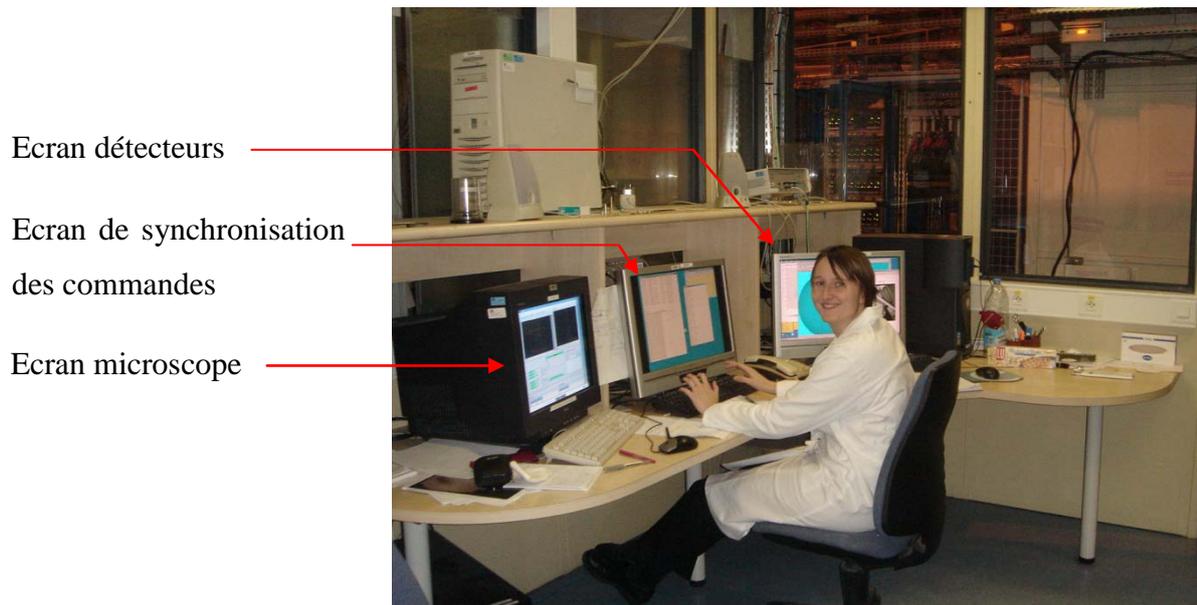


Figure 15 : Station de travail de la ligne ID13, ESRF

La station de travail (Figure 15) est composée de trois écrans permettant de contrôler les différents éléments présents dans la cabine d'expérience : un écran pour le microscope, un écran de synchronisation des commandes et un écran pour les détecteurs.

L'écran « microscope » permet de visualiser l'échantillon lorsque l'on utilise le microscope en position basse.

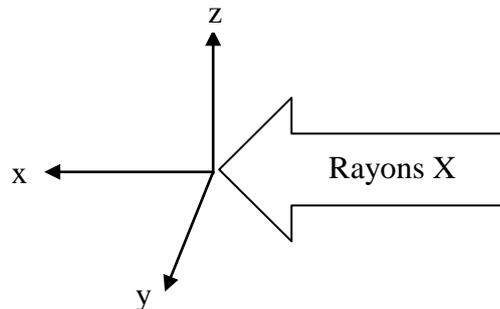
L'écran « synchronisation des commandes » permet de rentrer différentes commandes afin de faire bouger les moteurs ainsi que les éléments présents dans la cabine d'expérience. Il comprend plusieurs applications (fenêtres) qui gèrent chacune des moteurs différents :

1. Scanning : permet de faire bouger les moteurs de l'installation

Fonction « str » permet les translations en x, y et z

Fonction « srot » permet les rotations en x, y et z

Rem : x est l'axe des rayons X, y est l'axe perpendiculaire aux rayons X dans un plan horizontal et z est l'axe vertical



2. Bigmic : permet de faire bouger les différents éléments de l'installation :

Fonction « microz » pour le microscope

Fonction « trdet » pour le détecteur

Fonction « escap » pour le beam stop (permet de stopper le faisceau de rayons X)

L'écran « détecteurs » permet de visualiser les éléments grâce à une caméra situé dans la salle des rayons X, et les résultats que l'on obtient durant les scans des échantillons (Figure 16).

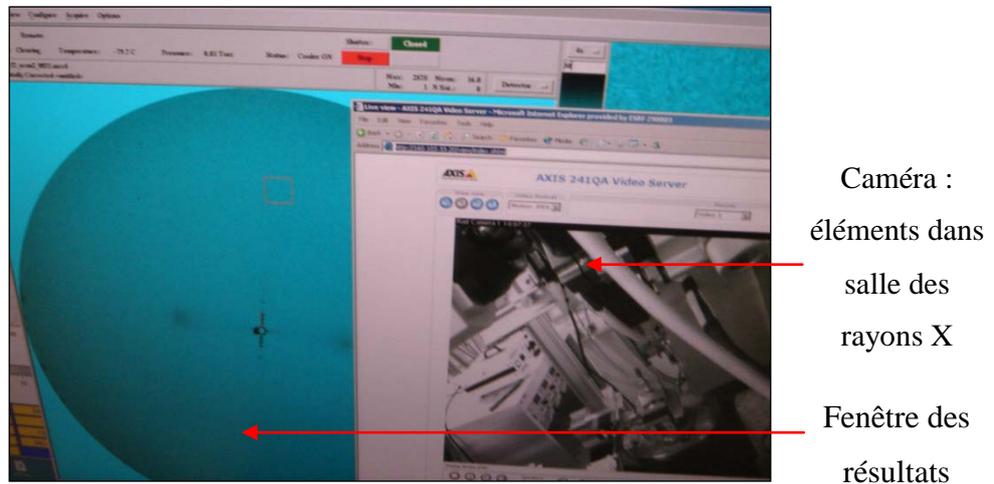


Figure 16 : Ecran « détecteurs »

c) Prélèvement des fibres tendineuses

Des fibres, issues du tendon dorsal de la queue, ont été isolées sur des souris femelles de 3 mois : 5 WT et 4 TIEG1 KO (TGF- β Inducible Early Gene 1), sous un vidéo microscope (Figure 17 A et B).

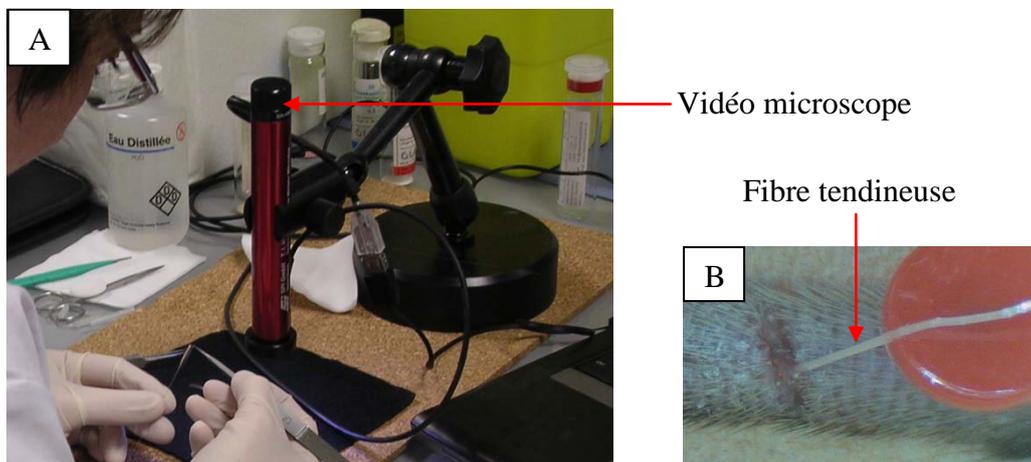


Figure 17 : Extraction d'une fibre du tendon dorsal de queue de souris (B) sous un vidéo microscope (A)

Chaque fibre de tendon ($N_{WT} = 9$ and $N_{TIEG1_KO} = 8$) a été introduite dans un capillaire de 0,7 mm de diamètre (Figure 18) et placée verticalement dans le faisceau de rayons X (Figure 14) afin d'être analysée.

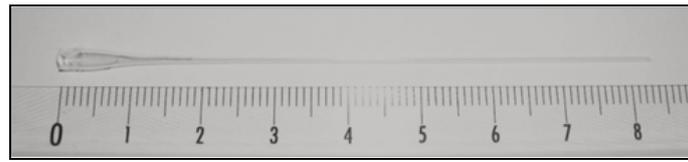


Figure 18 : capillaire de 0,7 mm de diamètre

d) Réalisation des tests au synchrotron

Les expériences de microdiffraction aux rayons X ont été réalisées à l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) dans la ligne de lumière ID13 (Grenoble, France) en utilisant un faisceau monochromatique de $2\mu\text{m}$ de diamètre (13 KeV). Les données de diffraction provenant de la structure interne des fibres tendon ont été recueillies sur un détecteur 2D (caméra MARCCD). Les expérimentations au synchrotron ont été réalisées en collaboration avec le Dr Jean Doucet du laboratoire de physique des solides d'Orsay (UMR 8502).

Des spectres, représentant la diffraction aux rayons X (Figure 19) et provenant des fibres issues des souris WT et TIEG1 KO, ont été obtenus par balayage des fibres dans la direction radiale (sur $160\mu\text{m}$ avec des pas de $2\mu\text{m}$). Le faisceau a été déplacé le long de la fibre (dans la hauteur) afin de répéter l'analyse 2 à 3 fois.

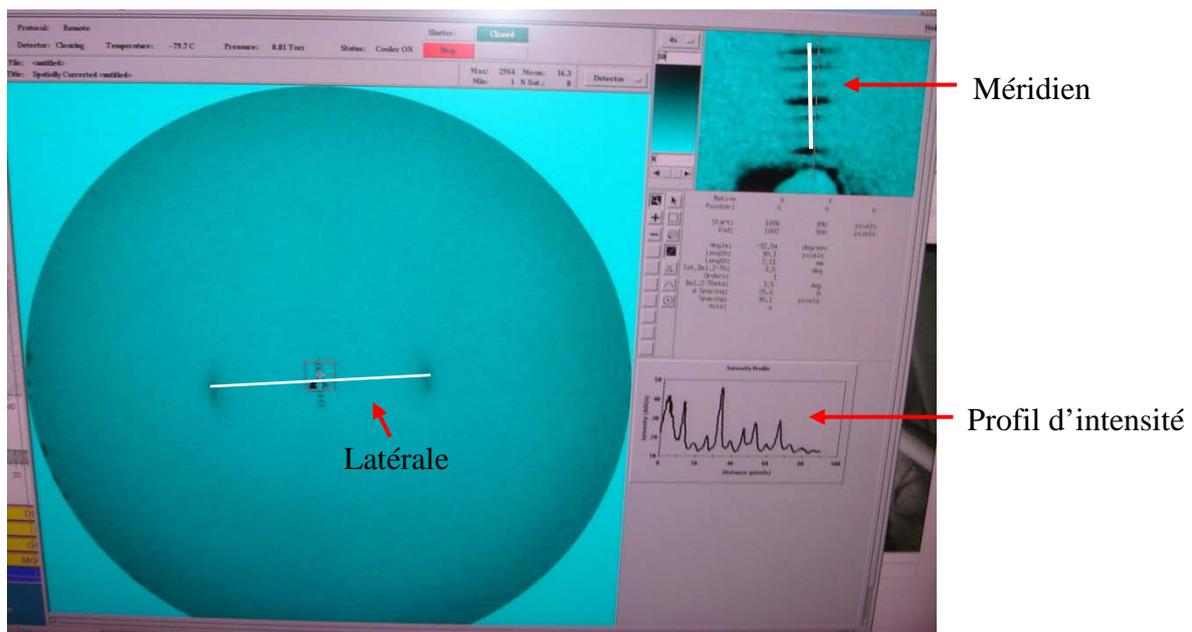


Figure 19 : Spectre de diffraction aux rayons X et profil d'intensité

Un profil a été tracé dans la direction verticale (Méridien) à partir du centre du spectre jusqu'à une des extrémités pour obtenir un profil d'intensité de rayons X (Figure 20).

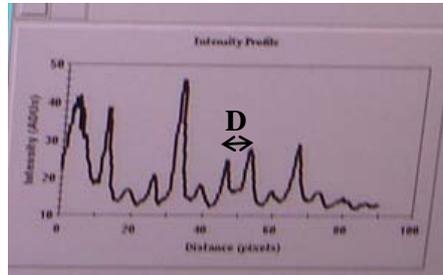


Figure 20 : Période D sur le profil d'intensité

L'intensité des rayons X suivant l'axe de la fibre a été analysée afin de déterminer l'empilement moléculaire permettant d'obtenir la période (D) de la fibre de collagène, grâce à la loi de Bragg :

$$2d \sin \theta = n \cdot \lambda \quad (\text{équation 1})$$

avec :

- d = distance interréticulaire, c'est-à-dire distance entre deux plans cristallographiques
- θ : angle de Bragg = demi-angle de déviation (moitié de l'angle entre le faisceau incident et la direction du détecteur)
- n = ordre de diffraction
- λ = longueur d'onde des rayons X

Le spectre est représenté en fonction du vecteur d'onde (S) qui correspond à la valeur de $1/d$, ou d est la distance de la loi de Bragg. On a ainsi : $S=2\sin(\theta)/\lambda$.

En plus de la période, l'organisation latérale de la triple hélice de collagène a été caractérisée par un profil latéral placé horizontalement sur le spectre des rayons X (Figure 19). En parallèle à cette étude, un modèle numérique a été développé pour analyser la structure moléculaire de la triple hélice de collagène enregistrée le long de la direction latérale

[Doucet et al, 2010]. Ce modèle fournit un pourcentage de la distorsion qui dépend de la distance entre deux triples hélices et son écart-type.

Afin de comprendre les différences observées grâce à l'étude au synchrotron, le dosage de l'hydroxyproline a été effectué.

II. 2. Détermination de la quantité d'hydroxyproline

a) Présentation de la molécule

L'hydroxyproline (Figure 21) est un acide aminé présent dans les os et les tissus conjonctifs tels que la peau, les tendons et les cartilages. Cette protéine représente 13% des acides aminés totaux du collagène. Le dosage de la quantité d'hydroxyproline est donc proportionnel à la quantité de collagène présent au sein du tissu étudié. Le principe de ce dosage repose sur une réaction colorimétrique réalisée sur des prélèvements de tissus tendineux.

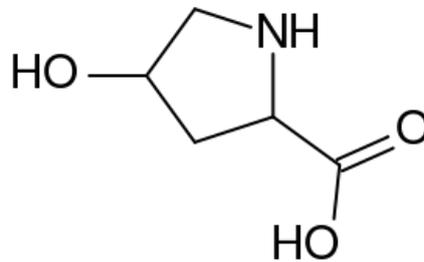


Figure 21 : Structure de l'hydroxyproline (O : oxygène, H : hydrogène, N : azote)

b) Préparation des échantillons

Les dosages d'hydroxyproline ont été effectués sur le tendon dorsal de queue extrait sur une longueur de 1 cm, ainsi que sur les tendons d'Achille des souris WT et TIEG1 KO. Les échantillons tendineux, extraits de souris femelles de 1 mois ($N_{WT} = 6$, $N_{TIEG1_KO} = 6$), 3 mois ($N_{WT} = 8$, $N_{TIEG1_KO} = 8$) et 8 mois ($N_{WT} = 6$, $N_{TIEG1_KO} = 6$), ont été nettoyés pour éliminer les résidus de muscle et immédiatement pesé afin de normaliser les dosages.

c) Mesure du contenu en hydroxyproline

Les dosages d'hydroxyproline ont été effectués pour estimer la teneur en collagène dans le tendon dorsal de la queue et le tendon d'Achille. Les échantillons de tendon ont été incubés toute la nuit à une température de 110°C dans 1,5 ml de solution d'acide perchlorique. Cette hydrolyse acide a permis aux acides aminés d'être libérés par rupture des liaisons peptidiques. Puis, la solution a été dissoute dans de l'eau Milli-Q afin d'obtenir un volume total de 10 ml. Afin de réaliser le dosage colorimétrique, le mélange suivant a été effectué, dans un falcon de 15 ml, pour les tendons de la queue :

- 250 µl de l'échantillon
- 250 µl de NaOH 1,8N (Voir annexe 1)
- 500 µl de tampon A (Voir annexe 1)
- 500 µl de solution oxydante (Chloramine T) (Voir annexe 1)
- Laisser réagir 4 minutes à température ambiante
- 2,5 ml de réactif d'Ehrlich (Voir annexe 1)
- Fermer le tube et incuber 25 minutes à 60 °C
- Laisser refroidir

Les volumes ont été divisés par deux pour les tendons d'Achille par rapport aux tendons de la queue. L'étalonnage est réalisé avec une gamme de solutions standards d'hydroxyproline à 0, 1, 3, 5, 10, 15, et 20 µg/ml traitées dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les échantillons de tendon.

L'oxydation de l'hydroxyproline par la chloramine T conduit à la production de dérivés pyrroliques qui donnent avec le tampon A et le réactif d'Erlich, en milieu acide, une coloration rose qui peut être évaluée spectrophotométriquement. La couleur a été quantifiée à 558 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (Varian Cary 50 scans UV-Visible, USA), pour déterminer le contenu total en hydroxyproline pour chaque échantillon. Cette quantité a été normalisée en fonction du poids du tendon pesé immédiatement après la dissection. Selon la littérature [Cetta et al, 1982 ; Derwin et al, 2001], l'hydroxyproline représente 13% du collagène total, ce qui nous permet d'évaluer sa teneur dans chaque échantillons.

d) Analyses statistiques

Des tests t non appariés ont été réalisés avec le logiciel Statgraphics 5,0 (Sigma Plus, Maryland, USA) pour comparer la teneur en hydroxyproline entre les souris WT et TIEG1 KO avec un intervalle de confiance de 95%.

Afin de déterminer les mécanismes de régulation impliquant le gène TIEG1 (TGF β inducible early gene 1), la technique de qRT-PCR a été utilisée.

II. 3. Analyse des gènes par qRT-PCR

a) Principe de la technique

La RT-PCR quantitative (real time quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction ou qRT-PCR) a été réalisée en 2 grandes étapes :

- La Reverse Transcription (RT ou transcriptase inverse)
- La Polymerase Chain Reaction (PCR ou Réaction de Polymérisation en Chaîne)

La RT est une enzyme qui transcrit l'information génétique de l'ARN en ADN (appelé aussi ADNc). Cette propriété est très utile pour quantifier les ARN, parfois présents en infime quantité, en utilisant l'ADNc produit par la RT pour effectuer une PCR.

La qRT-PCR repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR. La quantification par PCR des acides nucléiques peut se faire soit de façon « absolue » après établissement d'un étalonnage, soit de façon relative par rapport à un gène de référence. Dans cette étude, la quantification relative a été utilisée. Pour cela, un gène de référence est quantifié en même temps que le gène étudié et la concentration de ce dernier est ensuite normalisée par rapport à celle connue du gène de référence. Le gène de référence est un gène qui n'est pas induit par des traitements et qui est mesuré pour étudier la variation du gène cible (ou gène d'intérêt). Effectuer une correction à partir d'un gène de référence permet d'éliminer les effets de fluctuations (dus aux erreurs de pipetages par exemple).

Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des gènes: les agents se liant à l'ADN double brin (ex : SYBR Green I) et les sondes fluorescentes.

Pour les agents se liants à l'ADN double brin, la PCR quantitative repose sur la mesure continue d'une libération de fluorescence émise par un agent intercalant de l'ADN : le SYBR Green (Figure 22). Un fluorochrome (fluorophore) s'intercale entre les deux brins d'ADN, c'est-à-dire entre le brin initialement présent en solution et le brin nouvellement synthétisé. Ainsi au cours des cycles de la PCR, la quantité de fluorescence mesurée est directement en relation avec la quantité d'ADN produit. Le SYBR Green permet donc la quantification des acides nucléiques en solution et n'interférant que peu avec la PCR, il est le principal marqueur de séquence spécifique utilisé en PCR quantitative.

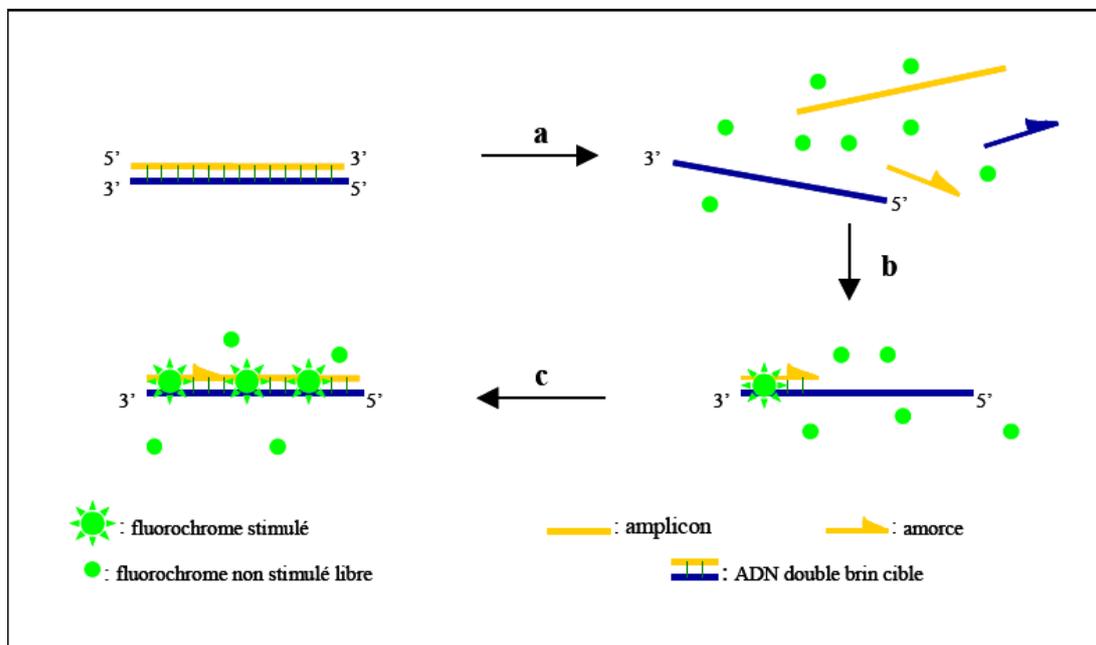


Figure 22 : Agents se liant à l'ADN double brin

(a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (b) Quand la température d'appariement est atteinte, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel. (article : La PCR en temps réel: principes et applications)

Pour les sondes fluorescentes, il existe quatre technologies principales : hydrolyse de sondes (Taqman assay), hybridation de 2 sondes (HybProbes), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpion (Scorpion primers). Pour la technologie Taqman, celle qui a été choisie dans cette étude, des sondes fluorescentes se fixent sur une séquence d'ADN précise, définie par des amorces qui ont été choisi spécifiquement pour se fixer sur cette séquence d'ADN. Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN (Figure 23).

