DAVID MARSOLAIS

MODULATION DU PROCESSUS INFLAMMATOIRE ET RÉPARATION TENDINEUSE

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en physiologie-endocrinologie
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2005

© David Marsolais, 2005

Résumé

Les tendinopathies sont fréquentes et entraînent une diminution de la qualité de la vie à long terme. Les connaissances des événements physiopathologiques suivant un traumatisme tendineux sont toutefois parcimonieuses. Conséquemment, peu ou pas de stratégies thérapeutiques permettent d'en accélérer le processus de réparation. Le but de cette thèse était donc d'explorer les mécanismes cellulaires et le rôle de différents régulateurs potentiels de la réaction inflammatoire dans la réparation des tendons. Dans un premier temps, nous avons mis au point un modèle de blessure tendineuse aiguë consistant en l'injection de collagénase dans le tendon d'Achille de rats. Nous avons observé, par marquages immunohistochimiques, que les neutrophiles étaient les premières cellules à infiltrer le site de la lésion, suivis des macrophages. Nous avons également remarqué, dans un second projet que l'injection de collagénase, une métalloprotéinase, dans le tendon, induisait une altération des propriétés mécaniques des tendons de rats, et que l'administration d'un anti-inflammatoire non stéroïdien n'affectait pas significativement cette perte fonctionnelle, probablement en raison d'un effet anti-inflammatoire localisé en périphérie des faisceaux tendineux. En utilisant le même modèle expérimental, nous avons ensuite étudié le rôle d'un médiateur central de la physiopathologie tendineuse : p53. L'inhibition pharmacologique de la transactivation des gènes cibles de p53, par une molécule appelée pifithrin-α, a diminué l'accumulation des cellules inflammatoires dans le tendon blessé. Cet effet anti-inflammatoire n'était pas associé à une diminution de la perte fonctionnelle en phase aiguë, mais retardait la guérison de la blessure tendineuse. Puisque les stratégies anti-inflammatoires ne diminuent pas le déficit fonctionnel en phase inflammatoire, nous avons finalement testé le dogme voulant que les cellules inflammatoires pouvaient causer des dommages non spécifiques à la matrice des tendons. L'injection intra tendineuse de carraghénine a induit une accumulation massive de cellules inflammatoires. Cependant, cette réaction n'était pas associée à une altération des propriétés biomécaniques ni à une diminution du contenu en collagène des tendons. En conclusion, nos résultats ont permis d'accroître les connaissances de la séquence physiopathologique suivant un traumatisme tendineux et jettent un doute sur les effets délétères de l'inflammation suivant un traumatisme aigu.

Abstract

Tendinopathies show a high prevalence and can alter the quality of life for many years. Nevertheless, the pathophysiology of tendinopathies is not well characterized and it may explain the lack of effective treatments to accelerate tendon healing. This thesis was therefore dedicated to the study the role of potential regulators of the pathophysiological sequence following tendon trauma. In a first project we set up an experimental model of acute tendon injury where collagenase was injected into the Achilles tendon of rats. This procedure induces a classical sequence of accumulation of leukocytes where neutrophils accumulate massively 24 hours following the injection of collagenase, followed by macrophages on day 3. We also showed, in a second project, that injection of collagenase reduces the load to failure by more than 50% 3 days post trauma. Moreover, administration of diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, did not rescue tendons from that loss of mechanical strength, presumably because the anti-inflammatory effect was located in the paratenon and not in the core of the tendon where the load-resisting collagen bundles are located. In a third project we studied the role of p53, a putative regulator of the inflammatory process and extracellular matrix homeostasis, on the pathophysiological sequence following an acute tendon trauma. Transactivation inhibition of p53 reduced the accumulation of neutrophils and macrophages in the entire tendon. This anti-inflammatory effect was not associated to a rescue of the mechanical properties and even delayed the onset of healing. In view of the evidence that anti-inflammatory strategies failed to rescue tendons from functional loss, we challenged the dogma that the inflammatory process could induce non-specific damages to the tendon extracellular matrix. Intra-tendinous injection of carrageenan induced a massive accumulation of inflammatory cells. However this was neither associated to a reduction of tendons' collagen content nor to a reduction of the load to failure. In conclusion, we identified new mediators and mechanisms of the pathophysiology of tendons. Our results challenge the concept that inflammatory cells strictly play deleterious effects following tendon trauma.

Avant-propos

Le corps de cette thèse est constitué d'une suite de deux articles publiés (chapitres II et III) et d'un article en révision (chapitre IV). Les travaux réalisés au chapitre II et III ont été publiés dans « Journal of Orthopaedic Research » en 2001; et dans la revue « Laboratory Investigations» en 2003, respectivement. Les travaux effectués au chapitre IV ont été soumis pour publication à la revue « American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology » à l'été 2005. Le contenu intégral des articles, tel que publié ou soumis, a été inclus dans cette thèse sans modifications majeures. Pour ces trois articles, j'ai effectué l'entièreté des expériences et analysé tous les résultats, en plus de réaliser les figures et de participer à la rédaction du manuscrit. Le processus de rédaction fut accompli en collaboration avec mon directeur, le Dr Jérôme Frenette, et révisé par mon codirecteur, le Dr Claude H. Côté. Finalement, le contenu intégral d'un article de synthèse publié dans la revue « Médecine Sciences », en 2004, a été annexé à cette thèse. J'ai effectué la revue de littérature et écrit cet article en collaboration avec le Dr Frenette.

Afin d'alléger le texte, les abréviations scientifiques communes ne sont pas définies systématiquement cependant, une liste exhaustive est présentée à la page X et la lectrice ou le lecteur est donc invité à s'y référer. Les acronymes nouveaux ou moins communs sont également inclus dans la liste des abréviations, en plus de leur définition lors de la première apparition dans le texte.

Remerciements

Dr Frenette a su paver mon chemin à travers plaines, collines et montagnes. Sa rigueur, son implication, son enthousiasme, sa patience et son courage m'ont fait avancer à pas de géant au cours de cette épopée qui, avouons-le, partait de loin. Étant le premier étudiant gradué du Dr Frenette, je ne croirais pas me tromper en affirmant que cette aventure constituait également pour lui un test. Selon mes critères sachez, cher directeur, que vous vous êtes acquitté de votre tâche avec brio.

Cette direction pleine de fougue fut contrebalancée par l'expérience et la sagesse de mon co-directeur. Le Dr Claude H. Côté, calme et solide, fut de bon conseil tant au point de vue pédagogique que moral. Dr Côté, vous m'avez fait intégrer la notion d'équilibre dans plusieurs sphères de ma vie et je vous en suis reconnaissant. Grâce à vous, mon apprentissage s'est effectué tant sur le plan académique que personnel.

Merci à un autre apprenti – Benoît Lapointe – pour ne m'avoir jamais laissé prendre pour acquis quelque information que ce soit. Benoît, je dois t'avouer que depuis ton départ pour l'ouest, je me suis un peu ramolli. Vivement que nos chemins se recroisent! Merci également aux étudiants gradués du laboratoire Frenette, Nadia et spécialement Charles, pour les brins d'entraide que nous nous sommes échangés.

J'aimerais aussi remercier tous les voyageurs qui ont été de passage et qui ont contribué à l'épopée. Geneviève Giguerre et Élise Duchesne, vous vous êtes particulièrement impliquées dans mes projets. Vous m'avez apporté une assistance inestimable ainsi que de précieux rayons de soleil dans certaines journées mornes de manipulations interminables! Patrice Bouchard, ta venue récente a grandement amélioré la structure du laboratoire dont tu es maintenant, n'ayons pas peur des mots, un pilier. Merci pour les dizaines de tâches que tu effectues avec bienveillance, ce qui rend la recherche beaucoup moins lourde à mener.

Je souhaite également remercier le Dr André Marette et son équipe pour l'opportunité pédagogique qu'a constitué le « Lab Meeting », ainsi que pour l'assistance technique. Une mention spéciale pour Sébastien Bergeron, car il fait bon passer du temps en sa compagnie.

Sébastien, je suis heureux d'avoir partagé avec toi quelques milliers de km de vélo, et environ un cinquantième de ce nombre en unité de bières post exercice.

Il ne faudrait surtout pas oublier le support moral qui a été offert par ma famille et mes proches. Sans vous le trajet aurait probablement été le même, mais le voyage, beaucoup moins agréable. Merci spécialement à Marie-Hélène pour ton support constant et pour tout le reste…

Différents organismes m'ont permis de subsister en m'octroyant des bourses d'études dont la Fondation du Dr Georges Phénix, le Réseau Provincial en Adaptation et en Réadaptation et le Fonds de Recherche en Santé du Québec; je leur en suis reconnaissant.

Table des matières

Résumé II
Abstract III
Avant-propos IV
Remerciements V
Table des matières VII
Liste des abréviations X

Chapitre I : Introduction Générale 12
1.1 Problématique 13
1.2 Homéostasie des tendons 14
1.2.1 Localisation et organisation 14
1.2.2 Matrice extracellulaire tendineuse 19
1.2.3 Tests de fonction tendineuse 22
1.2.4 Composantes cellulaires tendineuses 29
1.3 Anabolisme du collagène 30
1.3.1 Acteurs intracellulaires de la synthèse du collagène 30
1.3.2 Stress mécanique, facteurs de croissance et régulation de la MEC 32
1.3.3 Prostaglandines et synthèse de la MEC 33
1.3.4 p53 et régulation de la synthèse du collagène 35
1.4 Biodégradation du collagène 36
1.4.1 Dégradation par les métalloprotéinases 36
1.4.2 Prostaglandines, MMPs et TIMPs 39
1.4.3 p53, MMPs et TIMPs 39
1.5 Étiologie et physiopathologie des tendinopathies chroniques 43
1.5.1 Pathogénie des tendinopathies 44
1.6 Séquence physiopathologique suivant une blessure tendineuse aiguë 50
1.6.1 Le traumatisme 51
1.6.2 Rôle des PGs et de p53 dans la phase catabolique de l'inflammation 52
1.6.3 Résolution de l'inflammation 55
1.7 But et objectifs 56

Chapitre II : Les neutrophiles et les macrophages s'accumulent séquentiellement suivant une blessure au tendon d'Achille 60
Résumé 62
Summary 63
2.1 Introduction 64
2.2 Materials and Methods 65
2.2.1 Experimental design 65
2.2.2 Tissue Preparation 66
2.2.3 Immunohistochemistry 66
2.2.4 Statistical Analysis 67
2.3 Results 67
2.3.1 Inflammatory cells in the EAT procedure 67
2.3.2 Comparison of EAT and NEAT procedures 68

2.4 Discussion 69
2.5 Acknowledgements 71
2.6 Figures and Legends 72
2.7 References 79

Chapitre III : Un anti-inflammatoire non stéroïdien diminue l'accumulation des neutrophiles et des macrophages mais n'améliore pas la réparation tendineuse 82
Résumé 84
Summary 85
3.1 Introduction 86
3.2 Materials and Methods 87
3.2.1 Experimental procedures 87
3.2.2 Drug administration 88
3.2.3 Immunohistochemistry 88
3.2.4 Mechanical testing 89
3.2.5 Measurements of edema and hydroxyproline content 89
3.2.6 Statistical analysis 90
3.3 Results 90
3.3.1 Concentration of inflammatory cells and blood vessels in the paratenon and the core of the Achilles tendon 90
3.3.2 Edema formation, hydroxyproline content and biomechanical properties. ..91
3.4 Discussion 92
3.5 Figures and Legends 96
3.6 References 105

Chapitre IV : Pifithrin-α interfère avec le processus inflammatoire et retarde la guérison suivant une blessure aiguë 110
Résumé 112
Summary 113
4.1 Introduction 114
4.2 Materials and Methods 115
4.2.1 Tendon Injury 115
4.2.2 Drug Administration 116
4.2.3 Histology 116
4.2.4 Mechanical Testing 116
4.2.5 Hydroxyproline Determination 117
4.2.6 Western Blots 117
4.2.7 Gelatin Zymography 117
4.2.8 *In vitro* Assays 118
4.2.9 RNA Isolation and Semiquantitative RT-PCR 118
4.2.10 Statistical Analysis 119
4.3 Results 119
4.3.1 Inflammatory Cell Accumulation 119
4.3.2 Influence of Pifithrin-α on Apoptosis 120
4.3.3 Influence of Pifithrin-α on Healing 120
4.4 Discussion 121
4.4.1 Pifithrin-α Reduces Inflammatory Cell Accumulation 121

4.4.2 Pifithrin-α Delays Tendon Recovery 122
4.5 Acknowledgements 123
4.6 Sources of Support 124
4.7 Figures, Legends and Tables 125
4.8 References 134

Chapitre V : Conclusion générale et perspectives 140
5.1 L'injection de collagénase induit une séquence classique d'accumulation de cellules inflammatoires 141
5.2 L'injection de collagénase induit une perte fonctionnelle 143
5.3 Le modèle d'injection de collagénase possède plusieurs limites 144
5.4 L'administration d'un anti-inflammatoire non stéroïdien perturbe l'accumulation des cellules inflammatoires 145
5.5 La protéine p53 est impliquée dans l'organisation de la réponse inflammatoire et dans l'homéostasie tendineuse 146
5.6 Le processus inflammatoire n'induit pas de dommages non spécifiques à la matrice extracellulaire des tendons 147

Bibliographie : 149

Annexe 1 : Inflammation et réparation tendineuse 162
Résumé 164
Summary 165
A1.1 Introduction 166
A1.2 Blessure et réaction inflammatoire 166
A1.3 Résolution de l'inflammation 168
A1.4 AINS et réparation tendineuse 169
A1.5 Autres effets des AINS 171
A1.6 Conclusion 171
A1.7 Remerciements 172
A1.8 Figures et Légendes 173
A1.9 Références 178

Annexe 2 : Figures complémentaires 182
A2.1 Intra-tendinous injection of carrageenan induces massive accumulation of inflammatory cells. 183
A2.2 Carrageenan injection does not influence tendon hydroxyproline content 184
A2.3 Carrageenan injection does not influence biomechanical properties 185

Liste des abréviations

ADAMTS : A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien
ANOVA : Analysis of variance
AP-1 : Activator protein-1
ARN : Acide ribonucléique
ATF : Activating transcription factor
bFGF : Basic fibroblast growth factor
BMP : Bone morphogenic protein
C/EBP-b : CCAAT/enhancer binding protein-b
cDNA : Complementary DNA
COX : Cyclooxygénase
CTGF : Connective tissue growth factor
DICLO : Diclofenac
DMIE : Dommages musculaires induits par l'exercice
DMSO : Dimethyl sulfoxide
DNA : Deoxyribonucleic acid
dNTP : Deoxynucleotide-triphosphate
EAT : Exposed Achilles tendon
EGF : Epidermal growth factor
EP : E-type prostaglandins G-protein-coupled receptors
ERK : Extracellularly regulated kinase
FGF : Fibroblast growth factor
GC : Sp-1 binding site
GMCSF : Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HSP : Heat shock protein
Hz : Hertz
ICAM : Intercellular adhesion molecule
Ig : Immunoglobulin
IGF : Insulin like growth factor
IL : Interleukine
iNOS : Inducible nitric oxide synthase
JAK : Janus kinase
JMT : Jonction myotendineuse
JNK : c-Jun N-terminal kinase
JOT : Jonction ostéotendineuse
LPS : Lipopolysaccharide
MEC : Matrice extracellulaire
MΦ : Macrophage
MMPs : Métalloprotéinases dirigées contre la MEC
Mpa : Mégapascals
mRNA : Messenger ribonucleic acid

MTJ : Myotendinous junction
MVC : Maximal volontary contraction
N : Newtons
NEAT : Non exposed Achilles tendon
NF : Nuclear factor
NO : Nitric oxide
NSAID : Non-steroidal anti-inflammatory drug
OSE-2 : Osteoblast-specific element-2
OTJ : Osteotendinous junction
PAF : Platetet activating factor
PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS : Phosphate buffered saline
PCB : Placebo
PCR : Polymerase chain reaction
PDGF : Platelet-derived growth factor
PEA3 : Polyoma enhancer A binding protein-3
PECAM : Platelet/endothelial cell adhesion molecule
PFT : Pifithrin-α
PG : Prostaglandine
PLSD : Protected least square difference
PMN : Neutrophils (polymorphonuclear)
RARE : Retinoic acid responsive element
RE : Réticulum endoplasmique
RNA : Ribonucleic acid
SBE : STAT binding element
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SEM : Standard error of the mean
Sil : Silencer sequence
SMAD : Sma (C. elegans) + Mad (Drosophile)
SPRE : Stromelysin-1 PDGF-responsive element
STAT : Signal transducer and activator of transcription
TGF-β : Transforming growth factor beta
TIE : TGF-β inhibitory element
TIMPs : Tissue inhibitor of MMPs (Inhibiteurs tissulaires des MMPs)
TNF : Tumor necrosis factor
TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling

Chapitre I :

Introduction Générale

1.1 Problématique

L'incidence des pathologies tendineuses est relativement élevée et une vaste proportion de la population est familiarisée au terme « tendinite ». En réalité, le pourcentage de la population affecté par les « tendinites », ou par toute blessure tendineuse, est élevé. Les causes des pathologies tendineuses sont multiples : blessures reliées au sport, au travail répétitif, accidents traumatiques, brûlures, chirurgies, etc. On observe que les pathologies tendineuses affectent 11,6 % des travailleurs oeuvrant dans le domaine du textile, (1) 20 % des bouchers, (2) et jusqu'à 50 % des empaqueteurs (3). Les blessures tendineuses peuvent également être le fruit d'un long processus dégénératif qui se concrétise ultimement par une rupture spontanée (4). La prévalence des ruptures spontanées du tendon d'Achille a augmenté de 600 % de 1980 à 1994. Ce type de lésion est retrouvé particulièrement dans les pays industrialisés et pourrait être dû à la fois à la sédentarisation générale et à l'augmentation de la pratique ponctuelle des loisirs à nature sportive chez les adultes de plus de 50 ans. Il est connu que les altérations tissulaires suivant une blessure tendineuse peuvent durer des années, voire toute une vie, et que de 3 à 9 % des patients souffrant de ruptures tendineuses subiront une récidive 3 à 12 mois suivant le traumatisme initial (5). Ces données mettent en évidence l'inefficacité des thérapies actuelles à pallier au lent processus de réparation des tendons.

Les altérations tendineuses affectent aussi le tissu musculaire. Notamment, les muscles rattachés aux tendons lésés sont susceptibles à l'atrophie, à l'augmentation de leur contenu en matrice extracellulaire (MEC) et à la formation d'adhérences (6), ce qui contribue à aggraver la dysfonction et se traduit par une détérioration du pronostique de guérison. Pour ces raisons, l'impact socio-économique des blessures musculosquelettiques est considérable. Au Canada, on évaluait à 12 milliards de dollars par année les coûts associés aux blessures musculosquelettiques en 1994. Près de 24% de ces coûts seraient liés à la thérapie et aux conséquences sociales de la perte fonctionnelle (7).

Une connaissance plus approfondie des processus sous-jacents aux pathologies tendineuses est donc nécessaire afin d'élaborer de meilleures stratégies thérapeutiques, d'améliorer la qualité de la vie et de diminuer le fardeau économique. Ce premier chapitre se veut une

introduction à l'homéostasie des tendons sains puis à l'étiologie des pathologies tendineuses. Les phénomènes de blessure tendineuse, inflammation, résolution de l'inflammation, sont également décrits en détail et les concepts essentiels à la compréhension des chapitres subséquents sont intégrés tout au long de l'introduction.

1.2 Homéostasie des tendons

En guise de préambule à cette section sur l'homéostasie des tendons, il est intéressant de se resituer dans le contexte historique. Les tendons furent longtemps considérés comme de simples cordes. Ironiquement, Ötzi, une momie vieille de plus de 5300 ans trouvée en 1991 était vêtue de peaux animales cousues, entre autres, avec des tendons. Les premières observations macroscopiques sérieuses concernant les tendons datent du 15e siècle où Léonard de Vinci dessinait l'apparence torsadée des tendons des fléchisseurs profonds des doigts, suggérant une structure microscopique complexe. Néanmoins, une vision simpliste et un intérêt mineur ont été voués aux tissus tendineux jusqu'à la fin du 19e siècle. (8) À cette époque, les recherches en sciences de la santé se tournaient plutôt vers les maladies infectieuses et congénitales qui avaient des conséquences dévastatrices. Dans les pays industrialisés, la prévention des maladies infectieuses, l'amélioration des conditions d'hygiène, la multiplication des emplois à tâches répétitives ainsi que l'allongement de l'espérance de vie ont engendré d'autres problèmes, dont les atteintes au système musculosquelettique. Ces profonds changements sociologiques ont entre autre causé une augmentation des stress répétitifs sur l'appareil tendineux ainsi qu'un accroissement de l'incidence des blessures traumatiques, alourdissant de ce fait le fardeau lié aux pathologies tendineuses. C'est en réponse à cette nouvelle problématique que les recherches relatives à la physiologie des tendons se sont grandement développées.

1.2.1 Localisation et organisation

Les tendons relient les muscles aux os pour assurer une transmission efficace de la force et générer le mouvement. Le corps humain contient quelques centaines de tendons distincts possédant tous une structure riche en MEC. La spécialisation histologique des tendons, des muscles et des os implique une grande complexité des zones de liaison entre ces trois

entités. Voici donc une description des trois principales parties des tendons, c'est-à-dire la jonction myotendineuse (JMT), le tendon lui-même et la jonction ostéotendineuse (JOT).

1.2.1.1 La jonction myotendineuse

La JMT se caractérise par une succession de calanques musculaires où s'infiltre du tissu fibreux provenant du tendon (Figure 1). Les nombreux replis membranaires solidifient le lien entre le muscle et le tendon de deux façons : 1- par l'augmentation de la surface de contact et 2- par l'établissement d'une structure tridimensionnelle qui répartit le stress généré par les contractions musculaires (9).

L'augmentation de la surface de contact permet d'établir un grand nombre de liens moléculaires entre le muscle et le tendon. Bien que la structure moléculaire de la JMT soit encore abstraite, deux modèles de liaison sont actuellement proposés (Figure 2). Le premier système est appelé le complexe dystrophine-glycoprotéine (11). Dans ce système, le β-dextroglycan sarcolemmal établit le lien entre la dystrophine, une protéine liant l'actine, et la laminine-2 (12). Les laminines sont des protéines hétérotrimériques (13) en forme de croix qui ont la capacité d'interagir avec une multitude de ligands dont les intégrines et une variété de protéoglycanes (11, 14, 15). Ces protéoglyganes sont elle-mêmes en grande concentration à la JMT et possèdent à leur tour une grande affinité pour différents types de collagènes fibrillaires (16). Bien qu'aucun lien direct n'ait été identifié jusqu'à maintenant, la théorie actuelle veut que cette chaîne actine-dystrophine-β-dextroglycan-laminine-protéoglycans-collagène fibrillaire explique en partie la transmission efficace des forces entre le muscle et le tendon (5).

Le deuxième système moléculaire majeur est celui de l'intégrine α7β1. Les intégrines sont des glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires qui servent à la fois de récepteur et de lien physique entre la cellule et son environnement extracellulaire. Les intégrines interagissent avec une multitude de protéines intracellulaires dont l'actine (17).

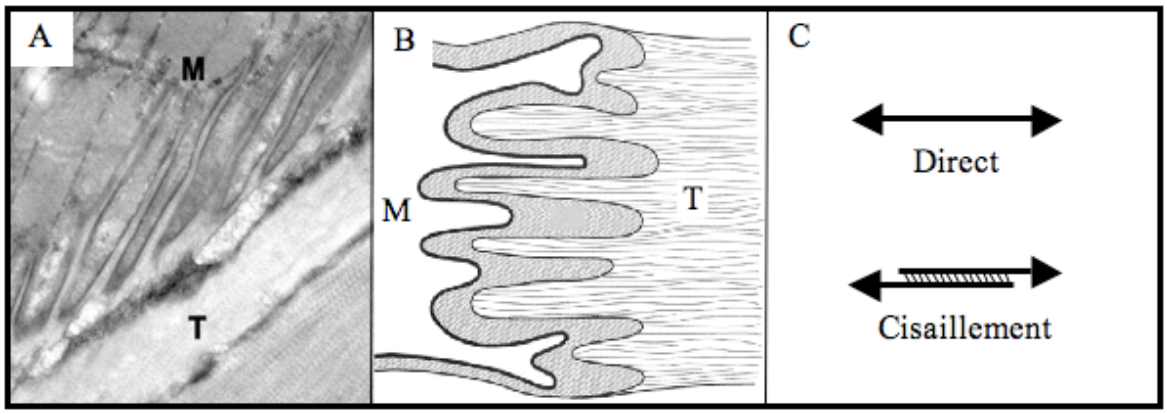

Figure 1: Structure de la jonction myotendineuse. Partie A : coupe histologique d'une JMT, tiré de (10). Partie B : schématisation, tirée de (5). Muscle (M); Tendon (T). Partie C : Illustration du mode de transmission des forces par cisaillement.

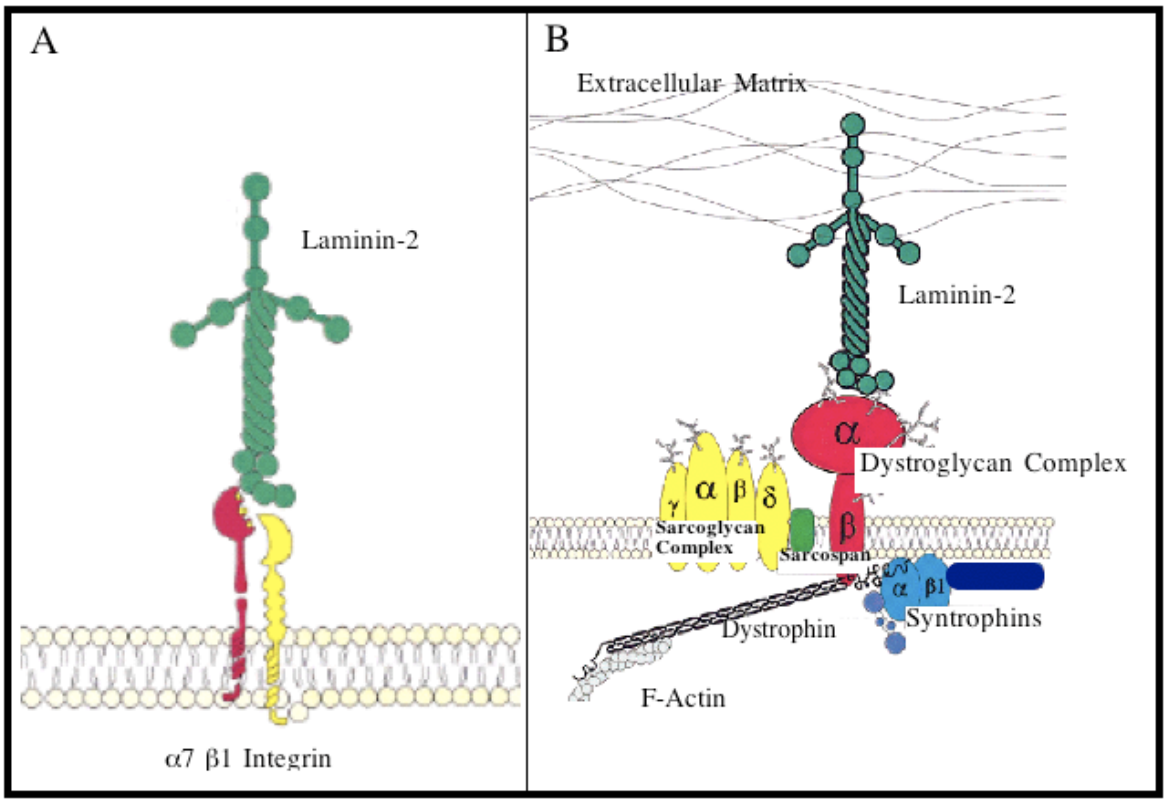

Figure 2: Modèles moléculaires de liaison entre l'appareil contractile et le tendon. A) L'intégrine, B) Dystrophine-glycoprotéine. Adapté de (11).