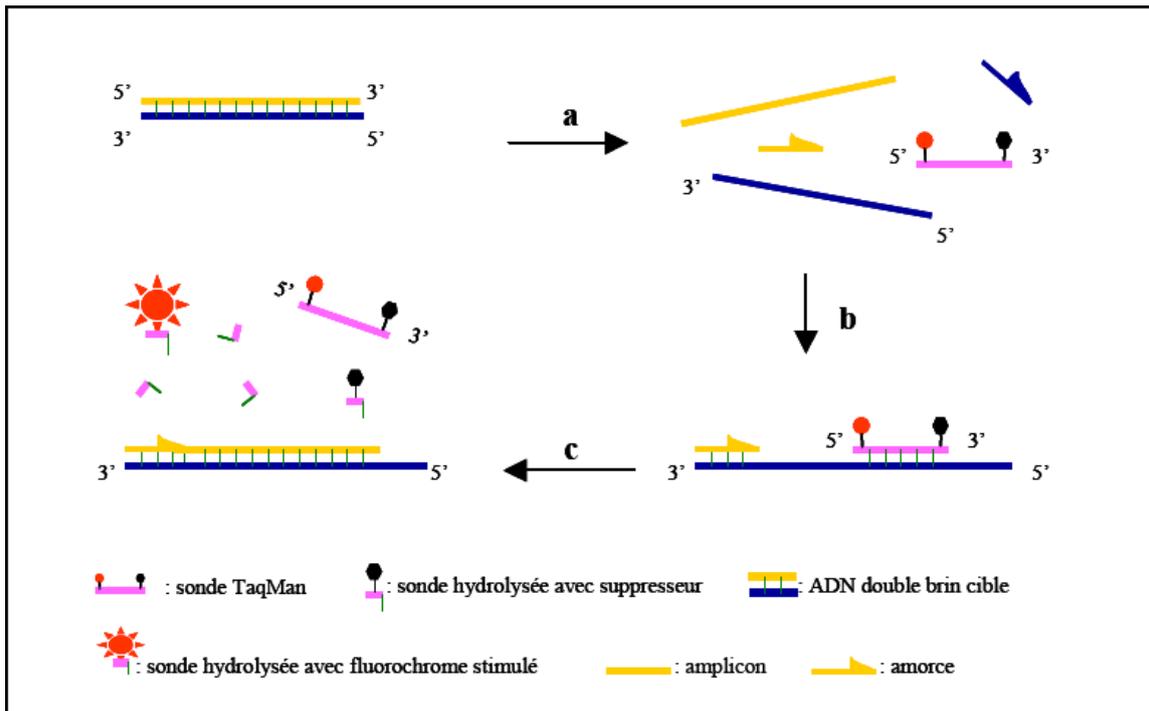


Figure 23 : Hydrolyse de sondes (Taqman)

(a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) Quand la température d'appariement est atteinte, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

b) Analyse des gènes à partir des fibroblastes

La PCR quantitative en temps réel a été réalisée sur les cultures cellulaires de fibroblastes en utilisant le kit « TaqMan Gene Expression Cells-to-Ct » comme spécifié par le constructeur (Applied Biosystems). Les fibroblastes, issus de souris femelle de 1 ($N_{WT} = 3$,

$N_{TIEG1\ KO} = 3$), 3 ($N_{WT} = 3$, $N_{TIEG1\ KO} = 3$) et 8 mois ($N_{WT} = 3$, $N_{TIEG1\ KO} = 3$), ont été détachés de la boîte de culture (Flacon de 25cm² avec col incliné et bouchon filtrant) avec de la trypsine, puis les cellules ont été comptées et mise en suspension à une concentration de 200 cellules/ μ l dans une solution de lyse contenant 1% de DNase I. La réaction de lyse a été arrêtée grâce à une solution d'arrêt et l'ADNc a été synthétisé par transcription inverse (RT) à l'aide du master mix fourni sous les conditions de PCR suivantes: une première étape à 37°C pendant 60 minutes, suivie d'une seconde étape à 95°C pendant 5 minutes et enfin maintien de la température à 4 ° C jusqu'à utilisation de l'ADNc.

La PCR en temps réel a ensuite été effectuée en utilisant des amorces spécifiques de gènes à étudier et un système de détection par PCR en temps réel MiniOpticon (Bio-Rad, France, Figure 24) avec les conditions suivantes de température: une étape initiale de 2 minutes à 50°C, une étape d'activation à 95°C pendant 10 minutes suivie de 40 cycles à 95°C pendant 15 secondes et à 60°C pendant 1 minute à l'aide d'un cocktail de PCR : master mix TaqMan 2X (kit cellules-à-Ct, Applied Biosystems) et amorces de gène TaqMan 20X (Applied Biosystems). Ces amorces spécifiques de gènes ont été achetées chez Applied Biosystems (France) et les références des séquences utilisées pour les gènes cibles sont les suivantes: 1) Collagène 1A2 (COL1A2): Mm00483888_m1, 2) Décorine (DCN): Mm00514535_m1, 3) Fibromoduline (Fmod): Mm00491215_m1, 4) TIEG1 (Klf10): Mm00449812_m1, 5) Laminine beta1-1 (LAMB1-1): Mm00801853_m1, 6) Lysyl oxydase (LOX): Mm00495386_m1, et 7) Lumican (Lum): Mm01248292_m1. Le gène de référence qui a été utilisé est la beta-2 microglobuline (B2M): Mm00437762_m1. Les gènes choisis sont impliqués dans la formation de la matrice du collagène et dans les mécanismes de formation de la structure tendineuse. Les valeurs quantitatives ont été calculées sur la base du cycle seuil (C_T) obtenus au cours de la réaction de PCR en temps réel. Le ratio de chaque gène cible a été calculé en utilisant une méthode de quantification relative: $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [Livak, 2001]. Deux expériences indépendantes ont été réalisées en duplicate pour chacun des gènes.



Figure 24 : Système de PCR en temps réel MiniOpticon (Bio-Rad) (<http://www3.bio-rad.com>)

c) *Traitement des données*

L'aspect quantitatif de cette technique repose sur la détermination du C_t « cycle threshold » qui correspond au nombre de cycles minimum nécessaires pour que la fluorescence dépasse un certain seuil (début de la phase exponentielle) correspondant au seuil de bruit de fond présents en solution. Pour cela, nous nous sommes basés sur l'analyse des courbes de fluorescence (Figure 25). Une courbe de fluorescence par rapport au nombre de cycle effectué permet d'obtenir les C_T utiles pour la quantification. On peut également voir sur ce graphique l'évolution de la quantité de fluorescence et déterminer les différentes phases des courbes (initiation, exponentielle, stationnaire) afin d'optimiser les C_T des échantillons.

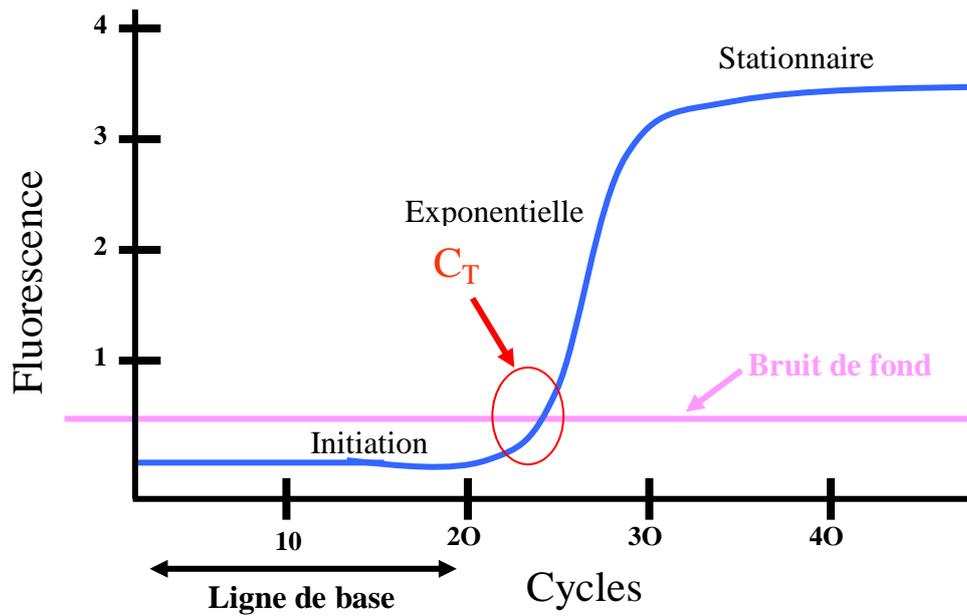


Figure 25 : Exemple de courbe de fluorescence par rapport au nombre de cycles afin de déterminer le C_T de la qRT-PCR

Grâce à l'obtention des différentes courbes de fluorescence, on peut déterminer si l'expérience est concluante et si on peut prendre en compte les résultats obtenus. L'analyse s'effectue par la suite grâce à l'équation $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Nous avons adopté la quantification relative par la méthode $2^{-\Delta\Delta C_T}$ décrite par Livak et Schmittgen, en 2001, pour calculer les changements relatifs dans l'expression des gènes d'intérêt, entre les échantillons provenant des souris transgéniques (TIEG1 KO) et ceux provenant des souris contrôles (WT) et en utilisant une référence de normalisation. Nous avons choisi comme gène de référence le gène de « ménage » la beta-2 microglobulin (B2m).

Les calculs sont effectués en utilisant l'équation de $\Delta\Delta C_T$:

$$\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ gène d'intérêt} - C_T \text{ B2m})_{\text{TIEG1 KO}} - (C_T \text{ gène d'intérêt} - C_T \text{ B2m})_{\text{WT}}$$

Le calcul de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ est utilisé pour quantifier la variation de l'expression du gène d'intérêt sur les souris transgéniques TIEG1 KO par rapport aux souris WT.

Le logiciel MJ Opticon Monitor™ Analysis software (Opticon Monitor 3.1.32, Copyright (C) 2001-2004 MJ Geneworks, Inc ; Copyright (C) 2004-2010 Biorad Laboratories, Inc) a été utilisé pour obtenir les courbes de fluorescence et déterminer les C_T

pour chacune de ces courbes. Les applications GeneEx Macro OM 3.x conversion template (Bio-Rad) et Gene Expression Analysis for iCycler iQ[®] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) ont été utilisés pour analyser les résultats de qRT-PCR.

d) Analyses statistiques

Des tests t non appariés ont été réalisés avec le logiciel Statgraphics 5,0 (Sigma Plus, Maryland, USA) pour comparer les différences d'expression des gènes entre les fibroblastes WT et TIEG1 KO avec un intervalle de confiance de 95%.

Après l'étude des gènes, l'analyse de la composition moléculaire a été étudiée par microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

II. 4. *Microspectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (MIRTF)*

a) Présentation de la technique

La méthode spectrométrique d'absorption infrarouge est fondée sur les propriétés vibrationnelles des liaisons interatomiques et est idéale pour confirmer la présence de groupements fonctionnels. Deux configurations du spectromètre sont possibles: une analyse de l'échantillon sous la forme d'une pastille (quelques milligrammes d'échantillon dans une pastille de KBr) ou une étude sous microscope optique (l'échantillon est déposé sur une fenêtre de chlorure de sodium : NaCl ou de fluorure de baryum : BaF₂). Un balayage d'air sec permet de maintenir une surpression dans l'enceinte du microscope et du spectromètre afin de minimiser les perturbations liées à la présence du CO₂ et de la vapeur d'eau atmosphériques.

La préparation en pastille de bromure de potassium (KBr) est généralement utilisée pour l'analyse infrarouge des échantillons. Cependant l'analyse des spectres doit être faite avec une précaution particulière. La présence d'eau résiduelle et de potassium dans le KBr génère des bandes de vibrations qui s'ajoutent à celles analysées notamment dans la zone entre 3000 et 3700 cm⁻¹ [Pelletier et al, 1999] et peut déplacer certaines bandes de vibration [Petit et al, 1999]. Afin d'éviter l'utilisation du KBr, nous avons donc été amenés à travailler avec des préparations sous microscope sur des fenêtres de BaF₂. Bien que limitant pour les

analyses quantitatives, cette technique présente deux autres intérêts majeurs : elle est non destructive et permet de travailler sur des quantités réduites d'échantillon [Thèse de Mathieu Gautier, Université d'Orléans, 2008].

b) Principe de l'analyse des spectres

L'analyse des échantillons donne un signal qui apparaît sous la forme d'un interférogramme (Figure 26), c'est à dire une signature d'intensité. L'interférogramme est la somme de toutes les fréquences du faisceau.

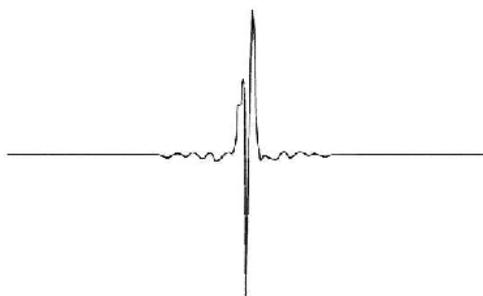


Figure 26 : Interférogramme en sortie du détecteur

Cet interférogramme est ensuite converti en un spectre infrarouge (Figure 27) par une opération mathématique appelée transformée de Fourier. Le spectre est acquis sur un intervalle de 650 cm^{-1} à 7400 cm^{-1} , pour l'analyse de nos échantillons tendineux, mais ne révèle la présence de pics caractéristiques que sur l'intervalle 650 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} . Ce spectre infrarouge représente la transmittance en fonction du nombre d'onde et permet d'obtenir la composition moléculaire de l'échantillon analysé. En effet, la figure 27 représente différents types de pics :

- ⇒ Groupes fonctionnels
- ⇒ Empreinte digitale → Simple liaisons et pics associés à tous les groupes fonctionnels
- ⇒ Différentes zones où sont localisés des pics spécifiques (triples liaisons, doubles liaisons...)

Afin de faciliter la comparaison, les spectres de transmittance ont été transformés en spectres d'absorbance (Figure 28) en fonction du nombre d'onde.

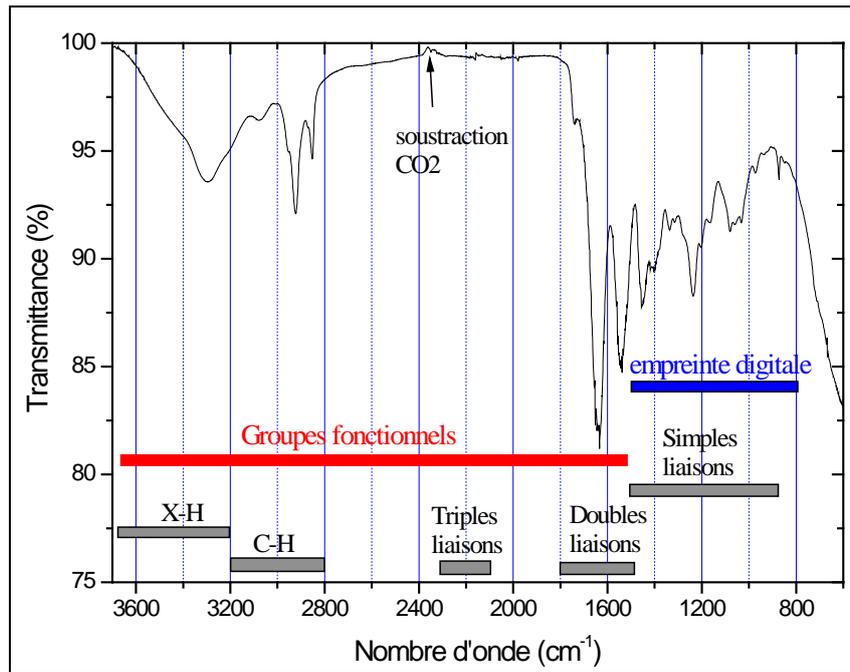


Figure 27 : Exemple de spectre infrarouge représentant la transmittance en fonction du nombre d'onde

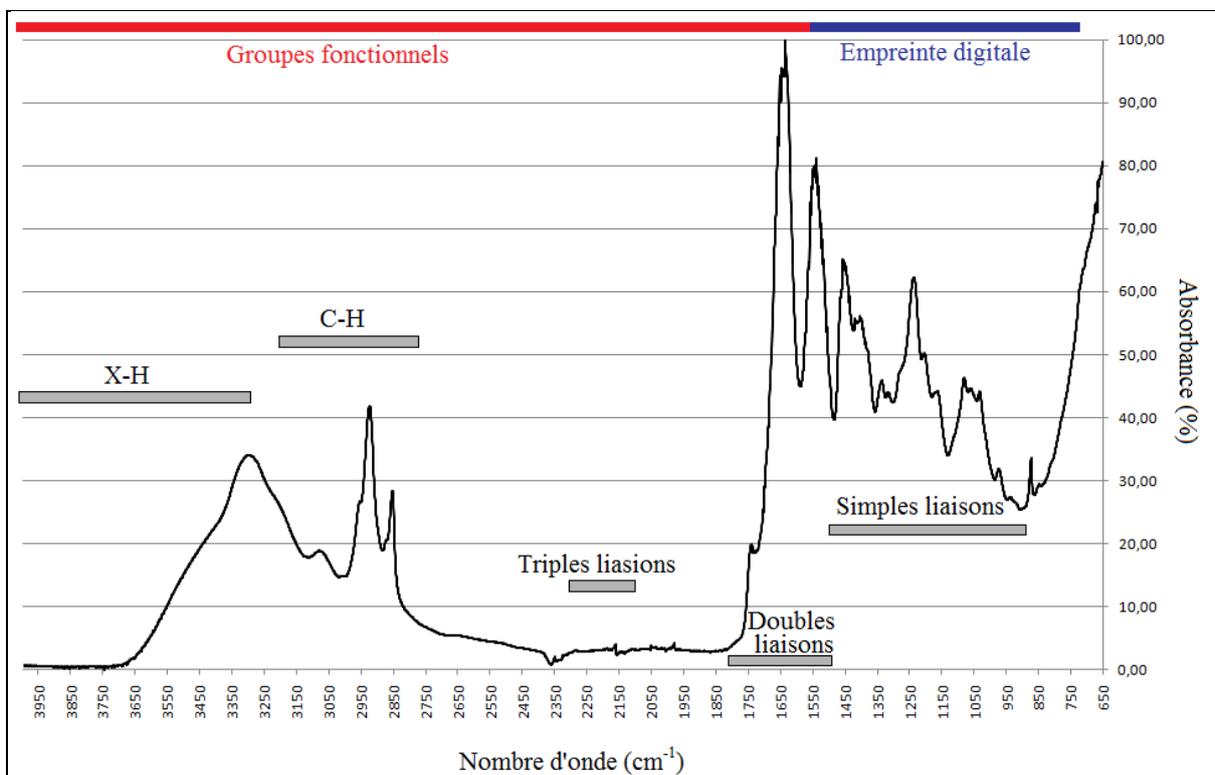


Figure 28 : Exemple de spectre infrarouge représentant l'absorbance en fonction du nombre d'onde

Les radiations infrarouges comprises entre 4000 et 400 cm^{-1} sont absorbées par une molécule en tant qu'énergie de vibration moléculaire. Généralement, on peut diviser le spectre en deux sections :

La section de droite ($<1500 \text{ cm}^{-1}$) est appelée "empreinte digitale" parce qu'elle comprend un très grand nombre de bandes aux formes variées. Si toutes les bandes de cette région se retrouvent dans deux spectres IR (aux même positions et intensités relatives), on peut conclure avec confiance qu'il s'agit de spectres du même composé. Le nombre important de bandes rend cependant l'analyse de cette section passablement ardue. De plus la nature des bandes qui se retrouvent dans cette région du spectre révèle peu d'information structurale. On peut donc, initialement, ignorer les bandes de l'empreinte digitale du spectre et concentrer l'analyse sur les groupes fonctionnels [Richard Giasson, spectroscopie infrarouge].

Les groupes fonctionnels ($>1500 \text{ cm}^{-1}$) comporte la plupart des bandes qui sont caractéristiques de groupes fonctionnels. La présence ou l'absence de bandes pour les liens C=O, O-H, NH, C=C, CC, CN et NO₂ est généralement évidente et procure une information structurale importante. Il est aussi souvent inutile d'analyser de façon très détaillée les absorptions CH vers 3000 cm^{-1} puisque presque tous les composés organiques ont des absorptions dans cette région [Richard Giasson, spectroscopie infrarouge].

Dans cette étude, les spectres infrarouge (IR) ont été obtenus en utilisant un spectromètre Nicolet Magna-IR 760 à transformée de Fourier équipé d'un microscope Nicolet NicPlan et d'un détecteur MCT-A (Figure 29) qui ont été purgés avec de l'air sec pour éliminer la plupart des H₂O et CO₂ gazeux atmosphériques.



Figure 29 : Spectromètre Nicolet Magna-IR 760 à transformée de Fourier équipé d'un microscope Nicolet NicPlan et d'un détecteur MCT-A de l'Institut des Sciences de la Terre d'Orléans (ISTO).

c) Préparation des échantillons pour la mise en place du protocole

Les queues de souris femelles de 3 mois ont été amputés à proximité du corps, après stockage à -80°C , et le tendon dorsal de la queue a été extrait sous un vidéo microscope. Pour toutes les expériences, les échantillons ont été récoltés dans la partie proximale du tendon de la queue. Trois différentes préparations des échantillons de tendon ont été analysées afin d'obtenir la meilleure méthode pour examiner la structure interne des tendons à l'aide de la microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (MIRTF).

d) Développement du protocole expérimental

Pour la première préparation, 2 à 3 fibres tendineuses par souris ($N = 4$) ont été isolées. Ces fibres ont été manuellement tendue et fixée aux 2 extrémités avec du ruban adhésif, afin d'obtenir une surface plane à analyser.

Pour la deuxième préparation, 5 à 6 fibres tendineuses pour chaque souris ($N = 4$) ont été extraites. L'ensemble des fibres extraites d'une même souris ont ensuite étaient broyées

dans un mortier à l'aide d'azote liquide jusqu'à obtention de petites particules de tendons. Ensuite, trois de ces particules par souris ont été placés sur un support spécifique composé de Fluorure de Baryum (BaF_2 , Eurolabo, France, 13 mm x 0,2 mm, Figure 30).



Figure 30 : Fenêtre BaF_2

Pour la troisième préparation, le tissu tendineux a été prélevé au niveau de la région proximale du tendon dorsal de la queue sur une longueur de 1 cm et des sections transversales ont été effectuées en utilisant un microtome et un cryostat. Pour la préparation au microtome, 3-4 échantillons par souris ($N = 2$) ont été intégrés dans une résine Epon/Araldite avant de les couper à une épaisseur de 5 μm . Pour la préparation au cryostat, 3 échantillons de tendon ont été sectionnés entre -20°C et -30°C sur une épaisseur de 20 μm . De plus, 3-4 échantillons de tendons d'Achille par souris ($N = 2$) ans ont été extraits et sectionnés avec un cryostat comme pour le tendon de la queue.