À son domaine extracellulaire, l'intégrine α7β1 peut se lier avec une variété de molécules, dont les laminines. L'existence de ce modèle est supportée par la présence de laminine-2 et une importante concentration de l'intégrine α7β1 à la JMT. Notamment, la délétion de la sous unité α7 des intégrines entraîne une désorganisation de la JMT (18). Ces systèmes moléculaires combinés à la grande surface de contact entre le tendon et le muscle donnent donc à la JMT la capacité de résister aux stress de tension.

Au point de vue mécanique, la structure repliée de la JMT favorise un patron particulier de transmission des forces. En effet, les sarcolemmes ainsi que les fibres tendineuses se côtoient en grande partie de manière longitudinale dans les invaginations, ce qui favorise une transmission des stress par cisaillement. Le cisaillement se définit ainsi : séparation d'une pièce en deux tronçons glissant l'un sur l'autre suivant le plan de la section qui les sépare, sous l'action de deux forces parallèles et de sens contraire (19) (Figure 1C). Ce mode de transmission de la force prévient l'accumulation de grands stress en un point localisé et évite conséquemment l'endommagement de la structure (20).

1.2.1.2 Le tendon

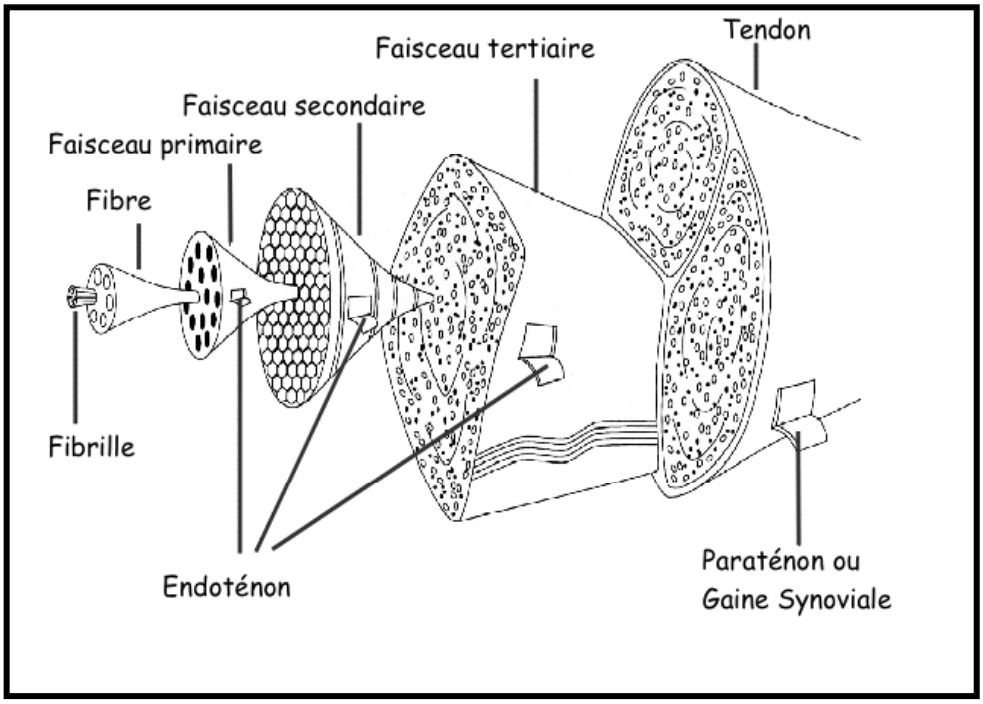

Figure 3: Organisation des tendons. Traduit de :(5).

À partir de la JMT s'étend le tendon proprement dit (Figure 3). Les molécules de tropocollagène forment des microfibrilles qui sont par la suite regroupées en fibrilles, en fibre puis en faisceaux. Les fibrilles ainsi que les fibres de collagène sont entourées d'un amas de différents types de protéoglycanes. Les faisceaux primaires, secondaires et tertiaires sont, quant à eux, réunis par une fine couche de tissu conjonctif lâche appelée endoténon.

1.2.1.3 La jonction ostéotendineuse

Graduellement, les fibres tendineuses adopteront un phénotype osseux afin d'assurer une liaison efficace avec l'os. Trois zones distinctes assurent la transition du tendon à l'os : 1- la zone fibrocartilagineuse, 2- la zone fibrocartilagineuse minéralisée et 3- l'os. La transition entre le tendon et la zone fibrocartilagineuse s'effectue premièrement par une augmentation de la quantité de glycosaminoglycanes. Dans la zone fibrocartilagineuse, les cellules changent leur apparence allongée pour une forme circulaire qui ressemble à celle des chondrocytes. Les fibres de collagène sont de moins en moins définies, la quantité de collagène de type II, communément retrouvé dans le cartilage, augmente et la MEC est constituée majoritairement de glycosaminoglycanes. Dans la zone fibrocartilagineuse minéralisée, la matrice gélatineuse se calcifie graduellement autour des fibres de collagène pour ultimement se fusionner directement avec l'os (5).

1.2.1.4 Paraténon, mésoténon et vascularisation

On divise généralement les tendons en deux grandes classes : les tendons intrasynoviaux et les tendons extrasynoviaux. Les tendons intrasynoviaux sont entourés d'une gaine synoviale remplie de liquide appelé liquide synovial ou synovie. Cette structure permet d'isoler le tendon du reste des organes et de minimiser le frottement ce qui alloue le libre mouvement du tendon qui glisse littéralement à l'intérieur de la gaine. Les gaines synoviales se retrouvent généralement autour des tendons longs comme ceux des muscles longs fléchisseurs des doigts et des orteils. En plus de prémunir contre le frottement, les gaines synoviales assurent un apport en nutriments. Cet apport pallie la faible perfusion sanguine de ces types de tendon qui ne sont vascularisés que par leurs extrémités. La gaine

synoviale assure donc la diffusion des nutriments et des métabolites, qui est essentielle à la survie des cellules tendineuses.

Quant à eux, les tendons extrasynoviaux, comme le tendon d'Achille, sont quant à eux entourés d'un paraténon constitué de tissu conjonctif très lâche, majoritairement des fibres de collagène de type I et III. Le rôle primaire de ce paraténon est analogue à celui des gaines. Il minimise le frottement et assure un apport de nutriments à la partie centrale. Le réseau vasculaire des tendons extrasynoviaux, quoique parcimonieux, présente un haut degré de complexité. Les tendons sont majoritairement vascularisés par les JMT et JOT. Dans le cas du tendon d'Achille, un apport sanguin important provient également de son paraténon et de son mésoténon. Le mésoténon est un amas de tissu conjonctif lâche riche en vaisseaux sanguins situé à sa face antérieure du tendon d'Achille (21). Les quelques vaisseaux sanguins qui proviennent du paraténon et du mésoténon perforent transversalement le tendon d'Achille et se faufilent entre les faisceaux par l'endoténon. L'hypovascularisation du tendon est en accord avec sa faible concentration cellulaire et son métabolisme lent. Cette description générale de la structure des tendons nous permet d'apprécier le haut degré de spécialisation qui assure un apport sanguin minimal mais suffisant à assumer l'homéostasie, le tout dans l'optique d'offrir une résistance suffisante aux forces générées par les muscles afin de produire efficacement le mouvement.

1.2.2 Matrice extracellulaire tendineuse

1.2.2.1 Composition de la matrice extracellulaire tendineuse

La MEC des tendons est composée d'eau, de différents types de collagène, d'élastine, de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes, de glycoprotéines et, dans de très faibles proportions, de matière inorganique. Le pourcentage d'eau des tendons varie en fonction de l'espèce, du genre, du stade de développement, du site anatomique, de l'hydratation et de la condition physiopathologique du tissu (8, 22, 23). Ainsi la quantité d'eau, relativement à la masse tendineuse totale, peut varier de 53 % chez le lapin mature (24), jusqu'à 85 % chez le nouveau-né humain (8, 25). Les tendons de rats contiennent quant à eux approximativement 55 à 60% d'eau (22, 26-29).

On croyait que l'eau jouait le rôle de « lubrifiant » au sein des tendons (30). En fait, des études récentes en résonance magnétique nucléaire indiquent que le niveau d'hydratation des tendons influence certains liens intermoléculaires (31) ce qui affecterait les propriétés mécaniques du collagène. Quel qu'en soit le mécanisme, il est accepté que le contenu en eau des tissus conjonctifs influence leurs propriétés mécaniques et, conséquemment, fonctionnelles. En effet, les tendons normaux se déforment plus facilement sous l'effet d'une tension constante que des homologues partiellement déshydratés (32). Ces résultats ont également été reproduits dans le tissu ligamentaire (33, 34). Nonobstant que le contenu en eau module les propriétés fonctionnelles des tissus conjonctifs et des tendons, il n'en demeure pas moins que ce sont les composantes insolubles du tendon qui sont responsables de sa capacité à résister à de très grandes tensions.

On estime que 90 % des protéines du tendon sain se retrouvent dans l'espace extracellulaire (5). Le collagène compte pour 60 à 85 % de ces protéines (30), ce qui équivaut à environ 70 % de la masse sèche. Le collagène de type I est le plus répandu et représente près de 98 % du collagène tendineux. En raison de sa capacité à s'organiser en fibres résistantes à la déformation (35), le collagène de type I joue un rôle fonctionnel primordial. Le collagène de type III possède aussi la capacité de former des fibres. On observe toutefois que celles-ci ont un diamètre moins élevé que les fibres de collagène de type I et conséquemment, leur capacité à supporter des stress de tension est inférieure à celle du collagène de type I. Le pourcentage de collagène de type III varie de 0 à 10 dépendamment des tendons (36) et sa concentration se verra augmentée dans différentes situations pathologiques. La distribution des protéoglycanes, incluant le dermatane sulfate, la chondroïtine; et des protéoglycanes comme l'acide hyaluronique, varie en fonction des types de stress appliqués sur les différentes régions tendineuses. En raison de leur nature hydrophile et de l'incompressibilité de l'eau, les zones soumises à des stress de compression sont généralement riches en glycosaminoglycanes (3,5 à 5 % de la masse sèche) comparativement aux zones de tension (0,2 % de la masse sèche) (5). D'autres types de collagène (IV, V, VI), l'élastine, des composantes inorganiques ainsi que d'autres protéines non structurales compteront pour 10 % de la masse sèche des tendons.

Ainsi, les structures tendineuses sont majoritairement constituées de collagène de type I. Bien que ce dernier soit en grande partie responsable des propriétés mécaniques du tendon, leur comportement physiologique global est expliqué par l'ensemble des composantes, qui sont elles-mêmes influencées par de nombreux facteurs. Ainsi, l'évaluation fonctionnelle des tendons dans un contexte expérimental doit tenir compte de cet ensemble.

1.2.2.2 Propriétés fonctionnelles des tendons

Dans une optique physiologique, il est primordial de déterminer l'impact fonctionnel des traitements expérimentaux. La prochaine section sera ainsi vouée à la description des propriétés mécaniques des tissus conjonctifs. Ainsi, tout matériel possède des propriétés mécaniques qui lui sont propres et les fibres de collagène n'y font pas exception. Selon certaines conditions, les fibres de collagène soumises à un stress de tension démontreront une bonne capacité à reprendre leur longueur initiale suivant le retrait du stress ayant induit cette déformation. Ce phénomène fait référence à la nature élastique de la déformation définie par Hooke au 17e siècle qui décrivait ainsi l'élasticité : «… the power of any spring is in the same proportion of the tension thereof» (37). Cette définition implique l'accumulation d'une certaine quantité d'énergie potentielle qui permettra au «ressort» de retourner à sa longueur initiale de manière efficace. Les propriétés mécaniques du collagène et des tendons ne s'expliquent que partiellement par cette loi (8). Le collagène, et conséquemment les tendons, démontre également un comportement associé à la viscosité. Lors d'une déformation de nature visqueuse, peu d'énergie sera emmagasinée et le tendon déformé sera peu efficace à reprendre ses dimensions initiales. En raison du fait que les tendons démontrent à la fois des comportements élastiques et visqueux, nous dirons qu'il possède des propriétés viscoélastiques. Cette appellation prend son origine d'un modèle de résistance des matériaux qui stipule que la « réaction à la contrainte d'une matière se comporte comme si elle était composée d'un solide élastique et d'un fluide visqueux où l'écoulement est dépendant de certains paramètres » (19). Ces paramètres sont la charge, la vitesse d'application de la charge ou de l'étirement, et la température. La standardisation de ces paramètres est cruciale afin d'assurer la validité ainsi que la fidélité des tests fonctionnels. En ce qui a trait à la température, l'augmentation de celle-ci en deçà de 60°C augmente la ductilité du collagène tandis que le passage au-delà de 60°C induit un

rétrécissement des fibres et une diminution de son point de rupture (38). (Les autres paramètres seront discutés dans les sections subséquentes.) L'élasticité ainsi que la viscosité impliquent différents corollaires physiologiques, c'est pourquoi différents tests ont été mis au point pour les évaluer.

1.2.3 Tests de fonction tendineuse

Dans cette section, la lectrice ou le lecteur sera brièvement introduit aux tests de fluage et de relaxation, puis une section plus étoffée sera consacrée à la description du test de tension-allongement car ce dernier a été utilisé, dans la présente thèse, pour évaluer les propriétés fonctionnelles des tendons.

1.2.3.1 Essais de relaxation et de fluage (Figure 4)

La relaxation d'un matériel consiste en « la réduction des contraintes par substitution de déformations plastiques aux déformations élastiques » (19). De ce fait, l'essai de relaxation s'effectue classiquement en mesurant la tension générée lors d'un étirement stable et contrôlé sur une période de temps déterminée. La majorité de la relaxation s'effectuera dans les premières secondes du test puis la diminution de la tension deviendra presque nulle après quelques minutes, et ce, indépendamment de l'étirement initial (39). En accord avec la viscosité des tendons, cette perte de résistance perdure une certaine période suivant le retrait de l'étirement. Ce concept est notamment mis en application clinique lors d'étirements où le déplacement, et non la charge, imposé aux membres demeure fixe pendant un intervalle de temps. Dans un contexte dynamique, la relaxation des tendons est interreliée au fluage.

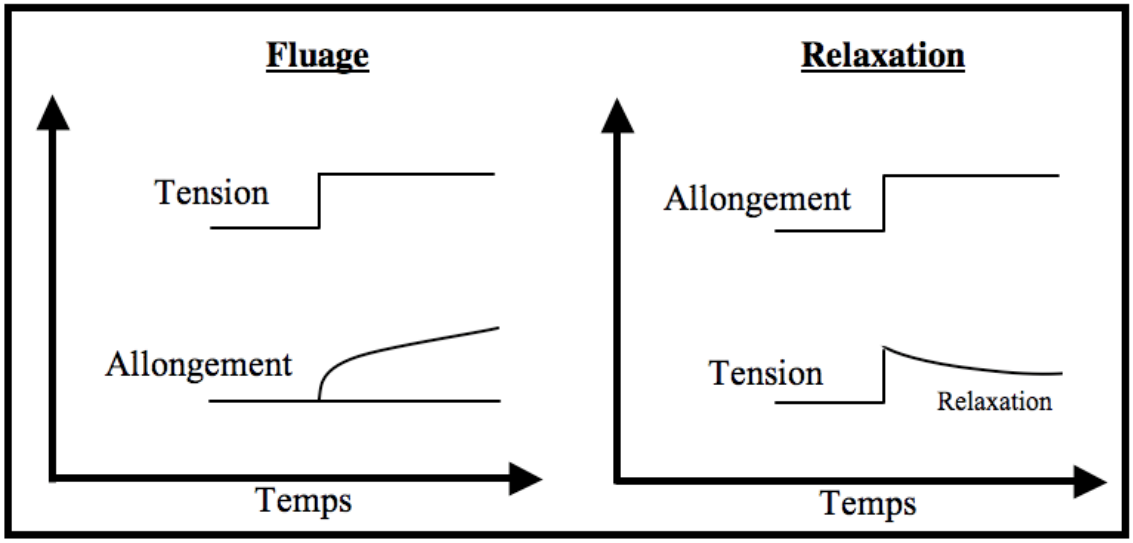

Figure 4: Schématisation des phénomènes de fluage (gauche) et de relaxation (droite). Adapté de (5).

Le fluage se définit comme une « déformation lente subie par une matière soumise à une contrainte permanente » (19). Ce test consiste donc en la mesure de la déformation, en unité de longueur, d'un tendon soumis à une force constante pendant une période prolongée. Les tests de fluage peuvent être effectués de manière statique ou dynamique (Figure 5). Lors du test statique, le tendon est tout simplement soumis à une charge stable, mais lors d'un test dynamique, le tendon sera soumis à une succession de cycles d'étirement à une fréquence constante et variant entre 2 charges constantes. Le test statique mime un étirement sous une charge constante ou une contraction prolongée tandis que le test cyclique mime un étirement balistique ou toute activité de nature cyclique comme la marche (40).

Quoique l'idée ait été remise en doute pendant plusieurs années, le fluage des tendons est un comportement qui prend place *in vivo*, comme l'ont démontré Maganaris et collaborateurs, par l'utilisation de l'ultrasonographie (41). Le fluage statique pourrait avoir comme corollaire physiologique une diminution de la force contractile entraînée par une diminution de la longueur des sarcomères en deçà de la longueur optimale. De leur côté, les tests de fluage cycliques prolongés peuvent induire la rupture totale du tendon ex vivo (42), supportant ainsi l'hypothèse que ce type de stress pourrait faire partie de l'étiologie des

ruptures tendineuses. Néanmoins, Kher et collaborateurs (43) ont spéculé qu'à la suite de cycles répétés de tension équivalant à 100 % de la force déployée lors d'une contraction maximale volontaire, plus de 4h seraient nécessaires à induire une rupture tendineuse complète. L'atteinte du point de rupture pourrait cependant être devancée selon différentes situations pathologiques (42).

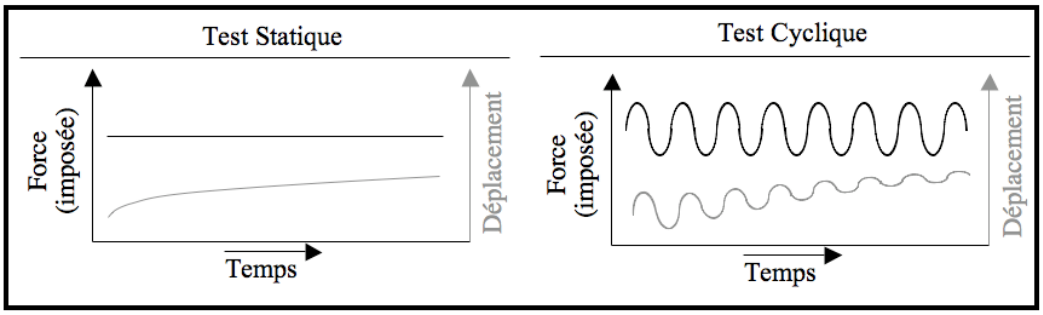

Figure 5: Schématisation de différents tests de fluage.

Les tests de fluage cycliques permettent également d'obtenir une mesure de « la dissipation de l'énergie, quelle qu'en soit sa forme, lorsque les forces imposées sur le tendon sont inversées » (19), ce que l'on appelle l'hystérèse. Cette donnée est recueillie en mesurant l'aire retrouvée entre la courbe générée par l'application de la force et le retrait de celle-ci. (Figure 6 A & B). Un graphique exprimant la force en fonction de l'étirement est ainsi obtenu.

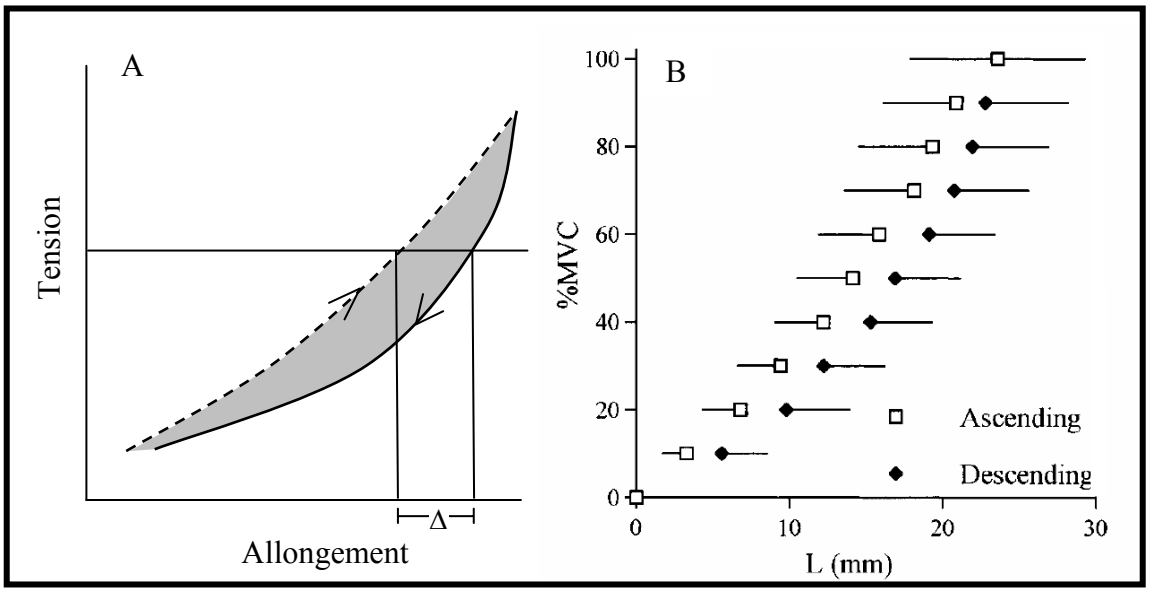

Figure 6: A : Schématisation de l'hystérèse. La portion ascendante de la courbe (ligne noire pointillée), où une force est progressivement apposée, montre un degré d'étirement moins élevé que la portion de la courbe où la force est progressivement enlevée (ligne noire pleine), pour une même tension (Δ), que ce qui sous-tend une perte d'énergie proportionnelle à la zone grise. B : Graphique montrant une aire d'hystérèse classique effectuée chez l'humain où la force de tension, qui est représentée par le pourcentage de la contraction volontaire maximale (% MVC), est exprimée en fonction de l'étirement (L) du tendon d'Achille. Adapté de (44).

Le fluage est ainsi représentatif des propriétés visqueuses des tendons puisqu'il induit une déformation durable, où l'énergie est plutôt dissipée qu'emmagasinée. De plus, ce phénomène présente certaines implications physiologiques, car la dissipation de l'énergie des tendons s'effectue, dans ce contexte, par la libération de chaleur. Également, l'augmentation de la température des tendons favorise leur ductilité et, à des degrés élevés, pourrait induire des dommages au tendon.

1.2.3.2 Essai de tension-allongement

La communauté scientifique s'intéressait sérieusement aux propriétés mécaniques des tendons au 19ième siècle. Cependant, la fameuse courbe tension-allongement avait été observée dès le 18ième siècle. Cette courbe est générée par l'étirement d'un tendon à vitesse constante jusqu'à son point de rupture, et par l'enregistrement de la force de tension

conséquemment générée. Les propriétés mécaniques des tendons sont influencées par les dimensions du spécimen (45), mais il est possible de standardiser cette courbe en divisant la tension générée lors de l'étirement par la surface de section du spécimen (tension); et la longueur de l'étirement par la longueur initiale (déformation relative). Le besoin d'appliquer cette normalisation dépend cependant du devis expérimental sachant que les propriétés mécaniques de tendons homologues controlatéraux provenant d'un même animal ne sont pas différentes et que les propriétés mécaniques de tendons d'animaux de même race, âge, sexe, poids et activité, sont très similaires (46, 47). Évidemment, la forme générale de la courbe n'est pas affectée par cette normalisation. Ainsi, lorsque des fibres de collagène ou les tendons sont étirés à une vitesse constante jusqu'à rupture, on observe une courbe en forme de «S» (Figure 7).

La courbe en «S» caractéristique de l'étirement des fibres de collagène est généralement divisée en 3 régions : la région « toe », qui se situe de 0 à 1% de la déformation relative ; la région linéaire, de 1 à 3% de la déformation relative ; et la région des microlésions qui commence à 3% de la déformation relative et qui continue jusqu'à la rupture totale des fibres de collagène à 8% de la déformation relative. De manière notoire, le pourcentage de la déformation relative associé à chacune des régions est plus élevé pour un tendon entier, comparativement à une fibre de collagène isolée. Il n'est donc pas rare, lors d'un essai tension-allongement, de voir le pourcentage de l'étirement relatif augmenter à 50% avant d'obtenir une rupture complète du tendon, ce qui serait dû à l'arrangement tridimensionnel des faisceaux de collagène et à leur glissement les uns sur les autres (48).

La région « toe », se caractérise par une augmentation curvilinéaire concave de la tension en réponse à l'allongement. Classiquement, il était cru que la forme de cette portion de la courbe correspondait à l'abolissement de la forme vaguée, des fibres de collagène. Fratzl et collaborateurs (49) ont cependant apporté une nuance à cette vision classique de la région « toe » en la subdivisant en 2 régions : « toe » et « heel ». Cette séparation est basée sur le fait que la région concave de la courbe tension-allongement s'étend au-delà du point où des déformations peuvent être détectées en microscopie classique, suggérant que la perte de la forme vaguée n'explique pas à elle seule la région concave le la courbe. Leurs observations effectuées en spectroscopie par absorption de rayons X indiquent qu'une diminution du

désordre moléculaire serait à l'origine de la phase « heel » de la courbe (Figure 7a). Les auteurs spéculent que cette diminution du désordre moléculaire se concrétiserait par le redressement des coudes (kinks) des molécules de collagène.

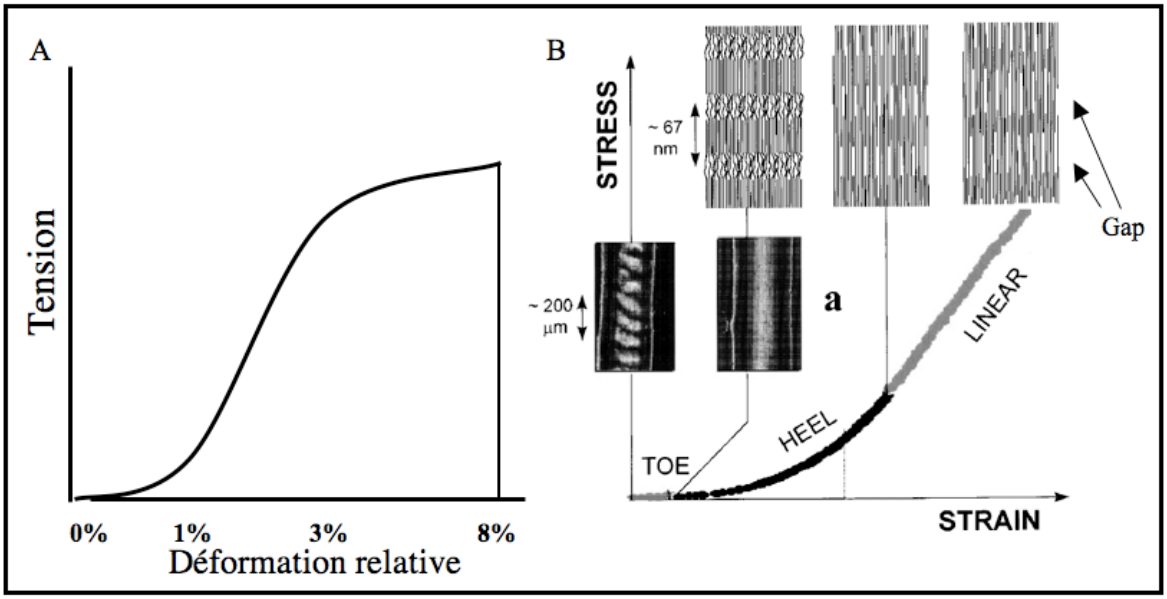

Figure 7: A : Courbe tension-allongement typique. B : Illustration des régions «toe» et «heel» Tiré de (49).

Après la région « heel », l'augmentation de la tension est directement proportionnelle à l'augmentation de la déformation, ce qui caractérise la région dite linéaire. C'est à partir de cette portion de la courbe qu'il est possible de calculer le «Young' modulus», un indice de la rigidité du tendon, qui équivaut à la quantité d'énergie nécessaire à induire l'étirement d'un matériel. Le «Young's modulus» correspond donc à la pente de la région linéaire et se mesure, dépendamment du devis expérimental en N par mm (dans le cas de valeurs absolues) ou en mégapascals (MPa) (dans le cas d'une courbe normalisée). À l'échelle moléculaire, l'étirement des tendons s'explique par le glissement des molécules de collagène (49) ce qui pourrait se traduire par une augmentation de la longueur des régions « gap » (Figure 7). Au-delà de la région linéaire, l'étirement dépasse la limite physiologique du tendon et se produisent alors des micro et subséquemment des macro ruptures. La courbe s'aplatira et un point de rupture totale marquera la fin du test. Le test de

tension-allongement permet ainsi d'obtenir à la fois, des indices de rigidité du tendon et de sa capacité maximale à soutenir une charge. Malgré tout, ce test comporte plusieurs biais expérimentaux et représente un défi de standardisation.

En premier lieu, la taille du spécimen doit être considérée tant au plan analytique que méthodologique. Au plan analytique, il est reconnu que la force de résistance d'un tendon est proportionnelle à sa surface de section. De cette manière, l'unité préférée afin de comparer différents tissus est le MPa (quantité de N soutenus en fonction de la surface de section du spécimen en mm2). Il est généralement cru que les tendons sains peuvent soutenir de 50 à 100 N/mm2 (5). Il a été rapporté que les tendons d'Achille de rats peuvent quant à eux soutenir des tensions équivalant à 40 N/mm2 (50).

Au plan méthodologique, une courbe de tension-allongement valide doit être exempte de « glissements » entre le spécimen et les serres, ce qui entraînera une sous-estimation de la rigidité et du point de rupture de la structure. Dépendamment des devis expérimentaux et des spécimens, différentes stratégies ont été utilisées afin de minimiser l'effet de glissement. Parmi ces stratégies on compte l'utilisation de pinces cryogéniques (51). L'utilisation de ces pinces nécessite toutefois des spécimens de gros calibre puisque la température affecte les propriétés mécaniques du collagène. Les spécimens très longs peuvent aussi être déshydratés à leurs extrémités (38, 52), cependant cette technique ne peut être transférée aux spécimens courts en raison de la variation du contenu en eau de la portion testée. Les groupes de recherche utilisant des spécimens de petite taille ont plutôt opté pour l'utilisation de colle, appliquée sur les pinces (53, 54). Cette technique semble offrir des résultats valides, mais un haut taux d'insuccès est encore dû aux glissements (55).

Un autre point important à considérer est l'effet de serrage. Ce phénomène résulte de la compression d'un matériel, de la distribution non uniforme de la force de serrage, de l'accumulation de stress près des pinces et de l'altération conséquente de la structure à évaluer (38). Le serrage cause des ruptures pouvant s'étendre jusqu'à quelques millimètres des pinces, ce qui rend la détection de ce phénomène pratiquement impossible sur de courts spécimens. Ainsi, d'autres stratégies ont été mises de l'avant afin de minimiser la concentration des forces induites par les pinces. Entre autres, Almeida et collaborateurs (50) ont recouvert les pinces de caoutchouc tandis que Probst et collaborateurs (55) ont

apposé du papier, ce qui a partiellement amélioré la situation. La mesure dynamique des propriétés fonctionnelles des tendons de petite taille demeure donc un défi technique et il est reconnu que ces protocoles sous-estiment les propriétés mécaniques réelles des tendons (8, 38, 52). Ce type de test est quand même grandement utilisé puisqu'il permet de comparer l'effet de différents traitements expérimentaux sur plusieurs paramètres déterminants de la capacité fonctionnelle des tendons (50, 56, 57).

1.2.4 Composantes cellulaires tendineuses

Comme il a été mentionné précédemment, le tendon est une structure très riche en MEC et conséquemment, le ratio cellule/matrice y est faible. Parmi ces cellules on compte les chondrocytes, mastocytes, les cellules endothéliales et musculaires des vaisseaux sanguins et des cellules dendritiques. Les cellules les plus communes sont cependant les ténoblastes et les ténocytes. On retrouve les ténoblastes entre les fibres de collagène, leur forme varie de ronde à allongée et ils possèdent un appareil de Golgi volumineux, ce qui suggère une activité de synthèse assez élevée. Les ténocytes représentent un plus faible pourcentage des cellules tendineuses et leur concentration augmenterait avec l'âge. Ces cellules ont une apparence très allongée en coupes longitudinales, mais les coupes transversales laissent paraître une forme étoilée. D'ailleurs, les expansions des ténocytes pourraient compenser pour leur nombre restreint. Leur ratio noyau/cytoplasme est élevé, suggérant une activité métabolique plus faible que celle des ténoblastes (résumé par (58)). Les ténoblastes et les ténocytes sont interreliés par des jonctions de type « gap » (59) qui seraient impliquées dans un réseau cellulaire tridimensionnel sensible aux variations de stress mécanique (60). Cette caractéristique morphologique assurerait une modulation efficace de l'activité de synthèse ou de résorption de la MEC par les ténocytes/ténoblastes qui ont pour rôle majeur d'assurer l'adaptation adéquate de l'appareil tendineux aux différents stress mécaniques.

1.3 Anabolisme du collagène

1.3.1 Acteurs intracellulaires de la synthèse du collagène

Les protéines de la famille du collagène sont caractérisées par la présence répétitive de la séquence d'acides aminés Gly-X-Y où Gly est une Glycine et X et Y sont des résidus proline, et quelques fois, lysine. Plus de 25 types de collagène ont été identifiés à ce jour, mais seule une fraction de ces protéines a la capacité de former des fibrilles, le collagène de type I étant l'archétype de cette sous-classe de collagène (61) (Tableau 1). Le collagène de type I est le fruit d'une torsade entre 2 chaînes α1 et une chaîne α2, qui proviennent de 2 gènes différents. Suite à l'activation de la transcription (section suivante), les chaînes de procollagène α sont traduites puis se retrouvent dans le réticulum endoplasmique (RE) où elles interagissent avec au moins neuf protéines différentes (62) ce qui mènera à leur assemblage en triple hélice dextrogyre. Parmi ces protéines, la prolyl 4-hydroxylase, la lysil hydroxylase ainsi que la protéine de choc thermique (HSP) 47 jouent des rôles dominants. HSP47 chaperonnerait les unités α assemblées et non assemblées dès leur entrée dans le RE rugueux jusqu'à leur sortie dans l'appareil de Golgi. Quoique son rôle exact reste encore à clarifier, on suspecte que HSP47 participerait à l'entrée des chaînes α dans le RE (63), empêcherait le repliement des sous unités α sur elles-mêmes et ralentirait la sécrétion des molécules de collagène pour assurer une maturation adéquate (64). Lors de son transit dans le RE, la triple hélice constituée de différentes chaînes α est solidifiée par l'hydroxylation des résidus proline et lysine par la prolyl 4-hydroxylase et la lysil hydroxylase. Cette caractéristique est intéressante au plan analytique considérant que la concentration de l'hydroxyproline, résultat de l'hydroxylation de la proline, est environ 5,4 fois plus élevée dans le collagène que dans toute autre protéine. Sa quantification est ainsi une manière acceptée (65) de comparer, sous l'influence de différents traitements, le contenu en collagène des tissus qui, d'or et déjà sont riches en collagène comme, les ligaments, la peau et les tendons (23, 61).

Tableau 1: Description des différents collagènes pouvant s'assembler sous forme de fibrilles. Inspiré de (5, 61).

Types	Composition moléculaire	Gène	Chromosome		Distribution	
			Humain	Rat	Générale	Dans les Tendons
I	[α1(I)]2 + α2(I)	COL1A1 COL1A2	17 7	10 4	Tendons, ligaments, peau, cornée, os	Fibres de collagène. Endoténon, épiténon, paraténon, JMT
II	[α1(II)]3	COL2A1	12	7	Cartilage, corps vitré, annulus pulposus	Tendon embryonnaire
III	[α1(III)]3	COL3A1	2	9	Peau, paroi des vaisseaux sanguins, fibres réticulaires	Zone cartilagineuse de la JOT
V	α1(V) + α2(V) + α3(V)	COL5A1 COL5A2 COL5A3	9 2 19	3 9 8	Poumon, cornée, os,	Membranes basales des vaisseaux sanguins, JMT
XI	α1(XI) + α2(XI) + α3(XI)	COL11A1 COL11A2 COL11A3	1 6 6	2 20 N/A	Cartilage, corps vitré	N/A

L'hydroxylation des lysines contribue à la formation de ponts hydrogène entre les différentes sous unités α, pour solidifier la structure du complexe protéique. À sa sortie de l'appareil de Golgi, les peptides terminaux du domaine NH3 des molécules seront clivés par des enzymes de la famille ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs), plus spécifiquement par ADAMTS-2 (66). Les peptides terminaux situés à l'extrémité COOH seront quant à eux clivés par la protéine bone morphogenic protein (BMP)-1 (67, 68), ce qui permettra l'assemblage extracellulaire des molécules de procollagène, en collagène puis en tropocollagène ou microfibrille. L'assemblage adéquat des microfibrilles serait par la suite assuré par la présence de décorine, une protéoglycane, par un mécanisme qui reste à déterminer (69).

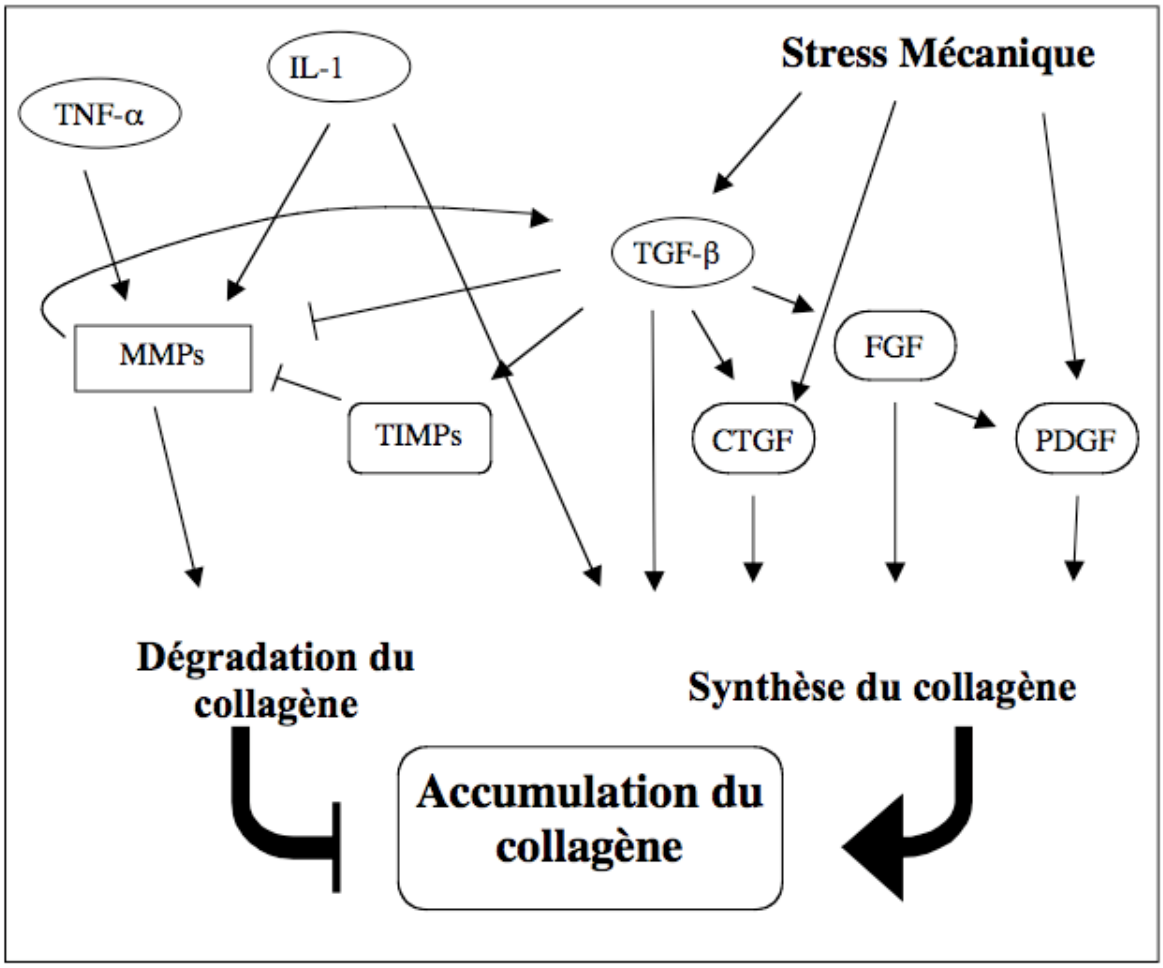

Figure 8: Résumé des facteurs influençant potentiellement le contenu en collagène des tendons.

1.3.2 Stress mécanique, facteurs de croissance et régulation de la MEC

Le stress mécanique ainsi que différents facteurs de croissance et cytokines comme IL-1, IL-4, TGF-β, IGF-1, CTGF, FGF (voir la liste des abréviations) induisent la synthèse de collagène (30, 70-75) (Figure 8). Les effets du stress mécanique et des facteurs de croissance sur la synthèse de collagène sont reliés. Dans différentes lignées cellulaires capables de synthétiser du collagène, le stress mécanique a la capacité d'induire la synthèse de différents facteurs de croissance (76-78), ainsi que la synthèse de collagène via différentes cascades de signalisation en aval de structures protéiques et récepteurs sensibles aux stress mécaniques comme les complexes d'adhésion focaux et les intégrines. La synthèse de collagène induite par le stress mécanique est partiellement dépendante de la

libération de facteurs de croissance car, dans les cellules stressées mécaniquement, la neutralisation du TGF-β diminue la synthèse de collagène (79, 80). Les mécanismes de régulation de la synthèse du collagène par le TGF-β font encore l'objet de recherches. Malgré tout, il est accepté que le TGF-β induise directement la synthèse de collagène via l'activation de certains « éléments de réponse au TGF-β » dans le promoteur du gène de la chaîne α2 du collagène type I (73). Le TGF-β induit également l'expression d'autres facteurs de croissance comme le CTGF (81) et le FGF (82) qui induisent à leur tour la synthèse du collagène et favorisent la stabilisation de l'ARN messager des chaînes α1 et α2 du collagène type I (83). Ainsi, différents mécanismes régulent la synthèse du collagène et ces mécanismes sont partagés entre le stress mécanique, la libération de facteurs fibrogéniques et les mécanismes intracellulaires menant à stabilisation des transcrits de sous-unités du collagène.

1.3.3 Prostaglandines et synthèse de la MEC

Les prostaglandines (PGs) sont des médiateurs lipidiques faisant partie de la famille des éicosanoides qui résultent de la conversion de l'acide arachidonique par les enzymes cyclooxygénases (COX)-1 (constitutive) et COX-2 (inductible) (Figure 9). Via l'activation de leurs récepteurs, les PGs sont impliquées dans une multitude de processus physiologiques et physiopathologiques dont, le cycle ovarien, l'angiogenèse, le cancer, l'inflammation et la résolution de l'inflammation. De nouvelles données montrent que les PGs sont aussi impliquées dans la régulation de la MEC. Les stress mécaniques reconnus pour stimuler le renouvellement du collagène *in vivo* et sa synthèse *in vitro*, entraînent une augmentation de la libération de PGE_2 (84) (85). L'implication des PGs dans la régulation de la MEC est acceptée malgré que leurs effets soient encore controversés. Les conclusions de nombre d'études effectuées *in vitro*, utilisant différents types cellulaires, suggèrent que la PGE_2 ainsi que la $PGF_2\alpha$ inhibent l'expression et/ou la synthèse de collagène (75, 86-90). Cette inhibition se manifeste indépendamment des récepteurs EP1 et EP3 mais nécessite l'activation du récepteur EP2 (89).

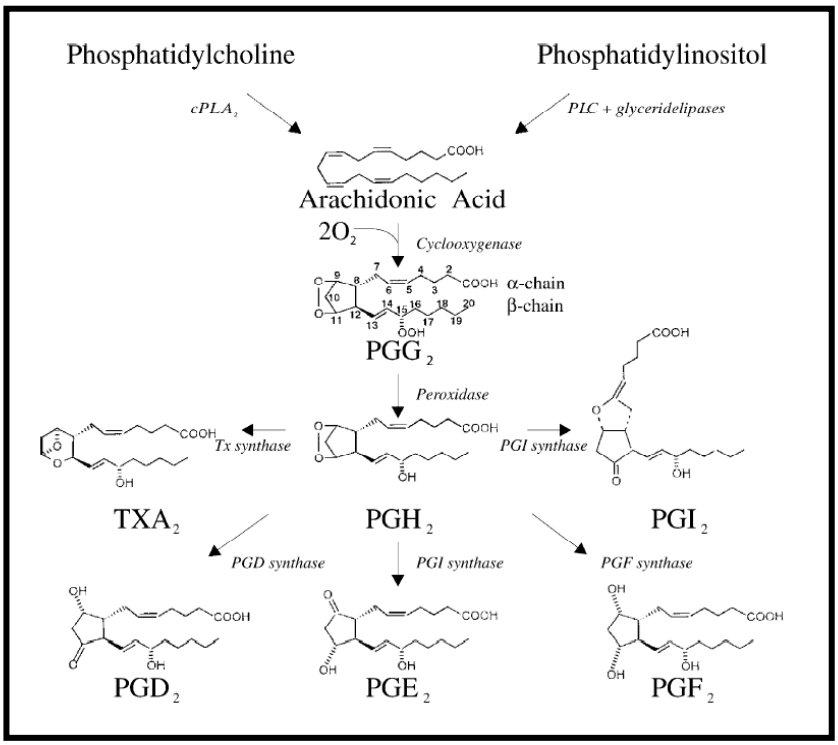

Figure 9: Métabolisme de l'acide arachidonique par les COX. Adapté de (91).

Également, Hui et collaborateurs (86) ont montré que PGE_2 inhibe la production de la protéine HSP47 qui, comme il a été mentionné plus tôt, participe à la biosynthèse du collagène. Cet effet d'inhibition relativement unanime de la synthèse de la MEC *in vitro* est toutefois loin d'être supporté pas les études effectuées *in vivo*. En effet, l'administration de PGE_2 stimule l'expression de l'ARN des collagènes de type I et III mais n'affecte pas le contenu en collagène d'implants de polyvinyle alcool (92). Aussi, l'injection régulière de PGE_2 chez la souris augmente l'activité du promoteur du collagène de type I dans les cellules osseuses. De manière contradictoire, une étude a montré que l'administration, continue et à long terme, d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) non spécifiques, c'est-à-dire capables d'inhiber les COX 1 et 2, pourrait augmenter la quantité de collagène insoluble ainsi que la tension de rupture de tendons de rats (26). Dans cette étude, l'augmentation du contenu en collagène associée à l'administration d'AINS sous-tend que les produits des COX, dont les PGs, interféreraient avec l'accumulation de collagène. En raison de résultats opposés, le rôle *in vivo* des PGs sur la régulation du collagène des tendons, en réponse à des stress physiologiques, reste encore à déterminer.

1.3.4 p53 et régulation de la synthèse du collagène

La protéine p53 est un facteur de transcription impliqué dans le maintien de l'intégrité du génome de par sa capacité à arrêter le cycle cellulaire et d'induire l'apoptose dans les situations où l'ADN génomique est irrémédiablement endommagé. Il n'est donc pas surprenant que cette protéine soit mutée dans presque 50 % des cancers. p53 est généralement distribuée de façon parcimonieuse et possède une durée de vie d'environ 20 minutes. En réponse à différents stress, la synthèse de p53 et des modifications post-traductionnelles assurent l'augmentation de l'activité et de la concentration de cette protéine (93). Une fois active, p53 interagit directement avec l'ADN ou via certains complexes protéiques afin de moduler l'expression de gènes cibles. L'activité transcriptionnelle de p53 a donc été abondamment étudiée dans le contexte de la modulation de la survie cellulaire. De récentes études suggèrent cependant que p53 pourrait également jouer un rôle clé dans la régulation de la MEC.

Ce paradigme provient du fait que différents désordres fibrotiques, dont la fibrose pulmonaire idiopathique (94) ainsi que la fibrose buccale sous-muqueuse (95), sont associés à une mutation de p53. Il a également été observé que la modulation génétique de p53 dans un modèle de traumatisme pulmonaire accroît la déposition de collagène (96). Bien que l'étude du rôle de p53 dans la synthèse de la MEC soit un champs de recherche relativement nouveau, différentes pistes mécanistiques ont été suivies afin d'évaluer son implication. Il est maintenant connu que p53 peut interagir directement avec les molécules de signalisation intracellulaires en aval du récepteur du TGF-β, appelées SMADs (97). Concrètement, p53 interfère avec l'interaction entre SMAD 3 et p300 (98), ce qui module l'expression du collagène de type I. Peu de données sont encore disponibles concernant l'implication de p53 dans la déposition du collagène fibrillaire. De plus, la plupart des études touchant au rôle de p53 sur la déposition des constituants de la MEC ont utilisé des modèles de cellules tumorales ou des méthodes génétiques de surexpression qui ne représentent pas vraiment la situation d'homéostasie tendineuse. Ainsi, il est possible que p53, quoique parcimonieuse en situation basale, puisse influencer l'homéostasie MEC tendineuse. Cependant, cette hypothèse n'a jamais été vérifiée.

1.4 Biodégradation du collagène

1.4.1 Dégradation par les métalloprotéinases

L'activation des différentes MMPs est complexe et nécessite parfois une cascade de digestion impliquant différentes MMPs. Cette section vise à situer la lectrice ou le lecteur concernant le rôle des MMPs dans la régulation de la MEC et à présenter les mécanismes de régulation transcriptionnelle. Les mécanismes explicites d'activation et d'inactivation des MMPS ne seront donc qu'effleurés.

Les métalloprotéinases dirigées contre la MEC (MMPs) sont des enzymes capables de dégrader plusieurs composés, dont les collagènes fibrillaires, différentes protéoglycanes, glycosaminoglycanes (Tableau 2) ainsi qu'une variété d'autres protéines et glycoprotéines. Les MMPs comptent environ 25 membres qui ont des spécificités ainsi que des mécanismes de régulation différents (99). Parmi ces mécanismes, on compte l'activation protéique, l'inhibition par les inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs) ainsi que la régulation de l'expression de leur gène et du gène des TIMPs. Les 4 TIMPs possèdent un large spectre d'inhibition qui couvre vraisemblablement la majorité des MMPs identifiées à ce jour. Ainsi, différents TIMPs seront libérés dans différents tissus afin de régulation l'activation des diverses MMPs(100).

Les MMPs comprennent généralement un prodomaine, un domaine catabolique, une région charnière et un domaine hémopexine. On appelle les MMPs non activées zymogènes ou pro-MMPs. L'activation des MMPs peut s'effectuer de différentes manières dont le clivage du prodomaine et la libération conséquente du site catalytique. Également, les MMPs peuvent être activées via une modification chimique comme un changement de pH ou la nitration de domaines spécifiques (99). On considère généralement que les MMPs 1, 8 et 13 sont responsables de la dégradation du collagène fibrillaire et certaines études suggèrent également que MMP-2, dans certaines conditions, pourrait aussi jouer ce rôle.

Tableau 2: Appellations et principaux substrats des MMPs. Tiré de (101).

Ancienne appellation	**Nouvelle appellation**	**Substrats connus**
Collagénases		
Collagénase-1	MMP-1	Collagènes (I, II, III, VII, VIII et X)
Collagénase-2	MMP-8	Collagènes (I, II, III, V, VII, VIII et X), gélatine, aggrécane
Collagénase-3	MMP-13	Collagènes (I, II, III, IV, IX, X, XIV), gélatine, aggrécane, perlecane, ténascine-C, fibronectine, ostéonectine
Gélatinases		
Gélatinase A	MMP-2	Collagènes (I, IV, V, VII, X, XI et XIV), gélatine, élastine, fibronectine, laminine-1, laminine-5, galectine-3, aggrécane, décorine, MMP-13, « hyaluronidase-treated versican », « proteoglycan link protein », ostéonectine
Gélatinase B	MMP-9	Collagènes (IV, V, VII, X, et XIV) gélatine, élastine, galectine-3, aggrécane, fibronectine, « hyaluronidase-treated versican », « proteoglycan link protein », entactine, ostéonectine

Différentes évidences soutiennent l'implication des MMPs et des TIMPs dans l'homéostasie des tendons sains. Toutes provenances confondues, les cellules tendineuses ont la capacité de libérer plusieurs MMPs dont MMP 1, 2, 3, 9 et 13 ainsi que les TIMPs 1 à 4 (102-111). Les conclusions des études effectuées *in vitro* convergent vers l'idée que le stress de tension interfère avec la libération des MMPs. Notamment, les stress de tension inhibent l'expression de MMP-1 dans les cultures primaires de ténocytes/ténoblastes provenant de rats (104) tandis que l'absence de stress stimule l'expression de MMP-1 (109). L'absence du gène codant pour MMP-1 chez le rat jette toutefois un doute sur l'exactitude de ces résultats. Il est cependant très probable que les auteurs de cette étude aient confondu MMP-1 avec MMP-13, qui présente des caractéristiques homologues (112). Outre le stress mécanique, d'autres facteurs peuvent influencer la libération des MMPs. Par

exemple, les ténocytes/ténoblastes ensemencés sur une plaque de culture recouverte de collagène de type I libèrent MMP-2 et MMP-9 tandis que ces mêmes cellules ne se comportent pas ainsi une fois liées à un matériel synthétique, suggérant que la composition de la MEC influence la libération des MMPs. Aussi, le stress mécanique agit en synergie avec certaines cytokines pro-inflammatoires. À titre d'exemple, le stress de tension augmente la synthèse de MMP-3 stimulée avec l'IL-1β.