En parallèle, l'effet du processus de congélation sur la structure interne du tendon a été analysé sur les mêmes souris que pour la troisième préparation mais sur des tendons qui n'ont pas été préalablement stockée à -80°C . Ces échantillons ont été caractérisés avec le microtome (6 échantillons provenant de 2 souris) et le cryostat (3 échantillons d'une souris).

e) Analyse des échantillons pour la comparaison de WT et TIEG1 KO

Les tendons d'Achille et de la queue ont été extraits de deux souris WT et deux souris TIEG1 KO et des sections transversales de ces tendons ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (environ 3-4 sections par tendon). À la suite de la préparation des échantillons de tendons, les sections ont été montées sur une fenêtre BaF_2 avant l'acquisition de données. La reproductibilité a été obtenue avec trois acquisitions pour chaque échantillon.

Ensuite, la fenêtre BaF_2 , contenant les échantillons de tendon, a été placée sur la platine du microscope et une région d'intérêt (ROI) a été choisie sur l'échantillon en utilisant un objectif Cassagrainian (X15). Trois différentes ROI, représentée par une tâche circulaire, d'un diamètre de $100\ \mu\text{m}$, ont été analysés par échantillon (Figure 31). Les épaisseurs ont été mesurées par différences de hauteur entre la mise au point sur l'échantillon et sur la fenêtre BaF_2 . Pour chaque ROI, une représentation spectrale de la composition moléculaire a été obtenue représentant le niveau d'énergie absorbée par les liaisons chimiques présentes dans les tissus.

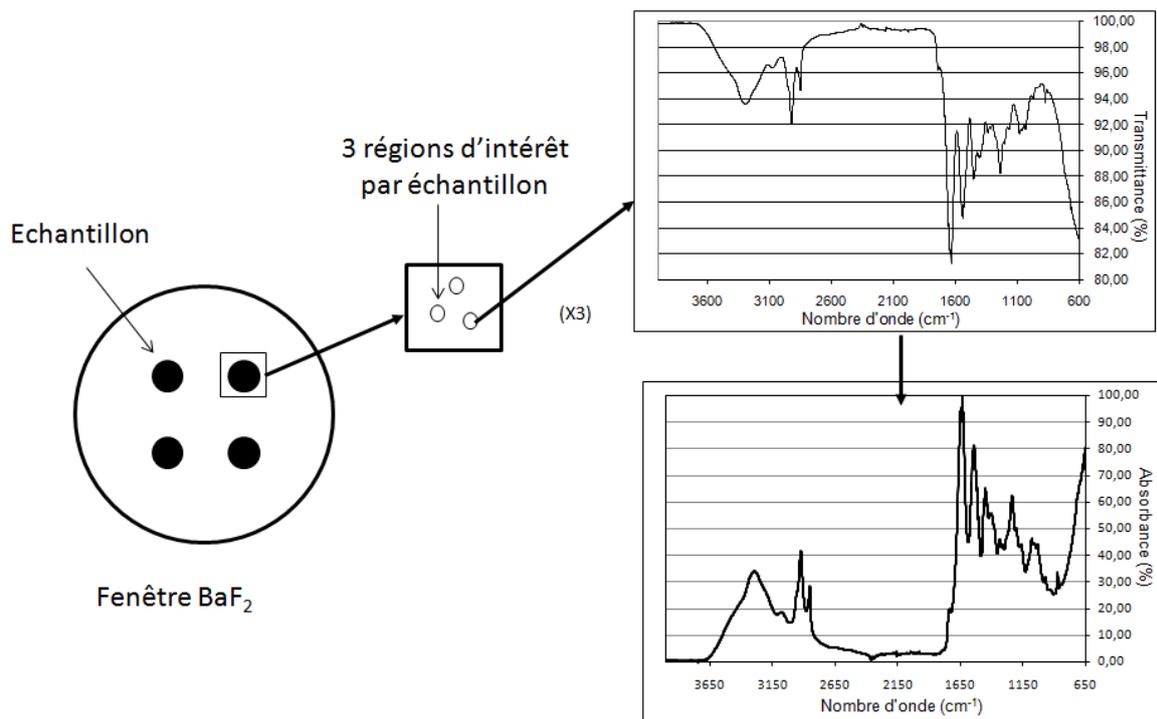


Figure 31 : Représentation d'un spectre infrarouge acquis dans la région d'intérêt

Les spectres ont été acquis avec 128 scans à une résolution de $2\ \text{cm}^{-1}$, sur une région de 650 à $4000\ \text{cm}^{-1}$, avec un background, correspondant au rapport entre le spectre récolté sur l'échantillon et le spectre de référence sur la fenêtre BaF_2 , donnant un spectre en pourcentage de transmittance (T). Ensuite, ce spectre de transmittance a été représenté en absorbance (Abs) avec l'équation suivante: $\text{Abs} = -\log(1 / T)$. La fonction d'apodisation Happ-Genzel a été utilisée et la forme de raie des spectres a été améliorée par une fonction « 2 levels of zero filling ». En outre, une correction ligne de base a été appliquée pour réduire la pente des spectres.

Les expérimentations de MIRTf ont été réalisées en collaboration avec le Dr Jean-Michel Bény de l'institut des sciences de la terre d'Orléans (UMR 6113).

Après avoir déterminé la composition moléculaire interne des échantillons tendineux par microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, la composition externe (en surface) de ces tendons a été analysée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

II. 5. *Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)*

a) Présentation de la technique

La spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet, via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. La spectrophotométrie dans l'infrarouge moyen est utilisée depuis de nombreuses années dans l'industrie pharmaceutique pour identifier directement les composés organiques et inorganiques purs. Les avantages majeurs de l'IRTF sont sa spécificité et son universalité. La spécificité réside dans le concept de « fréquences caractéristiques ». Les groupes fonctionnels absorbent à des fréquences relativement constantes, donnant ainsi la possibilité d'obtenir des informations structurales détaillées sur les molécules étudiées à partir de ces spectres. On peut donc considérer un spectre infrarouge comme l'empreinte unique d'un composé chimique. Dès lors, la concordance exacte entre le spectre d'un composé de structure connue et celui d'un composé analysé permet d'identifier ce dernier sans aucun doute possible. Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. A l'exception de quelques molécules telles que Cl₂, N₂ et O₂, toutes les espèces moléculaires absorbent dans l'infrarouge [Thèse d'Eric Ziemons, Université de Liège, 2007].

Les radiations infrarouges de fréquences comprises entre 4000 et 400 cm⁻¹ sont absorbées par une molécule en tant qu'énergie de vibration moléculaire. Il existe deux grands types de vibrations moléculaires : les élongations et les déformations [Sevhla G et al, 1976 ; Silverstein RM et al, 1998 ; Mohan J et al, 2000].

On définit une éloration (Figure 32) lorsque deux atomes s'associent pour former une liaison covalente, il s'établit un équilibre entre les forces d'attraction et de répulsion. La distance qui sépare les deux atomes est telle que l'énergie est minimale. La liaison va se comporter comme un oscillateur non-harmonique. En d'autres termes, les atomes vont se rapprocher et s'éloigner en fonction de la variation de la distance interatomique. C'est ainsi que deux atomes et leur liaison se traitent comme un simple oscillateur harmonique composé de deux masses reliées par un ressort.

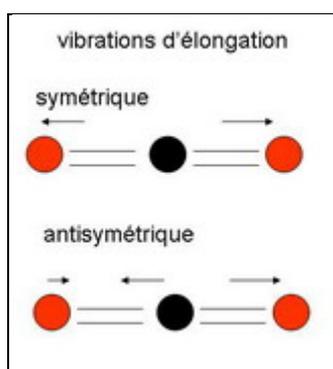


Figure 32 : Elongation de la molécule de CO_2

On définit une déformation (Figure 33) lorsque les vibrations de déformation angulaire consistent en une variation de l'angle formé entre deux liaisons successives ou en un mouvement d'un groupe d'atomes par rapport au reste de la molécule. Les vibrations de déformation peuvent s'effectuer dans le plan ou hors du plan et également de manière symétrique ou asymétrique.

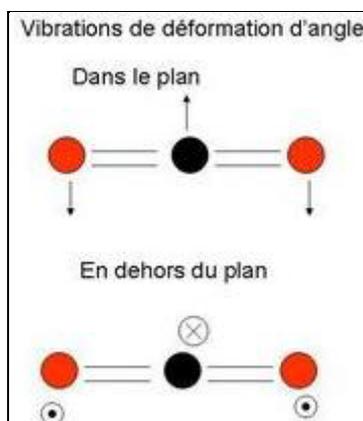


Figure 33 : Déformation de la molécule de CO_2

La position des bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse. Par conséquent pour un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau. L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités d'absorption.

b) Principe de l'analyse des spectres

Tout comme pour l'analyse de spectre de MIRTF, le spectre d'IRTF est tout d'abord sous une forme d'un interférogramme et est ensuite converti en un spectre infrarouge par une opération de transformée de Fourier.

Les informations extraites des spectres sont de deux sortes :

- Informations qualitatives : Les longueurs d'onde auxquelles l'échantillon absorbe, sont caractéristiques des composés organique présents dans le matériau analysé. Des tables permettent d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques présents. Le tableau 1 présente les bandes de vibrations caractéristiques des principales fonctions rencontrées dans les composés organiques.

- Informations quantitatives : L'intensité de l'absorption à la longueur d'onde caractéristique est reliée à la concentration du composé organique responsable de l'absorption. En mesurant l'aire du signal caractéristique on peut, si on connaît l'épaisseur de la couche, comparer la proportion d'un groupement chimique donné dans plusieurs échantillons ou si on a une composition constante avoir une idée de l'épaisseur des coupes les unes par rapport aux autres. Pour avoir une mesure absolue il convient d'étalonner auparavant les couches par une autre technique pour pouvoir établir une relation expérimentale entre intensité du signal et l'épaisseur.

Composé	Vibrations caractéristiques	Fréquence de vibration (cm ⁻¹)
Alcane	CH _x <i>stretching</i>	2950-2850
	CH _x <i>déformation</i>	1500-1400
Insaturé	CH _x <i>stretching</i>	3050-3000
	C=C <i>stretching</i>	1600-1500
	Aromatique substitué (CH)	1900-1700
	Aromatique <i>bending</i>	800-750
Alcool	OH <i>stretching</i>	3400 (large)
	C-O <i>stretching</i>	1050-1250
	OH <i>déformation</i>	(1 ^{aire} <2 ^{aire} <3 ^{aire} <Phénol)
Cétone	C=O <i>stretching</i>	1690-1680
Aldéhyde	H-C=O	2800-2650
	C=O <i>stretching</i>	1710-1700
Acide	OH (avec liaison hydrogène)	3200-2500 (large)
	C=O <i>stretching</i>	1725-1700
	C-O	1440-1395, 1320-1210
	OH <i>déformation</i>	950-900
Sel de l'acide	COO ⁻ <i>stretching antisymétrique</i>	1615-1650
	COO ⁻ <i>stretching symétrique</i>	1400-1300
Ester	C=O	1775-1720
	Aromatique	1250-1100
Amine	NH <i>stretching</i>	3400-3300 (1 ^{aire} >2 ^{aire})
	NH <i>déformation</i>	1650-1550 (1 ^{aire} >2 ^{aire} >Arom.)
	C-N <i>stretching</i>	1350-1250 (1 ^{aire} <2 ^{aire} <Arom.)
Amide	NH <i>stretching</i>	3350-3070 (1 ^{aire} >2 ^{aire})
	C=O	1680-1630
	NH <i>déformation</i>	1650-1515 (1 ^{aire} >2 ^{aire})
	C-N <i>stretching</i>	1180-1040 (1 ^{aire} <2 ^{aire})
Nitrile	C≡N	2250
Isocyanate	N=C=O	2275
Sulfone	S=O	1100-1000
	C-S <i>stretching</i>	740-690
	SO ₂	1380-1300
Halogénure	C-F	1400-1000
	C-Cl	1175-650
	C-Br	590-510
	C-I	525-485

Tableau 1 : Fréquences de vibrations des principales fonctions rencontrées dans les composés organiques (Biophyresearch)

c) Préparation et analyse des échantillons

Des fibres isolées du tendon dorsal de la queue (environ 10-15 fibres par queue) et des tendons d'Achille ont été extraits de deux souris WT et deux souris TIEG1 KO puis placés dans un tube pour les sécher. Ensuite, la réflexion totale atténuée (ATR) des échantillons, placés entre une presse et un support ZnSe (Séléniure de Zinc), a permis l'analyse de la

surface des échantillons par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier par le spectromètre Thermo Optek, Nicolet 710 (Figure 34).

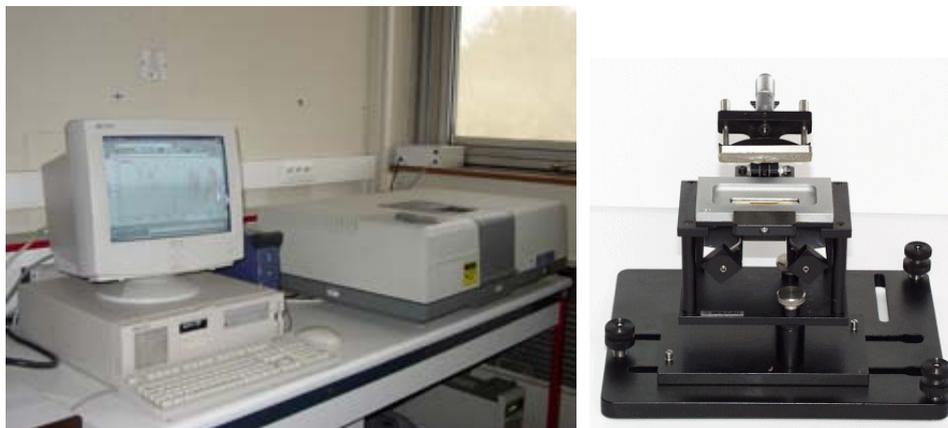


Figure 34 : A : Spectromètre Thermo Optek, Nicolet 710 du Centre de Recherche sur la Matière Divisée (CMRD) d'Orléans, B : Montage de réflexion totale atténuée (ATR) dans lequel les échantillons sont placés entre une presse et un support ZnSe.

d) Fonctionnement de l'appareil

Le faisceau infrarouge provenant de la source est dirigé vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente (Figure 35). Dans l'interféromètre, le faisceau lumineux arrive sur la séparatrice. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, le reste passe à travers la séparatrice et est dirigé sur le miroir mobile (ou oscillant). Quand les deux faisceaux se recombinent, des interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique (Biophyresearch, Educnet).

Ces expérimentations ont été réalisées en collaboration avec le Dr Samuel Guillot du centre de recherche sur la matière divisée d'Orléans (UMR 6619).

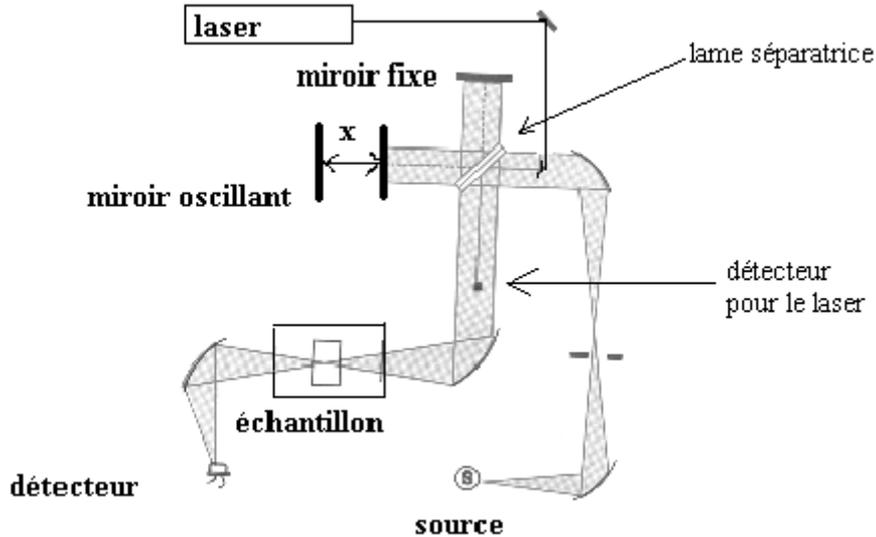


Figure 35 : Schéma du fonctionnement du Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier

Après avoir déterminé la composition moléculaire interne et externe, par microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, l'analyse de la composition chimique a été étudiée avec la technique de spectroscopie des photoélectrons XPS.

II. 6. Spectrométrie des photoélectrons aux rayons X

a) Présentation de la technique

La spectrométrie des photoélectrons XPS (X-Ray photoelectron spectrometry), anciennement nommée ESCA (electron spectroscopy for chemical analysis) est une méthode physique d'analyse chimique mise au point à l'université d'Uppsala (Suède) dans les années 1960, sous la direction de Kai Siegbahn, ce qui lui a valu le prix Nobel en 1981. La méthode est basée sur la détermination à haute résolution de l'énergie de liaison des électrons atomiques par l'effet photoélectrique sous l'irradiation d'une raie X monochromatique. L'intérêt de la technique résulte de la variation de ces énergies de liaisons, en fonction de l'environnement chimique des atomes et de leur degré d'oxydation. Il existe différentes sources de photons X. Elles diffèrent par leur énergie ou par la largeur de leur raie d'excitation. Les sources les plus communément utilisées sont l'aluminium et le magnésium.

Depuis deux décennies, la spectroscopie XPS s'est imposée comme un des outils principaux en analyse de surface, en raison de ses deux atouts majeurs : analyse quantitative et information sur la nature chimique des éléments. Ses limites de détection sont actuellement son manque de résolution latérale et sa relativement faible sensibilité (1% massique) dues au bruit de fond qui peut compromettre l'analyse dans la mesure où les pics de trop faible intensité ne pourront pas être distingués du fond continu. Le XPS permet de connaître la composition élémentaire (atomes), l'état électronique et chimique des éléments contenus dans les 10 premiers nanomètres de la surface d'un matériau. Le XPS peut être utilisé pour caractériser de petites surfaces sur une profondeur de quelques nanomètres pour tous types de solides: biomatériaux, constituants alimentaires, catalyseurs, céramiques, fibres, verres, métaux, minéraux, polymères, etc... Tous les éléments sont détectables, excepté l'hydrogène. Avant notre étude, la technique XPS n'avait jamais été utilisées sur des échantillons biologiques tels que les tendons.

b) Principe de la technique XPS

Un échantillon, introduit dans une chambre sous ultra haut vide, est irradié par des rayons X monochromatiques. Le XPS utilise la réflexion avec un faisceau qui pénètre de 10 nm en profondeur. En absorbant un photon, un atome reçoit une quantité d'énergie, il émet alors un électron afin de retrouver son état de stabilité initial. L'électron ainsi éjecté a pris la totalité de l'énergie du photon incident, pour se libérer de l'atome et acquérir une énergie cinétique (Figure 36).

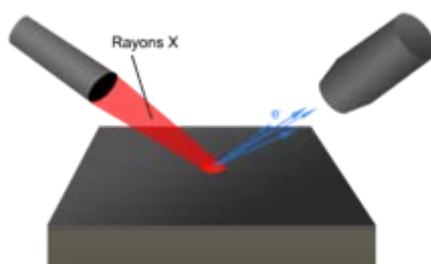


Figure 36 : Principe de la technique XPS

Cette énergie cinétique (exprimée en électron volts, eV) est mesurée, ce qui donne le spectre de l'intensité des électrons en fonction de l'énergie mesurée (Figure 37).

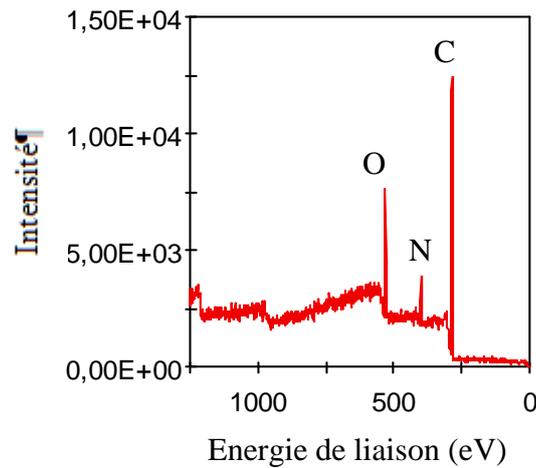


Figure 37 : Exemple de spectre d'intensité des électrons en fonction de l'énergie

Le spectre en énergie cinétique présente donc des pics, et on peut déterminer l'énergie de liaison correspondant à chaque pic par la relation d'Einstein :

$$E_L = h \cdot \nu - E_c \quad (\text{équation 2})$$

avec :

- E_L = Energie de liaison [J]
- E_c = Energie cinétique électronique [J]
- h = Constante de Planck [J s] ($\sim 6,6260755 \times 10^{-34}$)
- ν = Fréquence de radiation [s^{-1}]

On a finalement accès à la composition chimique de la surface du matériau analysé sur une profondeur de 10 nm environ, par comparaison avec des spectres connus. Des analyses semi-quantitatives peuvent être également extraites des spectres XPS normalisés en se basant sur l'intégrale des pics.

c) Préparation des échantillons

Trois souris WT et trois TIEG1 KO ont été utilisées pour ces expériences. Les fibres isolées du tendon dorsal de la queue (environ 10-15 fibres par queue) et les tendons d'Achille

ont été extraits des mêmes souris. Après différents essais, nous avons pu constater que, pour obtenir des résultats reproductibles, les fibres devaient être tressées, par rotation, pour former un échantillon compact à analyser au XPS. Tous les échantillons ont ensuite été séchés entre deux lames de verre. Enfin, les tresses de fibres et les tendons d'Achille ont été analysés en utilisant un spectromètre Thermo Electron (Figure 38), afin de déterminer la composition chimique de la surface de ces échantillons (% de carbone (C), % d'azote (N), % d'oxygène (O), etc ...).

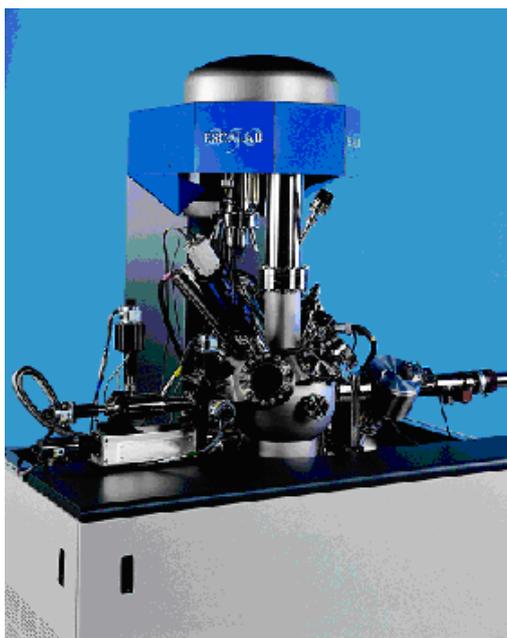


Figure 38 : Spectromètre XPS Thermo Electron du Centre de Recherche sur la Matière Divisée (CMRD) d'Orléans (<http://www.sciencefrance.com>)

Ce spectromètre présente une très haute résolution spatiale (XPS : < 20 micromètres). Il possède un monochromateur microconcentré, une source X aluminium (Al : 1486,6eV) et magnésium (Mg : 1253,6 eV) (sans monochromateur ; largeur 0,8 eV), un détecteur hémisphérique de résolution $\pm 0,2$ eV et un vide limite de 10^{-10} mBar avec une pompe ionique à sublimateur Titane. La température de l'échantillon est variable (de 100 à 500 K) et la surface analysée est de $15 \mu\text{m}$ à 15mm^2 .