L'influence du stress mécanique sur la libération des TIMPs est d'une importance cruciale en ce qui a trait à la régulation de la MEC. Cependant, peu de données sont encore disponibles dans le contexte du tendon. Il est toutefois à noter que, dans des fibroblastes provenant du ligament périodontal, un stress de tension augmente l'expression du gène de TIMP-1 et de TIMP-2 (113). Des résultats divergents ont cependant été obtenus à l'aide de fibroblastes cutanés, suggérant que l'effet du stress mécanique en regard de la libération des TIMPs pourrait être dépendant de la souche de cellules utilisées (114). Les études effectuées *in vitro* suggèrent donc que la régulation des MMPs et des TIMPs est extrêmement complexe et peut être influencée par de nombreux facteurs tels les stress mécaniques, le type cellulaire, la matrice d'attachement ainsi que les médiateurs présents dans le milieu de culture.

Les résultats issus des études effectuées *in vivo* montrent quant à elles que des stress physiologiques, comme l'exercice, peuvent moduler l'expression et la libération des MMPs ainsi que des TIMPs. Archambault et collaborateurs (103) ont entre autres démontré, dans un modèle de stress tendineux induit par une contraction musculaire stimulée électriquement chez le lapin, que l'expression de différentes MMPs était augmentée, mais que cette augmentation n'était pas associée à une altération histologique des tendons. Chez l'humain, Koskinen et collaborateurs ont montré que la course sur tapis roulant peut induire une libération de MMP-2, de MMP-9 ainsi que de TIMP-1 et TIMP-2 dans l'espace péri tendineux du tendon d'Achille humain. Bien que l'on soupçonne que ces médiateurs influencent le renouvellement du collagène *in vivo*, le rôle exact des MMPs et des TIMPs dans l'homéostasie des tendons reste encore à déterminer.

1.4.2 Prostaglandines, MMPs et TIMPs

Malgré que peu d'études établissent un lien entre les PGs les MMPs et les TIMPs dans le contexte des cellules tendineuses, plusieurs travaux effectués sur d'autres souches cellulaires relient ces médiateurs de l'homéostasie de la MEC. La PGE_2 accroît la synthèse des MMPs -1 et -9 une fois stimulée par le TNF-α et le GMCSF (115). Cette PG stimule également la transcription de MMP-2 via ETS-1 (116) et est essentielle à l'induction de la transcription de MMP-2 stimulée par IL-1β (117). Tung et collaborateurs (118) ont montré qu'une concentration de 5mg/ml de PGE_2 inhibe l'expression des MMPs -1, -3, -13 et de TIMP-1 induites par IL-1β. Les conclusions de cette étude sont cependant affaiblies par le fait que les doses de PGE_2 utilisées étaient bien au-delà des valeurs physiologiques. Cependant, une autre étude confirme que PGE_2 pourrait inhiber l'expression de MMP-13 induite par TNF-α à des concentrations plus réalistes (119). D'un autre côté le Latanoprost, un analogue de $PGF_2\alpha$, diminue l'expression basale de MMP-1, -2 et 8, mais augmente MMP-3, -10 ainsi que TIMP-1, -2, et -3. $PGF_2\alpha$ inhibe l'expression de MMP-1 induite par IL-1β. Le métabolite de PGD_2, prostaglandine 15-deoxy-delta$^{(12,14)}$ J_2, inhibe l'expression de MMP-1 et -13 dans les fibroblastes (120) mais stimule MMP-1 dans les cellules endothéliales(121).

Outre le fait que PGE_2 semble préférentiellement impliquée dans la stimulation de la synthèse des MMPs, plutôt que dans leur inhibition, aucune conclusion franche ne peut être actuellement tirée de ces résultats, conséquemment aux différences de modèles. Les PGs semblent toutefois jouer un rôle non négligeable en regard de la régulation des MMPs et des TIMPs mais peu de publications s'intéressent à cette question dans le contexte du tendon.

1.4.3 p53, MMPs et TIMPs

La synthèse des MMPs est influencée par une variété de facteurs, molécules, cytokines et facteurs de croissance dont le stress mécanique, le NO, le M-CSF, les PGs, le TNF-α, L'IL-1, le PDGF, le TGF-β, la fractalkine, MIF, MCP-1 et probablement par d'autres médiateurs (100, 102, 122-126). La multitude des facteurs influençant la synthèse des MMPs sous-tend

une régulation complexe et cette section sera dédiée à décrire les différentes cascades cellulaires menant à la modulation transcriptionnelle des MMPs et des TIMPs.

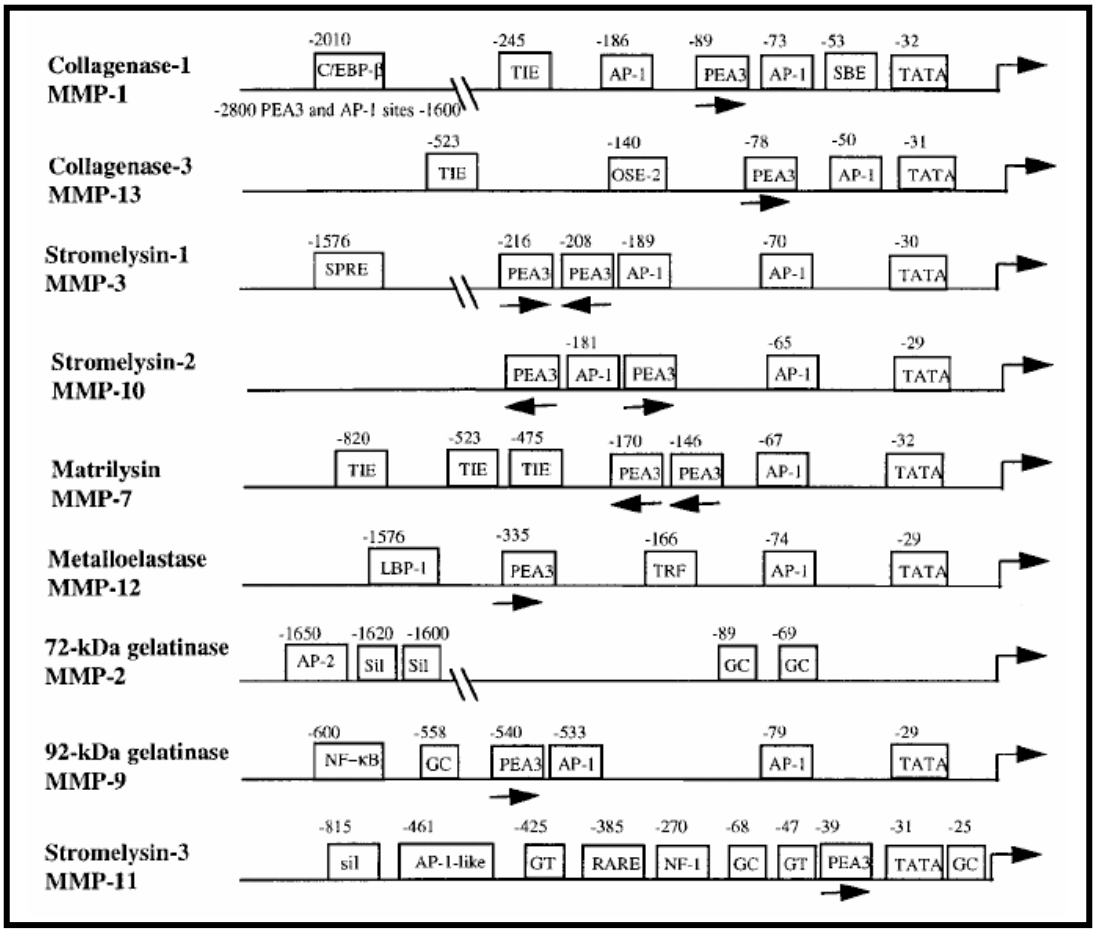

Figure 10: Éléments de régulation dans le promoteur des gènes des MMPs humaines. Les boîtes indiquent les « cis-acting elements » : AP-1, activator protein-1; PEA3, polyoma enhancer A binding protein-3; TIE, TGF-β inhibitory element; GC, Sp-1 binding site; SBE, STAT binding element; C/EBP-b, CCAAT/enhancer binding protein-b; OSE-2, osteoblast-specific element-2; SPRE, stromelysin-1 PDGF-responsive element; TRF, octamer binding protein; Sil, silencer sequence; NF-κB, nuclear factor- κB; NF-1, nuclear factor-1; RARE, retinoic acid responsive element. Tiré de (135).

Une variété de régions modulatoires ont été identifiées dans le promoteur des différentes MMPs humaines (Figure 10). On peut remarquer que, de manière générale, les promoteurs des MMPs sont riches en séquences AP-1 et PEA3 et ces dernières jouent un rôle prédominant dans l'activation de la transcription des MMPs. Il est généralement cru que les sites AP-1 à proximité du site d'initiation de la transcription sont responsables des niveaux

basaux de transcription tandis que la séquence AP-1 distale régule les taux de transcription(127). Il est bien connu que les sites AP-1 lient Fos et Jun, et que les sites PEA3 lient les facteurs de transcription de la famille ETS, ce qui sous-tend une implication importante des MAP kinases dans la régulation transcriptionnelle des MMPs (Figure 11). D'ailleurs, une certaine communication pourrait s'effectuer entre la voie de ERKs et des JNKs puisque Erg, un membre de la famille ETS pourrait, en plus de se lier directement avec les éléments cis, interagir avec la voie des JNKs de manière à moduler l'expression des différentes MMPs (128). D'autres facteurs de transcription ont la capacité de moduler l'expression des MMPs dont NF-κB, STAT, p53, ATF3 ainsi que les SMADs. Par exemple, l'activation de NF-κB stimule l'activation de MMP-1, 2 et 9 (129-131) et le TGF-β inhibe la transcription de MMP-9 dépendamment à NF-κB (132). Le TGF-β peut également réprimer l'expression de MMPs via la liaison de SMAD 3 au « TGF-β inhibitory element » (TIE), comme c'est le cas pour MMP-1(133) et MMP-3 (134).

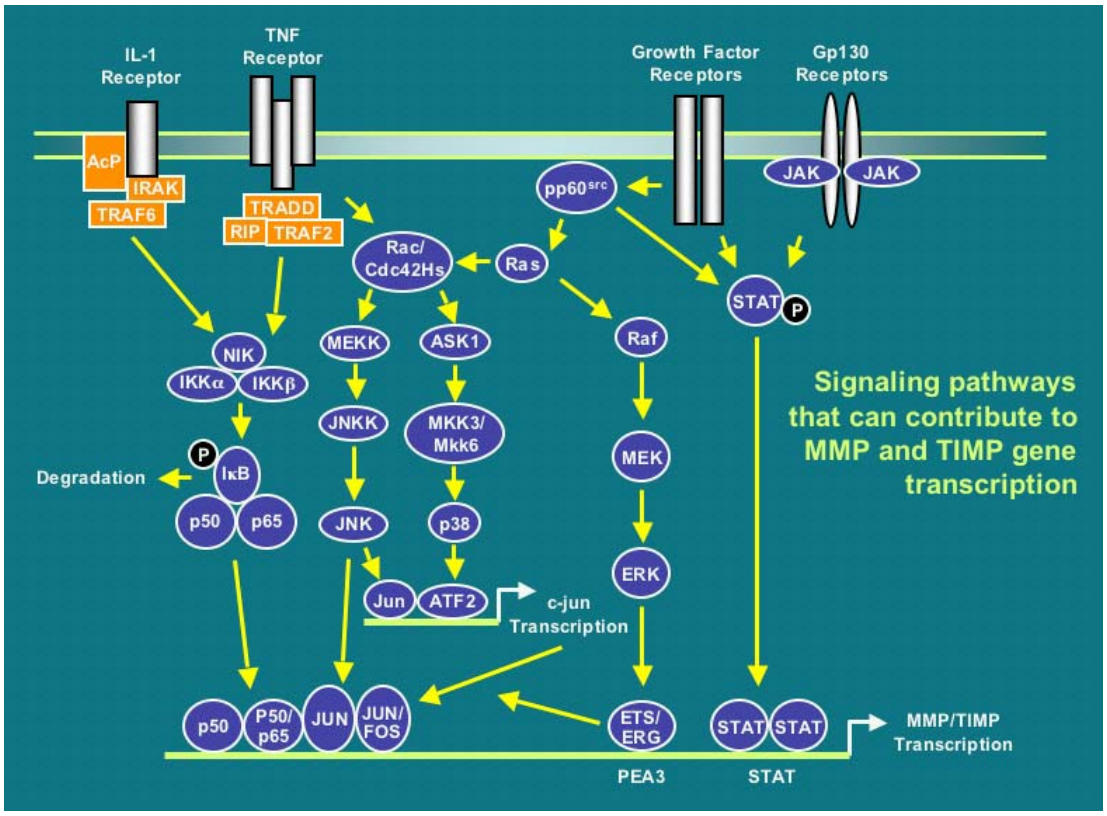

Figure 11: Cascades de signalisation impliquées dans la régulation des MMPs et des TIMPs. Adapté de (100).

De plus en plus d'études effectuées *in vitro* suggèrent que p53 module l'expression de diverses collagénases. Notamment, p53 diminue l'expression des MMPs 1 et 3 (136-138) en interférant avec la liaison des complexes de transcription sur AP-1. En ce qui a trait à MMP-2, il est reconnu que le promoteur de l'humain et du rat contient une séquence de liaison pour p53 (139, 140), et que celui-ci exercerait un effet positif sur l'expression de MMP-2 *in vitro* (139). Ces résultats sont cependant en contradiction avec ceux de Toschi et collaborateurs (141) qui montrent qu'une mutation de p53 rendant la protéine inactive, favorise la libération de MMP-2 et que l'insertion du p53 non mutée diminue la libération de MMP-2. Ces contradictions pourraient s'expliquer, outre les considérations méthodologiques, par un système de régulation transcriptionnel complexe. Il a récemment été démontré que l'activation de la transcription de MMP-2 par p53 pouvait être inhibée par le facteur de transcription ATF3 (142) et que ATF3 est lui-même une cible transactivationnelle de p53 (143). Cette boucle de régulation impliquant p53 rend donc difficile la prédiction de la régulation transcriptionnelle de MMP-2 dans un contexte physiologique. Cette boucle de régulation est d'autant plus complexifiée par le fait que p53 présente une multitude de cibles tant protéiques que génomiques. Par exemple p53 peut activer NF-κB(144), qui à son tour stimule la transcription de plusieurs gènes pro-inflammatoires dont iNOS qui peut à son tour induire ATF3 via la libération de NO (145). La régulation de la transcription des MMPs est donc très complexe, ce qui rend difficile la prévision de leurs modulations par différents traitements *in vivo*. Aussi, le contrôle de l'expression des gènes des MMPs est étroitement lié à celui des TIMPs, ce qui assure un mécanisme additionnel de régulation de l'activité des MMPs *in vivo*.

La pluralité des rôles des TIMPs est de plus en plus reconnue. En plus d'inhiber les MMPs, les TIMPs possèdent intrinsèquement des propriétés mitogéniques ainsi que pro-apoptotiques (146). La régulation de l'activité transcriptionnelle des TIMPs est le résultat d'une combinaison de plusieurs cascades de signalisation. Il est reconnu que les TIMPs possèdent différents mécanismes d'induction. Par exemple, TIMP-1 est considérée comme étant inductible tandis que TIMP-2 serait constitutive. Tout comme pour les MMPs, la transcription des TIMPs est influencée par une variété de facteurs incluant le bFGF, le PDGF, l'EGF, l'IL-6, l'IL1 et le TGF-β pour ne nommer que ceux-ci (147). Le fait que les promoteurs des TIMPs soient truffés de sites AP-1 suggère fortement que leur modulation

transcriptionnelle soit coordonnée avec celle des MMPs. Par exemple, l'IL-1 stimule la transcription à la fois de TIMP-1 et de MMP-1. Le système de signalisation JAK-STAT pourrait également coordonner l'activation des TIMPs avec les MMPs sachant que l'activation de cette voie active conjointement MMP-1 et TIMP-1 (100). D'un autre côté, il semble clair que certains mécanismes de régulation puissent découpler cette activation parallèle. Par exemple, le TGF-β inhiberait l'expression des MMPs tout en stimulant l'expression de TIMPs (148).

La modulation de l'expression des TIMPs par p53 est quant à elle encore obscure, malgré que différentes dérégulations des TIMPs aient été observées en association avec certains cancers (149, 150). TIMP-3 contient une séquence de liaison potentielle pour p53 dans son promoteur mais de plus amples investigations ont montré que cette séquence ne liait pas p53 (151). Malgré cette absence de liaison, p53 peut tout de même moduler l'expression de TIMP-3 dans les cellules tumorales (152).

Pour résumer cette section sur la physiologie des tendons, on peut affirmer que la fonction tendineuse est déterminée par le contenu de sa MEC et la composition de cette matrice est déterminée par l'équilibre entre les mécanismes de synthèse et de dégradation. Différentes MMPs ont la capacité de dégrader les composantes de la MEC tendineuse. Ces dernières sont soumises à des mécanismes de régulation complexes avant d'être transcrites puis libérées sous forme de proenzymes. Conséquemment à divers stress, ces enzymes sont activées et cette activation peut être contrebalancée par la présence de leurs inhibiteurs naturels, les TIMPs, qui possèdent à leur tour des mécanismes de régulation complexes et encore mal connus. Un nombre grandissant d'évidences suggère une implication pour les PGs et p53 dans la régulation de MEC. Cependant, leur contribution respective dans la régulation de l'homéostasie des tendons est encore largement à déterminer.

1.5 Étiologie et physiopathologie des tendinopathies chroniques

La nomenclature des tendinopathies a été revue et expliquée ad nauseam (16, 153-156), et fait l'objet de constantes révisions. Pour des raisons cliniques, les pathologies des tendons sont actuellement classifiées selon leurs manifestations histopathologiques. Cette

nomenclature facilite la compréhension, le diagnostic, ainsi que le choix thérapeutique pour les différentes tendinopathies, comparativement à l'ancienne nomenclature qui faisait plutôt référence à l'étiologie (153). L'appellation « tendinite » était autrefois utilisée afin de déterminer l'ensemble des pathologies tendineuses. Or, ce terme réfère à un processus inflammatoire et certaines pathologies tendineuses ne présentent pas de signes d'inflammation. Le terme « tendinite » a donc été remplacé par tendinopathie. D'ailleurs, l'appellation « tendinite » créait une confusion chez les cliniciens qui traitaient certaines pathologies non inflammatoires selon des modalités habituellement réservées aux traumatismes aigus. Le Tableau 3 fait état d'une classification des pathologies tendineuses contemporaine et bien acceptée. Il est néanmoins important de souligner que les manifestations histologiques ne sont pas toujours représentatives de la nature chronique ou aiguë des tendinopathies. En réponse à cette problématique, il a récemment été proposé que les tendinopathies d'origine chronique soient regroupées sous l'appellation « tendinopathie » afin qu'elles soient clairement dissociées des phénomènes aigus issus des traumatismes tendineux ponctuels. Dans les prochains paragraphes, la lectrice ou le lecteur sera brièvement introduit aux différentes théories visant à expliquer la dégénérescence tendineuse dans les tendinopathies.

1.5.1 Pathogénie des tendinopathies

La plupart des spécialistes s'accordent sur le fait que l'étiologie ainsi que la physiopathologie des tendinopathies sont loin d'être bien caractérisées. Ces connaissances partielles de la pathogénie des tendinopathies laissent donc place à l'élaboration de différentes théories (16, 153, 156-158). On compte parmi ces dernières la théorie mécanique, la théorie inflammatoire et la théorie nerveuse. En combinaison avec différents facteurs extrinsèques et intrinsèques, ces théories tentent d'expliquer la pathogénie des tendinopathies telles que présentées au Tableau 3, à l'exception de la tendinite.

Tableau 3: Classification histopathologique des tendinopathies. Tiré de (153).

Diagnostic	**Évaluation macroscopique**	**Histopathologie**
Tendinose	Dégénération intratendineuse communément causée par le vieillissement et la redistribution de l'apport sanguin.	Désorientation et séparation des fibres de collagène, augmentation de la quantité de substance mucoïde, augmentation de la cellularité et de l'espace alloué aux vaisseaux sanguins.
Tendinite	Dégénération symptomatique d'un tendon accompagnée par un bris vasculaire et une réponse inflammatoire.	Dégénérescence accompagnée d'une déchirure, d'accumulation de fibroblastes et myofibroblastes, hémorragie et tissu de granulation
Paratendinite	Inflammation du paraténon	Dégénérescence mucoïde, présence d'un infiltrat de cellules mononcléées, accompagné ou non de déposition de fibrine.
Paratendinite avec tendinose	Paratendinite associée à une dégénérescence intratendineuse	Dégénérescence typiquement observée lors d'une tendinose en combinaison avec une infiltration de cellules inflammatoires dans le paraténon.

1.5.1.1 La théorie mécanique

La théorie mécanique fait référence à plusieurs concepts, dont les microtraumatismes, l'hystérèse et l'hypoperfusion conséquente à la compression des vaisseaux sanguins. La théorie mécanique se base ainsi sur l'idée que l'accumulation de microtraumatismes aux fibres tendineuses peut outrepasser la capacité réparatrice intrinsèque du tendon, ce qui mènerait à une perte graduelle de fonction, une désorganisation des fibres de collagène et ultimement à un épisode symptomatique (159). Parellèlement, la perte d'énergie se produisant lors de stress cycliques peut faire monter la température des tendons jusqu'à 45°C ce qui induirait la mort des ténocytes et hypothéquerait conséquemment le potentiel de réparation des tendons (160). Il est également reconnu que des stress mécaniques

intenses et continus diminuent la perfusion tendineuse au point de créer un environnement hypoxique qui, lors de la reperfusion, favorise la génération de radicaux libres potentiellement létaux pour les cellules endogènes (161). Dans ce modèle, les stress mécaniques causent donc par eux-mêmes certains dommages à la matrice tendineuse et à la fois, diminuent la capacité réparatrice du tendon en induisant la mort des ténocytes par différents mécanismes dont l'hyperthermie et la mort cellulaire induite par les radicaux libres de l'oxygène ou de l'azote. La combinaison entre la dégénérescence de la MEC et la diminution du potentiel de réparation du tendon pourrait ainsi se traduire par une tendinose.

1.5.1.2 La théorie inflammatoire

Une certaine controverse entoure la théorie inflammatoire. Cette controverse provient du fait que les tendinopathies chroniques ne sont généralement pas associées à la présence de médiateurs inflammatoires ni à l'accumulation massive de cellules inflammatoires lors de l'examen histologique. Néanmoins, le fait que les spécimens tissulaires sont généralement prélevés tardivement, jusqu'à plus de 80 mois par rapport au premier épisode douloureux (162), représente une source importante de biais quant aux conclusions relatives à l'étiologie des tendinopathies chroniques. D'ailleurs, les études supportant l'absence de médiateurs inflammatoires chez l'humain ne se sont intéressées qu'à peu de médiateurs et regroupent, pour la plupart, un nombre restreint d'individus et démontrent une erreur de mesure importante, ce qui permet de douter de la puissance du test statistique utilisé(163-165). Certains modèles animaux (166) tendent également à démontrer l'absence du processus inflammatoire dans la pathogenèse de la tendinose. Les conclusions de ces études sont néanmoins discutables puisque tout semble indiquer que les altérations histologiques induites par le protocole de course sur tapis roulant incliné vers le bas, seraient réversibles. D'ailleurs, Marini(167) avançait qu'une désorganisation tissulaire ainsi qu'une diminution de la rigidité du tendon pourraient être des étapes normales de l'adaptation tendineuse conséquente à une augmentation des stress, sans toutefois être associées à l'accumulation de microtraumatismes, mais plutôt à un phénomène physiologique d'adaptation, remettant ainsi en question la validité des ce type de modèle.

Bien que plusieurs spécialistes nient l'implication d'un processus inflammatoire dans l'étiologie et la physiopathologie des tendinopathies chroniques (168), de plus en plus de chercheurs adhèrent à la possibilité que des épisodes inflammatoires puissent être à l'origine des tendinopathies chroniques (156). En raison de la lenteur du processus de réparation tendineuse, la période de guérison suivant un traumatisme aigu pourrait laisser place à une fenêtre temporelle de susceptibilité à une rupture récidivante (4). Également, les résultats de plusieurs études suggèrent une implication du processus inflammatoire dans les premiers stades des tendinopathies chroniques, sans toutefois impliquer que l'inflammation soit nécessaire au développement des tendinopathies chroniques ni à leur perpétuation. Par exemple, l'administration prolongée de PGE_1 en périphérie du tendon d'Achille de rats induit une dégénérescence interne qui ressemble étrangement à ce que l'on peut observer dans les tendinopathies chroniques humaines (169). On note aussi une augmentation de la concentration tendineuse des macrophages infiltrants et résidents dans les premières semaines suivant l'imposition d'une tâche répétitive induisant une perte fonctionnelle à moyen terme (170). De plus, une étude utilisant des tendons prélevés chez des humains présentant des symptômes de tendinose depuis plus de 6 mois montre une expression accrue de COX-2 et du TGF-β, comparativement aux tendons sains, deux protéines liées à l'inflammation et à la résolution de l'inflammation (171). Aussi, l'association entre la paratendinite et la tendinose supporte la théorie inflammatoire. Les paratendinites résultent d'un frottement excessif des tendons sur une structure avoisinante solide, ce qui résulte en une réponse inflammatoire en périphérie du tendon. Il est généralement cru que cette libération des médiateurs de l'inflammation puisse contribuer à la dégénérescence interne du tendon, c'est-à-dire à la tendinose.

Il est de plus en plus clair que certaines pathologies tendineuses sont relativement indépendantes des médiateurs de l'inflammation. Toutefois, les études supportant cette idée sont souvent discutables et de nouvelles données suggèrent que certaines cellules inflammatoires ainsi que différents médiateurs de l'inflammation pourraient être impliqués à différents stades du développement des tendinopathies chroniques.

1.5.1.3 La théorie neurogène

La théorie neurogène (Figure 12) est basée sur les données factuelles suivantes : 1- les mastocytes des tissus conjonctifs peuvent être activés par les terminaisons nerveuses sensorielles (172) via la libération de différents neuropeptides dont la substance P et le « calcitonin gene related peptide » (173) 2- la concentration de la substance P et de « calcitonin gene related peptide » est augmentée dans les tendons pathologiques (174, 175). Ces molécules activent donc les mastocytes qui ont la capacité de libérer un arsenal de molécules pro-inflammatoires, cytotoxiques et capables de dégrader la MEC (156). Malgré le fait que l'inflammation de nature neurogène ait été observée dans la peau (173), cette théorie semble beaucoup moins populaire que les théories inflammatoire et mécanique dans le domaine des tendinopathies. L'implication de la théorie neurogène ne peut cependant pas être réfutée.

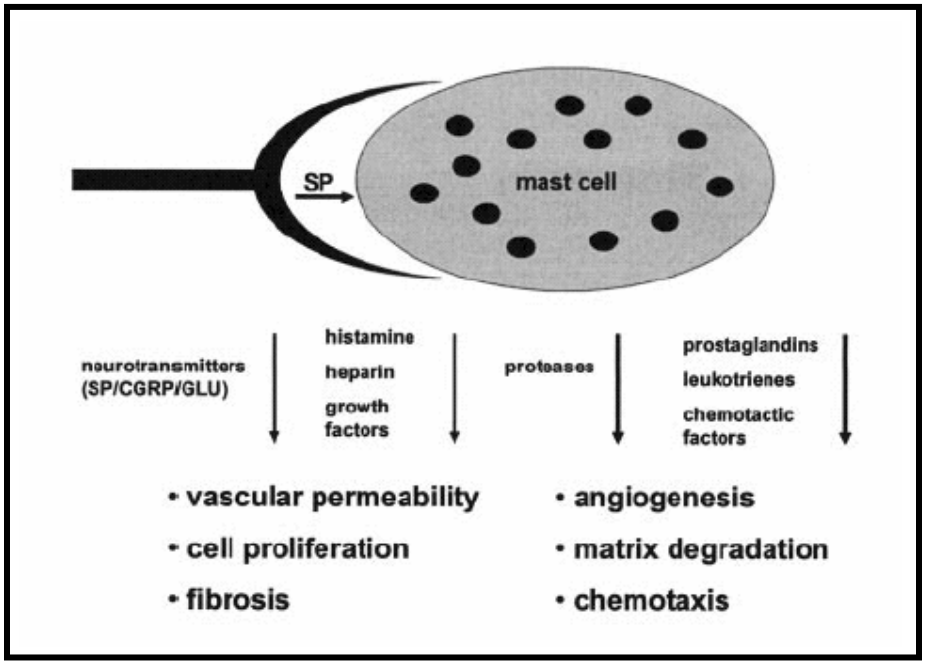

Figure 12: Théorie neurogène de la blessure tendineuse de surusage. Tiré de (156).

Ces trois théories de la pathogenèse des tendinopathies chroniques sont très différentes, mais compatibles. Il est ainsi possible, voire même probable, que la pathogénie des tendinopathies chroniques soit le fruit de l'interaction entre ces trois modèles (Figure 13). Les stress mécaniques qui induisent un affaiblissement de la structure de collagène causent,

en association ou non avec la réponse inflammatoire, une altération des composantes cellulaire et extracellulaires du tendon. Le processus inflammatoire induit par une accumulation temporelle de lésions ou par un traumatisme sérieux pourrait à son tour contribuer à la perte fonctionnelle en causant des dommages non spécifiques. D'un autre côté, certains facteurs induits par les stress mécaniques, comme la chaleur, peuvent également provoquer la libération de neuropeptides par les fibres nerveuses sensorielles et conséquemment stimuler la dégranulation des mastocytes. Les produits des mastocytes contribueraient directement à dégrader les composantes de la MEC et stimuleraient le processus inflammatoire. Finalement, la mise en place de ce processus physiopathologique serait facilitée par différentes prédispositions intrinsèques et extrinsèques à l'individu. Un résumé de ces facteurs est présenté au Tableau 4 et la Figure 13 est une synthèse des théories concernant la pathogenèse des tendinopathies chroniques.

Tableau 4: Facteurs impliqués dans les tendinopathies. Adapté de (156).

Facteurs intrinsèques	**Facteurs extrinsèques**
Âge	Travail
Perfusion vasculaire	Sport
Nutrition	Charge
Prédispositions anatomiques	Force excessive
Écart entre la longueur des membres	Répétition
Mauvais alignement	Mouvements inhabituels
Frottement osseux	Erreurs d'entraînement
Laxité articulaire	Mauvaise technique
Faiblesse/déséquilibre musculaire	Progression rapide
Genre	Intensité élevée
Poids corporel	Fatigue
Pathologie systémique	Souliers et équipement
	Conditions environnementales
	Température
	Surface

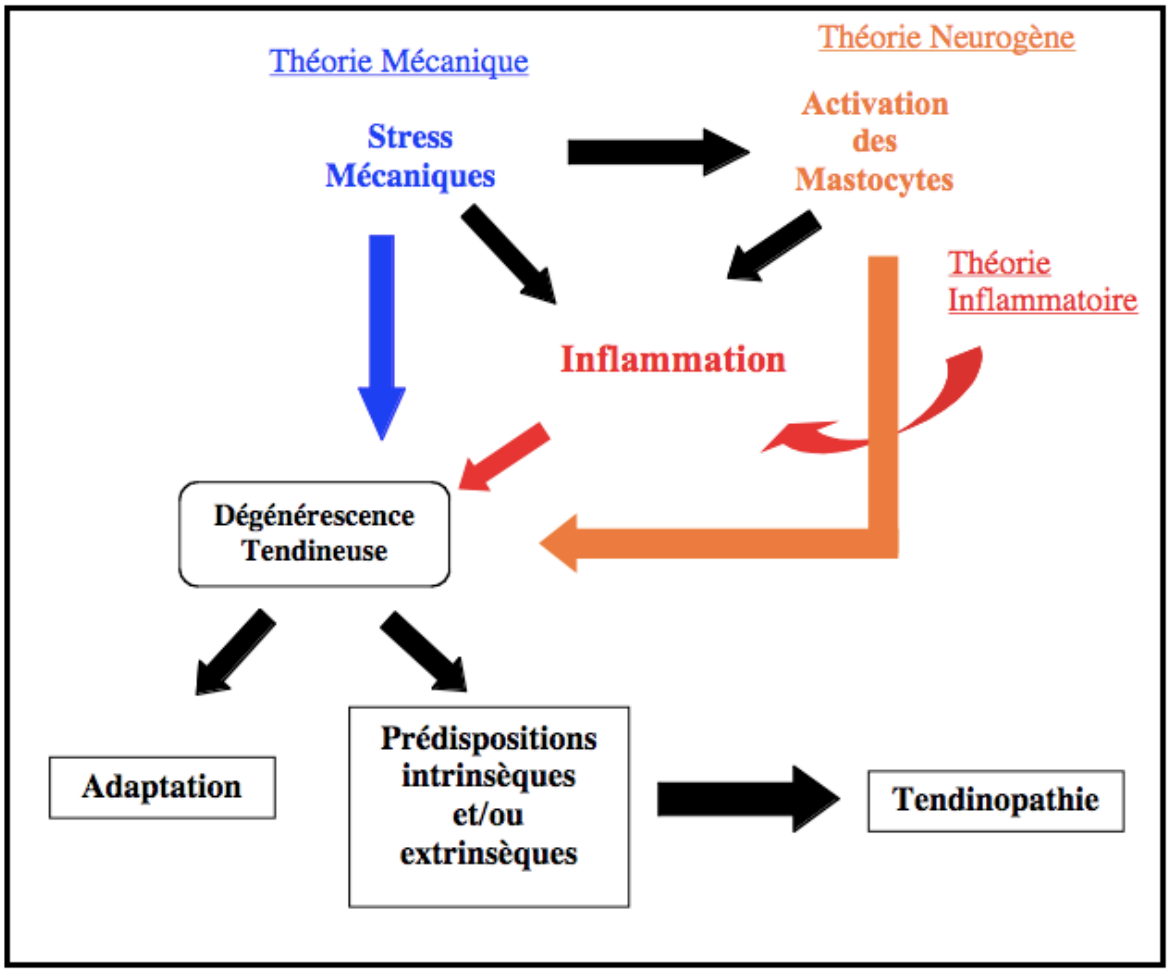

Figure 13: Unification des modèles théoriques de l'étiologie et de la physiopathologie des tendinopathies.

1.6 Séquence physiopathologique suivant une blessure tendineuse aiguë

La physiopathologie des traumatismes tendineux aigus présente un intérêt scientifique indéniable en raison de l'implication potentielle du processus inflammatoire dans l'étiologie des tendinopathies chroniques et des conséquences de la lenteur du processus de réparation tissulaire. De fait, une hypothèse veut que le potentiel de réparation limité du tendon pourrait être dû à l'absence d'une réponse inflammatoire significative (176). Ainsi, la caractérisation des médiateurs de l'inflammation tendineuse pourrait, en plus d'améliorer

la compréhension de la physiopathologie des tendinopathies, permettre de déterminer de nouvelles stratégies afin d'améliorer l'arsenal thérapeutique.

Il est connu que les traumatismes tendineux induisent une réaction inflammatoire caractérisée par l'accumulation de leucocytes ; une phase de résolution de l'inflammation où les leucocytes disparaissent ; une phase de prolifération et de synthèse où une MEC provisoire est mise en place ; et une phase de remodelage où le tendon se réorganise. Ce processus peut durer des mois voire quelques années (177). Suivant une blessure tendineuse, la nature exacte des cellules inflammatoires s'accumulant au site lésé reste à déterminer, tout comme les mécanismes cellulaires exacts impliqués dans les phases subséquentes du processus physiopathologique. Les prochains paragraphes constituent donc la pierre angulaire de cette introduction, car ils seront dédiés à décrire la séquence physiopathologique suivant un traumatisme tendineux aigu. Cette séquence est encore mal caractérisée dans le tendon et la présente section se voudra un rassemblement d'évidences recueillies à partir de différents modèles expérimentaux de blessures aiguës pouvant se transférer vers le modèle de blessure tendineuse.

1.6.1 Le traumatisme

La blessure est définie comme une lésion faite accidentellement aux tissus vivants au moyen d'un choc, une coupure ou autres facteurs externes (19). Généralement, les traumatismes tendineux induisent une désorganisation de la MEC, un saignement, une accumulation de cellules inflammatoires et une perte fonctionnelle. Différents modèles expérimentaux ont été utilisés afin de reproduire des manifestations histopathologiques. Parmi ces derniers, on compte la ténotomie totale, la ténotomie partielle, la « fenêtre » l'étirement mécanique, l'écrasement et l'injection de collagénase (45, 179-182). Ces modèles miment différentes situations pathologiques, par exemple, les ténotomies reflètent des situations cliniques où l'on observe une perte totale de la tension par opposition aux ténotomies partielles et à l'injection de collagénase où les fonctions tendineuses et musculaires sont maintenues, et qui représentent beaucoup mieux les blessures tendineuses comme les déchirures partielles.

1.6.2 Rôle des PGs et de p53 dans la phase catabolique de l'inflammation

L'un des premiers événements suivant un traumatisme aigu est l'activation des cellules sentinelles dont les ténocytes/ténoblastes et les mastocytes. Ces cellules des tissus conjonctifs libèrent une panoplie de molécules servant à organiser la réponse inflammatoire (183). L'hyperhémie locale est tout d'abord favorisée par la libération massive d'histamine et de PGs. La PGE_2 ainsi que la PGI_2 sont retrouvées en grande quantité aux sites inflammatoires (184). La PGE_2 favorise l'hyperhémie locale par l'activation de ses récepteurs EP2 et EP4 qui stimulent généralement la vasodilatation (184). PGE_2 peut également favoriser l'exudation plasmatique via l'activation de son récepteur EP3 (185). De son côté, PGI_2, alias prostacycline, induit la vasodilatation et la formation d'œdème par l'activation du récepteur IP (186). PGF_2-α pourrait, quant à elle, favoriser le recrutement des neutrophiles, bien que le mécanisme d'action exact reste encore à déterminer. Ainsi, l'implication des PGs dans le recrutement et la migration des leucocytes fait encore objet de controverse (187 , 188) et l'on considère que leur effet pro-inflammatoire serait surtout dû à la vasodilatation.

L'hyperhémie locale, la libération de diverses molécules pro-inflammatoires et chimiotactiques ainsi que l'activation de l'endothélium favorisent l'accumulation de différentes sous populations de cellules inflammatoires. Suivant une agression tissulaire, les neutrophiles sont généralement les premières cellules à infiltrer le site, suivis des macrophages (189). Les neutrophiles libéreront différentes molécules, dont des protéinases, des radicaux libres, des chimiokines et d'autres cytokines pro-inflammatoires. Subséquemment, des chimiokines seront libérées par les neutrophiles, ce qui attirera les macrophages au site lésé où ils exerceront initialement une activité catabolique, contribueront à la phagocytose des débris et également à la sécrétion d'une grande variété de molécules pro-inflammatoires (190). De nouvelles observations suggèrent que p53 régulerait les mécanismes de recrutement des leukocytes. En effet, les résultats de Vollmar et collaborateurs montrent que l'administration de pifithrin-α (PFT), un inhibiteur transactivationnel de p53, perturbe les interactions entre l'endothélium et les cellules inflammatoires suivant un traumatisme aigu (191), et réduit l'accumulation de cellules inflammatoires dans un modèle d'hépatotoxicité induite par un choc septique (192). Les

mécanismes par lesquels l'inhibition de la transactivation des gènes cibles de p53 réduit l'accumulation de cellules inflammatoires dans ces modèles sont totalement inconnus.

1.6.2.1 Dommages cellulaires non spécifiques et p53

Durant la phase catabolique de l'inflammation, les cellules inflammatoires peuvent induire la mort de divers autres types cellulaires (193, 194) par la libération d'espèces réactives oxygénées et azotées. En réponse à des dommages cellulaires et génomiques, la mort des cellules tendineuses pourrait être influencée par la protéine p53 dont on observe une surexpression en phase inflammatoire (195, 196). Après phosphorylation, ce facteur de transcription peut favoriser l'apoptose par l'augmentation de l'expression des «death receptors», l'inhibition des signaux de survie et l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la voie mitochondriale de l'apoptose (197-199). Également, la protéine p53 active la transcription de diverses protéines capables d'entraîner la sortie du cytochrome C de la mitochondrie et conséquemment l'assemblage de l'apoptosome, l'activation des caspases effectrices 3 et 7 puis ultimement, l'apoptose. De plus, p53 peut induire l'apoptose indépendamment de son activité transcriptionnelle par un mécanisme impliquant sa translocation à la mitochondrie (200, 201). Il est donc difficile de prévoir de quelle manière la modulation de l'activité transcriptionnelle de p53 influencera le phénomène de l'apoptose *in vivo*. Cependant, Vollmar et collaborateurs ont récemment observé une diminution de l'activation des caspases et/ou de la mort cellulaire suite à l'administration de PFT dans différents modèles d'agressions hépatiques (192, 202). Ce même groupe de recherche (191) a également observé une accélération de la réépithélialisation chez des souris traitées avec PFT comparativement aux blessures des souris traitées avec le placebo, ce qui suggère que l'inhibition de la mort cellulaire pourrait accélérer la réparation des tissus conjonctifs. Nous verrons au chapitre IV que le rôle de p53 durant la réponse inflammatoire conséquente à un traumatisme tendineux aigu s'avère partiellement différent de ce qui a été observé dans les modèles de blessures cutanée ou hépatique.

Dans le contexte du tendon, certaines évidences confirment qu'un traumatisme tendineux stimule l'accumulation de leucocytes (177) ainsi que la mort des cellules résidentes. Ces évidences sont cependant parcimonieuses et discutables à certains égards. Concernant l'accumulation des cellules inflammatoires, Enwemeka et collaborateurs n'ont pas utilisé

de marqueurs spécifiques afin d'identifier les cellules inflammatoires au site de la blessure tendineuse. En regard de la mort cellulaire Yuan et collaborateurs (203) ont appliqué un essai de type TUNEL sur des tissus chauffés et paraffinés. Sachant que ce type d'essai marque l'ensemble des cellules dont l'ADN est fragmenté et que la chaleur peut causer des dommages à l'ADN, le risque de détecter des cellules faussement positives est grand. Des investigations plus poussées devront donc être menées concernant la nature des cellules présentes suivant un traumatisme tendineux et les dommages cellulaires non spécifiques.

1.6.2.2 Dommages matriciels non spécifiques, MMPs et PGs

Les molécules libérées en phase pro-inflammatoire peuvent également endommager les composantes de la MEC. Il a notamment été démontré que la présence de radicaux libres augmente l'activité de MMP-8, libérée par les neutrophiles (204). De plus, l'élastase des neutrophiles ainsi que les MMPs membranaires augmentent l'activité de plusieurs autres MMPs dont la MMP-1 et 3. *In vivo*, la présence de MMPs a été associée avec la dégradation de la MEC de tissus buccal (205) ce qui pourrait, par transposition, se traduire par une perte fonctionnelle du tissu tendineux. Il semble toutefois clair que différents mécanismes sont mis en place afin de minimiser ces dommages. En effet, Van de Louw et collaborateurs (206) ont observé une colocalisation des MMPs avec les TIMPs dans les poumons sains et inflammés. Dans le même ordre d'idées, les travaux récents de Langberg et collaborateurs (107, 207) indiquent que de légers stress tendineux entraînent une augmentation du catabolisme du collagène des tendons par les MMPs et que cette action est ultimement contrebalancée par la libération des TIMPs. Même si plusieurs mécanismes d'autorégulation semblent être mis en place afin de prévenir la dégradation de la MEC, il est néanmoins accepté que le processus inflammatoire induit une dégradation non spécifique de la MEC, ce qui pourrait se traduire par une aggravation de la blessure et une augmentation du temps de guérison. Cette croyance est à la base de l'acharnement clinique à vouloir contrôler l'inflammation suivant un traumatisme aigu.

1.6.3 Résolution de l'inflammation

La fin de la phase inflammatoire se caractérise par la suppression des agents pathogènes, la diminution de la concentration des molécules pro-inflammatoires et la libération de molécules anti-inflammatoires. C'est également à cet instant que les neutrophiles infiltrants entreront massivement en apoptose. Différents mécanismes induiront l'apoptose des neutrophiles, notamment l'activation des «death receptors» (208-210) et l'inhibition de la voie de NF-κB par PGD_2. La 15-deoxy$^{-(\Delta 12, \Delta 14)}$-$PGJ_2$, un métabolite de la PGD_2 exerce des effets similaires *in vitro* mais son implication *in vivo* est toutefois remise en question. Les neutrophiles apoptotiques seront rapidement phagocytés par les macrophages. Un mécanisme qui explique cette attraction rapide des macrophages vers les neutrophiles est la libération de lysophosphatidylcholine suite à l'activation de la caspase-3 (211). Les macrophages ayant phagocyté les cellules apoptotiques commuteront la synthèse de cytokines pro-inflammatoires pour celle de cytokines anti-inflammatoires (212, 213). La libération de TNF-α, d'IL-8, de GMCSF, d'IL-10, d'IL-1β et de thromboxane A_2 sera inhibée et celle de TGF-β1 sera augmentée. Cette commutation s'effectuerait via une action auto ou paracrine de PAF et de PGE_2, ce qui suggère que PGE_2 pourrait faire partie des médiateurs organisant cette commutation.

Même si de plus en plus de données suggèrent que les PGs sont impliquées dans les premières phases de la réparation tissulaire, il n'est pas rare que des AINS soient prescrits pour une période de dix à quinze jours post-trauma et que le début du traitement soit tardif. Dans le contexte de la blessure tendineuse aiguë, le chevauchement de la fenêtre temporelle d'administration des AINS et de la phase de résolution de l'inflammation pourrait donc perturber la libération d'une panoplie de médiateurs anti-inflammatoires et de facteurs de croissance. Il est possible que cette modulation puisse ultimement retarder la réparation tendineuse. Différentes données supportent cette hypothèse. Il est maintenant connu que les AINS interfèrent avec la commutation de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires vers la synthèse de cytokines anti-inflammatoires lorsque les macrophages phagocytent les neutrophiles apoptotiques (212). Dans un même ordre d'idée, de récentes évidences indiquent qu'une deuxième vague d'expression de COX-2 en phase de résolution de l'inflammation est associée à la production de PGD_2 (214); une PG qui joue de nombreux rôles anti-inflammatoires. Également, l'inhibition de COX-2 prolonge la phase

inflammatoire et l'inhibition de COX-1, par la mutation de son gène, retarde la réparation tissulaire (215, 216). Des percées récentes en cancérologie (217) ont également permis d'identifier un rôle primordial pour COX–2 dans le processus de l'angiogenèse qui est aussi une condition essentielle à la réparation tissulaire. En dépit de l'implication des PGs dans l'initiation de la réparation tissulaire et de la controverse entourant l'efficacité thérapeutique des AINS, ces derniers sont souvent utilisés dans les phases tardives découlant d'un traumatisme tendineux ou ligamentaire (218). Le chapitre III apportera une explication potentielle au manque d'efficacité des AINS en tant que molécules thérapeutiques en regard de la réparation tendineuse.

Malgré l'avancement constant des recherches, la physiopathologie des blessures tendineuses est encore mal caractérisée. Le dogme actuel veut que l'inflammation soit dommageable pour les tissus et qu'elle puisse, si mal contrôlée, aggraver la blessure et ainsi retarder la guérison. Il est probable que le processus inflammatoire prenant place suivant un traumatisme tendineux puisse nuire à la réparation de l'unité tendineuse. Cependant, de plus en plus d'évidences, notamment l'identification de mécanismes intrinsèques de défense contre les protéases ainsi que l'implication des cellules inflammatoires dans l'initiation de la réparation tissulaire, suggèrent que ce paradigme pourrait être erroné. Les PGs ainsi que p53 pourraient ainsi jouer des rôles primordiaux dans la régulation de l'inflammation et de la réparation des tendons, ce qui en fait des cibles expérimentales alléchantes.

1.7 But et objectifs

À ce jour, le modèle théorique de la séquence physiopathologique suivant un traumatisme tendineux aigu est largement extrapolé à partir des connaissances recueillies à l'aide d'autres modèles traumatiques comme les blessures musculaires, ligamentaires et cutanées. Quelques données obtenues dans le tendon nous permettent de confirmer certaines facettes de ce modèle. Cependant, les connaissances des processus exacts mis en place dans le tendon suivant un traumatisme tendineux sont peu avancées. **Le but de cette thèse était ainsi d'étudier le rôle de différents régulateurs potentiels de la réaction inflammatoire en regard de la réparation tendineuse.** Pour ce faire, nous avons dû mettre au point un

modèle de blessure tendineuse qui nous permettrait ultérieurement d'étudier le rôle des PGs et de p53 dans la séquence physiopathologique menant à la guérison des tendons. De manière complémentaire, nous avons finalement pu démystifier la contribution des cellules inflammatoires aux dommages non spécifiques à la MEC en utilisant un modèle impliquant une molécule capable d'induire l'accumulation de cellules inflammatoires à proximité du tendon, sans toutefois induire par elle-même une dégradation de la matrice.

Les modèles expérimentaux de blessure tendineuse sont jusqu'à maintenant très invasifs et la procédure chirurgicale compterait à la fois pour une grande portion de l'inflammation et de la blessure tendineuse, de telle sorte qu'il devient impossible de déterminer dans quelle mesure la blessure observée est bien attribuable à l'agent ou à la modalité traumatisante. Du reste, il n'est pas rare que la caractérisation du processus inflammatoire ainsi que des dommages attribuables à la procédure chirurgicale soit omise. Dans de tels modèles, les risques d'infection doivent aussi être pris en considération, car cette dernière peut influencer la nature même du processus inflammatoire (182), ce qui pourrait nuire à la reproductibilité du modèle expérimental. L'intensité du processus inflammatoire ainsi que le type de cellules inflammatoires s'accumulant au site d'une lésion influencent également les processus de réparation tissulaire (189). Notamment, les monocytes/macrophages, aussi appelés macrophages infiltrants, coopéreraient avec les neutrophiles pour débarrasser le tissu de l'intrus et joueraient le rôle de nettoyeur en effectuant une grande quantité de cycles de phagocytose. Des travaux portant sur le muscle squelettique montrent également que, outre les macrophages infiltrants, l'appareil musculosquelettique contient des macrophages résidents qui sont responsables d'organiser la réparation tissulaire (219). La caractérisation des sous populations de cellules inflammatoires au site d'une blessure tendineuse pourrait donc fournir des informations utiles pour la compréhension du processus de réparation tendineuse. En réponse au besoin d'établir un modèle reproductible d'inflammation tendineuse et d'identifier les sous populations de cellules inflammatoires, **le premier objectif de cette thèse était de mettre au point un modèle de blessure tendineuse chez le rat et de caractériser le décours temporel d'accumulation des neutrophiles, des monocytes/macrophages et des macrophages résidents.** Nous avons posé l'hypothèse qu'un traumatisme tendineux aigu induirait une séquence classique d'accumulation de leucocytes, telle qu'observée dans le muscle squelettique. Cette

séquence procéderait par une accumulation initiale de neutrophiles, suivie de l'accumulation des monocytes/macrophages puis des macrophages résidents. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons reproduit un modèle de blessure tendineuse par injection de collagénase dans le tendon d'Achille de rats où le tendon était exposé par une incision cutanée. Par la suite, nous avons comparé cette procédure à l'injection intra tendineuse de collagénase sans incision cutanée. Dans ces deux modèles nous avons quantifié la densité de différentes sous populations de cellules inflammatoires par le comptage manuel des cellules marquées spécifiquement par immunohistochimie.

Les effets anti-inflammatoire et analgésique des AINS sont bien caractérisés et cette classe de médicament est encore privilégiée pour le traitement des blessures tendineuses (218), avec la prémisse que l'inflammation pourrait être dommageable pour les portions tendineuses qui sont restées saines. De plus en plus d'évidences supportent cependant l'idée que le processus inflammatoire per se ainsi que certains médiateurs qui en sont issus, pourraient également favoriser la réparation tissulaire. En accord avec cette logique tordue, il n'est pas surprenant que les études portant sur l'effet des AINS sur la réparation des tissus conjonctifs aient produit des résultats divergents. Nombre de spéculations ont été formulées afin d'expliquer ces incongruités dont les différences de modèles, la nature exacte de l'AINS utilisé, la dose… etc. Cependant, peu de mécanismes ont été défendus de manière convaincante. Selon le dogme actuel, les dommages inflammatoires non spécifiques se produiraient durant la phase hautement catabolique de l'inflammation, tandis que l'implication de l'inflammation dans l'initiation des processus de réparation serait plus tardive. De manière contradictoire, l'administration d'AINS peut facilement durer deux semaines suivant un traumatisme aigu. **Le second objectif de cette thèse était de déterminer l'effet de l'administration d'un AINS durant les 72 premières heures suivant un traumatisme tendineux aigu sur différents marqueurs de l'inflammation et de la réparation tendineuse.** Selon la prémisse que les dommages non spécifiques s'effectueraient tôt suivant la blessure, notre hypothèse était que l'administration d'un AINS, restreinte à la phase inflammatoire, diminuerait les dommages superflus et accélérerait ultimement la réparation du tendon.

Les médiateurs de la réparation tissulaire sont nombreux et leur nombre, ainsi que les rôles qui leur sont associés, s'accroissent constamment. La protéine p53 est classiquement reconnue pour réguler de la « destinée » cellulaire. Récemment, on a également identifié des rôles pour p53 dans la régulation de la MEC ainsi que dans le processus inflammatoire. En regard de différents mécanismes potentiellement modulés par p53, **le troisième objectif de cette thèse est donc d'évaluer *in vivo* l'effet de l'inhibition de l'activité transactivationnelle de p53 durant la phase inflammatoire suivant un traumatisme tendineux aigu.** Selon notre hypothèse, l'administration de PFT-α durant la phase inflammatoire aurait un effet anti-inflammatoire et anti-apoptotique, ce qui pourrait ultimement diminuer le temps de guérison du tendon.