Les expérimentations XPS ont été réalisées en collaboration avec le Dr Roland Benoit du centre de recherche sur la matière divisée d'Orléans (UMR 6619).

d) Analyses statistiques

Des tests t non appariés ont été réalisés avec le logiciel Statgraphics 5,0 (Sigma Plus, Maryland, USA) pour comparer les pourcentages en carbone, oxygène et azote entre les souris WT et TIEG1 KO avec un intervalle de confiance de 95%.

Chapitre 3 : Résultats

I. Synchrotron

a) *Analyse des spectres de diffraction aux rayons X*

La figure 39 montre les résultats des spectres de diffraction aux rayons X obtenu pour les souris WT (Figure 39, A) et pour les souris TIEG1 KO (Figure 39, B). Les fibres tendineuses provenant du même génotype (TIEG1 KO vs WT) ont montré les mêmes spectres de diffraction aux rayons X. La comparaison entre les spectres de diffraction obtenu pour WT et TIEG1 KO ont montré des différences significatives, ce qui reflète une organisation de la structure des fibrilles différente entre les souris WT et TIEG1 KO.

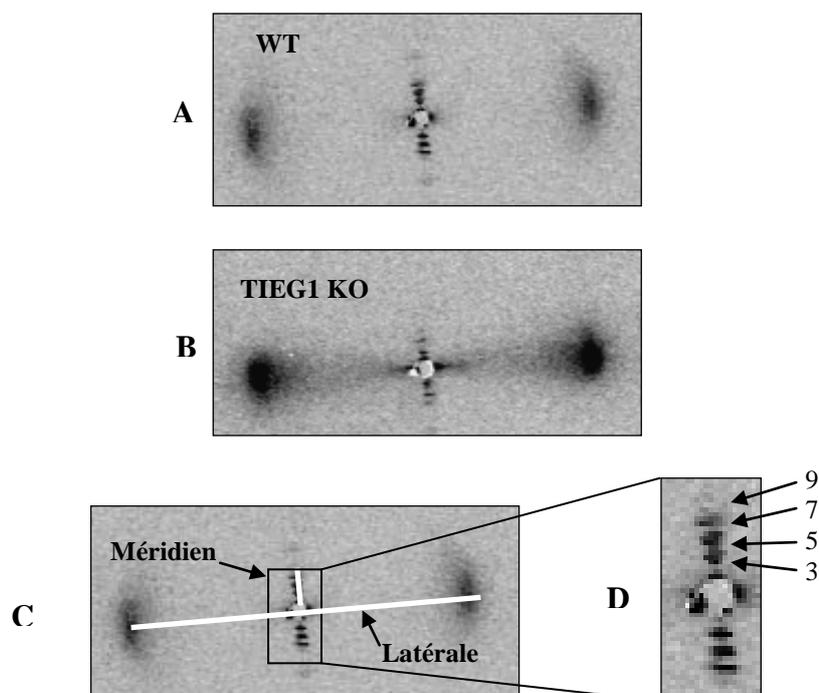


Figure 39: Spectres de diffraction aux rayons X obtenus pour une fibre tendineuse WT (A) et TIEG1 KO (B). C: Profils placés le long du méridien et de la direction latérale. D: Ordre des pics représenté sur le profil d'intensité des rayons X le long du méridien.

A partir de ces spectres de diffraction, deux analyses ont été effectuées. Une première analyse le long du méridien, elle a permis d'obtenir des profils d'intensité qui ont été comparés entre les échantillons WT et TIEG1 KO. Une seconde analyse le long de la

direction latérale permettant de déterminer des modifications d'organisation de la triple hélice de collagène.

b) Analyse des spectres de diffraction le long du méridien

La figure 40 illustre les profils d'intensité obtenus le long du méridien (Fig. 39, C) et associés avec les spectres de diffraction aux rayons X des figures 39A et 39B. Les séries de pics d'intensité correspondent à des ordres différents (de 3 à 9) de la périodicité caractéristique du collagène (Figure 39, D). Pour les fibres tendineuses WT, la plus haute intensité est observée pour le pic de sixième ordre, alors qu'il correspond au cinquième ordre pour les fibres TIEG1 KO. De plus, les fibres du tendon TIEG1 KO ont une plus grande période ($D = 673 \text{ \AA}$) par rapport au WT ($D = 650 \text{ \AA}$). Les pics d'intensité sont étiquetés avec un numéro correspondant à l'ordre du pic obtenu dans les spectres de diffraction aux rayons X. La distance entre deux pics représente la période D .

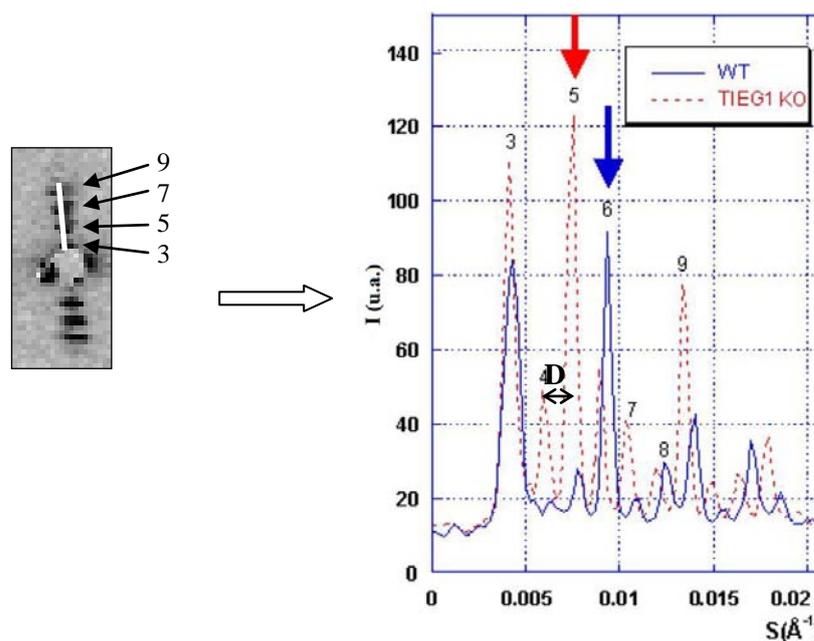


Figure 40: Intensité des rayons X (I) le long du méridien pour les fibres tendineuses WT et TIEG1 KO, représenté en unités arbitraires (u.a.), en fonction du vecteur d'onde (S) qui correspond au déplacement angulaire du faisceau.

c) Analyse des spectres de diffraction le long du profil latéral

Les spectres de diffraction aux rayons X pour les souris TIEG1 KO laissent apparaître une forme caractéristique diffuse de "papillon" qui n'apparaît pas pour les souris WT (Figure 41). Ce résultat de l'analyse latérale a montré une importante désorganisation du réseau de collagène au sein de la triple hélice pour les souris TIEG1 KO par rapport aux souris WT.

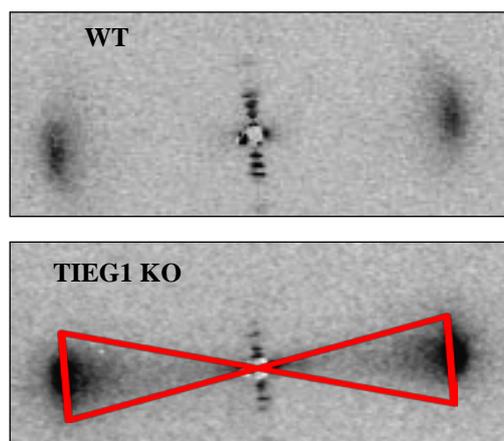


Figure 41 : Spectres de diffraction aux rayons X.

II. Dosage hydroxyproline

La figure 42 résume l'ensemble des résultats de dosage d'hydroxyproline qui représente 13% du collagène contenu dans les tendons. Pour les tendons de queue, des différences significatives ($P < 0,001$) entre WT et TIEG1 sont obtenues à 1 et 3 mois alors qu'à 8 mois il n'y a pas de différences.

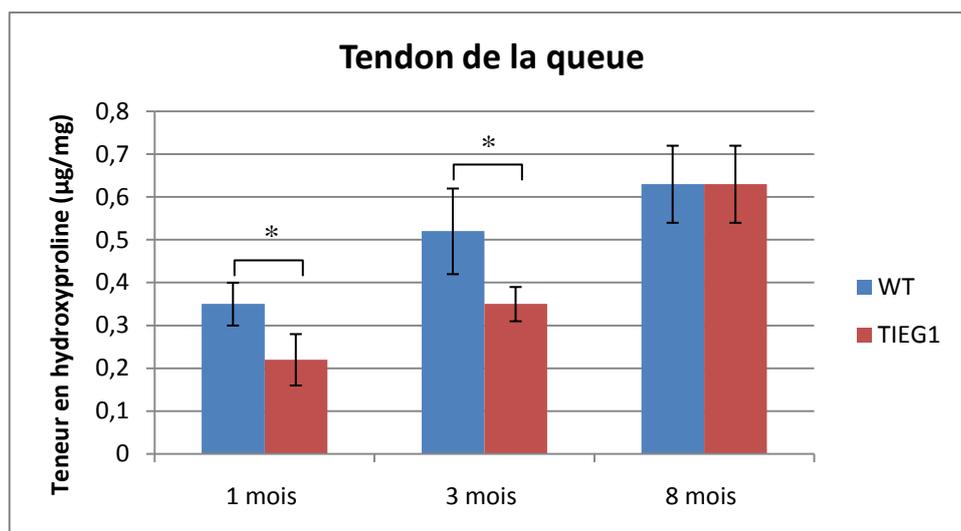


Figure 42 : Moyenne \pm SD de la teneur en hydroxyproline (en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tendon) contenu dans le tendon dorsal de la queue des souris WT ou TIEG1 KO femelle âgées de 1, 3 et 8 mois.

(* $P < 0,001$)

Pour les tendons d'Achille (Figure 43), la concentration d'hydroxyproline à 1 et 3 mois est significativement supérieure ($P < 0,001$) dans les tendons WT par rapport à TIEG1 KO, comme pour les tendons de la queue mais avec une différence significativement plus importante. À 8 mois, on observe une quantité d'hydroxyproline plus importante dans les tendons d'Achille issus des souris TIEG1 KO par rapport aux tendons WT, soit une inversion par rapport à 1 et 3 mois.

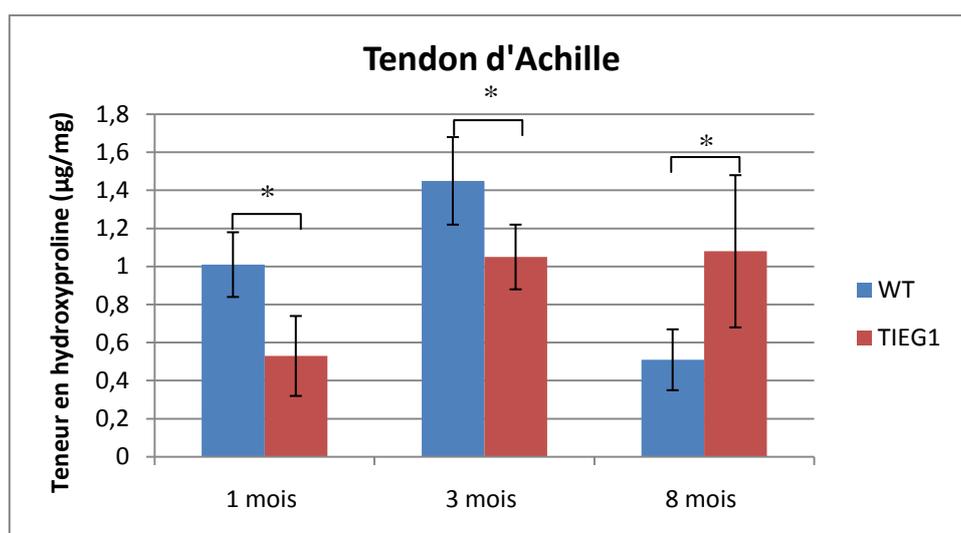


Figure 43 : Moyenne \pm SD de la teneur en hydroxyproline (en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tendon) contenu dans le tendon d'Achille des souris WT ou TIEG1 KO femelle âgées de 1, 3 et 8 mois.

(* $P < 0,001$)

La comparaison entre les tendons d'Achille et de la queue des souris WT (Figure 44) montre une teneur en hydroxyproline significativement plus importante ($P < 0,001$) pour les tendons d'Achille à 1 et 3 mois et ne montre pas de différence à 8 mois.

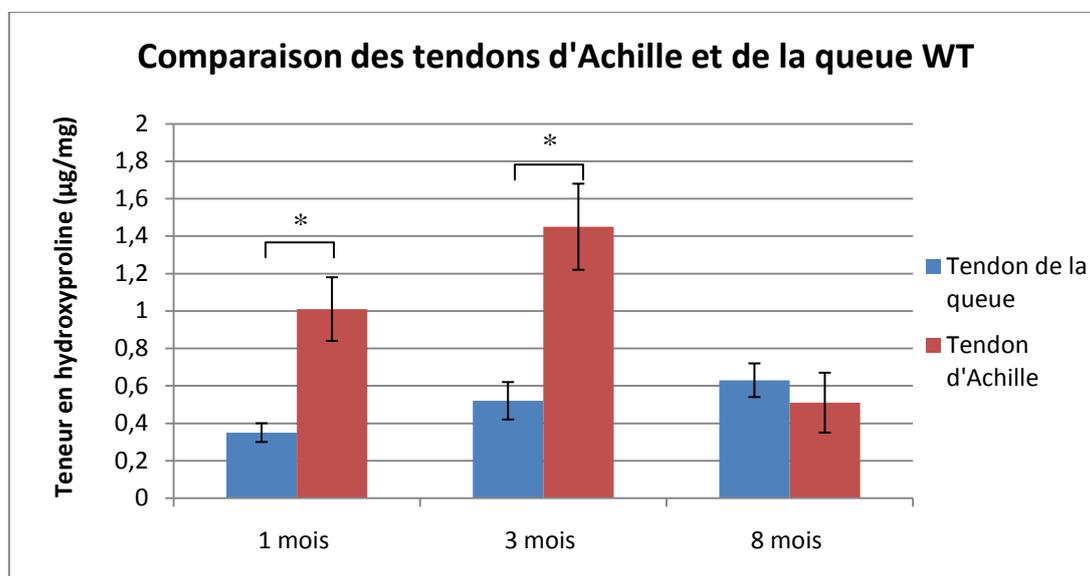


Figure 44 : Moyenne \pm SD de la teneur en hydroxyproline (en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tendon) contenu dans le tendon de la queue et d'Achille des souris WT femelle âgées de 1, 3 et 8 mois.

(* $P < 0,001$)

La comparaison entre les tendons d'Achille et de la queue des souris TIEG1 KO (Figure 45) montre une teneur en hydroxyproline significativement plus importante ($P < 0,001$) pour les tendons d'Achille à 1, 3 et 8 mois.

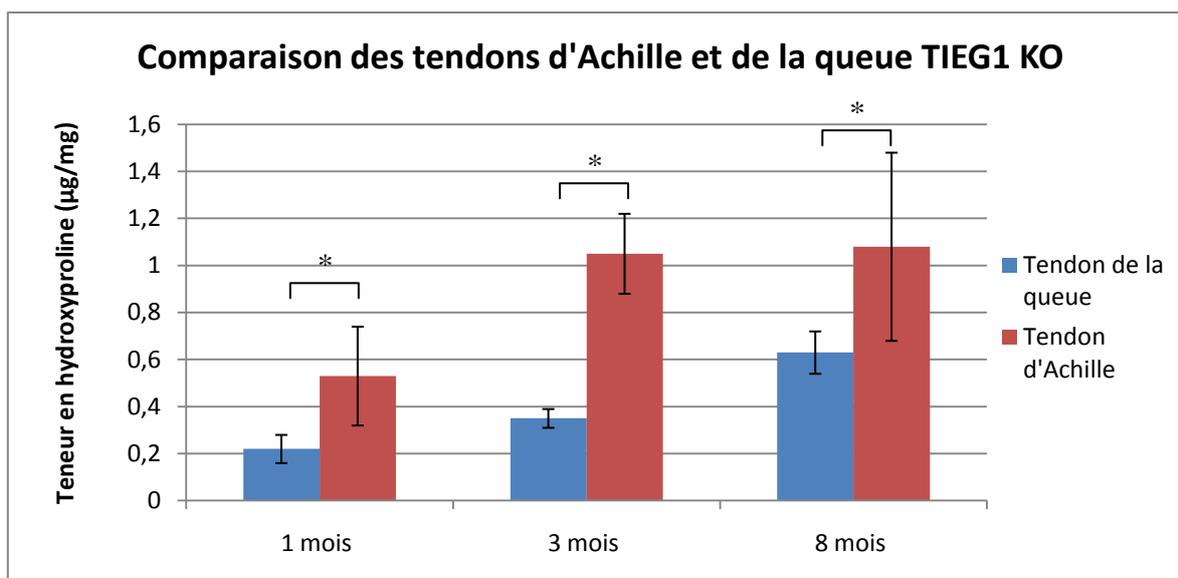


Figure 45 : Moyenne de la teneur en hydroxyproline (en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tendon) contenu dans le tendon de la queue et d'Achille des souris TIEG1 KO femelle âgées de 1, 3 et 8 mois.
(* $P < 0,001$)

III. Analyse de l'expression des gènes par qRT-PCR

L'analyse de l'expression des gènes a révélé que les gènes de la matrice extracellulaire sont plus ou moins régulés en fonction de l'âge des souris et des différents gènes étudiés (Figure 46). Le ratio de l'expression des gènes est analysé par le calcul de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ qui quantifie la variation de l'expression du gène d'intérêt sur les souris transgéniques TIEG1 KO par rapport aux souris WT. Si le ratio est inférieur à 1, le gène est moins exprimé dans les fibroblastes TIEG1 KO par rapport aux contrôles WT. Si le ratio est supérieur à 1, le gène est plus exprimé dans les fibroblastes TIEG1 KO par rapport aux contrôles WT. Pour un ratio proche de 1, l'expression est la même entre les fibroblastes TIEG1 KO et WT. Les gènes étudiés sont la fibromoduline (Fmod), le lumican (Lum), la laminine beta-1 (Lamb1-1), le collagène de type I (Col1a2), la décorine (Dcn) et la lysyl oxydase (Lox).

Pour les souris de 1 mois, les résultats de qRT-PCR ont révélé que tous les gènes étudiés sont moins exprimés dans les fibroblastes TIEG1 KO par rapport aux contrôles WT avec un ratio d'expression significativement ($P < 0,05$) inférieur à 1.

Pour les souris de 3 mois, les résultats de qRT-PCR ont révélé, de façon significative ($P < 0,05$), que le lumican, la laminine beta1-1 et la décorine ont une expression moins

importante dans les fibroblastes TIEG1 KO par rapport aux témoins WT, alors que l'expression du collagène I et de la lysyl oxydase est significativement supérieure ($P < 0,05$) pour les fibroblastes TIEG1 KO par rapport aux contrôles WT. L'expression du gène de la fibromoduline est similaire pour les fibroblastes WT et TIEG1 KO avec un ratio proche de 1.

Pour les souris de 8 mois, la fibromoduline, le lumican, la laminine beta 1-1, la décorine et la lysyl oxydase sont moins exprimés dans les fibroblastes TIEG1 KO par rapport aux contrôles WT alors que l'expression du collagène I est similaire entre les fibroblastes WT et TIEG1 KO.

De plus, et comme contrôle de la qRT-PCR, l'expression de TIEG1 (Klf10) a été analysée dans les fibroblastes WT et TIEG1 KO de 1, 3 et 8 mois mais n'a pas été détectée dans les fibroblastes TIEG1 KO, ce qui permet de valider l'absence du gène TIEG1 pour nos souris TIEG1 KO.

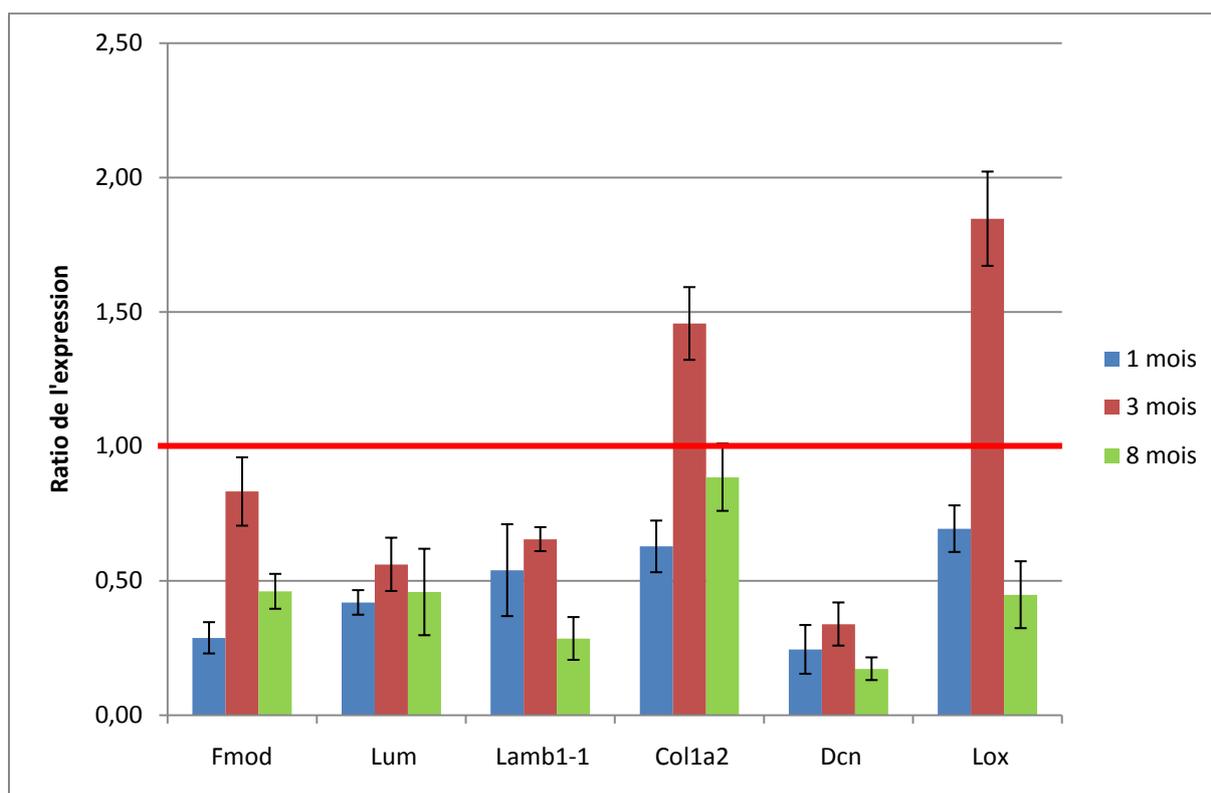


Figure 46 : Ratio de l'expression des gènes entre les fibroblastes WT et TIEG1 KO analysés par qRT-PCR en temps réel calculé par la méthode de calcul $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Les gènes étudiés sont la fibromoduline (Fmod), le lumican (Lum), la laminine beta-1 (Lamb1-1), le collagène de type I (Col1a2), la décorine (Dcn) et la lysyl oxydase (Lox).