Chapitre II :

Les neutrophiles et les macrophages s'accumulent séquentiellement suivant une blessure au tendon d'Achille

Neutrophils and Macrophages Accumulate Sequentially Following Achilles Tendon Injury

David Marsolais, Claude H. Côté and Jérôme Frenette

CHUL Research Center
Department of Rehabilitation
Faculty of Medicine
Laval University

Running title:
Leukocyte accumulation after tendon injury

Address for correspondence:

Jérôme Frenette
Laval University Hospital Research Center
RC-9500, 2705 Blvd Laurier, Ste-Foy, Québec
Canada G1V 4G2

J Orthop Res, 2001. 19(6): p. 1203-9.

Résumé

Les blessures tendineuses induisent des dommages structuraux ainsi qu'un processus inflammatoire. Le but de cette étude était de déterminer la séquence d'accumulation des cellules inflammatoires en utilisant deux modèles de blessure tendineuse aiguë. Le premier modèle consistait à faire une légère incision de la peau et injecter une solution de collagénase dans le tendon d'Achille. Les animaux étaient sacrifiés 1, 3, 7, 14 et 28 jours suivant la procédure chirurgicale. Quant à lui, le second modèle consistait à injecter la collagénase de manière percutanée. Les rats étaient sacrifiés 1 et 3 jours suivant l'injection. La concentration des neutrophiles et des macrophages macrophages $ED1^+$ augmentait de 46 et 28 fois les niveaux de base, respectivement, 24 heures suivant la procédure chirurgicale où le tendon était exposé et injecté à la collagénase. Trois jours suivant cette procédure chirurgicale, la concentration des neutrophiles diminuait de 70% tandis que celle des macrophages $ED1^+$ restait constante. La concentration des neutrophiles et des macrophages $ED1^+$ retournait aux valeurs de base 7 et 14 jours, respectivement, suivant la chirurgie. La concentration des macrophages $ED2^+$ n'a pas été modulée par cette procédure chirurgicale mais une faible tendance à la hausse était observée après 28 jours. L'injection percutanée de collagénase a induit une accumulation des cellules inflammatoires plus faible que la procédure où le tendon était exposé. Ainsi, les tendons blessés démontrent une séquence spécifique d'accumulation des cellules inflammatoires dont l'intensité varie en fonction de la modalité utilisée afin d'acheminer la collagénase au tendon.

Summary

Structural damage and inflammation occur following tendon injury. The purpose of this study was to determine the time course of inflammatory cell accumulation in two animal models of acute tendinopathy. In the first model, rat Achilles tendons were exposed by blunt dissection, injected with collagenase and sacrificed at 1, 3, 7, 14 and 28 days. In the second model, collagenase was injected percutaneously and rats were sacrificed after 1 and 3 days. Sham animals were sacrificed at 1 and 3 days in both models. Neutrophil and $ED1^+$ macrophage populations increased by 46- and 18-fold, respectively after 1 day in surgically exposed Achilles tendons injected with collagenase. Neutrophils dropped by 70% while the concentration of $ED1^+$ macrophages remained constant at day 3 post-injury. Neutrophils and $ED1^+$ macrophages returned to control values after 7 and 14 days, respectively. $ED2^+$ macrophages showed a tendency to increase at day 28 although no significant difference was observed relative to ambulatory controls. Collagenase injected percutaneously reduced the extent of inflammation compared with operated animals. Thus, injured tendons exhibited a specific sequence of inflammatory cell accumulation which varied in intensity according to the modality used for collagenase injection.

2.1 Introduction

The sequence of appearance of inflammatory cells is thought to be very consistent following an injury but has never been intensively studied in traumatized tendon. Accumulation of inflammatory cells relies on either recruitment of new cells from the circulatory system or mitogenesis of resident inflammatory cells. The recruitment of new inflammatory cell populations through chemotactic substances is believed to be the primary mechanism by which cells accumulate in injured tissue. Phagocytic neutrophils are usually the first cells to appear at sites of infection or inflammation where they release cytokines, that may attract macrophages (1), and a variety of destructive agents such as reactive oxygen species (2) and proteases (3). The concentration of neutrophils usually declines 24 hours post-injury and apoptotic neutrophils are phagocytosed by macrophages (4) or fibroblasts (5). Macrophage populations become then the predominant subsets of cells until the end of the inflammatory process. Activated macrophages can release growth factors that induce extracellular matrix synthesis (6), inhibit extracellular matrix degradation (7) and stimulate fibroblasts or other stem cells to proliferate (8).

The heterogeneity of macrophage populations has raised the possibility that different subclasses of macrophages may play complementary functions during tissue inflammation and healing. For example, $ED1^+$ macrophages are mainly present in circulation and migrate into injured rat skeletal muscle to remove necrotic tissue by phagocytosis whereas $ED2^+$ macrophages are resident cells that do not participate in the removal of cell debris (9) but can enhance myogenic cell proliferation (10). Furthermore, Robertson et al. (11) have demonstrated that macrophages, but not neutrophils, can induce a strong chemotactic response in cultured myogenic cells. In view of the evidence that leukocytes play distinct functions in orchestrating skeletal muscle healing, it appears likely that different subpopulations of inflammatory cells may be serving similar roles in injured tendons.

Previous investigations provided evidences that overloading (12), overuse (13), compression (14), intrinsic degeneration (15), chemical irritation (16), complete (17) and partial tenotomy (18) induce tendon structural damages and inflammation that are histopathologically similar to those observed in skeletal muscle following an injury. For

instance, it was shown, using a classical dye staining, that inflammatory cells and fibroblasts appear sequentially at sites of injury of damaged tendons (18). Although the determination of the number and type of inflammatory cells recruited after a trauma is very important for understanding the healing processes, the exact nature of cell populations has never been identified in any representative model of acute tendinopathy. Because collagenase is the only protease produced by fibroblasts and inflammatory cells that is capable of inducing the degradation of the triple helical conformation of collagen, we have employed this model of tendon injury to examine the time course of the appearance of inflammatory cells. The first goal of this study was to determine the concentration of neutrophils, $ED1^+$ and $ED2^+$ macrophages following tendon injury. Our second goal was to compare the magnitude of the cellular response during the acute phase of inflammation in two different models of collagenase-induced tendon injury.

2.2 Materials and Methods

2.2.1 Experimental design

Female Wistar rats weighing about 200g were housed two per cage before the operation and alone following the surgical procedure. Food and water were provided ad libitum throughout the experimental protocol. Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of a ketamine-xylazine cocktail (87.5mg/kg and 12.5mg/kg, respectively). All pre-operative procedures were performed to prevent discomfort and instruments were sterilized to avoid any local inflammation due to infection. In 24 animals, skin was surgically cut and the right Achilles tendon was isolated by blunt dissection as described by Davidson et al. (19). Exposed Achilles tendons (EAT) were injected near the osteotendinous junction (OTJ) with 30 µl of crude collagenase (10mg/ml; Sigma, St-Louis, MI Cat# C-6885) using a 30G needle. Collagenase was dissolved in sterile phosphate buffered saline (PBS) containing 50mM NaH_2PO_4, 150mM NaCl at pH 7.4. The same volume of PBS without collagenase was injected following the same surgical procedure in sham-operated animals. The incision was closed with sutures and gently washed with a topical antiseptic solution. Immediately after the experimental procedures, animals were rehydrated with 5 ml of Ringer's lactate injected subcutaneously and placed under a heat supply to prevent

hypothermia until awakening. Rats were sacrificed 1 (n=4), 3 (n=5), 7 (n=5), 14 (n=4) or 28 (n=6) days post-collagenase injection. Ambulatory controls that were not injected with collagenase or PBS had normal cage activity (n=8).

The high number of neutrophils and $ED1^+$ macrophages in sham groups following EAT procedure led us to hypothesize that the surgical procedure was responsible for an important part of the inflammation. To test this hypothesis, percutaneous injection into the right Achilles tendon was performed. In these non-exposed Achilles tendon (NEAT) groups, skin was surgically prepared and the collagenase was injected percutaneously near the OTJ under anesthesia. We compared concentrations of neutrophils, $ED1^+$ and $ED2^+$ macrophages between NEAT and EAT groups at 1 (n= 4 or 5) or 3 (n= 4 or 5) days post-collagenase or PBS injection. The comparison between NEAT and EAT procedures was limited to 1 and 3 days post-injection because that time course encompasses that in which extensive cell accumulation occurs. All animal care and handling procedures were approved by the Laval University Research Center Animal Care and Use committee.

2.2.2 Tissue Preparation

At sacrifice, animals were overdosed with the ketamine-xylazine cocktail and the experimental hindlimb was removed. Foot was positioned in dorsiflexion and the whole limb was fixed overnight in 10% formalin at 4°C. Subsequently, Achilles tendons were excised between OTJ and myotendinous junction (MTJ), dehydrated in alcohol at concentrations ranging from 70 to 100% and finally cleared in three changes of xylene. After dehydration and clearing on ice, Achilles tendons were embedded overnight in paraffin at 60°C and paraffin blocks were then stored at -20°C. In each tendon, two sagittal regions were systematically selected at 0.25 and 0.75 mm from the lateral edge of the tendon. Three 5 µm thick longitudinal sections were then serially collected from each region and labeled for the neutrophils, $ED1^+$ and $ED2^+$ macrophages.

2.2.3 Immunohistochemistry

Sections were defrosted at room temperature for 30 min, deparaffined in xylene and rehydrated through a gradient of alcohol. Each step of paraffin removing and rehydration

lasted 5 min. After rehydration, tendon sections were digested for 30 min in 0.25% trypsin and quenched to abrogate endogenous peroxidase activity with a solution of 0.3% hydrogen peroxide diluted in PBS. Non-specific sites were blocked for 45 min in blocking solution containing 100mM Tris, 150mM NaCl, 150mM sodium azide, 0.5% Tween-20, 0.2% gelatin and 3% bovine serum albumin. Sections were then overlaid without primary antibodies or incubated for 2 hours with the following antibodies: anti-neutrophils (diluted 1:12000; Accurate chemicals, Westbury, NY), anti-ED1^{+} or anti-ED2^{+} macrophages (diluted 1:100; Bioproducts for Science, Indianapolis IN). Sections were then washed with PBS and incubated with biotinylated anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG (diluted 1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 60 min. Tissue samples were washed with PBS and incubated with horseradish peroxidase (1:1000; Vector Laboratories) before revealing the antibody-antigen complex by chromogenic development, using peroxidase substrate kit AEC (Vector Laboratories). The total number of labeled cells was counted manually by moving an eyepiece grid over the entire longitudinal section. The total area of the section was also determined and multiplied by the thickness to express the number of each cell per mm3.

2.2.4 Statistical Analysis

Fisher PLSD was used to compare means when a significant F ratio was obtained following the analysis of variance. The level of significance was set at $p<0.05$. All results are presented as the mean ± SEM.

2.3 Results

2.3.1 Inflammatory cells in the EAT procedure

Achilles tendon from ambulatory controls showed normal collagen fiber orientation with dispersed and fusiform tenocytes (Figure 1A). Morphological characteristics of tendon underwent significant changes following collagenase injection. Hypercellularity was observed in disorganized area showing the damaging nature of the protocol (Figure 1B). The cells that resembled morphologically to active fibroblasts decreased remarkedly at 28

days post-injection, but the extracellular matrix appearance was still not identical to ambulatory controls (Figure 1C).

The accumulation of leukocytes in injured tendon was characterized by a rapid increase in the concentration of neutrophils followed by a lesser response in $ED1^+$ macrophages after the injection of collagenase. The concentration of neutrophils increased by 46-fold in EAT animals at 1 day post-trauma and dropped by more than 70% after 3 days to return to control values at 7, 14 and 28 days post-injection (Figure 2A). Immunohistochemistry revealed that neutrophils were highly concentrated after 1 day in injured tendon (Figure 3C) but almost absent in tendon from ambulatory controls and animals that had recovered for 28 days (Figures 3B & D). Negative controls showed no labeling (Figure 3A).

The number of $ED1^+$ macrophages increased by 18-fold at 1 day and slightly decreased 3 days post-injection (Figure 2B). The most significant diminution was observed by day 7 but values similar to ambulatory controls were reached after 14 days. The magnitude of increase in cell number was about two-fold more important in neutrophils compared to $ED1^+$ macrophages in injured tendon after 1 day (Figures 3C & 4C). Interestingly, EAT procedure did not produce any significant increase in the concentration of $ED2^+$ macrophages following collagenase injection (Figure 2C) but a tendency to augment after 28 days was observed ($p = 0.052$) (Figures 2C & 5D). Unexpectedly, sham procedure did induce a significant increase in the concentration of neutrophils and $ED1^+$ macrophages when EAT groups were compared to ambulatory controls (Figures 2 & 6).

2.3.2 Comparison of EAT and NEAT procedures

Although the sequence of leukocyte appearance was similar for the two experimental procedures, the number of neutrophils and $ED1^+$ macrophages was significantly lower in NEAT than EAT groups at 1 and 3 days (Figure 6). The utilization of the NEAT procedure decreased the magnitude of cell accumulation by 35% and 39% for neutrophils and $ED1^+$ macrophages, respectively when compared with time-matched EAT groups. Interestingly, $ED2^+$ macrophages increased significantly in the NEAT group only 3 days following collagenase injection. In addition, no significant difference in the number of inflammatory

cells was observed between ambulatory controls and sham animals that underwent NEAT procedure.

2.4 Discussion

Increases of cellularity in injured tendons have been observed following mechanical (18) and chemical injuries (19) but the exact nature of the cell populations that invade injured tendons has never been confirmed immunohistochemically. The major finding of this investigation is the observation that collagenase injection into Achilles tendon induces an inflammatory response that begins with an initial accumulation of neutrophils, followed by the arrival of $ED1^+$ macrophages and a tendency for a delayed increase in $ED2^+$ macrophages. Although EAT and NEAT caused an increase in neutrophils and $ED1^+$ macrophages at 1 and 3 days post-injection, the increase in these cell types was significantly greater for EAT relative to NEAT. Interestingly, the concentration of $ED2^+$ macrophages increased as early as 3 days post-collagenase injection in NEAT whereas a tendency for $ED2^+$ macrophages to be elevated was observed only after 28 days in EAT. This pattern of macrophage response in NEAT is similar to the histological observations made in one model of skeletal muscle injury (20, 21). For example, the accumulation of $ED2^+$ macrophages followed the arrival of macrophages $ED1^+$ by approximately 1 day after muscle injury induced by modified mechanical loading suggesting different roles for the subsets of macrophages in skeletal muscle. Current evidence supports the view that neutrophils and $ED1^+$ macrophages are phagocytic cells involved in the removal of cellular debris and that $ED2^+$ macrophages are associated with the regenerating stage of muscle injury (1, 20, 21).

The occurrence of different concentrations and types of inflammatory cells in injured tendon strongly suggests that neutrophils, $ED1^+$ and $ED2^+$ macrophages have differing roles in tendon repair. Although the identity of the various molecules released by each subset of leukocytes has not yet been experimentally tested in tendons, there are several growth factors that could enhance tendon healing. For example, macrophages have been shown to be a potent source of a plethora of growth factors and cytokines (22) which can stimulate fibroblast proliferation, induce extracellular matrix synthesis (6) or inhibit

extracellular matrix degradation (23). On the other hand, macrophages are also known to secrete interleukine-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) which inhibit fibroblast proliferation and degrade extracellular matrix (8, 24, 25). We speculate that rapidly invading neutrophils and $ED1^+$ macrophages may release molecules that act predominantly on tendon catabolism while the putative activating molecules produced by endogenous $ED2^+$ macrophages govern tendon anabolism. This assumption fits very well with the present findings in which a less traumatic insult, like the NEAT procedure, caused a more rapid $ED2^+$ macrophage accumulation; one can assume that regeneration process would be present as early as 3 days in NEAT while it appears to be considerably delayed following EAT procedure.

The distinct time courses of disappearance of neutrophils, $ED1^+$ and $ED2^+$ macrophages observed in both models used are also in agreement with earlier reports in tendon and skeletal muscle (17, 26). In a model of muscle injury, apoptosis contributed to reduce the concentration of $ED1^+$ macrophages during the resolution of the inflammation. However, the apoptotic process was not occurring at the same frequency in $ED2^+$ macrophages following muscle injury (26) leading to accumulation of $ED2^+$ macrophages in injured tissue. This suggests that the onset of death is regulated independently in each population of inflammatory cells. $ED2^+$ macrophages are well-suited to perform fibroblast-associated functions since a phenotypic continuum exists between fibroblasts and macrophages (27) such that macrophages can differentiate into a collagen-producing phenotype under certain conditions (28). The possibility that the sustained level of $ED2^+$ macrophages seen in the present study contributes to fibroblast activation and collagen deposition can not be excluded.

The collagenase injection model was previously used by Davidson et al. (19) who observed that soft tissue mobilization on Achilles tendon surgically exposed and injected with collagenase can increase fibroblast proliferation at site of injury. However, the conclusion of these studies was weakened by the fact that neither sham-operated animals were used and nor specific markers were employed for fibroblasts or inflammatory cells. In the present study, we show that sham-operated animals in EAT groups presented an important tendon inflammation at 1 and 3 days post-trauma. On the other hand, sham-operated

animals that were injected percutaneously with PBS presented no sign of inflammation, suggesting that an important part of the inflammatory response is attributable to surgical procedures.

In summary, we have demonstrated, using two different models, that injury to tendon triggers a classic and sequential pattern of inflammatory cell accumulation, where rapid but transient neutrophil accumulation is followed by an increased of $ED1^+$ macrophage concentration. The percutaneous injection of collagenase constitutes a reliable model for collagenase-induced tendon degeneration where surgical procedures are not important compared to the model where Achilles tendon is exposed. This work should provide the foundation for future studies examining the role of each sub-population of inflammatory cells in tendon degeneration and regeneration.

2.5 Acknowledgements

This investigation was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to J. Frenette and C.H. Côté.

2.6 Figures and Legends

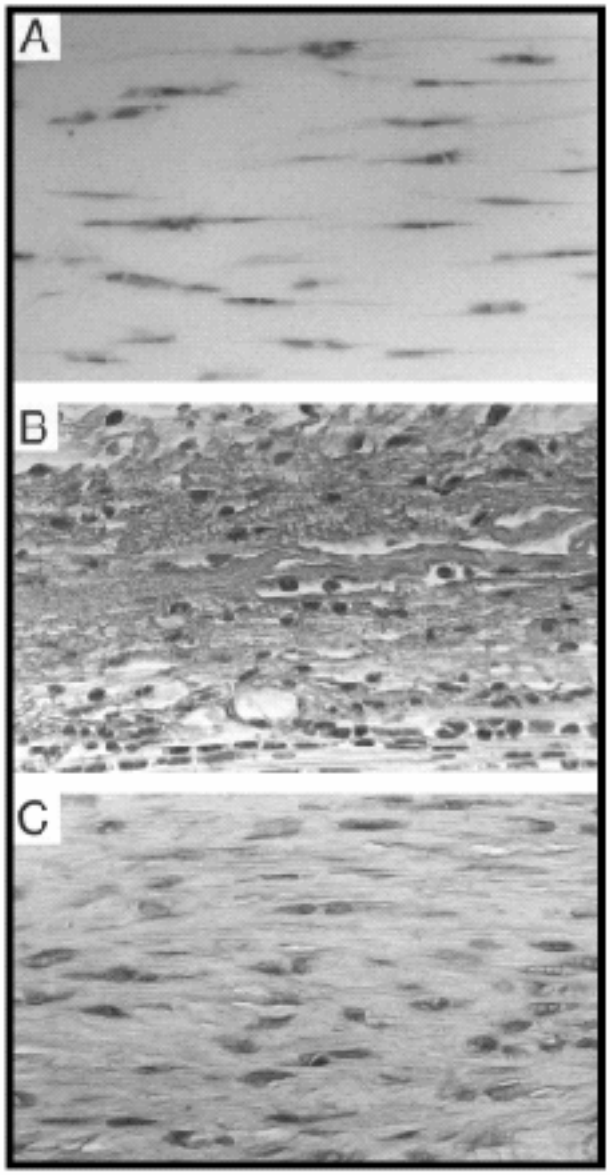

Figure 1: Staining of Achilles tendon sections with hematoxylin and eosin. A: Ambulatory controls B: EAT injected with collagenase after 1 day. C: EAT injected with collagenase after 28 days. Bar = 50 μm.

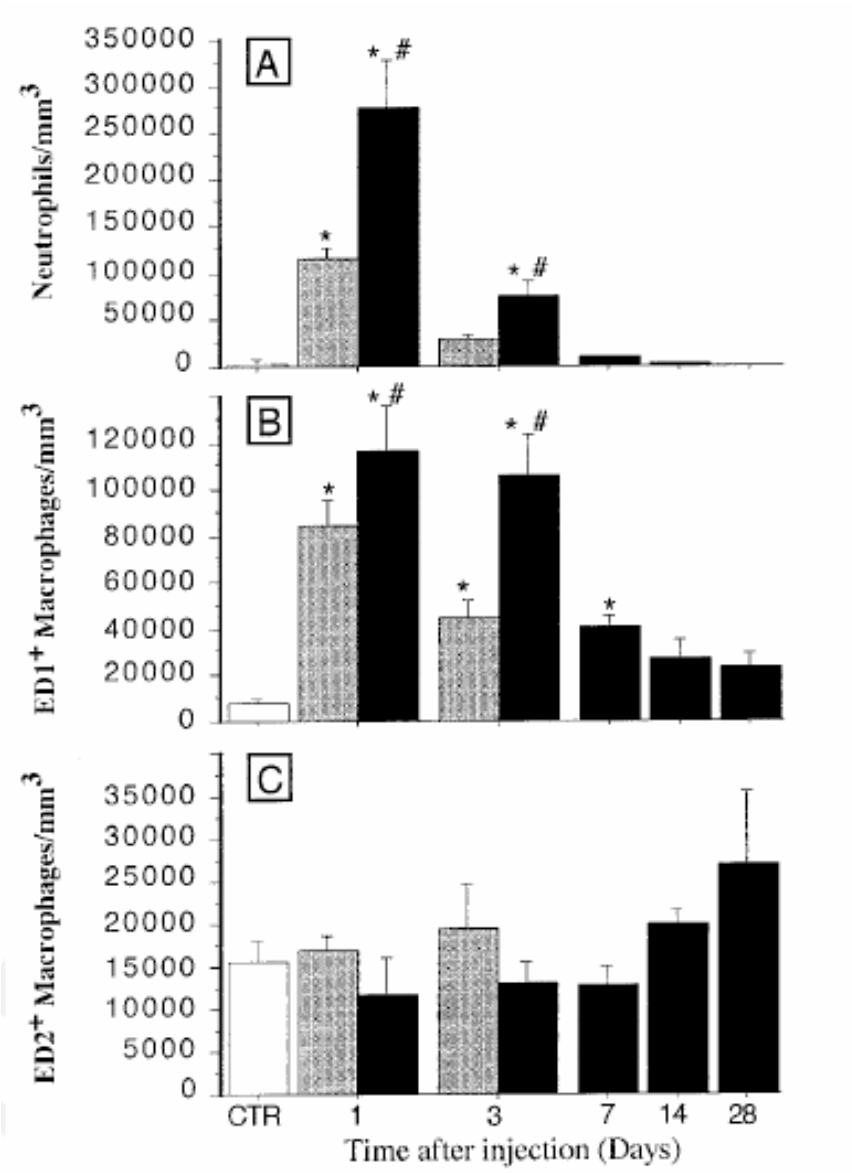

Figure 2: Time course of leukocyte accumulation following EAT injected with collagenase. Panel A illustrates the concentration of neutrophils in Achilles tendons. White bar, ambulatory control animals; black bar, EAT injected with collagenase at 1, 3, 7, 14 and 28 days post-trauma; grey bar, EAT from sham animals at 1 and 3 days following PBS injection. *Significantly different from ambulatory controls. #Significantly different from its matched sham group. Panels B and C illustrate $ED1^+$ and $ED2^+$ macrophage concentrations, respectively. Symbols are the same as in panel A.

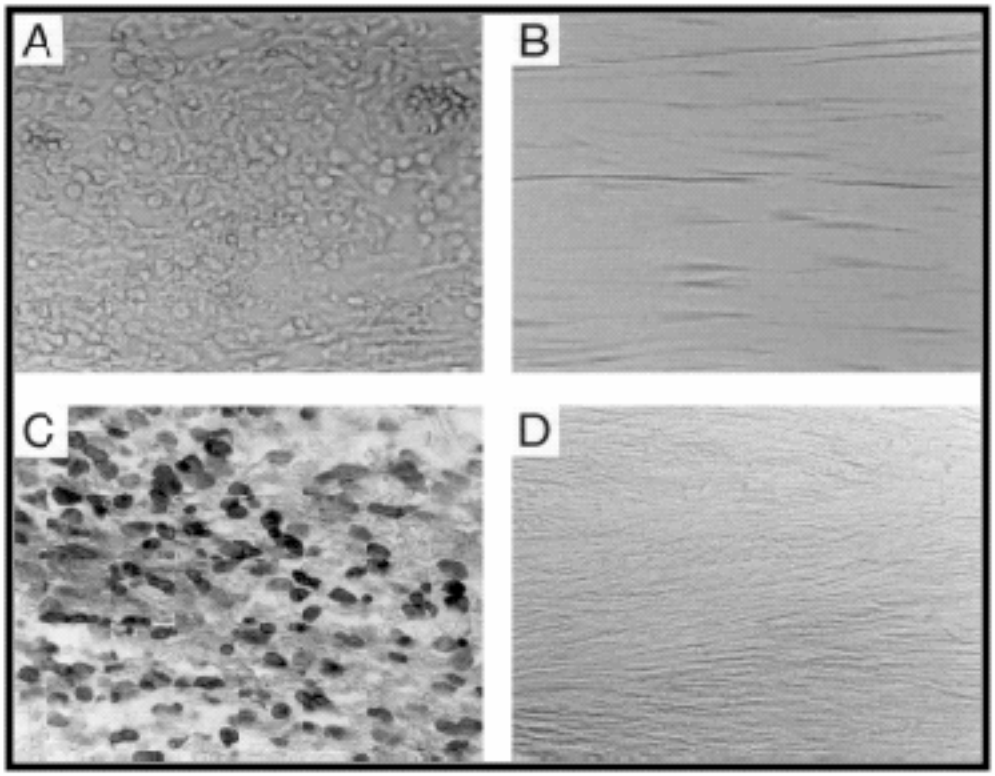

Figure 3: Immunoperoxidase labeling of neutrophils in longitudinal sections of Achilles tendon. A: negative controls (no primary antibody) showing no staining. B: Achilles tendon from ambulatory controls. C: EAT 1 day following injection of collagenase. D: EAT 28 days following injection of collagenase. Bar = 50 μm.

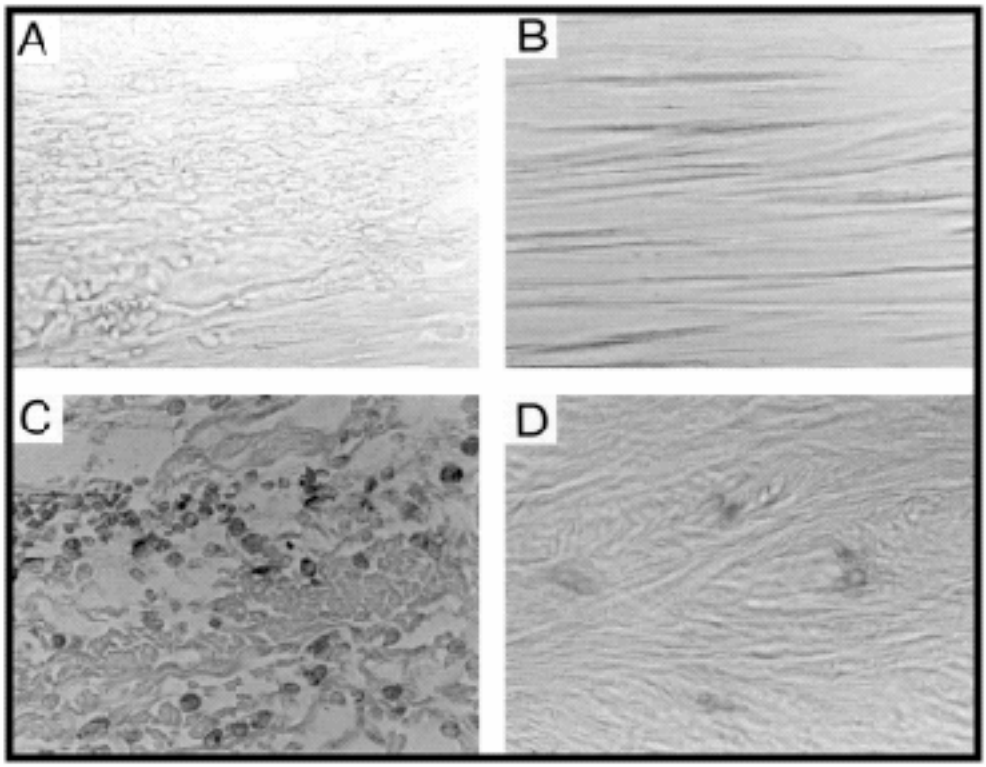

Figure 4: Immunoperoxidase labeling of ED1^{+} macrophages in longitudinal sections of Achilles tendon. A: negative controls (no primary antibody) show no staining. B: Achilles tendon from ambulatory controls. C: EAT 1 day following injection of collagenase. D: EAT 28 days following injection of collagenase. Bar = 50 µm.

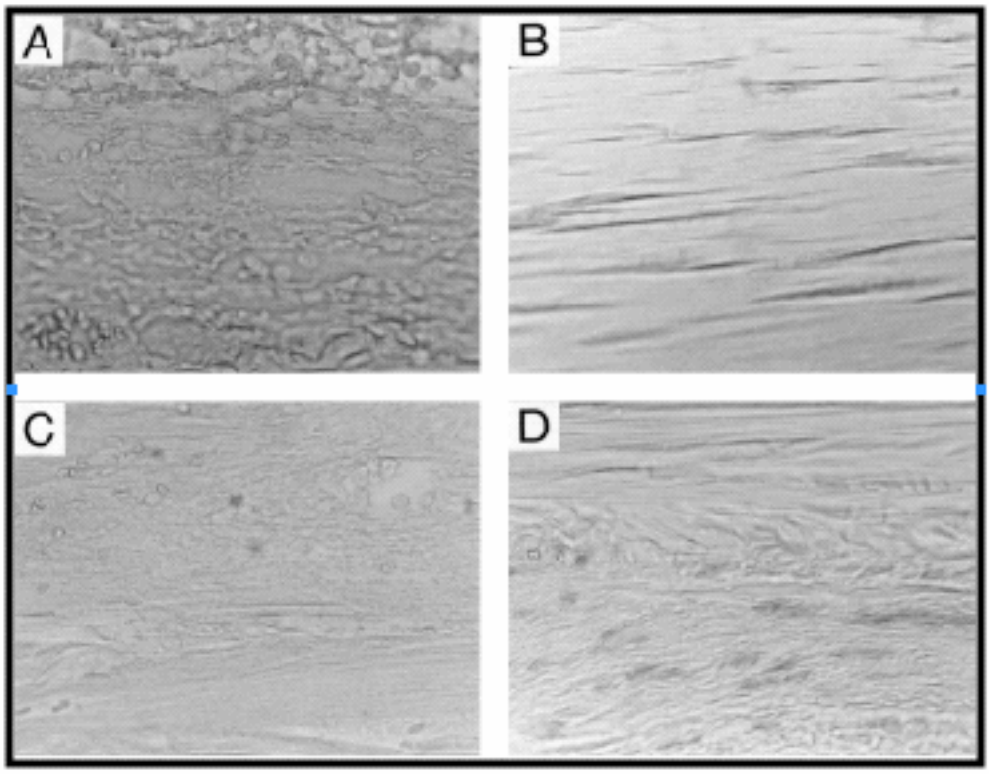

Figure 5: Immunoperoxidase labeling of $ED2^{+}$ macrophages in longitudinal sections of Achilles tendon. A: negative controls (no primary antibody) show no staining. B: Achilles tendon from ambulatory controls. C: EAT 1 day following injection of collagenase. D: EAT 28 days following injection of collagenase. Bar = 50 µm.

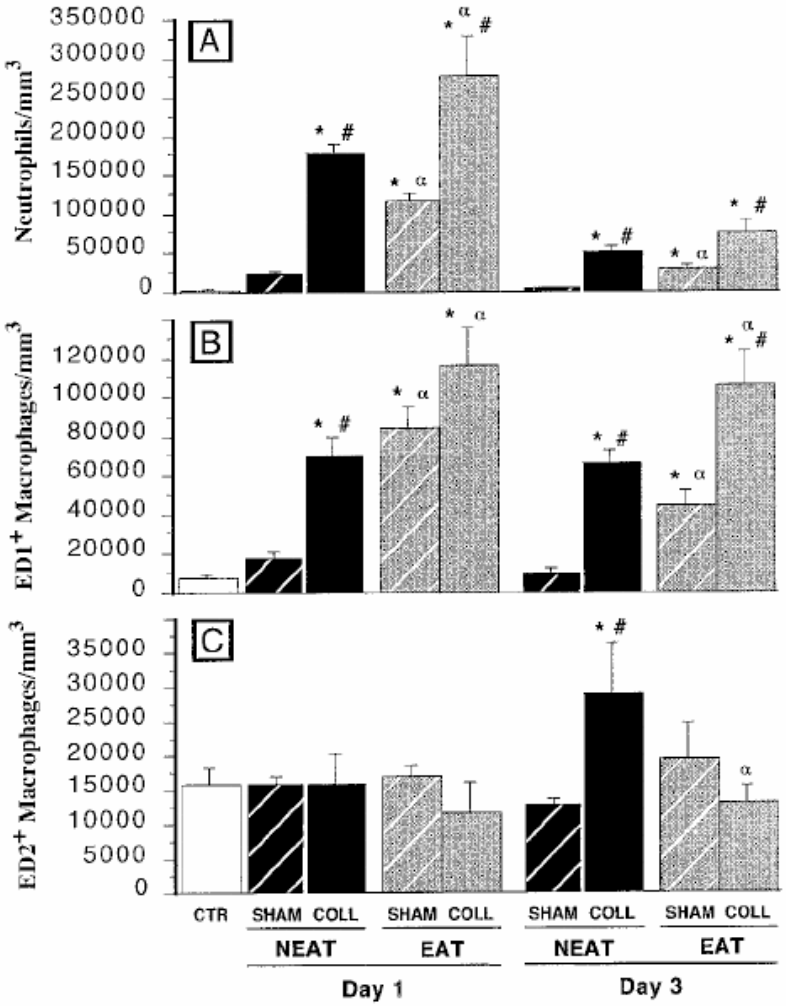

Figure 6: Concentration of neutrophils, $ED1^+$ and $ED2^+$ macrophages in Achilles tendon following two different surgical procedures. Panel A illustrates the concentration of neutrophils in Achilles tendons. White bar, ambulatory control animals; black with striped bars; NEAT from sham procedure; black bars; NEAT injected with collagenase; grey with striped bars; EAT from sham procedure; grey bars; EAT injected with collagenase. All experimental groups were done at 1 or 3 days post-trauma. * Significantly different from ambulatory controls. # Significantly different from its matched sham group. α Significantly different from NEAT procedure. Panels B and C illustrate $ED1^+$ and $ED2^+$ macrophage concentrations, respectively. Symbols are the same as in panel A.

2.7 References

1. Al-Mokdad, M., et al., Differential production of chemokines by phagocytosing rat neutrophils and macrophages. Inflammation, 1998. 22(2): p. 145-59.

2. Ley, K., Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. Cardiovasc Res, 1996. 32(4): p. 733-42.

3. Henson, P.M. and R.B. Johnston, Jr., Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. J Clin Invest, 1987. 79(3): p. 669-74.

4. Godson, C., et al., Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. J Immunol, 2000. 164(4): p. 1663-7.

5. Hall, S.E., et al., Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. J Immunol, 1994. 153(7): p. 3218-27.

6. Ignotz, R.A. and J. Massague, Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. J Biol Chem, 1986. 261(9): p. 4337-45.

7. Laiho, M., et al., Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial-type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor-beta. J Cell Biol, 1986. 103(6 Pt 1): p. 2403-10.

8. Fukasawa, M., et al., Modulation of fibroblast proliferation by postsurgical macrophages. J Surg Res, 1987. 43(6): p. 513-20.

9. McLennan, I.S., Resident macrophages (ED2- and ED3-positive) do not phagocytose degenerating rat skeletal muscle fibres. Cell Tissue Res, 1993. 272(1): p. 193-6.

10. Massimino, M.L., et al., ED2^{+} macrophages increase selectively myoblast proliferation in muscle cultures. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 235(3): p. 754-9.

11. Robertson, T.A., et al., The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. Exp Cell Res, 1993. 207(2): p. 321-31.

12. Messner, K., et al., Rat model of Achilles tendon disorder. A pilot study. Cells Tissues Organs, 1999. 165(1): p. 30-9.

13. Soslowsky, L.J., et al., Neer Award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study. J Shoulder Elbow Surg, 2000. 9(2): p. 79-84.

14. Wojciak, B. and J.F. Crossan, The accumulation of inflammatory cells in synovial sheath and epitenon during adhesion formation in healing rat flexor tendons. Clin Exp Immunol, 1993. 93(1): p. 108-14.

15. Sano, H., et al., Histologic evidence of degeneration at the insertion of 3 rotator cuff tendons: a comparative study with human cadaveric shoulders. J Shoulder Elbow Surg, 1999. 8(6): p. 574-9.

16. Williams, I.F., et al., Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. Res Vet Sci, 1984. 36(3): p. 326-38.

17. Enwemeka, C.S., Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation. Phys Ther, 1989. 69(10): p. 816-25.

18. Iwuagwu, F.C. and D.A. McGrouther, Early cellular response in tendon injury: the effect of loading. Plast Reconstr Surg, 1998. 102(6): p. 2064-71.

19. Davidson, C.J., et al., Rat tendon morphologic and functional changes resulting from soft tissue mobilization. Med Sci Sports Exerc, 1997. 29(3): p. 313-9.

20. St Pierre, B.A. and J.G. Tidball, Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. J Appl Physiol, 1994. 77(1): p. 290-7.

21. Frenette, J., B. Cai, and J.G. Tidball, Complement activation promotes muscle inflammation during modified muscle use. Am J Pathol, 2000. 156(6): p. 2103-10.

22. Nathan, C.F., Secretory products of macrophages. J Clin Invest, 1987. 79(2): p. 319-26.

23. Baricos, W.H., et al., Transforming growth factor-beta is a potent inhibitor of extracellular matrix degradation by cultured human mesangial cells. J Am Soc Nephrol, 1999. 10(4): p. 790-5.

24. Fujisawa, T., et al., Cyclic mechanical stress induces extracellular matrix degradation in cultured chondrocytes via gene expression of matrix metalloproteinases and interleukin-1. J Biochem (Tokyo), 1999. 125(5): p. 966-75.

25. Elias, J.A., K. Gustilo, and B. Freundlich, Human alveolar macrophage and blood monocyte inhibition of fibroblast proliferation. Evidence for synergy between interleukin-1 and tumor necrosis factor. Am Rev Respir Dis, 1988. 138(6): p. 1595-603.

26. Tidball, J.G. and B.A. St Pierre, Apoptosis of macrophages during the resulution of muscle inflammation. J Leukoc Biol, 1996. 59(3): p. 380-8.

27. Arlein, W.J., J.D. Shearer, and M.D. Caldwell, Continuity between wound macrophage and fibroblast phenotype: analysis of wound fibroblast phagocytosis. Am J Physiol, 1998. 275(4 Pt 2): p. R1041-8.

28. Vaage, J. and W.J. Lindblad, Production of collagen type I by mouse peritoneal macrophages. J Leukoc Biol, 1990. 48(3): p. 274-80.

Chapitre III :

Un anti-inflammatoire non stéroïdien diminue l'accumulation des neutrophiles et des macrophages mais n'améliore pas la réparation tendineuse

Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Reduces Neutrophil and Macrophage Accumulation But Does Not Improve Tendon Regeneration

David Marsolais, Claude H. Côté and Jérôme Frenette

CHUL Research Center
Department of Rehabilitation
Faculty of Medicine
Laval University

Running title:
Effects of Diclofenac on Tendon Inflammation and Regeneration

Address for correspondence:

Jérôme Frenette
Laval University Hospital Research Center
RC-9500, 2705 Blvd Laurier, Ste-Foy, Québec
Canada G1V 4G2

Lab Invest, 2003. 83(7): p. 991-9.

Résumé

L'effet bénéfique des anti-inflammatoires non stéroïdiens en regard de la réparation tendineuse fait encore l'objet de controverse. La présomption que les cellules inflammatoires puissent causer des dommages non spécifiques suivant une blessure existe. Nous avons donc vérifié l'hypothèse qu'un traitement de 3 jours avec du diclofénac protègerait les tendons des dommages induits par les cellules inflammatoires, ce qui serait ultimement associé à une accélération de la guérison. La concentration des neutrophiles et des macrophages $ED1^+$ a été déterminée dans la portion centrale ainsi que dans le paraténon des tendons blessés par injection de collagénase. Le contenu en hydroxyproline, l'oedème ainsi que les propriétés mécaniques ont également été évaluées aux jours 1, 3, 7, 14, et 28 post-trauma. L'injection de collagénase a causé une réduction du point de rupture de près de 70% au jour 3. L'administration de diclofénac (1mg/kg b.i.d.) a diminué l'accumulation des neutrophiles et des macrophages de 59% et 35%, respectivement, dans la portion du tendon la plus riche en vaisseaux sanguins, c'est à dire le paraténon, et non pas dans le centre du tendon. L'œdème était diminué au jour 3 mais persistait durant la phase de remodelage dans le groupe traité au diclofénac, comparativement au placebo. L'inhibition de l'accumulation des cellules inflammatoires ne s'est pas traduite par une réduction des dommages tendineux, ni par une accélération de la réparation tissulaire car les propriétés mécaniques étaient identiques entre les groupes traités avec le placebo et le diclofénac. Ces résultats montrent que le diclofénac réduit l'œdème ainsi que l'accumulation des cellules inflammatoires dans le paraténon, mais ceci n'est pas associé à des effets bénéfiques tant au point de vue fonctionnel que biochimique.

Summary

Whether nonsteroidal anti-inflammatory drugs have a beneficial effect on tendon regeneration is still a matter of debate. Given that inflammatory cells are thought to induce nonspecific damage following an injury, we tested the hypothesis that a three-day treatment with diclofenac would protect tendons from inflammatory cell injury and would promote healing. Neutrophil and $ED1^+$ macrophage concentrations were determined in the paratenon and the core of the rat Achilles tendon following collagenase-induced injury. Hydroxyproline content, edema and mechanical properties were also evaluated at 1, 3, 7, 14 and 28 days post-trauma. Collagenase injections induced a 70% decrease in the ultimate rupture point at day 3. Diclofenac treatment (1mg/kg b.i.d.) selectively decreased the accumulation of neutrophils and $ED1^+$ macrophages by 59% and 35%, respectively, in the paratenon, where blood vessels are numerous, but did not reduce the accumulation of neutrophils and $ED1^+$ macrophages in the core of the tendon. Edema was significantly reduced on day 3 but persisted during the remodeling phase in the diclofenac-treated group only. The inhibition of leukocyte accumulation by diclofenac did not translate into a reduction of tissue damage or a promotion of tissue healing, as the mechanical properties of injured Achilles tendons were identical in placebo and diclofenac-treated groups. These results indicate that diclofenac reduced both edema and the accumulation of inflammatory cells within the paratenon, but provided no biochemical or functional benefits for the Achilles tendon.

3.1 Introduction

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely prescribed to reduce pain and inflammation following soft tissue injuries. NSAIDs inhibit tissue inflammation by repressing cyclooxygenase (COX) activity, thereby leading to a reduction in pro-inflammatory prostaglandin (PG) synthesis (1). NSAIDs can also repress inflammation by inducing apoptosis, activating peroxisome proliferator-activated receptors α and γ (2) and inhibiting neutrophil (PMN) aggregation (3) and degranulation (4). Diclofenac can induce shedding of adhesion molecules located on PMNs, thereby inhibiting their locomotion and ability to invade inflamed tissues (5, 6). Because PGs can play an important role in the accumulation of inflammatory cells in many tissues, and leukocyte subsets may exacerbate tissue injuries, it is believed that reducing PGE_2 production and inflammatory cell accumulation using COX inhibitors will lead to a reduction in tendon injury. However, the effects of NSAIDs on connective tissue repair have produced diverging and contradictory results. For example, the administration of nonspecific inhibitor of COX activity increases ligament strength by 42% at 14 days post-surgical transection, while a specific COX-2 inhibitor decreases ligament strength as compared to a placebo (7). Although the conclusions of these studies are weakened by the fact that no specific inflammatory cell markers were employed to verify the efficacy of the NSAIDs, the observations are consistent with the current view that inflammatory cells participate in both the degenerating and regenerating processes at sites of injury (8-10).

We recently showed in a rat model of tendon injury that different populations of inflammatory cells (PMNs, $ED1^+$ and $ED2^+$ macrophages (MΦs)) accumulate sequentially (11). PMNs accumulate rapidly at injury sites, where they can increase extracellular matrix damage through the release of proteases and potentially delay tissue regeneration (12). PMN invasion is followed by MΦ accumulation 1–3 days post-injury. These cells play key roles in the early phase of wound healing and are likely very important for effective wound debridement (13), angiogenesis (14), fibroblast activity and subsequent collagen synthesis (15). The use of NSAIDs may thus both repress the catabolic actions of inflammation and/or alleviate important signals for tissue regeneration. We hypothesized that a three-day

treatment with diclofenac during the highly catabolic phase of inflammation would protect tendons from injury and promote tissue healing. In this study, we assessed inflammatory cell accumulation, edema, hydroxyproline content and mechanical properties of Achilles tendons at 1, 3, 7, 14 and 28 days post-collagenase injury. These time points encompass the periods of inflammatory cell accumulation, collagen degradation and initiation of the regeneration process (11). The results demonstrate that diclofenac decreased the accumulation of inflammatory cells during the acute phase of inflammation but neither prevented tissue damage nor accelerated the healing process.

3.2 Materials and Methods

3.2.1 Experimental procedures

Collagenase-induced tendon injury has been previously characterized in our laboratory and described in detail (11). Female Wistar rats (180–200 g) allowed normal cage activity were used. The rats were anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine/xylazine cocktail (87.5 mg/kg and 12.5 mg/kg, respectively). Instruments were sterilized to avoid local inflammation due to infection. The Achilles tendons of both hindlimbs were exposed by a slight incision above the osteotendinous junction. For immunolabeling analyses, the experimental tendon was injected with 30 µl of crude collagenase solution (5 mg/ml; Sigma, St. Louis, MI, USA) using a 30 gauge needle. Collagenase was dissolved in sterile phosphate-buffered saline (PBS). Contralateral Achilles tendons were injected with the same volume of vehicle and used as sham groups. In another series of experiments where mechanical testing was performed, both Achilles tendons were injected with 30µl of the 5mg/ml collagenase solution. Injury was induced in both tendons in order to evaluate hydroxyproline and water content as well as the mechanical properties of injured tendons on the same animal. Mechanical data from injured tendons were thus compared to tendons originating from control rats but the sham procedure did not induce any functional deficit (unpublished data). The incision was closed with sutures and gently washed with a topical antiseptic solution. Following the surgical procedures, the animals were rehydrated by injecting 5 ml of Ringer's lactate subcutaneously and then placed under a heat lamp to prevent hypothermia until awakening.

3.2.2 Drug administration

The animals were randomly divided into two groups. Six hours following collagenase injection, the time needed to recover completely from anesthesia, the placebo and experimental groups were gavaged with water or diclofenac dissolved in water at 1 mg/kg. All animals were treated b.i.d. for six doses. The rats were sacrificed 1, 3, 7, 14 and 28 days post-collagenase injection. Ambulatory control rats were sacrificed without prior intervention or after the administration of six doses of diclofenac administered b.i.d.

3.2.3 Immunohistochemistry

To label inflammatory cells, hindlimbs were removed immediately after sacrifice, the foot was positioned in a dorsiflexion position and the whole limb was fixed overnight in 10% formalin at 4°C. Achilles tendons were then excised between the osteotendinous and myotendinous junctions, dehydrated in increasing concentrations of alcohol and cleared in three changes of xylene. After dehydration and clearing on ice, Achilles tendons were embedded overnight in paraffin at 60°C and the paraffin blocks stored at –20°C. Sections from the paratenon and core of each tendon were systematically selected at 0.25 and 0.75 mm from the lateral edge of the tendon, respectively. Longitudinal sections were labeled for the PMNs and $ED1^+$ MΦs as previously described (11).

To label blood vessels, uninjured tendons were excised and fixed for three days in a zinc solution (0.5% zinc acetate and 0.5% $ZnCl_2$ in 0.1M Tris base buffer containing 0.05% calcium acetate) (16). Tendons were embedded in paraffin and transversally cut at a thickness of 5µm. Tissue sections from two distinct regions of the tendon were collected in duplicate. Tendons were quenched with a solution of 3% hydrogen peroxide diluted in methanol to abrogate endogenous peroxidase activity. Nonspecific sites were blocked for 20 min in a solution containing 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 150 mM sodium azide, 0.5% Tween 20, 0.2% gelatin and 3% bovine serum albumin. Sections were then overlaid without the primary antibody or incubated overnight at 4°C with anti-rat CD31 antibody (BD Pharmingen, CA, USA), which binds to an adhesion molecule commonly called PECAM-1 located in the endothelium of blood vessels. All sections were then washed with PBS and incubated with biotinylated anti-mouse IgG antibody (1:200; Vector Laboratories,

Burlingame, CA, USA) for 60 min. Tissue samples were washed with PBS and incubated with horseradish peroxidase (1:1000; Vector Laboratories) before revealing the antibody-antigen complex by chromogenic development using DAB peroxidase substrate kit (Dako Diagnostics Canada Inc., ON, Canada). Transverse sections were then viewed under a Nikon inverted microscope equipped with a Cool Snap photometrics CCD camera. Blood vessel density was quantified by using Metamorph image software. Following acquisition, images were converted from pixels to micrometers using a calibration image. The color threshold was set to include labeled blood vessels with minimal unspecific background. Three sample areas were selected in the paratenon and the core of the tendon, and the surface area occupied by blood vessels were expressed as percentages of total area.

3.2.4 Mechanical testing

In another set of experiments, Achilles tendons were excised with the calcaneum and the inferior portions of the gactrocnemius, plantaris and soleus muscles. Samples were placed in a humid chamber on PBS-moistened gauze to avoid drying and swelling (17). Muscle tissue was gently removed from the tendons, and both extremities were rapidly wiped and glued between two pieces of balsa wood with Loctite 495. Achilles tendons were then fixed in metal jaws covered with #40 sand paper and connected to the load cell of a MTS 858 Mini Bionix II device (MTS Systems Corporation, MN, USA). Initial length was manually set at a tension of 1 to 2 N. The test, conducted with Model 793.00 System Software, version 3.2 (MTS Systems Corporation, MN, USA), was performed to obtain a tension-elongation curve using a strain rate of 10% of initial length per second until rupture. Tension (Newtons) and elongation (mm) were monitored at a frequency of 10 Hz. Tension-elongation curves were plotted and discarded if slippage or absence of a clear rupture point was noted. Stiffness was defined as the maximal slope of the linear portion of the tension-elongation curve in a time lapse of 0.5 s. Ultimate rupture force was also recorded.

3.2.5 Measurements of edema and hydroxyproline content

Once the biomechanical properties had been measured, the left Achilles tendons were dehydrated for 24 hours at 60°C (18) and the ratio [(wet mass – dry mass)/wet mass] was used to obtain an index of the water content. After dehydration, tendons were then

hydrolyzed in 6 N HCl at 130°C for 3 h, neutralized with NaOH and diluted in water. The extracts were used for the determination of hydroxyproline content by the method of Woessner (19).

3.2.6 Statistical analysis

Fisher PLSD was used to compare means when a significant F ratio was obtained following the analysis of variance. Pearson correlate analysis was used to assess the relationship between ultimate rupture point and hydroxyproline content. The level of significance was set at $p < 0.05$. All results are presented as means ± standard errors of the means.

3.3 Results

3.3.1 Concentration of inflammatory cells and blood vessels in the paratenon and the core of the Achilles tendon

Collagen fibers are well organized and have a parallel orientation in normal Achilles tendons (Figure 1A). Collagenase injection induced tissue disorganization, as shown by the large pink areas in Masson's trichrome-stained sections (Figure 1B). The histological appearance of the Achilles tendon was identical in both experimental groups 28 days post-recovery but the collagen fibers remained small and disorganized (Figures 1C to 1D). To verify whether diclofenac can modify the accumulation of inflammatory cells, PMNs and $ED1^+$ MΦs were immunolabeled on longitudinal sections of Achilles tendon (Figures 1E to 1H). The sequence of inflammatory cell accumulation was similar to previous observations in tendons and skeletal muscles (11, 20). Immunolabeling with PECAM antibody showed that blood vessels are highly concentrated in the paratenon (Figure 1J). Relative to the ambulatory control, the sham procedure induced a small but significant increase in the concentrations of $ED1^+$ MΦs and PMNs up to days 3 and 7, respectively (Figures 2 & 3). Collagenase injection increased the concentrations of PMNs by 450-fold and $ED1^+$ MΦs by 15-fold compared to the control at day 1 post-trauma in the paratenon of the Achilles tendon (Figures 2A & 3A). PMNs and $ED1^+$ MΦs disappeared gradually and returned to sham values at days 14 and 28, respectively. The administration of diclofenac reduced the accumulation of PMNs by 59% and $ED1^+$ MΦs by 35% relative to the placebo in the

paratenon at day 1 post-trauma, indicating that diclofenac efficiently blocked leukocyte accumulation.

In contrast, the diclofenac treatment had no effect on the accumulation of PMNs and $ED1^+$ MΦs in the core of the Achilles tendon at days 1, 3, 7 and 14 post-trauma. As observed with the paratenon, the concentrations of $ED1^+$ MΦs in the core of Achilles tendons treated with diclofenac also failed to return to sham values on day 28. The concentration of $ED2^+$ MΦs did not increase significantly over time in either placebo or diclofenac-treated animals compared to sham values (unpublished data). Because diclofenac is transported through the circulatory system, we decided to verify whether differences in blood vessel concentrations could explain the specific effect of diclofenac in the paratenon. Quantitative analysis revealed that the density of blood vessels was 12 times higher in the paratenon than in the core of the Achilles tendon (Figure 4).