IV. Microspectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (MIRTF)

a) *Détermination du protocole d'utilisation de la MIRTF*

La première méthode de préparation des tendons (fibres tendineuses isolées) n'a pas donné de longueurs d'ondes caractéristiques pour les fibres placées sur la fenêtre BaF₂. Les échantillons n'ont pas pu être examinés en transmission, probablement dû à l'épaisseur des fibres du tendon, + ou - 100 µm, ce qui a entraîné la saturation du spectre.

En effet, la microspectroscopie infrarouge, qui est une expérience de transmission, nécessite l'utilisation de tissus plus minces en raison de la radiation infrarouge qui traversent l'échantillon. Ainsi, pour diminuer l'épaisseur de l'échantillon, les fibres tendineuses broyées en petites particules ont donné des épaisseurs comprise entre 9 et 29 µm. Cette méthode de préparation des échantillons a permis d'obtenir une répartition spectrale de la composition chimique. La figure 47 montre l'absorbance en fonction de la longueur d'onde pour deux particules tendineuses extraites de deux souris WT.

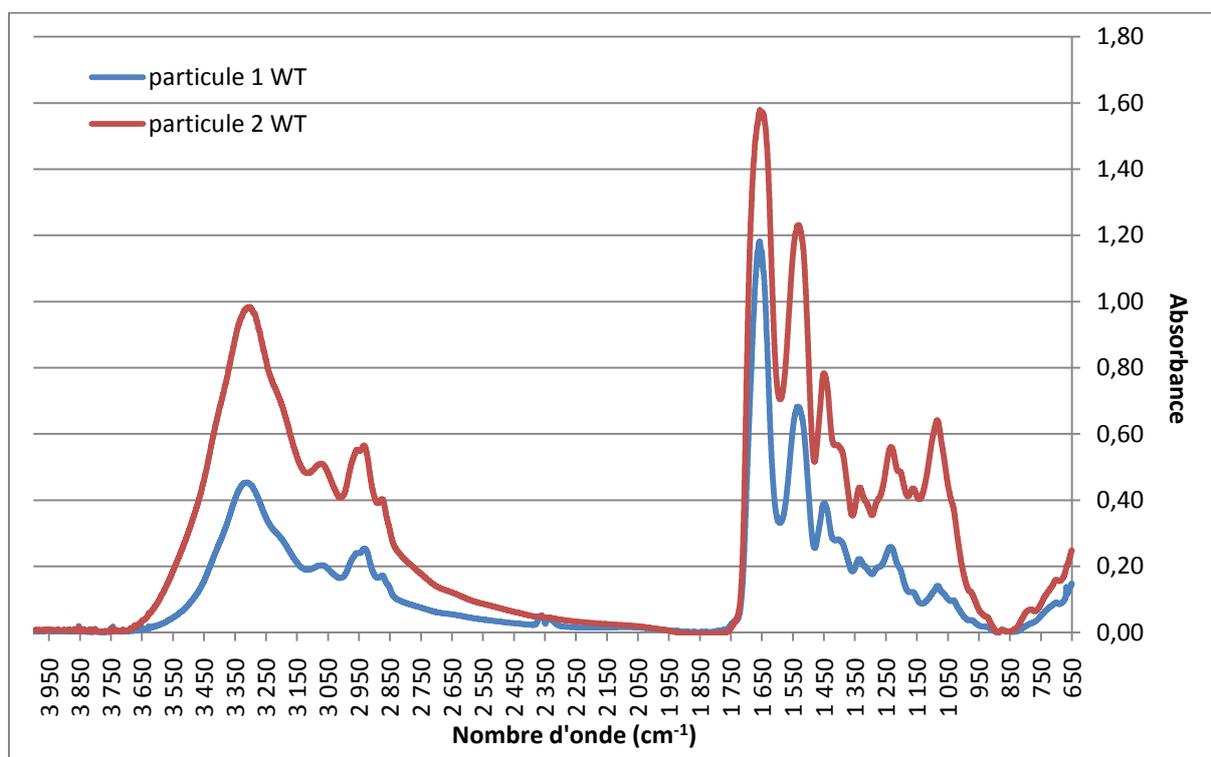


Figure 47 : Distribution spectrale représentant la composition chimique de deux particules provenant de fibres de tendons de la queue à partir de deux souris WT obtenues par broyage des tissus.

Bien que cette technique de préparation des échantillons semble bien fonctionner pour l'obtention de données sur la composition chimique par l'analyse MIRTf, il est très difficile d'obtenir une reproductibilité de l'épaisseur des particules de tendon et la comparaison de particules de tendons isolées de souris différentes est difficile.

Par conséquent, des coupes au microtome et au cryostat ont été réalisées afin d'obtenir des échantillons de tendon de mêmes épaisseurs, ce qui a permis de comparer de manière précise la répartition spectrale de la composition chimique entre des échantillons provenant de tendons différents. La figure 48 illustre la distribution spectrale des groupes fonctionnels pour les échantillons tendineux sectionnés avec un microtome et un cryostat.

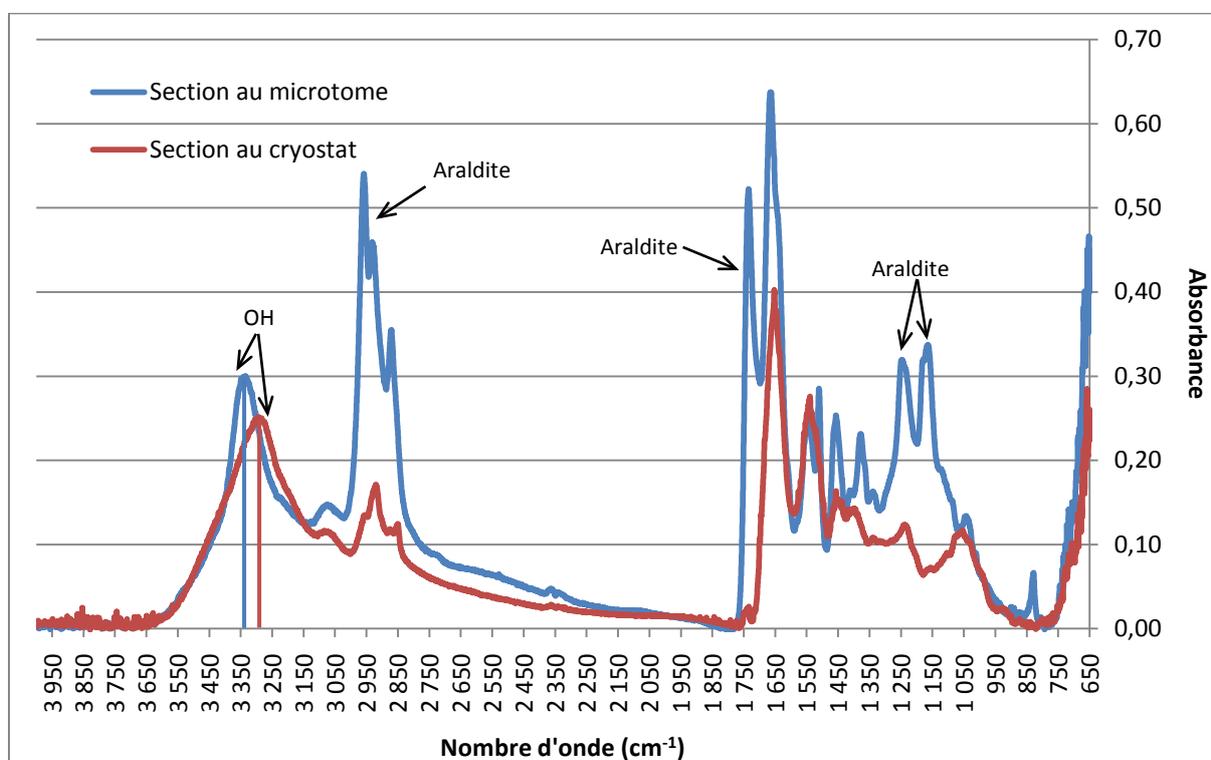


Figure 48 : Distribution spectrale des groupes fonctionnels pour les sections de fibres de tendon préparés en utilisant un microtome ou un cryostat.

Les sections des tendons effectués à l'aide d'un microtome ont permis d'obtenir des sections de faibles épaisseurs (entre 3 et 7 μm), tandis que la variabilité des épaisseurs des tissus sectionnés avec le cryostat est plus variable (entre 8 et 44 μm). Cependant, les spectres obtenus avec la technique cryostat sont semblables à ceux obtenus à partir des particules de tendon. Un autre fait intéressant, un décalage d'environ 50 cm^{-1} du nombre d'onde pour le pic

OH a été détecté pour la section microtome révélant des changements dans la composition moléculaire induite par cette préparation. En outre, la préparation au microtome a également montré la présence de pics supplémentaires autour de 3000 cm^{-1} et également entre 1730 cm^{-1} et 1100 cm^{-1} , qui sont dues à la présence de la résine araldite et qui provoque un chevauchement de pics au niveau de l'absorbance du tissu (Figure 49). Ainsi, il n'est pas possible de comparer la répartition spectrale entre les échantillons de tendon préparé avec un microtome.

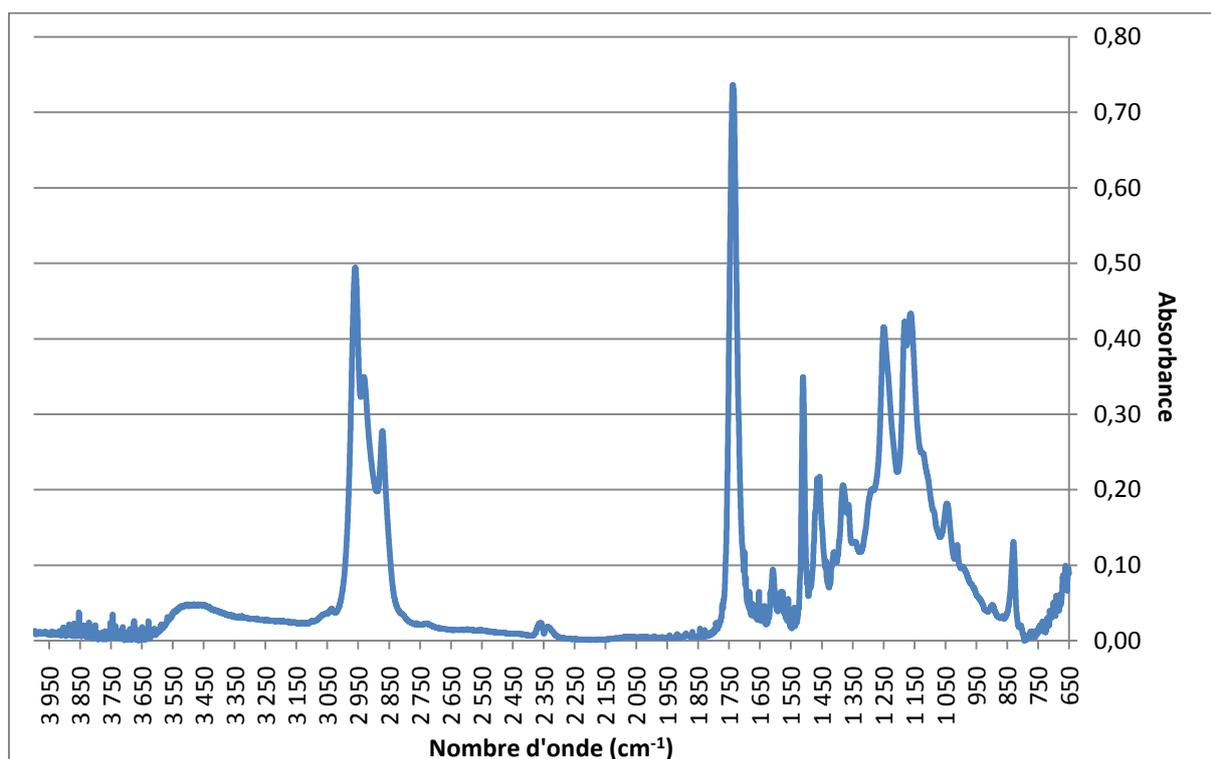


Figure 49 : Spectre représentatif de la résine Araldite

La comparaison des spectres obtenus à partir de tissus tendineux qui étaient préalablement congelé à -80°C ou préparés à partir d'échantillons frais, a révélé des spectres identiques, mais le processus de congélation entraîne une diminution significative de la hauteur des spectres de la composition moléculaire (Figure 50).

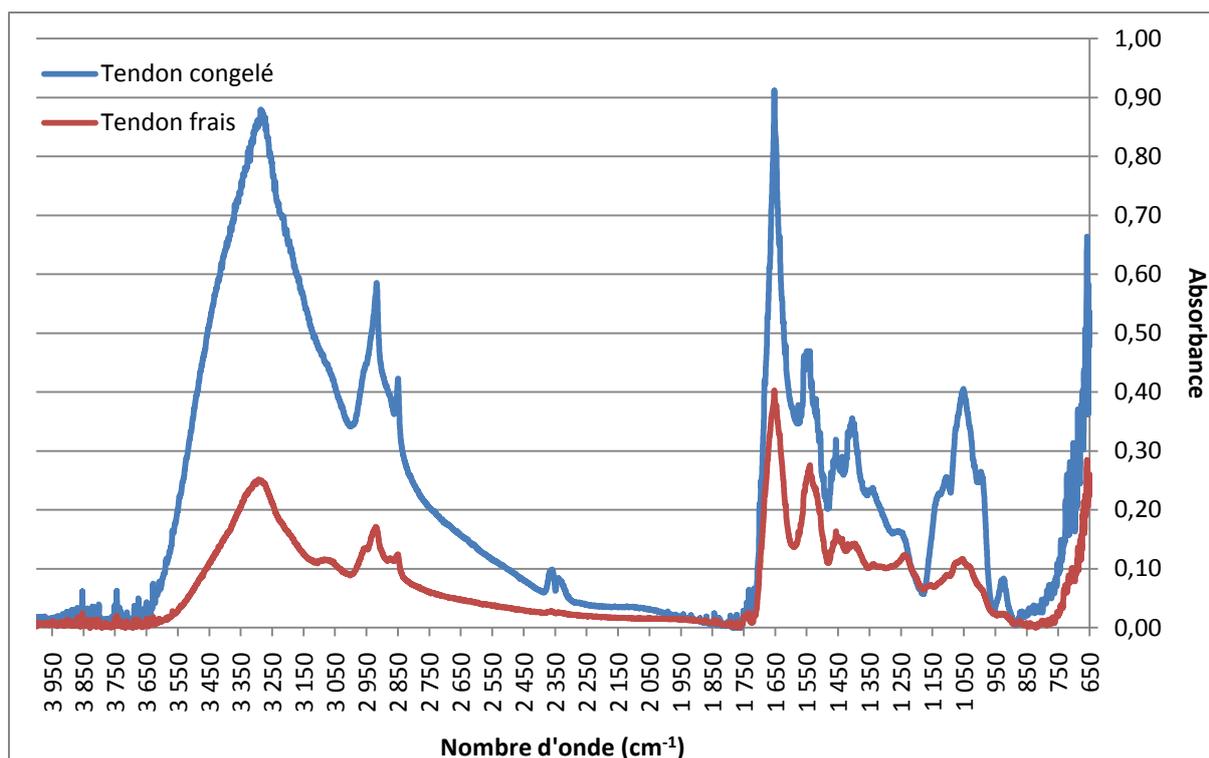


Figure 50 : Comparaison des spectres obtenus à partir d'échantillons de tendon de la queue frais ou congelé sectionné avec un cryostat.

b) Comparaison entre le tendon d'Achille et le tendon dorsal de la queue

➤ Composition moléculaire des tendons WT

La figure 51 représente la répartition spectrale obtenue pour les tendons d'Achille et de queue issus des souris WT et préparés en utilisant les sections au cryostat. L'analyse des sections de tendon d'Achille a révélé une augmentation de la composition moléculaire par rapport au tendon de la queue dans la région de l'« empreinte digitale », pour les amides I (1650 cm^{-1}) et II (1550 cm^{-1}), ainsi que dans la région des « groupes fonctionnels » avec une légère augmentation accompagnée d'un décalage du pic des OH (de 3200 à 3400 cm^{-1}). Un changement de nombre d'onde étant détecté pour le pic des OH indique une composition moléculaire différente entre les tendons contraints (tendon d'Achille) et non contraints (tendon de la queue) pour les souris WT.

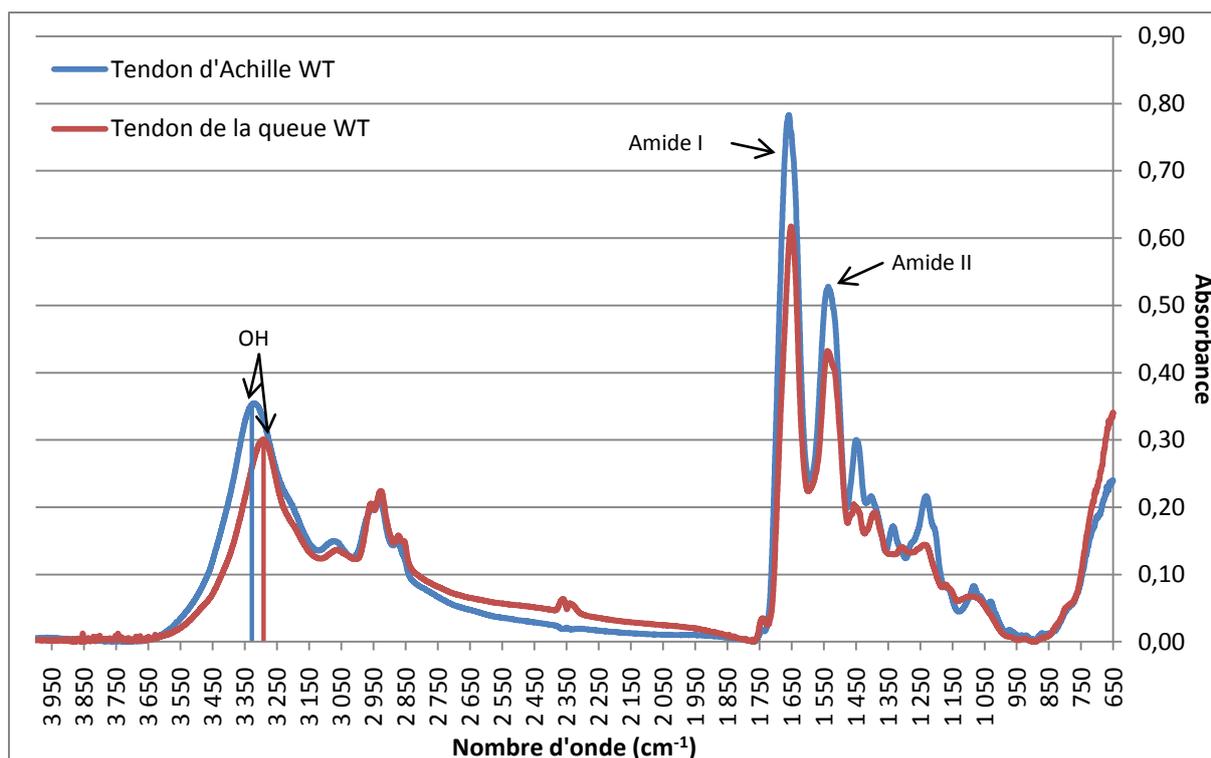


Figure 51 : Comparaison de la composition moléculaire du tendon d'Achille et de la queue issus des souris WT et sectionné avec un cryostat.

➤ Composition moléculaire des tendons TIEG1 KO

La comparaison entre le tendon d'Achille et de la queue pour les souris TIEG1 KO (Figure 52) a révélé une augmentation de la composition moléculaire pour tendon de queue par rapport au tendon d'Achille TIEG1 KO dans la région de l'« empreinte digitale », pour les doubles liaisons CO (de 1650 à 1820 cm^{-1}), les amides I (1650 cm^{-1}) et II (1550 cm^{-1}), ainsi que dans la région des « groupes fonctionnels » avec une augmentation du pic des OH (de 3200 à 3400 cm^{-1}), des liaisons CH insaturées (3000 cm^{-1}) et des liaisons CH_2 (2800 à 3000 cm^{-1}).

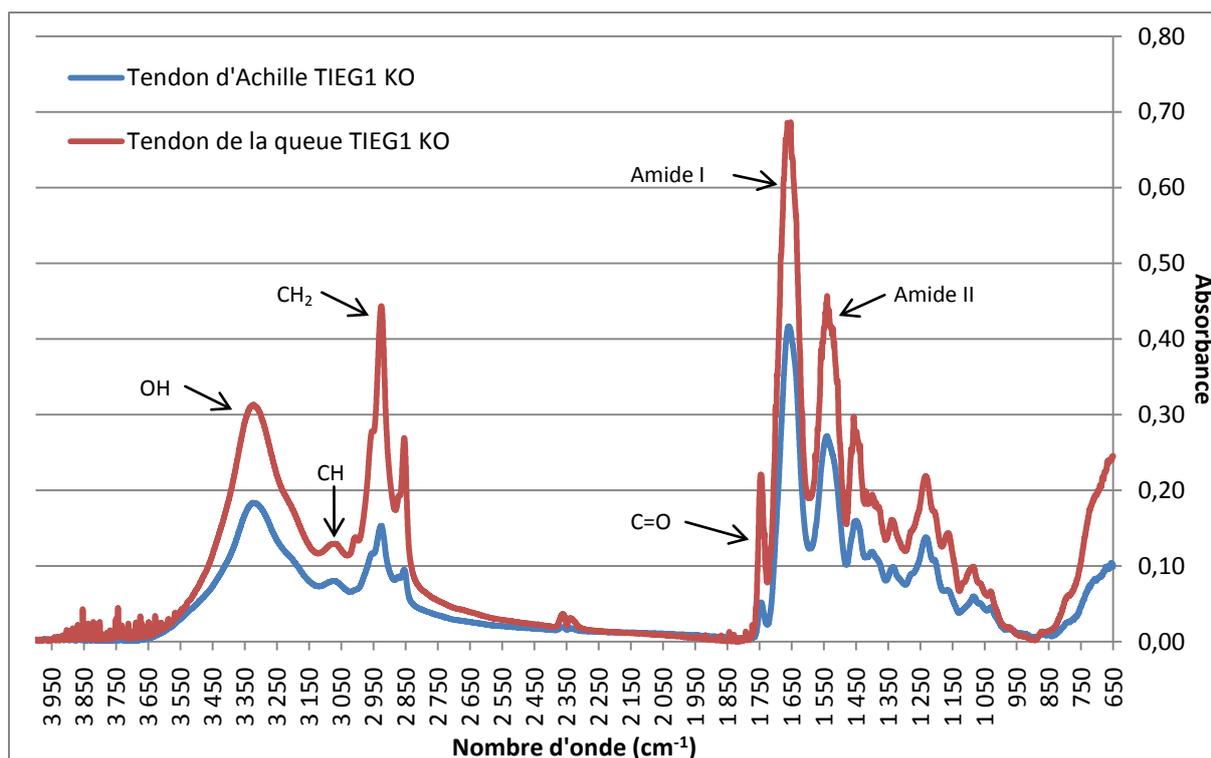


Figure 52 : Comparaison de la composition moléculaire du tendon d'Achille et de la queue issus des souris TIEG1 KO et sectionné avec un cryostat.

c) *Comparaison entre les souris WT et TIEG1 KO*

➤ *Composition moléculaire des tendons d'Achille*

La comparaison entre les tendons d'Achille issus des souris WT et TIEG1 KO (Figure 53) a révélé une composition moléculaire plus importante pour le tendon d'Achille WT par rapport au tendon d'Achille TIEG1 KO. Les augmentations se situent dans la région de l'« empreinte digitale », pour les doubles liaisons CO (de 1650 à 1820 cm^{-1}), les amides I (1650 cm^{-1}) et II (1550 cm^{-1}), ainsi que dans la région des « groupes fonctionnels » avec une augmentation du pic des OH (de 3200 à 3400 cm^{-1}), des liaisons CH insaturées (3000 cm^{-1}) et des liaisons CH₂ (2800 à 3000 cm^{-1}).

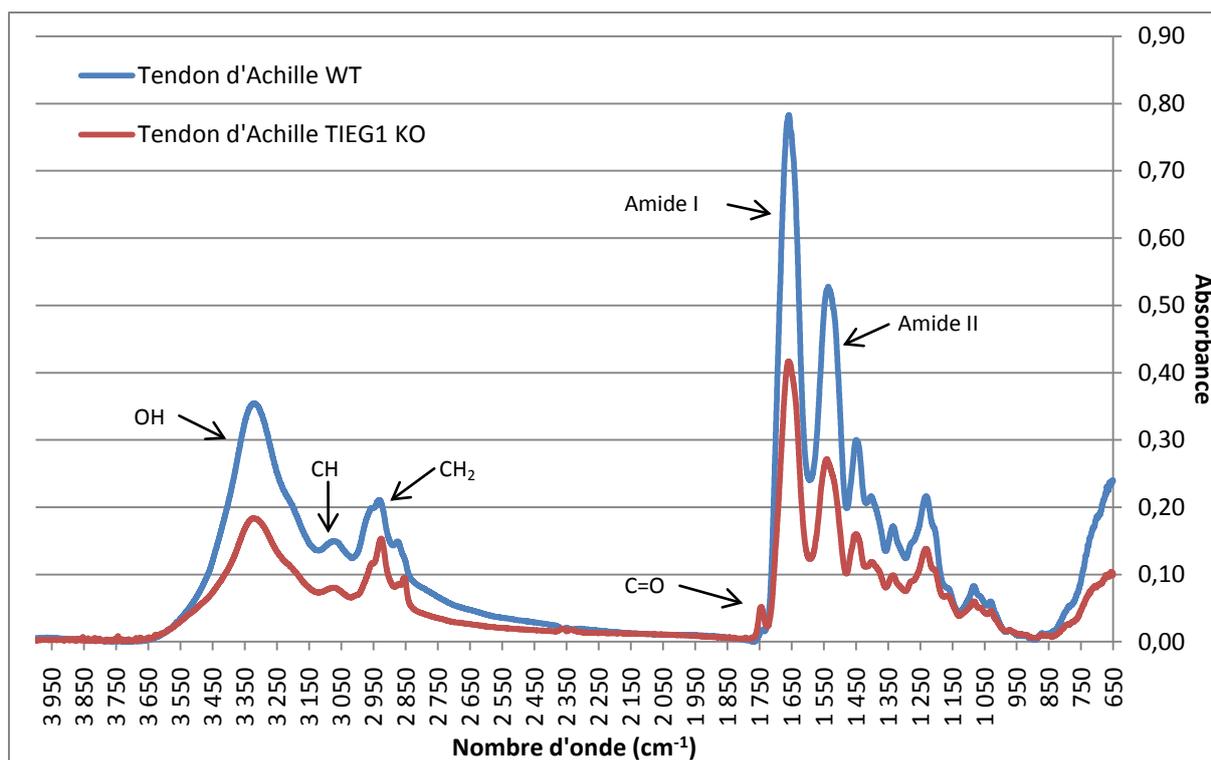


Figure 53 : Comparaison de la composition moléculaire des tendons d'Achille issus des souris WT et TIEG1 KO et sectionnés avec un cryostat.

➤ Composition moléculaire des tendons de la queue

La comparaison entre les tendons de la queue issus des souris WT et TIEG1 KO (Figure 54) a révélé une composition moléculaire légèrement plus importante pour le tendon de la queue TIEG1 KO par rapport au tendon de la queue WT. Les augmentations se situent dans la région de l'« empreinte digitale » au niveau des doubles liaisons CO (de 1650 à 1820 cm^{-1}), ainsi que dans la région des « groupes fonctionnels » avec une augmentation des liaisons CH_2 (2800 à 3000 cm^{-1}). On peut aussi visualiser un changement du nombre d'onde (décalage du pic) détecté pour le pic des OH indiquant une composition moléculaire différente entre les tendons de la queue WT et TIEG1 KO.

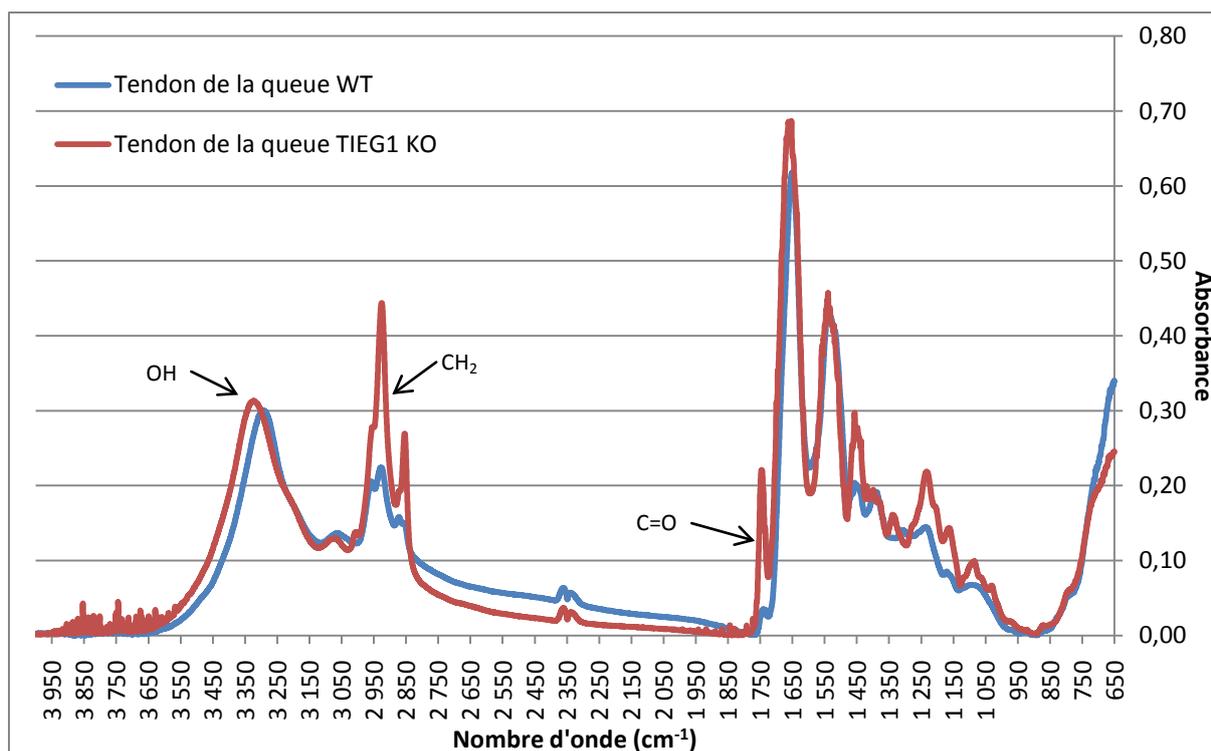


Figure 54 : Comparaison de la composition moléculaire des tendons de la queue issus des souris WT et TIEG1 KO et sectionnés avec un cryostat.

d) Résumé des résultats de MIRTF

Le tendon d’Achille (TA) WT présente un nombre de liaison moléculaire plus important que le tendon d’Achille TIEG1 KO. Pour le tendon de la queue (TQ), la composition moléculaire est légèrement plus importante pour le tendon TIEG1 KO que pour le tendon WT. De plus, la comparaison entre ces deux types de tendon (tendon de la queue *versus* tendon d’Achille) montre une augmentation des liaisons moléculaires pour le tendon d’Achille des souris WT et une augmentation de ces liaisons pour le tendon de la queue des souris TIEG1 KO (Tableau 2).

Comparaison entre les génotypes	Comparaison entre les types de tendon
TA _{WT} > TA _{TIEG1_KO}	TA _{WT} > TQ _{WT}
TQ _{TIEG1_KO} > TQ _{WT}	TQ _{TIEG1_KO} > TA _{TIEG1_KO}

Tableau 2 : Comparaison des compositions moléculaires entre le tendon d’Achille (TA) et le tendon dorsal de la queue (TQ) des souris WT et TIEG1 KO analysés par MIRTF.

V. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

a) Comparaison entre le tendon d'Achille et le tendon dorsal de la queue

La comparaison entre le tendon d'Achille et le tendon de la queue pour un même génotype a révélé une augmentation de la quantité de groupements NH (de 3300 à 3500 cm^{-1}), OH (3100 à 3500 cm^{-1}) et des CH insaturés (autour de 3000 cm^{-1}) pour le tendon de la queue que ce soit pour les souris WT (Figure 55) ou TIEG1 KO (Figure 56).

L'absorbance au niveau des CH_2 (2800 à 3000 cm^{-1}), de la double liaison CO (de 1650 à 1820 cm^{-1}), de la liaison CO (1100 à 1300 cm^{-1}) et de la fonction alcool (1000 à 1100 cm^{-1}) a augmenté pour le tendon d'Achille par rapport au tendon de la queue pour les 2 génotypes.

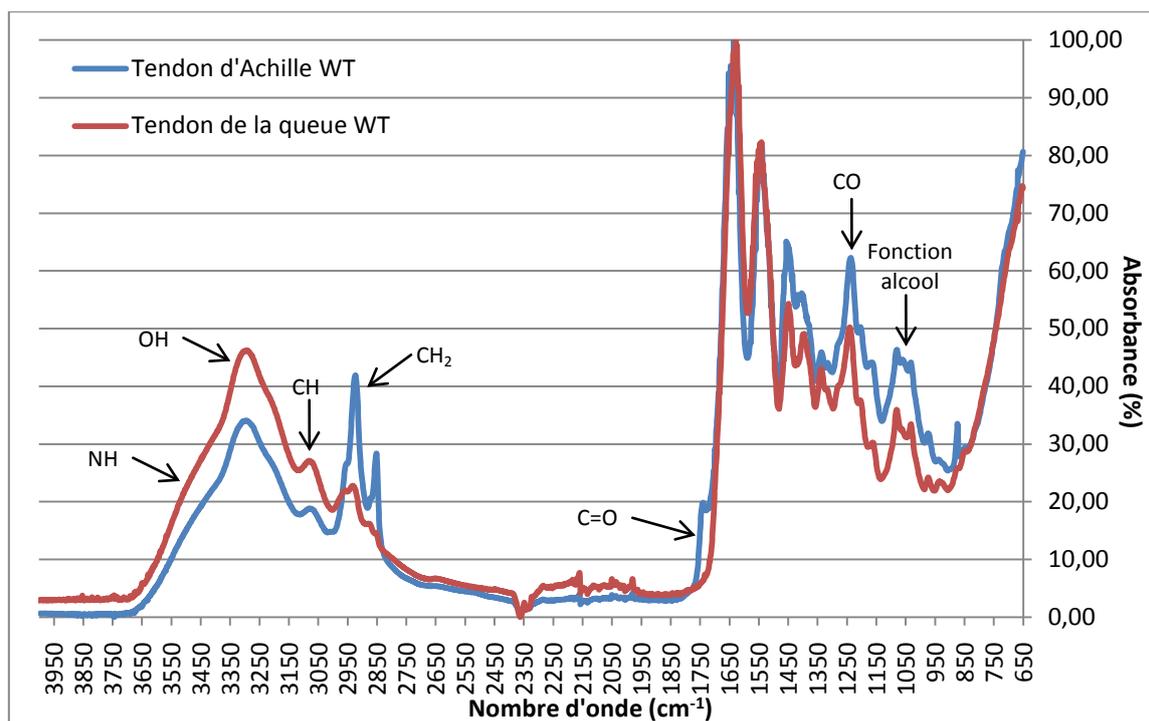


Figure 55 : Comparaison de la composition moléculaire entre le tendon d'Achille et tendon de la queue pour les souris WT analysé par la technique IRTF.

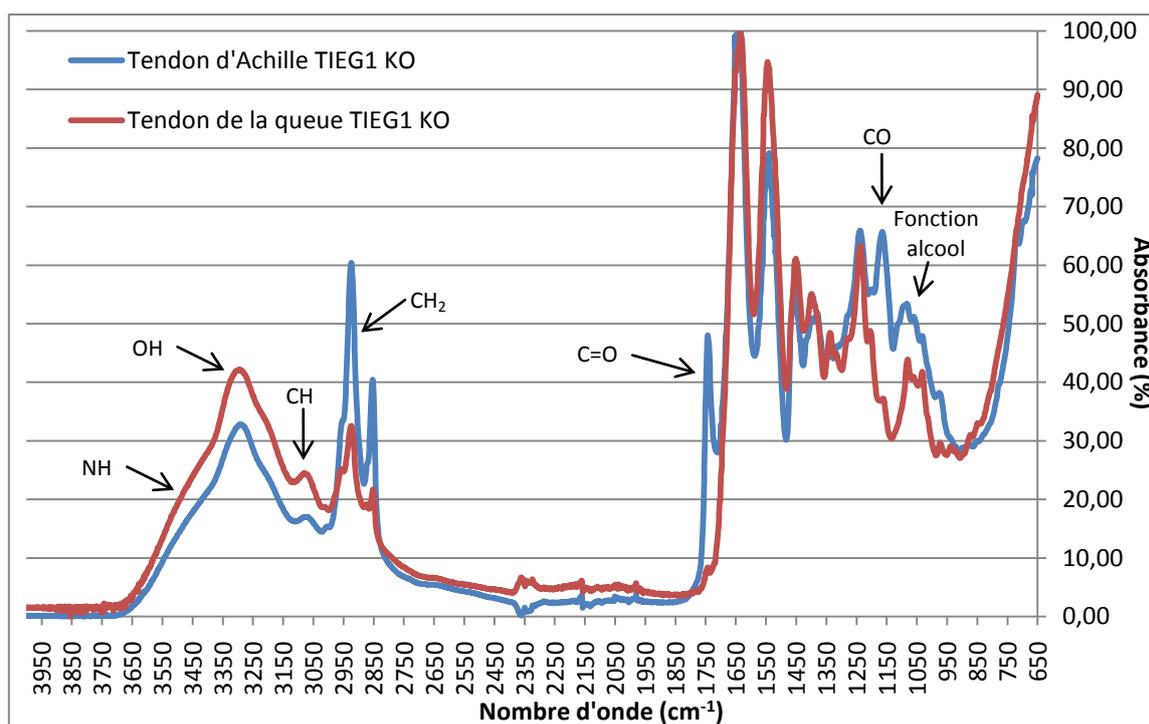


Figure 56 : Comparaison de la composition moléculaire entre le tendon d'Achille et tendon de la queue pour les souris TIEG1 KO analysé par la technique IRTF.

b) Comparaison entre les tendons WT et TIEG1 KO

➤ Composition moléculaire des tendons d'Achille

La figure 57 représente la répartition spectrale obtenue pour les tendons d'Achille WT et TIEG1 KO. La comparaison de la composition moléculaire montre une augmentation de la composition moléculaire pour le tendon d'Achille TIEG1 KO par rapport au WT en particulier dans la région de l'« empreinte digitale » avec une augmentation de la double liaison CO (de 1650 à 1820 cm^{-1}), des liaisons CO (1100 à 1300 cm^{-1}) et de la fonction alcool (1000 à 1100 cm^{-1}) ainsi qu'au niveau de la région des « groupes fonctionnels » avec une légère augmentation des liaisons CH_2 (2800 à 3000 cm^{-1}).

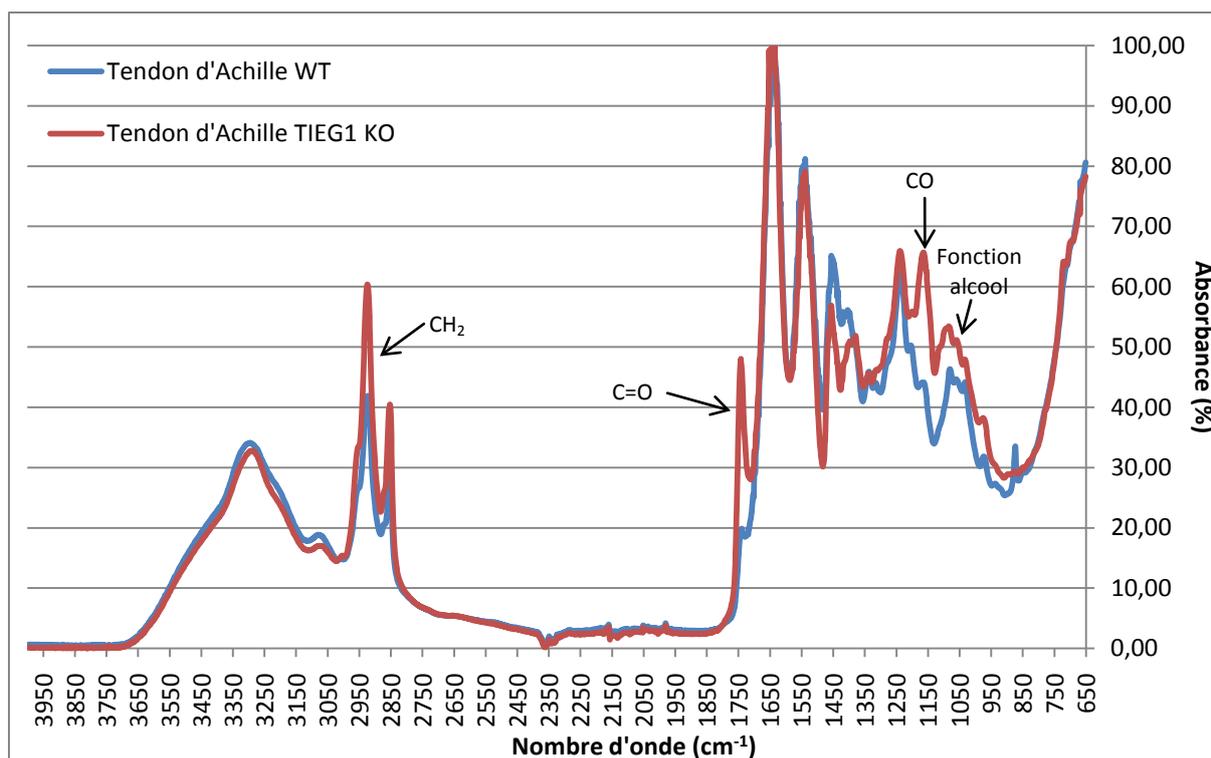


Figure 57 : Comparaison de la composition moléculaire entre WT et TIEG1 KO pour le tendon d'Achille analysé par la technique IRTF.

➤ Composition moléculaire du tendon dorsal de la queue

La figure 58 représente la répartition spectrale obtenue pour les tendons de la queue WT et TIEG1 KO. La comparaison de la composition moléculaire ne montre pas de différences entre les différents tendons de la queue.

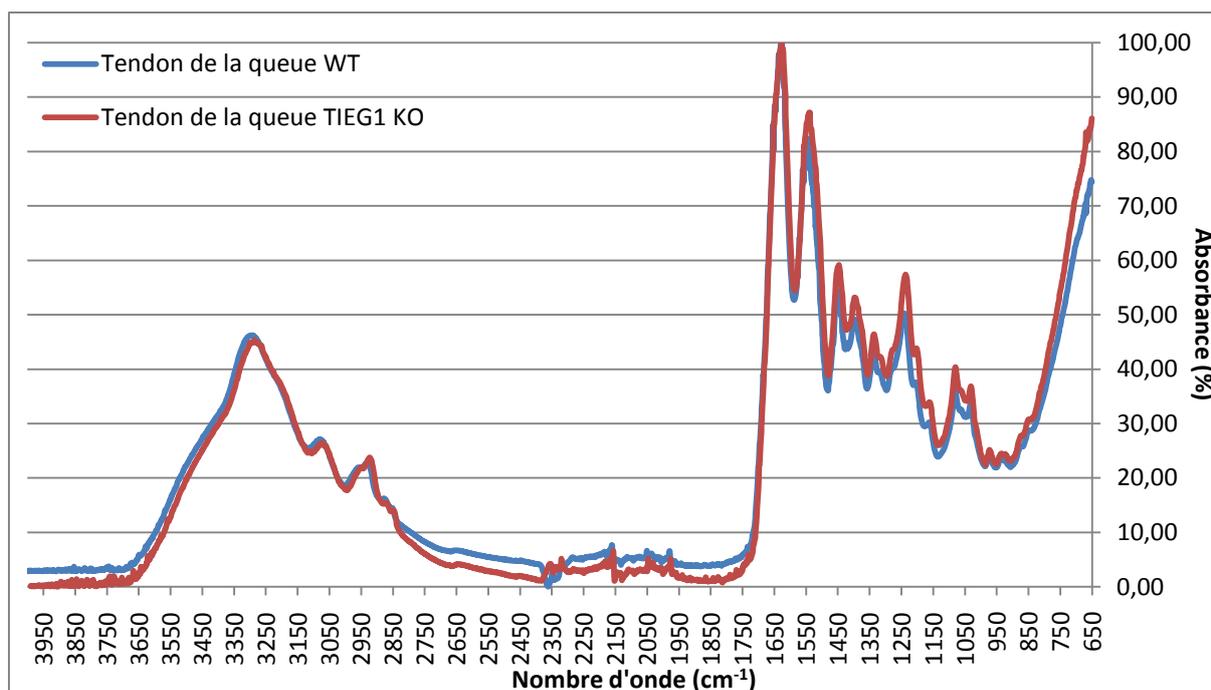


Figure 58 : Comparaison de la composition moléculaire entre WT et TIEG1 KO pour le tendon de la queue analysé par la technique IRTF.

c) Résumé des résultats IRTF

La comparaison entre le tendon d’Achille WT et TIEG1 KO ont montrés une augmentation de la composition moléculaire pour le tendon d’Achille TIEG1 KO par rapport au WT. En ce qui concerne les tendons de queue WT et TIEG1 KO, aucune différence n’a été observée entre ces 2 tendons. La comparaison entre le tendon d’Achille et le tendon de la queue pour les souris WT et les souris TIEG1 KO ont fourni les mêmes résultats, à savoir, une augmentation de la quantité des liaisons moléculaires dans la région des « groupes fonctionnels » pour le tendon de la queue et dans la région de l’« empreinte digitale » pour le tendon d’Achille (Tableau 3).

Comparaison entre les génotypes	Comparaison entre les types de tendon	
	Groupes fonctionnels	Empreinte digitale
$TA_{TIEG1_KO} > TA_{WT}$	$TQ_{WT} > TA_{WT}$	$TA_{WT} > TQ_{WT}$
$TQ_{WT} = TQ_{TIEG1_KO}$	$TQ_{TIEG1_KO} > TA_{TIEG1_KO}$	$TA_{TIEG1_KO} > TQ_{TIEG1_KO}$

Tableau 3 : Comparaison des compositions moléculaires entre le tendon d’Achille (TA) et le tendon dorsal de la queue (TQ) des souris WT et TIEG1 KO analysés par IRTF.

VI. Composition chimique analysée par la technique XPS

a) *Comparaison entre les souris WT et TIEG1 KO pour le tendon d'Achille*

La figure 59 présente la composition chimique des tendons d'Achille des souris WT et TIEG1 KO. Les résultats ne montrent pas de différences dans le pourcentage de carbone (C), d'oxygène (O) et d'azote (N).

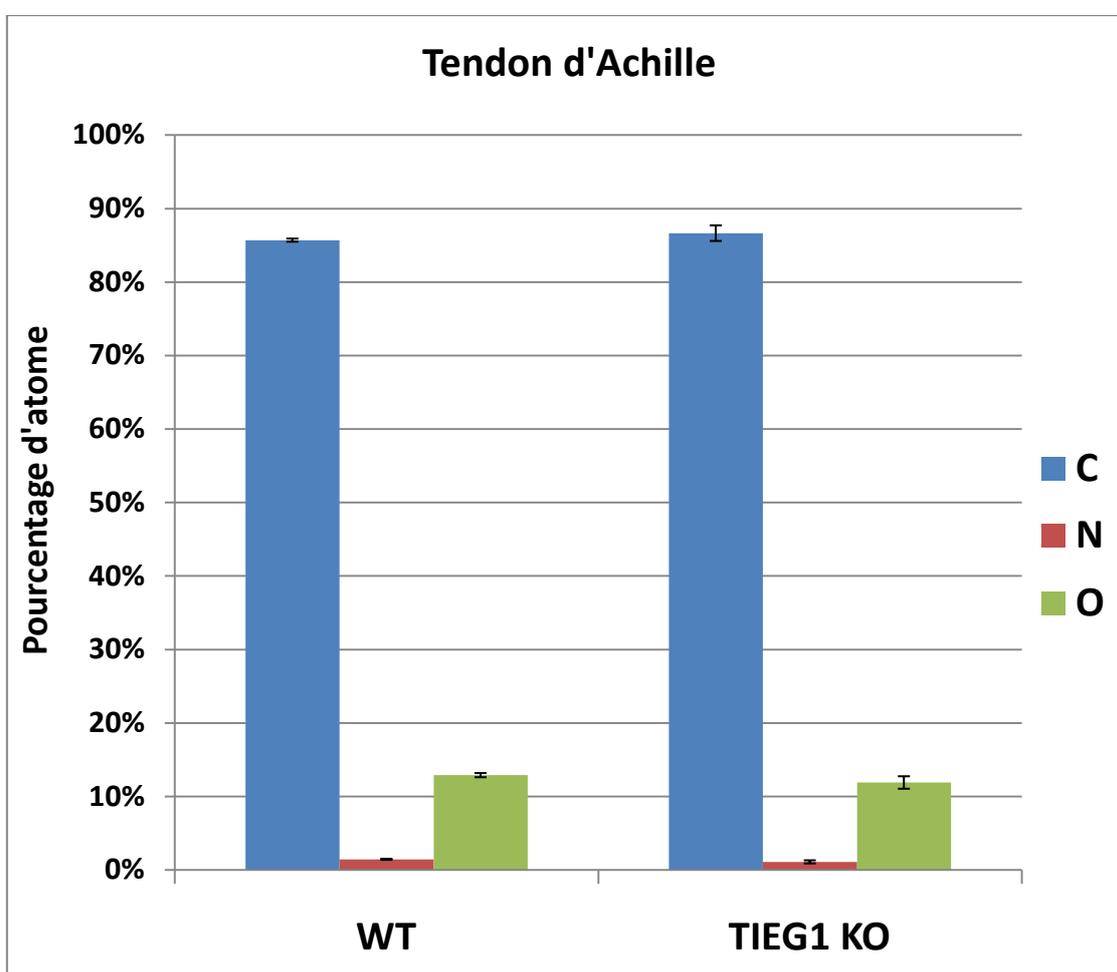


Figure 59 : Composition chimique des tendons d'Achille des souris WT et TIEG1 KO

b) Comparaison entre les souris WT et TIEG1 KO pour le tendon de la queue

La figure 60 présente la composition chimique du tendon de la queue pour des échantillons extraits des mêmes souris WT et TIEG1 KO que pour le tendon d'Achille. Les résultats montrent une diminution significative ($P < 0,05$) du pourcentage de carbone (C) et une augmentation significative ($P < 0,05$) du pourcentage d'oxygène (O) et d'azote (N) pour les souris TIEG1 KO par rapport aux souris WT.

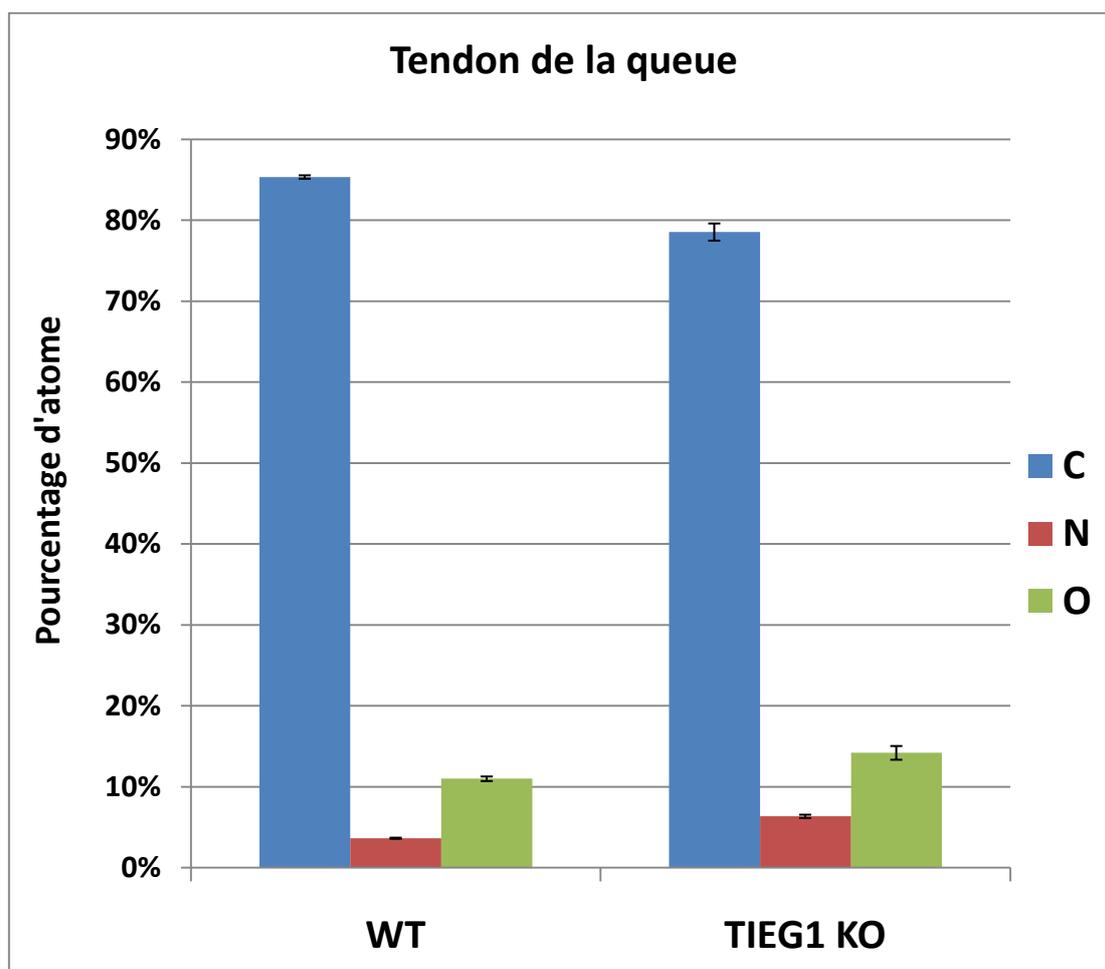


Figure 60 : Composition chimique des tendons de la queue des souris WT et TIEG1 KO

Chapitre 4 : Discussion

Ce mémoire présente les différentes expérimentations qui ont été réalisés au cours de cette thèse avec pour but la caractérisation des effets du gène TIEG1 sur les propriétés physico-chimique du tendon, en étudiant les différences observées sur ce tissu entre les souris TIEG1 KO et contrôles.

Dans des études précédentes, il a été démontré que TIEG1 avait un rôle important dans la croissance, la morphologie et les propriétés mécaniques des tendons. En effet, il a déjà été démontré que l'absence de l'expression de TIEG1 engendrait une augmentation du diamètre et une diminution de la force des fibres tendineuses issues de souris âgées de 3 mois [Bensamoun et al, 2006 (b)]. Afin d'expliquer cette relation entre la structure et la fonction de ces tendons, divers aspects concernant l'impact de TIEG1 sur la structure interne des tendons ont été étudiés afin de constater s'il y a: 1) des changements au niveau de l'organisation moléculaire du collagène, 2) des modifications dans la teneur en collagène, 3) la présence de différents types de molécules constituant les fibres tendineuses TIEG1KO par rapport aux témoins WT et 4) des différences d'expression de gènes pouvant être responsables des différences observées dans la modification du collagène.

Dans cette étude, l'organisation moléculaire des fibres tendineuses WT et TIEG1 KO a été caractérisée par une étude au synchrotron. L'analyse des fibres tendineuses WT aux rayons X a révélé une période ($D = 650 \text{ \AA}$) similaire à celle rapporté précédemment dans la littérature [Bigi et al, 1991]. Toutefois, la période qui a été déterminée pour les fibres tendineuses TIEG1 KO ($D = 673 \text{ \AA}$) est significativement augmentée de 23 \AA , ce qui démontre que l'organisation de la structure des fibres tendineuses TIEG1 KO est différente de celle des WT. Ces données démontrent la présence de différences dans l'organisation moléculaire du collagène entre les fibres WT et TIEG1 KO. Ce résultat suggère que l'absence d'expression de TIEG1 pourrait entraîner des modifications dans l'organisation interne de la structure des fibres du tendon et peut expliquer la diminution des propriétés mécaniques des fibres tendineuses TIEG1 KO précédemment observées [Bensamoun et al, 2006 (b)]. D'autre part, la modification de la structure interne est aussi représentée par la présence d'une forme en « papillon » visualisée sur le spectre de diffraction uniquement dans les fibres issues de tendon TIEG1 KO. De plus, l'organisation moléculaire du collagène a également été étudiée en utilisant un modèle numérique [Doucet et al, 2010] analysant l'organisation moléculaire du collagène dans le sens latéral, au sein de la triple hélice de collagène.

La deuxième partie de l'étude, effectuée au cours de cette thèse, nous a permis de vérifier si des différences de quantité de collagène pouvaient être détectées dans les tendons des souris TIEG1 KO par rapport aux souris WT. Notre analyse a révélé une diminution significative de la quantité d'hydroxyproline, reflétant une diminution de la quantité totale en collagène, dans les tendons TIEG1 KO. Cette différence pourrait également être responsable de la diminution des propriétés mécaniques obtenues pour les tendons TIEG1 KO qui a déjà observée dans une étude précédente [Bensamoun et al, 2006 (b)].

L'analyse des niveaux d'expression de gènes connus pour être impliqués dans la structure du tendon et de la force a été effectuée et cette étude a fourni une idée des défauts que possèdent les tendons TIEG1 KO au niveau moléculaire. Des gènes tels que la décorine, le lumican et la fibromoduline, appartenant à la famille des petits protéoglycanes riches en leucine (SLRP), sont impliqués dans les mécanismes de formation de la structure tendineuse. Plus précisément, la décorine interagit avec le TGF- β et influence la fibrillogénèse du collagène. Ainsi, des modifications de leurs niveaux d'expression pourraient conduire à une désorganisation de la structure du tendon [Bianco et al, 1990]. Le lumican intervient dans la régulation de l'organisation des fibrilles de collagène et dans la croissance périphérique des tendons qui est un processus essentiel au développement du tendon [Ezura et al, 2000]. La fibromoduline est connue pour participer à l'assemblage de la matrice extracellulaire par son interaction avec les fibrilles de collagène de types I et II et il a été suggéré que la fibromoduline pouvait avoir un rôle dans la réglementation de l'activité du TGF- β [Ameys et al, 2002 ; Ezura et al, 2000]. Les laminines, y compris la laminine β -1, sont les principaux composants non-collagéniques des membranes basales et, par conséquent jouent un rôle important dans la régulation de la structure du tendon [Jozsa et al, 1989]. De plus, le collagène de type I est le collagène le plus abondant dans les tendons [Ignatz et Massague, 1986]. Ainsi, des modifications dans l'expression de ces gènes liés aux tendons pourraient affecter de manière significative la structure, la microarchitecture et la fonction des tendons.

La qRT-PCR a permis de faire l'analyse de l'expression de ces gènes et les résultats ont révélés que les gènes de la matrice extracellulaire sont plus ou moins régulés en fonction de l'âge des souris et des différents gènes étudiés.

A l'âge de 1 mois, l'ensemble des gènes étudiés (fibromoduline, lumican, laminine beta1-1, collagène I, décorine, et lysyl oxydase) sont moins exprimés dans les fibroblastes TIEG1 KO par rapport aux témoins WT. Il y a donc un retard dans l'expression de ces gènes

importants pour la matrice extracellulaire des tendons dû à l'absence de TIEG1. Les tendons de ces souris transgéniques peuvent donc avoir une diminution de leurs propriétés mécaniques par rapport aux WT.

A l'âge de 3 mois, les gènes du lumican, de la laminine beta1-1 et de la décorine ont une expression moins importante dans les fibroblastes TIEG1 KO par rapport aux témoins WT, alors que l'expression du collagène I et de la lysyl oxydase se sont considérablement accrues. L'expression du gène de la fibromoduline est quant à lui similaire pour les fibroblastes WT et TIEG1 KO. L'absence du gène TIEG1 a donc entraîné une régulation de l'ensemble de ces gènes, entre 1 et 3 mois, qui pourrait expliquer les différences observées précédemment pour les propriétés mécaniques des tendons de 3 mois issus des souris TIEG1 KO en expliquant le rôle de la protéine TIEG1 sur les propriétés des tendons [Bensamoun et al, 2006 (b)]. Dans cette précédente étude, l'analyse de la structure avait également révélé une augmentation de la taille des fibrilles pour les souris TIEG1 KO âgées de 1 et 3 mois par rapport aux WT qui pourrait être dues aux modifications observées, par qRT-PCR, lors de l'analyse des gènes responsables de la croissance et de la morphologie des tendons.

A l'âge de 8 mois, les gènes de la fibromoduline, du lumican, de la laminine beta 1-1, de la décorine et de la lysyl oxydase sont moins exprimés dans les fibroblastes TIEG1 KO par rapport aux contrôles WT alors que l'expression du collagène I est similaire entre les fibroblastes WT et TIEG1 KO. Il y a donc eu une régulation négative de tous les gènes étudiés entre 3 et 8 mois. Bien que les mécanismes exacts ne soient pas encore bien décrits, ces données suggèrent que TIEG1 peut directement ou indirectement réguler ces gènes et fournit une explication possible du phénotype tendineux décrit précédemment chez les animaux TIEG1 KO [Bensamoun et al, 2006 (b)] ainsi que les changements structurels identifiés par l'étude au synchrotron et par dosage d'hydroxyproline [Gomez et al, 2010].

L'analyse des tissus par microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (MIRTF) permet de représenter la composition moléculaire de l'échantillon biologique et donc d'identifier des changements spécifiques qui se produisent au niveau moléculaire. Auparavant, les expériences effectuées sur les tendons en MIRTF ont analysé uniquement des régions limitées de spectres [Gadaleta et al, 1996 ; Ramakrishnan et al, 2008], permettant l'identification des groupes amides ou d'autres composants spécifiques aux tissus. Cette étude a permis une analyse de la représentation complète des groupes fonctionnels présents dans les tissus tendineux qui, à notre connaissance, n'a jamais été complètement caractérisée.

Dans cette étude, nous avons montré l'importance de la préparation des échantillons pour l'interprétation de la composition moléculaire. En effet, les échantillons préparés avec un microtome ont révélé avoir un décalage du nombre d'onde ainsi que des artefacts dus à la présence de la résine araldite. Ainsi, il faut être très prudent dans l'interprétation des données pour des échantillons préparés à l'aide de coupe au microtome. Cette observation est en accord avec les études précédentes de Mainprice et Paterson (2005) et Aparicio et al (2002) montrant la présence de pics supplémentaires dus à la présence de la résine araldite. Afin d'éviter les artefacts de l'araldite, l'enrobage doit être enlevé chimiquement. Cela entraîne une augmentation du temps de préparation des échantillons et conduit à une éventuelle modification des caractéristiques des tissus biologiques tels que la composition moléculaire. L'article d'Aparicio et al (2002) a utilisé la soustraction spectrale afin de supprimer les artefacts dus à la présence d'araldite et a démontré la difficulté de la soustraction de la contribution des enrobages qui vont s'intégrer aux spectres des tissus analysés. Il suggère fortement d'effectuer des cryosections. Ainsi, nous avons démontré par notre étude que la technique cryostat était la meilleure façon de préparer les tissus tendineux avec le principal avantage d'éviter la suppression des enrobages (que ce soit chimiquement ou par soustraction spectrale), qui est nécessaire pour l'analyse au microtome. De plus, les résultats obtenus avec le cryostat sur des échantillons de tendon qui avaient été congelés ont révélé la présence de groupes fonctionnels identiques à ceux obtenus sur des tissus fraîchement disséqués. Toutefois, le processus de congélation entraîne une diminution significative de la quantité de la composition moléculaire, ce qui suggère que la comparaison des échantillons doit se faire dans les mêmes conditions de conservation et de préparation. Ainsi, l'objectif de cette étude en MIRTF nous a permis de comparer la composition moléculaire entre le tendon de la queue (tendon non contraint) et le tendon d'Achille (tendon contraint) ainsi que la comparaison des tendons issus des souris WT et TIEG1 KO. Par conséquent, le protocole qui a été élaboré au cours de cette thèse afin de préparer des tissus tendineux nous a permis d'analyser la composition moléculaire des tendons sur un large spectre : des liaisons simples (4000 cm^{-1}) à l'empreinte digitale (650 cm^{-1}).

La technique MIRTF a permis l'analyse de la composition moléculaire interne entre les échantillons issus des souris WT et TIEG1 KO. Des différences ont été observées au niveau de la composition moléculaire en fonction des types de tendons et de la présence ou non du gène TIEG1. L'absence du gène TIEG1 a entraîné des modifications de la composition moléculaire interne. Ces différences peuvent expliquer les modifications des propriétés

mécaniques [Bensamoun et al, 2006 (b)] et structurelles [Gomez et al, 2010] des tendons qui ont été observées précédemment.

La technique IRTF a permis d'analyser la composition moléculaire externe des tendons. Cette analyse en surface a permis de comparer les tendons d'Achille et de la queue des deux types de souris étudiées (WT vs TIEG1 KO). Ces différences sont également dues à l'absence du gène TIEG1, ce qui a entraîné des modifications de la composition moléculaire en surface des tendons.

La composition moléculaire interne, obtenue par la technique de MIRTF, et en surface, obtenue par la technique IRTF est différente. Ces différences sont dues à la localisation de l'analyse du tissu. Nous pouvons en conclure que la composition interne et externe du tendon ne sont pas les mêmes au sein du même type de tendon entre les souris WT et TIEG1 KO et entre les tendons contraints (tendon d'Achille) et non contraints (tendon de la queue) extraits de la même souris.

L'analyse au XPS a permis de déterminer les changements chimiques au niveau de la surface tendineuse. Nous pouvons donc dire que la composition chimique entre deux types de tendons (tendon d'Achille vs tendon de la queue) n'est pas la même et donc qu'il est important d'analyser le rôle de TIEG1 sur les tendons ayant des fonctions mécaniques et physiologiques différentes.

Conclusion et perspectives

Les résultats de cette étude ont permis d'approfondir nos connaissances concernant le rôle de TIEG1 sur le tissu tendineux. Les modifications dues à l'absence du gène TIEG1 ont donc pu être déterminées grâce au modèle de souris TIEG1 KO.

Les perspectives de cette étude seront de compléter ces expérimentations par une analyse plus approfondie des tissus osseux et musculaire, car TIEG1 est majoritairement présent dans le muscle. Cela permettra de caractériser le rôle de la protéine TIEG1 sur l'ensemble du système musculo-squelettique à différentes échelles.

En perspective, nous envisageons également d'explorer l'utilisation du gène TIEG1 dans la régénération des tendons lésés. En effet, le rôle de TGF- β dans la régénération tendineuse en tant que facteur d'initiation n'est plus à démontrer. Or, son exploitation en thérapie a prouvé qu'il peut avoir un effet controversé dans divers mécanismes cellulaires. L'utilisation de TIEG1, agissant en aval et de manière plus pointue que TGF- β , pourrait être plus intéressante pour la régénération des tendons lésés.

Une autre étude est en cours pour analyser l'effet du gène TIEG2 sur le tissu tendineux. Des essais préliminaires ont été réalisés au microscope électronique à transmission (MET) et par culture cellulaire sur deux nouveaux modèles de souris TIEG2 KO et doubles KO : TIEG1/TIEG2 KO. Les premiers résultats sont intéressants et montrent des différences de diamètre pour les fibres TIEG2 KO et double KO.

Les perspectives à long termes de cette étude seraient d'expliquer comment réagit le tissu tendineux en absence du gène TIEG1, TIEG2 ou de ces 2 gènes afin de réaliser de nouvelles stratégies thérapeutiques à partir des données expérimentales. De plus, la conception de ces nouvelles approches thérapeutiques pour les troubles musculo-squelettiques liés à TIEG1 ou aux membres de la superfamille des TGF- β pourrait être développé dans un avenir proche.

Références

- Almeida-Silveira MI. Les propriétés mécaniques des tendons : effet d'une modification de la demande fonctionnelle. In. Jaffrin JY et Goubel F : *Biomécanique des fluides et des tissus*, Masson ed. Paris, p399-416, 1998.
- Ameys L and Young MF. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* 12(9):107R-16R, 2002.
- Aparicio S, Doty SB, Camacho NP, Paschalis EP, Spevak L, Mendelsohn R and Boskey AL. Optimal methods for processing mineralized tissues for Fourier Transformed Infrared Microspectroscopy. *Calcif Tissue Int.* 70: 422-429, 2002.
- Asano H, Li XS, Stamatoyannopoulos G. FKLf, a novel Krüppel-like factor that activates human embryonic and fetal beta-like globin genes. *Mol Cell Biol.* 19(5): 3571-9, 1999.
- Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB, Transforming growth factor- β in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization, *J. Biol. Chem.* 258: 7155–7160, 1983.
- Bailey AJ, Robins SP, Balian G. Biological significance of the intermolecular crosslinks of collagen. *Nature* 251(5471):105-9, 1974.
- Benjamin, M., Evans, E.J., and Copp, L. The histology of tendon attachments to bone in man. *J Anat.* 149: 89-100, 1986.
- Bensamoun SF, Hawse JR, Subramaniam M, Ilharreborde B, Bassillais A, Benhamou CL, Fraser DG, Oursler MJ, Amadio PC, An KN, Spelsberg TC. TGF β inducible early gene-1 knockout mice display defects in bone strength and microarchitecture. *Bone.* 39(6): 1244-51, 2006. (a)
- Bensamoun SF, Tsubone T, Subramaniam M, Hawse JR, Boumediene E, Spelsberg TC, An KN, Amadio P. Age-dependent changes in the mechanical properties of tail tendons in TGF β -inducible early gene-1 knockout mice. *J Appl Physiol* 101: 1419-1424, 2006. (b)
- Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 38(11): 1549-63, 1990.
- Bigi A, Dovigo L, Koch MH, Morocutti M, Ripamonti A, Roveri N. Collagen structural organization in uncalcified and calcified human anterior longitudinal ligament. *Connect Tissue Res* 25(3-4): 171-179, 1991.

Biophyresearch : <http://www.biophyresearch.com/pdf/ftir.pdf>

Bio-Rad: <http://www3.bio-rad.com/>

Bruns RR. Supramolecular structure of polymorphic collagen fibrils. *J Cell Biol* 68(3): 521-538, 1976.

Cameron GJ, Alberts IL, Laing JH, Wess TJ. Structure of type I and type III heterotypic collagen fibrils: an X-ray diffraction study. *J Struct Biol* 137(1-2): 15-22, 2002.

Cetta G, Tenni R, Zanaboni G, De Luca G, Ippolito E, De Martino C, Castellani AA. Biochemical and morphological modifications in rabbit Achilles tendon during maturation and ageing. *Biochem J*. 204(1): 61-67, 1982.

Chaloux E, Lopez-Rovira T, Rosa JL, Pons G, Boxer LM, Bartrons R, Ventura F. A zinc-finger transcription factor induced by TGF-beta promotes apoptotic cell death in epithelial Mv1Lu cells. *FEBS Lett* 457: 478-482, 1999.

Cheifetz S, Like B, Massagué J. Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor-b, *J. Biol. Chem.* 261: 9972-9978, 1986.

Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang ML, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massagué J. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell*. 48(3):409-15, 1987.

Cook T, Gebelein B, Mesa K, Mladek A, Urrutia R. Molecular cloning and characterization of TIEG2 reveals a new subfamily of transforming growth factor- β -inducible Sp1-like zinc finger-encoding genes involved in the regulation of cell growth. *J Biol Chem*. 273(40): 25929-36, 1998.

Cook T, Urrutia R. TIEG proteins join the Smads as TGF-beta-regulated transcription factors that control pancreatic cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 278(4): G513-21, 2000.

Dang DT, Pevsner J, Yang VW. The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol*. 32(11-12): 1103-1121, 2000.

Derwin KA, Soslowsky LJ. A quantitative investigation of structure-function relationships in a tendon fascicle model. *J Biomech Eng* 121(6): 598-604, 1999.

Derwin KA, Soslowsky LJ, Kimura JH, Plaas AH. Proteoglycans and glycosaminoglycan fine structure in the mouse tail tendon fascicle. *J Orthop Res* 19(2): 269-277, 2001.

- Derynck R, Feng XH. TGF- β receptor signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1333: 105–150, 1997.
- Doucet J, Briki F, Gourrier A, Pichon C, Gumez L, Bensamoun SF, Sadoc JF. Modelling the lateral organization of collagen molecules in fibrils using the paracrystal concept. *J Struct Biol*, 2010. En révision.
- Eductnet : <http://www.educnet.education.fr/rnchimie/phys/spectro/cours/spectro.htm>
- Elliott DM, Robinson PS, Gimbel JA, Sarver JJ, Abboud JA, Iozzo RV, Soslowsky LJ. Effect of altered matrix proteins on quasilinear viscoelastic properties in transgenic mouse tail tendons. *Ann Biomed Eng* 31(5): 599-605, 2003.
- Ezura Y, Chakravarti S, Oldberg A, Chevoneva I, Birk DE. Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *J Cell Biol* 151(4):779-88, 2000.
- Fautsch MP, Vrabel A, Subramaniam M, Hefferen TE, Spelsberg TC, Wieben ED. TGF β -inducible early gene (TIEG) also codes for early growth response α (EGR α): evidence of multiple transcripts from alternate promoters. *Genomics*. 51(3): 408-16, 1998. (a)
- Fautsch MP, Vrabel A, Rickard D, Subramaniam M, Spelsberg TC, Wieben ED. Characterization of the mouse TGF β -inducible early gene (TIEG): conservation of exon and transcriptional regulatory sequences with evidence of additional transcripts. *Mamm Genome*. 9(10): 838-42, 1998. (b)
- Folkhard W, Mosler E, Gercken W, Knörzer E, Nemetschek-Gansler H, Nemetschek T, Koch MHJ. Quantitative analysis of the molecular sliding mechanism in native tendon collagen-time-resolved dynamic studies using synchrotron radiation. *Int J Biol Macromol* 9: 169-175, 1986.
- Gadaleta S.J., Camacho N.P., Mendelsohn R., Boskey A.L. Fourier transform infrared microscopy of calcified turkey leg tendon. *Calcif Tissue Int*. 58(1): 17-23, 1996.
- Gumez L, Bensamoun SF, Doucet J, Hawse JR, Subramaniam M, Spelsberg TC, Pichon C. Molecular structure of tail tendon fiber in TIEG1 knockout mice structure using synchrotron diffraction technology. *J Appl Physiol*. 108(6): 1706-10, 2010.
- Hawse JR, Iwaniec UT, Bensamoun SF, Monroe DG, Peters KD, Ilharreborde B, Rajamannan NM, Oursler MJ, Turner RT, Spelsberg TC, Subramaniam M. TIEG-null mice display an osteopenic gender-specific phenotype. *Bone* 42(6): 1025-1031, 2008.

- Hefferan TE, Reinholz GG, Rickard DJ, Johnsen SA, Waters KM, Subramaniam M, Spelsberg TC. Overexpression of a nuclear protein, TIEG, mimics transforming growth factor-beta action in human osteoblast cells. *J Biol Chem* 275(27): 20255-20259, 2000. (a)
- Hefferan TE, Subramaniam M, Khosla S, Riggs BL, Spelsberg TC. Cytokine-specific induction of the TGF-beta inducible early gene (TIEG): regulation by specific members of the TGF-beta family. *J Cell Biochem* 78(3): 380-390, 2000. (b)
- Hodge AJ and Petruska JA. Recent studies with the electron microscope on ordered aggregates of the tropocollagen molecule. In: *Aspects of Protein Chemistry*, edited by Ramachandran, GN. p. 289-300, Academic Press, London, 1963.
- Hukins DW. X-ray diffraction by collagen tape shows that type I collagen fibrils need not have a three-dimensional lattice. *Biochem Biophys Res Commun* 77(1): 335-339, 1977.
- Ignotz RA and Massague J. Transforming Growth Factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation to the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261: 4337-4345, 1986.
- INRP : <http://acces.inrp.fr/acces/terre/CCCIC/ressources/irspco2>
- Johnsen SA, Subramaniam M, Effenberger KE, Spelsberg TC. The TGF β inducible early gene plays a central role in the anti-proliferative response to TGF β . 4(1-2): 29-35, 2004.
- Johnsen SA, Subramaniam M, Janknecht R and Spelsberg TC. TGFbeta inducible early gene enhances TGFbeta/Smad-dependent transcriptional responses. *Oncogene* 21(37): 5783-90, 2002.
- Jozsa L and Kannus P. *Human Tendons: Anatomy, Physiology, and Pathology*. Human Kinetics, 1997.
- Jozsa L, Lehto M, Kannus P, Kvist M, Reffy A, Vieno T, Jarvinen M, Demel S, Elek E. Fibronectin and laminin in Achilles tendon. *Acta Orthop Scand* 60: 469-71, 1989.
- Kannus P. Structure of tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports*. 10: 312-320, 2000.
- Leonardi, L., Ruggeri, A., Roveri, N., Bigi, A., and Reale, E. Light microscopy, electron microscopy, and X-ray diffraction analysis of glycerinated collagen fibers. *J Ultrastruct Res*. 85(2): 228-237, 1983.
- Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJ. Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech*. 37(6): 865-77, 2004.

- Mainprice D and Paterson M. Experimental deformation of flint in axial compression. In High-Strain Zones: Structure and Physical Properties, edited by Bruhn D and Burlini L, London, Geological Society, Special publications 245: 251-276, 2005.
- Mohan J, in Organic spectroscopy Principles and Applications, Narosa, New Delhi, p 505, 2000.
- Moses HL, Branum EL, Proper JA, R.A. Robinson RA. Transforming growth factor production by chemically transformed cells, Cancer Res. 41: 2842–2848, 1981.
- Mosler E, Folkhard W, Knörzer E, Nemetschek-Gansler H, Nemetschek T, Koch MH. Stress-induced molecular rearrangement in tendon collagen. J Mol Biol 182(4): 589-596, 1985.
- Muellner, T., Kwasny, O., Loehnert, V., Mallinger, R., Unfried, G., Schabus, R., and Plenk, H. Light and electron microscopic study of stress-shielding effects on rat patellar tendon. Arch Orthop Trauma Surg. 121: 561–565, 2001.
- Nowack, H., Gay, S., Wick; G., Becker, U., and Timpl, R. Preparation and use in immunohistology of antibodies specific for type I and type III collagen and procollagen. J Immunol Methods. 12(1-2): 117-124, 1976.
- Pelletier M, Michot LJ, Barres O, Humbert B, Petit S and Robert JL. Influence of KBr conditioning on the infrared hydroxyl-stretching region of saponites. Clay Minerals, 34: 439-445, 1999.
- Petit S, Righi D, Madejova J and Decarreau A. Interpretation of the infrared NH₄⁺ spectrum of the NH₄⁺-clays: application to the evaluation of the layer charge. Clay Minerals, 34: 543-549, 1999.
- Prévost P. Le tendon à la loupe. In : *Sport, Santé et Préparation Physique* 5: 1-4, 2003.
- Puxkandl R, Zizak I, Paris O, Keckes J, Tesch W, Bernstorff S, Purslow P, Fratzl P. Viscoelastic properties of collagen: synchrotron radiation investigations and structural model. Philos Trans R Soc Lond B 357: 191-197, 2002.
- Ramakrishnan, N., Xia, Y., and Bidthanapally, A. Fourier-transform infrared anisotropy in cross and parallel sections of tendon and articular cartilage. J Orthop Surg Res 3: 48, 2008.
- Ribeiro A, Bronk SF, Roberts PJ, Urrutia R, Gores GJ. The transforming growth factor beta (1)-inducible transcription factor TIEG1, mediates apoptosis through oxidative stress. Hepatology 30: 1490-497, 1999.

-
- Riley G. Chronic tendon pathology: molecular basis and therapeutic implications, *Expert Reviews in Molecular Medicine* 7:5:1-25, 2005.
- Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 5339–5343, 1981.
- Robinson PS, Lin TW, Jawad AF, Iozzo RV, Soslowsky LJ. Investigating tendon fascicle structure-function relationships in a transgenic-age mouse model using multiple regression models. *Ann Biomed Eng* 32(7): 924-931, 2004. (a)
- Robinson PS, Lin TW, Reynolds PR, Derwin KA, Iozzo RV, Soslowsky LJ. Strain-rate sensitive mechanical properties of tendon fascicles from mice with genetically engineered alterations in collagen and decorin. *J Biomech Eng* 126(2): 252-257, 2004. (b)
- Sasaki N, Shukunami N, Matsushima N, Izumi Y. Time resolved X-ray diffraction from tendon collagen during creep using synchrotron radiation. *J. Biomech* 32: 285-292, 1999.
- Sevha G, in *Comprehensive Analytical Chemistry: Analytical Infrared Spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam, p 555, 1976.
- Silverstein RM, Balsler GC, Morill TC, in *Identification spectrométrique de composés organiques*, traduction de la 5^{ème} édition américaine, De Boeck Université, Paris, p 420, 1998.
- Subramaniam M, Gorny G, Johnsen SA, Monroe DG, Evans GL, Fraser DG, Rickard DJ, Rasmussen K, van Deursen JM, Turner RT, Oursler MJ, Spelsberg TC. TIEG1 null mouse-derived osteoblasts are defective in mineralization and in support of osteoclast differentiation in vitro. *Mol Cell Biol* 25(3):1191-9, 2005.
- Subramaniam M, Hawse JR, Johnsen SA, Spelsberg TC. Role of TIEG1 in biological processes and disease states. *J Cell Biochem* 102(3): 539-548, 2007.
- Subramaniam M, Harris SA, Oursler MJ, Rasmussen K, Riggs BL, Spelsberg TC. Identification of a novel TGF- β -regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. *Nucleic Acids Res.* 23(23): 4907-12, 1995.
- Subramaniam M, Hefferan TE, Tau K, Peus D, Pittelkow M, Jalal S, Riggs BL, Roche P, Spelsberg TC. Tissue, cell type, and breast cancer stage-specific expression of a TGF- β inducible early transcription factor gene. *J Cell Biochem.* 68(2): 226-236, 1998.

-
- Tachibana I, Imoto M, Adjei PN, Gores GJ, Subramaniam M, Spelsberg TC, Urrutia R. Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *J Clin Invest* 99: 2365-2374, 1997.
- Tau KR, Hefferan TE, Waters KM, Robinson JA, Subramaniam M, Riggs BL, Spelsberg TC. Estrogen regulation of a transforming growth factor-beta inducible early gene that inhibits deoxyribonucleic acid synthesis in human osteoblasts. *Endocrinology*. 139(3): 1346-53, 1998.
- Wang Z, Peters B, Klussmann S, Bender H, Herb A, Krieglstein K. Gene structure and evolution of Tieg3, a new member of the Tieg family of proteins. *Gene*. 325:25-34, 2004.
- Wess TJ, and Cairns DE. Nanoarchitectures of the animal extracellular matrix: opportunities for synchrotron radiation studies on collagen and fibrillin. *Journal of Synchrotron Radiation* 12(6): 751-757, 2005.
- Yoon, J.H., and Halper, J. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *J Musculoskeletal Neuronal Interact*. 5(1): 22-34, 2005.
- Zhang, G., Young, B.B., and Birk, D.E. Differential expression of type XII collagen in developing chicken metatarsal tendons. *J Anat*. 202(5): 411-420, 2003.

Annexe

ANNEXE 1 : PREPARATION DES REACTIFS POUR LE DOSAGE
D'HYDROXYPROLINE :

NaOH 1,8 N : peser 7,2 g dans 100 ml d'eau Milli-Q

Tampon A : Dans 40 ml d'eau Milli-Q, dissoudre :

- 5,7 g d'acétate de sodium, 3 H₂O
- 4,44 g de citrate trisodique, 2 H₂O
- 0,55 g d'acide citrique
- 38,5 ml d'alcool isopropylique
- Mélanger soigneusement
- Qsp 100 ml eau Milli-Q
- Ajuster le pH à 6,0 si nécessaire

Solution oxydante (extemporanément) : dissoudre :

- 0,14 g de Chloramine T dans 2 ml d'eau Milli-Q
- Qsp 10 ml dans le tampon A

Réactif d'Ehrlich (extemporanément) : dissoudre :

- 4 g du réactif dans 6 ml d'HClO₄ à 72 %
- Ajouter 26 ml d'alcool isopropylique

Publications et communications

Publications:

Gomez L, Bensamoun SF, Doucet J, Hawse JR, Subramaniam M, Spelsberg TC, Pichon C. 2010.

Molecular structure of tail tendon fiber in TIEG1 knockout mice structure using synchrotron diffraction technology.

J Appl Physiol. 108(6): 1706-10, 2010.

Gomez L, Beny JM, Hawse JR, Subramaniam M, Spelsberg TC, Christensen T, Pichon C, Bensamoun SF. 2009.

Internal structure analysis of tail tendon fibers with fourier transformed infrared spectroscopy (FTIRM).

Journal of Connective Tissue. Révision #1.

Doucet J, Briki F, Gourrier A, Pichon C, **Gomez L**, Bensamoun S, Sadoc JF. 2010.

Modelling the lateral organization of collagen molecules in fibrils using the paracrystal Concept.

Journal of Structural Biology. Révision #1.

Haddad O, **Gomez L**, Hawse JR, Subramaniam M, Spelsberg TC, Bensamoun SF. 2010.

TIEG1-null fibroblasts display age-dependent differences in their adhesion, spreading and proliferation.

Journal of Cell Biology. Révision #1.

Communications internationales avec actes et comités de lecture:

Gomez L, Pichon C, Hawse JR, Subramaniam M, Doucet J, Spelsberg TC, Bensamoun S. 2008.

TGF β inducible early gene-1 knockout mice display defects in the molecular structure of tendon fibers.

30th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research - ASBMR, Montréal, Québec, Canada.

Gomez L, Subramaniam M, Doucet J, Pichon C, Bensamoun S. F. 2010.

Identification of specific changes in the molecular composition of tendon fibers mediated by TGF β Inducible Early Gene 1 (TIEG1)

17th Congress of the European Society of Biomechanics, Edinburgh, Scotland, UK.

Communications internationales avec actes et comités de lecture:

Bensamoun S, **Gomez L**, Hawse JR, Subramaniam M, Briki F, Gourrier A, Doucet J, Spelsberg TC, Pichon C. 2008.

Characterization of the tendon fiber structure of TIEG knockout mice using synchrotron diffraction technology.

33ème Congrès de la Société de Biomécanique, Compiègne

Gomez L, Guillot S, Benoit R, Beny JM, Hawse JR, Subramaniam M, Spelsberg TC, Christensen T, Pichon C, Bensamoun SF. 2009.

Internal structure analysis of tendon fibers with Fourier transform infrared spectroscopy, microspectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy.

34ème Congrès de la Société de Biomécanique, Toulon

Formations

J'ai pu durant ma thèse effectuer différentes formations qui m'ont permis de compléter mon cursus professionnel et personnel et ainsi d'augmenter mes compétences dans ces deux domaines. Ces formations m'ont permis d'apprendre de nombreuses techniques et m'ont ouvert les yeux sur une nouvelle approche du monde du travail.

J'ai ainsi effectué une **formation SST** (Sauveteur Secouriste du Travail), en 2008, qui m'a permis de me mettre en situation en cas d'urgence et donc engendre une confiance en soi lorsque l'on fait des expérimentations. J'ai aussi pu assister à 2 sessions de recyclage pour cette formation, en 2009 et 2010. L'ensemble de cette formation fourni les outils nécessaire à la gestion des risques potentiels lors d'expérimentation ainsi que les gestes permettant de secourir et de gérer la sécurité des victimes en cas d'accidents.

J'ai également pu assister à la **formation expérimentation animale de niveau I**, en 2009, qui permet de connaître les bons gestes à effectuer en contact avec le monde animal. Lorsque l'on travaille sur des animaux transgéniques, cela permet de prendre confiance en soi et de traiter les animaux avec le respect qu'ils méritent. J'ai également pu apprendre les bonnes pratiques de laboratoire ainsi que les différentes réglementations en matière d'élevage et d'entretien de ces animaux.

Résumés

Résumé en Français :

L'objectif de cette étude est de caractériser les propriétés physico-chimiques du tendon altéré par le gène TIEG1 (TGF- β Inducible Early Gene 1). L'effet de ce gène a été étudié aux échelles moléculaire et cellulaire pour le tendon dorsal de la queue et le tendon d'Achille extraits de souris femelles C57BL/6 WT et TIEG1 KO. L'organisation moléculaire du collagène au sein des fibres tendineuses a été analysée au synchrotron et la quantité de collagène a été déterminée par dosages d'hydroxyproline. En parallèle, l'analyse de l'expression de gènes impliqués dans le développement de la matrice extracellulaire du tendon a été réalisée par qRT-PCR sur des fibroblastes de 1, 3 et 8 mois. Ensuite, la composition moléculaire et chimique en surface des tendons a été déterminée par la technique IRTF (Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier) et XPS (Spectrométrie des Photoélectrons aux rayons X). En complément, la composition moléculaire interne a été quantifiée par la technique MIRTf (Microspectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier), nécessitant le développement de protocoles expérimentaux. Les résultats ont montré que l'absence du gène TIEG1 entraînait une désorganisation de la structure du collagène, une diminution significative de la quantité de collagène ainsi que des différences dans l'expression des gènes. De plus, la comparaison des compositions moléculaires interne et en surface sont différentes en fonction du type de tendon (tendon de la queue *vs* tendon d'Achille) et du génotype (WT *vs* TIEG1 KO). Ces données ont permis de caractériser le rôle de TIEG1 sur la structure des tendons afin de réaliser de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mots clés: Propriétés physico-chimique, Tendon, Synchrotron, Hydroxyproline, qRT-PCR, Spectroscopie.

Résumé en Anglais :

The purpose of this study is to characterize the physico-chemical properties of tendon altered by TIEG1 gene (TGF- β Inducible Early Gene 1). The effect of this gene was analyzed at the cellular and molecular levels for the dorsal tail tendon and Achilles tendon extracted from WT and TIEG1 KO female mice C57BL/6. The molecular organization of collagen inside tendon fibers was analyzed with synchrotron and the collagen amount was determined from hydroxyproline assays. In parallel, expression analysis of genes involved in the development of tendon extracellular matrix was performed by qRT-PCR on 1, 3 and 8 months old fibroblasts. Then, molecular and chemical compositions were determined with FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) and XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) techniques on tendon surface. In addition, the internal molecular composition was quantified by FTIRM (Fourier Transform Infrared Microspectroscopy) technique, requiring the development of experimental protocols. The results revealed that the absence of TIEG1 gene induced a disorganization of the collagen structure, a significant decrease in the amount of collagen as well as differences in gene expression. Moreover, the comparison of the internal and external molecular composition is different according to the type of tendon (tail tendon *vs* Achilles tendon) and genotype (WT *vs* TIEG1 KO). These data allow us to characterize the role of TIEG1 on tendon structure in order to design new therapeutics.

Keywords: Physico-chemical properties, Tendon, Synchrotron, Hydroxyproline, qRT-PCR, Spectroscopy.