3.3.2 Edema formation, hydroxyproline content and biomechanical properties

Water content, which was quantified to determine whether diclofenac influenced edema formation, was approximately 59 ml/100g of wet mass in control tendons and increased by 30% at day 3 post-trauma in the placebo group (Figure 5A). The administration of diclofenac reduced edema by approximately 35% at day 3 relative to the placebo. The water content decreased steadily in placebo-treated groups between days 3 and 14. In contrast, edema failed to diminish between these two time points in the diclofenac-treated rats, suggesting that the resolution of the inflammatory phase was retarded following the administration of the NSAID.

To assess collagen content, hydroxyproline was measured in placebo and diclofenac-treated animals. As expected, collagenase injection induced a significant reduction in collagen content in both the placebo and diclofenac groups (Figure 5B). The lowest concentrations of hydroxyproline were recorded at days 3 and 7 post-collagenase injection in the placebo and diclofenac groups, respectively. The hydroxyproline content gradually increased after day 7 but failed to reach the control value after 28 days in both experimental groups. The functional integrity of the tendons was also tested in a separate set of experiments. Tendons

were stretched to measure stiffness and the ultimate rupture point in order to determine whether NSAID treatment influenced mechanical properties. Control values for the ultimate rupture point and maximal stiffness were 85.7 N and 86.1 N/mm, respectively (Figures 6 A & 6B). Following collagenase injection, both the ultimate rupture point and stiffness dropped by approximately 70%, on day 3 in the placebo group. Subsequently, the ultimate rupture point and stiffness of injured tendons recovered progressively to reach 48% and 51% of control values, respectively, at the end of the protocol. Thus, the mechanical properties of the injured tendons remained significantly different from control values at the end of the protocol. Treatment with NSAIDs had no significant impact on the mechanical properties of the Achilles tendon at all time points tested. Lastly, we verified whether a relationship could be observed between the ultimate rupture point and hydroxyproline content. Interestingly, hydroxyproline content strongly correlated with the capacity of the Achilles tendon to sustain mechanical stress in all groups tested, suggesting that hydroxyproline content may be a good indicator of tendon function (Figure 7).

3.4 Discussion

Tendons heal very slowly through the formation of scar tissue following chemical, physical or mechanical injuries, and rarely regain their original strength. In general, the sequence and time course of events that occur during tendon healing closely resemble those reported in many other tissues. Different subpopulations of leukocytes rapidly invade the inflamed tissue to phagocyte cellular debris and stimulate fibroblast proliferation and collagen deposition (21). Interestingly, the number and type of inflammatory cells recruited at injured sites may play an important role in the degree of scarring and the quality of the healing response. For example, the number and persistence of different subsets of leukocytes are lower following dermal injuries in fetal tissues than in adult tissues. Lower leukocyte accumulation in fetal wounds results in a scar-free phenotype not observed in adult tissues (22, 23). The teleological arguments for the use of NSAIDs on regular basis in clinical practice are thus strongly based on the reduction and/or modulation of the number of inflammatory cells at wound sites which may eventually diminish tissue injury and scar formation.

Even though the history of NSAIDs stretches back through the use of willow bark extracts, the effects of NSAIDs on final healing outcome remain a topic of much debate. Previous investigations have demonstrated that NSAIDs may impair (7, 24), have no effect on (25, 26) or enhance (27, 28) tissue healing. The findings presented here clearly show that diclofenac did not change the functional properties of the healing tendon. Our results also demonstrate that diclofenac preferentially modulated the accumulation of PMNs and $ED1^+$ MΦs in the paratenon. Possible explanations for this unexpected finding include the following: 1- The bioavailability of diclofenac was only sufficient to inhibit leukocyte recruitment in the paratenon where the vascular system is well developed, and the available concentration of diclofenac was probably below the effective dose in the core of the tendon, which is the hypovascularized region of Achilles tendon; 2- PGs might be synthesized rapidly in the paratenon following tissue injury and may exert chemoattraction locally and promote leukocyte recruitment (29), 3- The presence of diclofenac could induce L-selectin shedding, which may impair leukocyte rolling and recruitment. Such action would predominantly occur where blood vessels are abundant (5); and 4- The use of diclofenac might inhibit the enzymatic degradation of lipoxins, biologically active eicosanoids that can decrease PMN recruitment via chemokine downregulation, reduce PMN degranulation and stimulate the uptake of apoptotic PMNs by MΦs (30). However, the presence of lipoxins at higher concentrations in the paratenon relative to the core of the tendon has not been documented. The hypovascular network in the core of Achilles tendon may explain the lack of effect of diclofenac in this region.

The results presented here also constitute a highly valuable addition for the characterization of collagenase-induced tendon injury. Our values for hydroxyproline content in control rats are in agreement with previous results published for tendons and other similar connective tissues (18, 31, 32). Although long term monitoring for hydroxyproline content during tendon degeneration and regeneration has never been clearly reported, we showed that the rapid loss of hydroxyproline coincides with the accumulation of PMNs and MΦs, which supports the hypothesis that leukocytes phagocytose and digest collagen during the inflammatory phase. The finding that the concentration of hydroxyproline gradually increased also supports similar observations that extensive collagen synthesis begins after 7 days (33). The appearance of MΦs is most likely necessary for the initiation and formation

of new tissue since MΦ-depleted animals have defective wound repair mechanisms and MΦ implantation accelerates tissue healing (34). Many cytokines secreted by MΦs can accelerate wound healing, the formation of granulation tissue and the deposition of extracellular matrix. Transforming growth factor-ß 1 would be the most likely candidate for orchestrating wound repair in that it can stimulate both fibroblast proliferation and collagen production (35, 36).

The biomechanical properties of rat Achilles tendon observed in our study compare favorably with those reported in the literature, but our technical procedures minimized slippage during stretching, which increased the ultimate rupture points relative to previous study (37). The present findings also clearly demonstrated that regenerating processes in Achilles tendon are remarkably slow since mechanical functions reached only 50–60% of control values after 28 days. Although total recovery following an Achilles tendon injury may require almost one year, the compelling histological, biochemical and mechanical data obtained with respect to the inflammation and repair phases indicated that diclofenac does not have any beneficial effects on tendon repair. These observations are consistent with the view that diclofenac has no effect on PMN accumulation in collagen bundles, the most important collagenic structures that transmit large loads following muscle contractions. The presence of PMNs can cause collagen damage through the release of metalloproteases and free radicals (38). The lack of effect of NSAIDs in collagen bundles is particularly relevant because many forms of tendinitis in man and horses occur in the tensile region of the tendon (39). In addition, our findings that edema and the presence of $ED1^+$ MΦs seem to persist in diclofenac-treated rats reinforce the current view that NSAIDs can prolong the inflammatory process. For example, Gilroy et al. (40) used a model of carrageenan-induced pleurisy to demonstrate that NSAIDs retard the resolution of inflammation. It was recently shown that a delay in the disappearance of $ED1^+$ MΦs occurred following diclofenac treatment in a model of exercise-induced muscle damage (41). Another recent study clearly demonstrated that specific inhibition of COX-2 activity by NS-398 or nonspecific inhibition of COX activity by indomethacin causes a significant delay in wound healing in rat skin (42). In contrast, the addition of PGE_2 stimulated wound closure in airway epithelium (43). Together, these findings suggest that COX-dependent metabolites play a role in stimulating wound healing in various tissues.

In summary, data obtained with the present model of tendon injury support the conclusions that treatment with diclofenac does not prevent collagen degradation and loss of tensile force at the onset of tendon injury. It is therefore questionable whether NSAIDs should be used to alleviate inflammation in acute tendon injuries. Further investigations using direct approaches are needed to determine the roles played by each inflammatory cell subset in tendon repair. Lastly, we speculate that the slow rate of tendon healing may be due to an insufficient number of cells activating fibroblast and/or secretory fibroblasts involved in tendon fabrication. Testing of strategies designed to promote migration and activation of fibroblasts in order to influence tendon healing and function might be a promising approach to resolve this question.

3.5 Figures and Legends

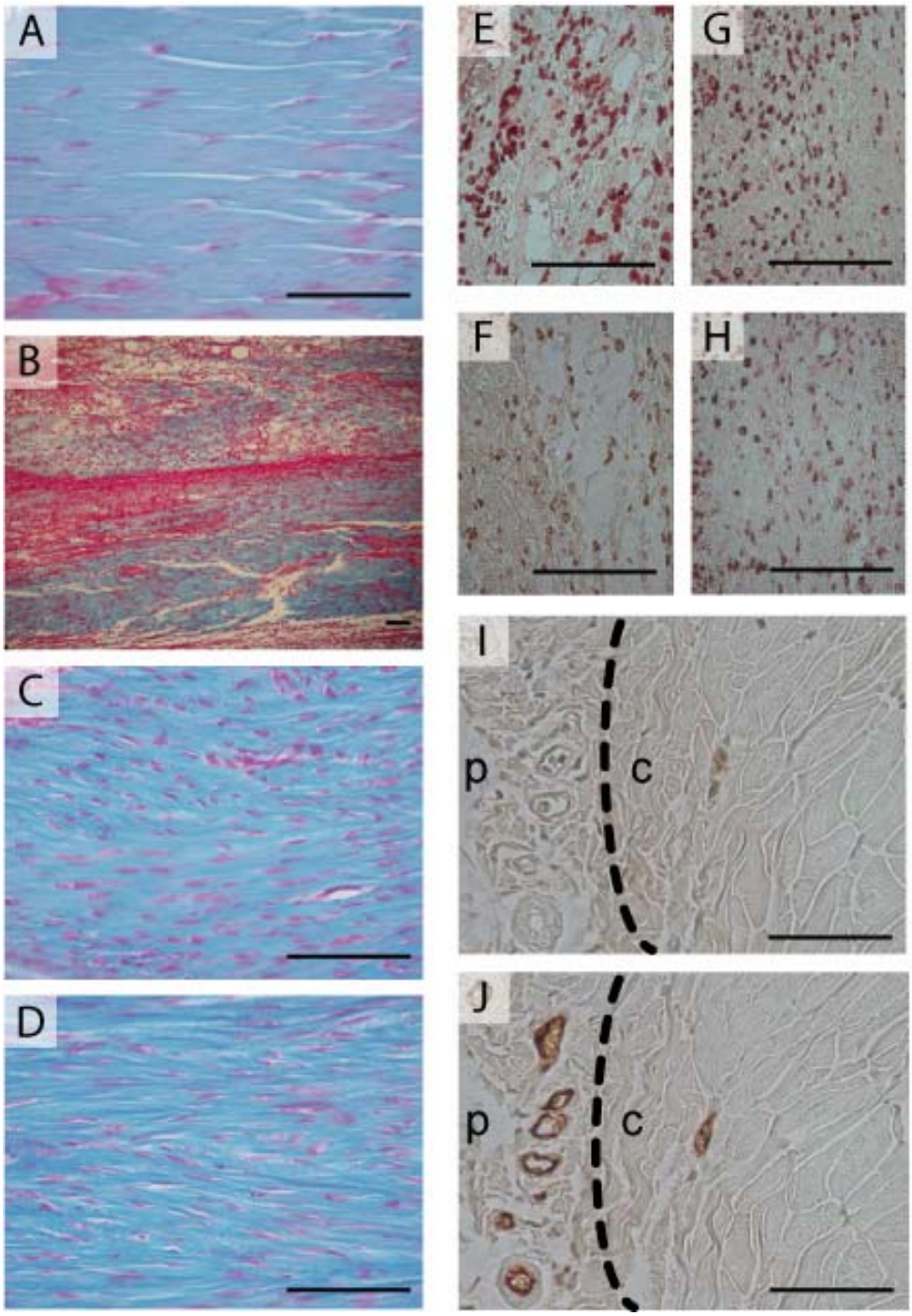
A
B
C
D
E
G
F
H
I
p
c
J
p
c

Figure 1 : Histological and immunohistochemical assessments of injured and control Achilles tendons. Masson's trichrome staining, which colors collagen blue and other proteins pink, was performed on longitudinal sections of uninjured tendon (A), placebo tendon 1 day post-collagenase injection (B), and placebo (C) and diclofenac-treated tendons (D) 28 days post-collagenase injection. Immunolabeling of PMNs was performed on peripheral sections of injured placebo (E) and diclofenac-treated (F) tendons 1 day post-trauma. Immunolabeling of $ED1^+$ MΦs on peripheral sections of injured placebo (G) and diclofenac-treated (H) tendons 1 day post-trauma showing that diclofenac reduces the number of inflammatory cells in the paratenon. PMNs and $ED1^+$ MΦs were not labeled when primary antibodies were omitted. Immunolabeling of blood vessels was performed on cross-sections of control Achilles tendons. Cross-sections of Achilles tendons labeled without (I) and with PECAM antibody (J) showing that blood vessels are highly concentrated in the paratenon (p) and widely dispersed in the core (c). The dashed line separates the paratenon from the core. Bars: 75µm.

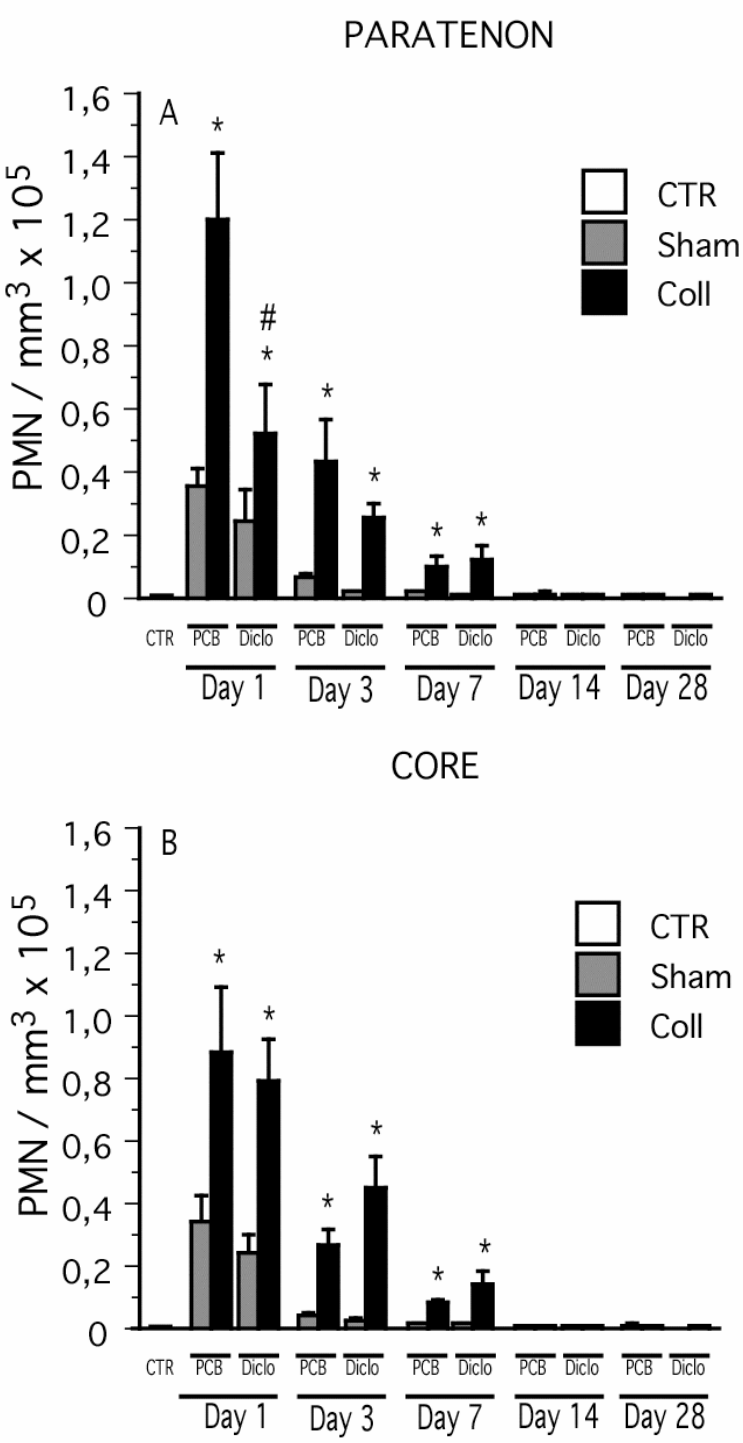

Figure 2: Concentrations of PMNs in Achilles tendons from placebo (PCB) and diclofenac-treated (Diclo) animals. PMN concentrations are shown in the paratenon (A) and core of the Achilles tendon (B). Data are means ± SEM from 5 to 6 experiments, $p < 0.05$.
* Significantly different from matched sham. # Significantly different from placebo.

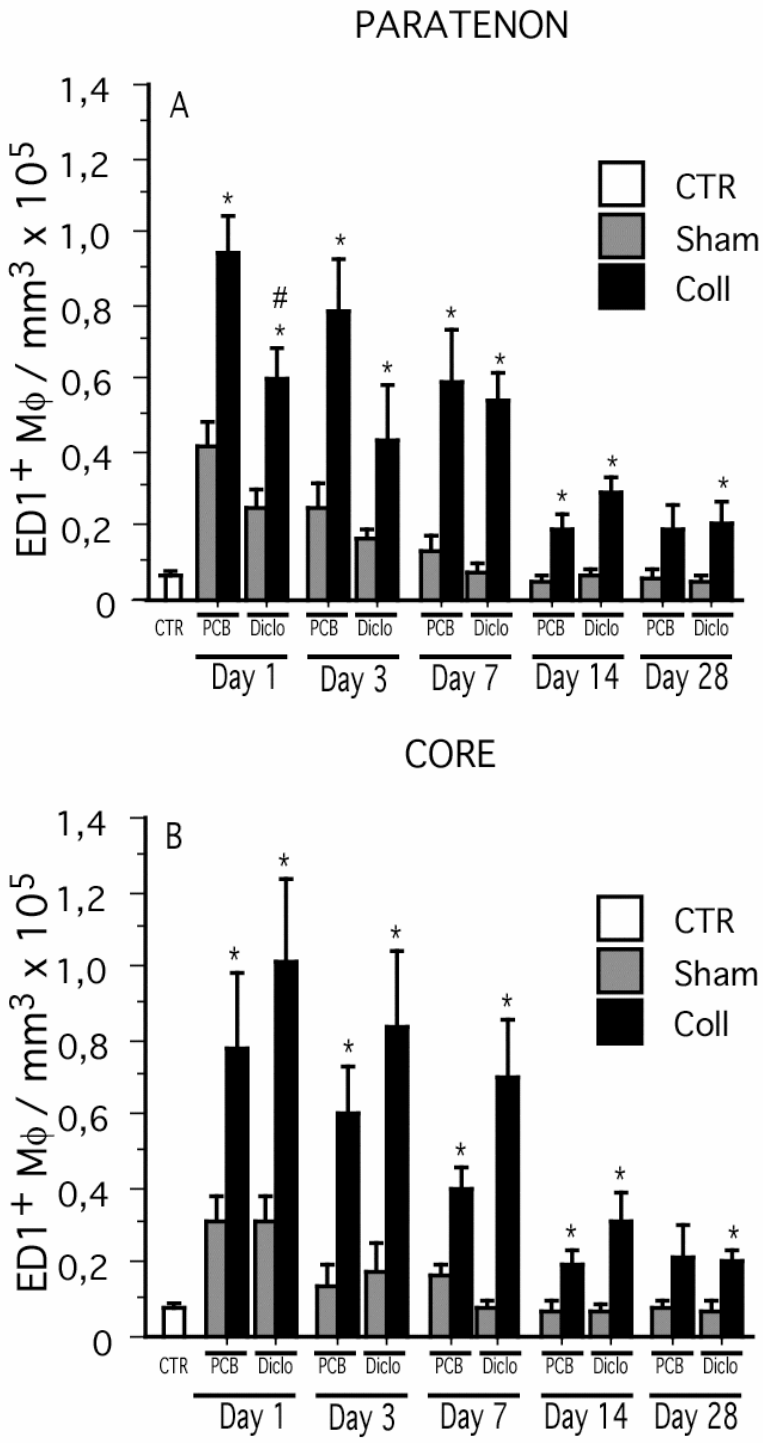

Figure 3: Concentrations of $ED1^+$ MΦs in Achilles tendons from placebo (PCB) and diclofenac-treated (Diclo) animals. $ED1^+$ MΦ concentrations are shown in the paratenon (A) and core of the Achilles tendon (B). Data are means ± SEMs from 5 to 8 experiments, $p < 0.05$. * Significantly different from matched sham. # Significantly different from placebo.

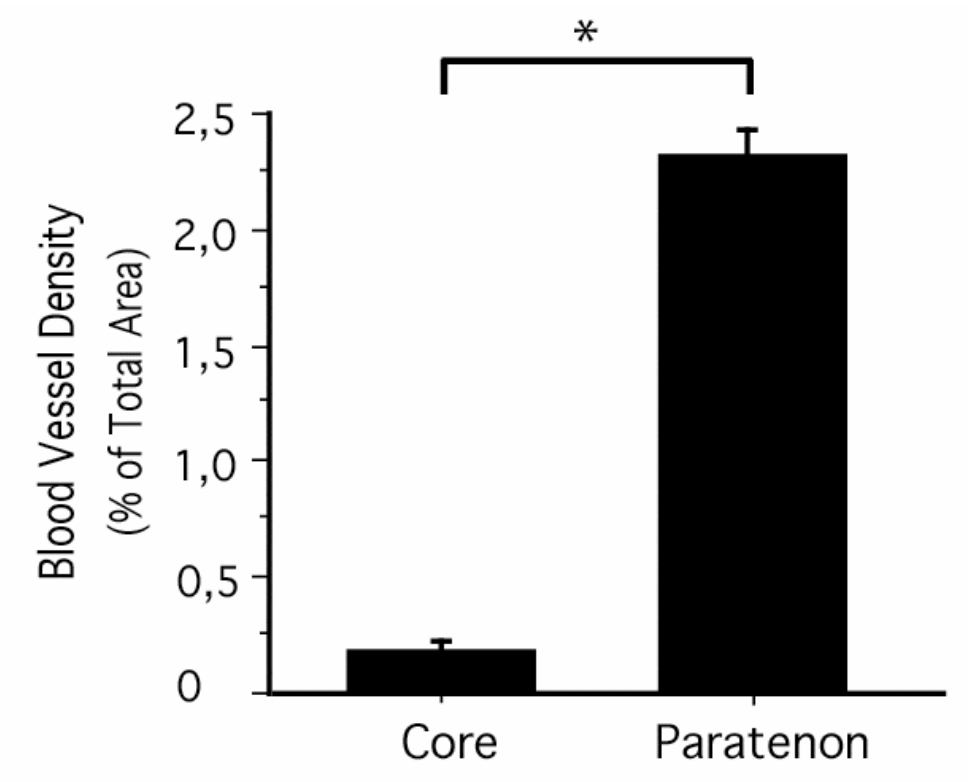

Figure 4: Quantification of blood vessel density in the core and the paratenon of control Achilles tendons. Immunolabeling was performed as described in Materials and Methods. Labeled areas are expressed as percentages of sampled areas from the paratenon and core area. Data are means ± SEMs from 6 experiments. * Significantly different, $p < 0.001$.

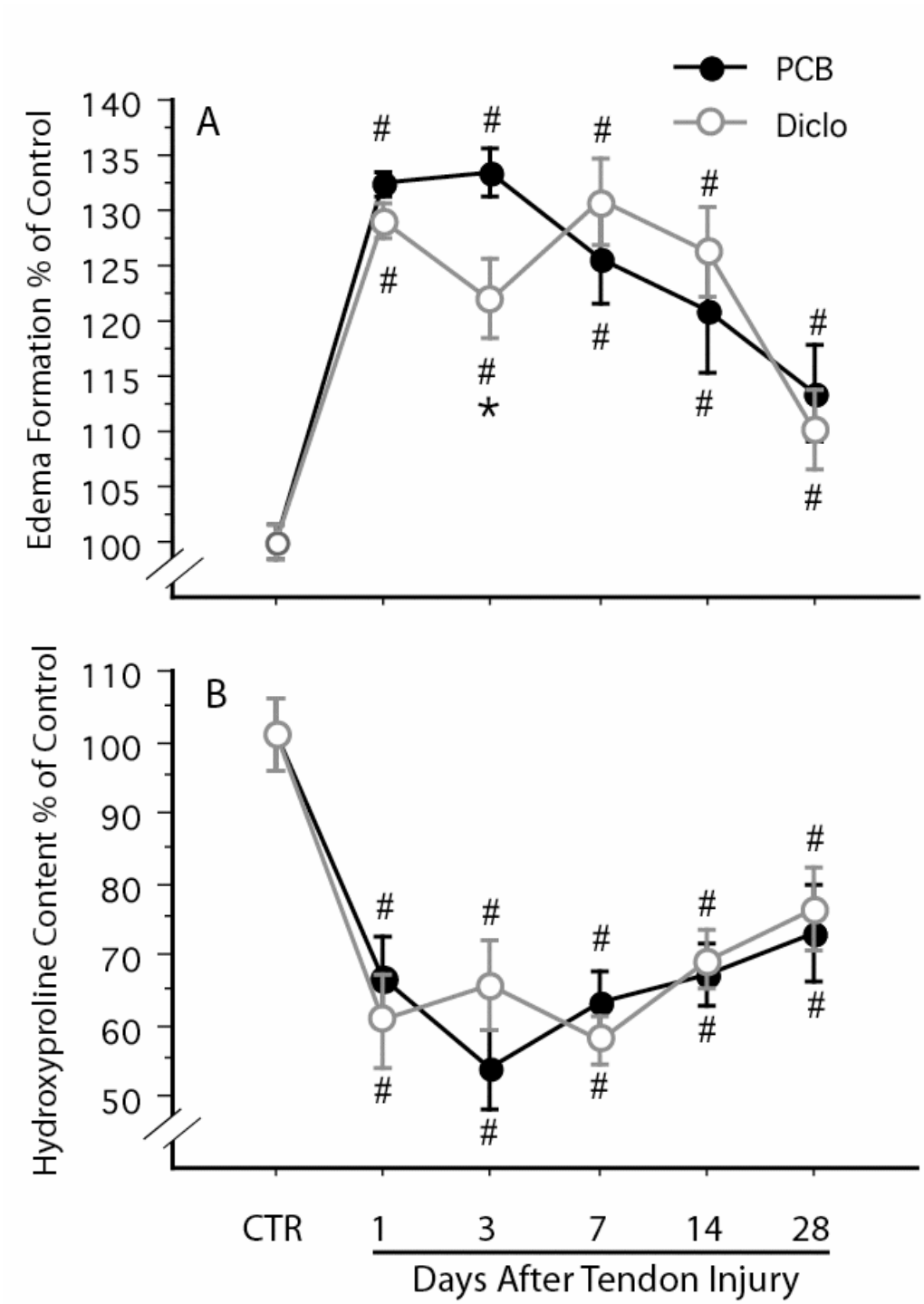

Figure 5: Hydroxyproline concentration and edema formation in injured Achilles tendons. Hydroxyproline concentrations (A) and edema formation (B) are shown in control animals and 1, 3, 7, 14 and 28 days post-collagenase injection. Values are expressed as percentages of controls. Data are means ± SEMs from 7 to 9 experiments, $p < 0.05$. * Significantly different from placebo.

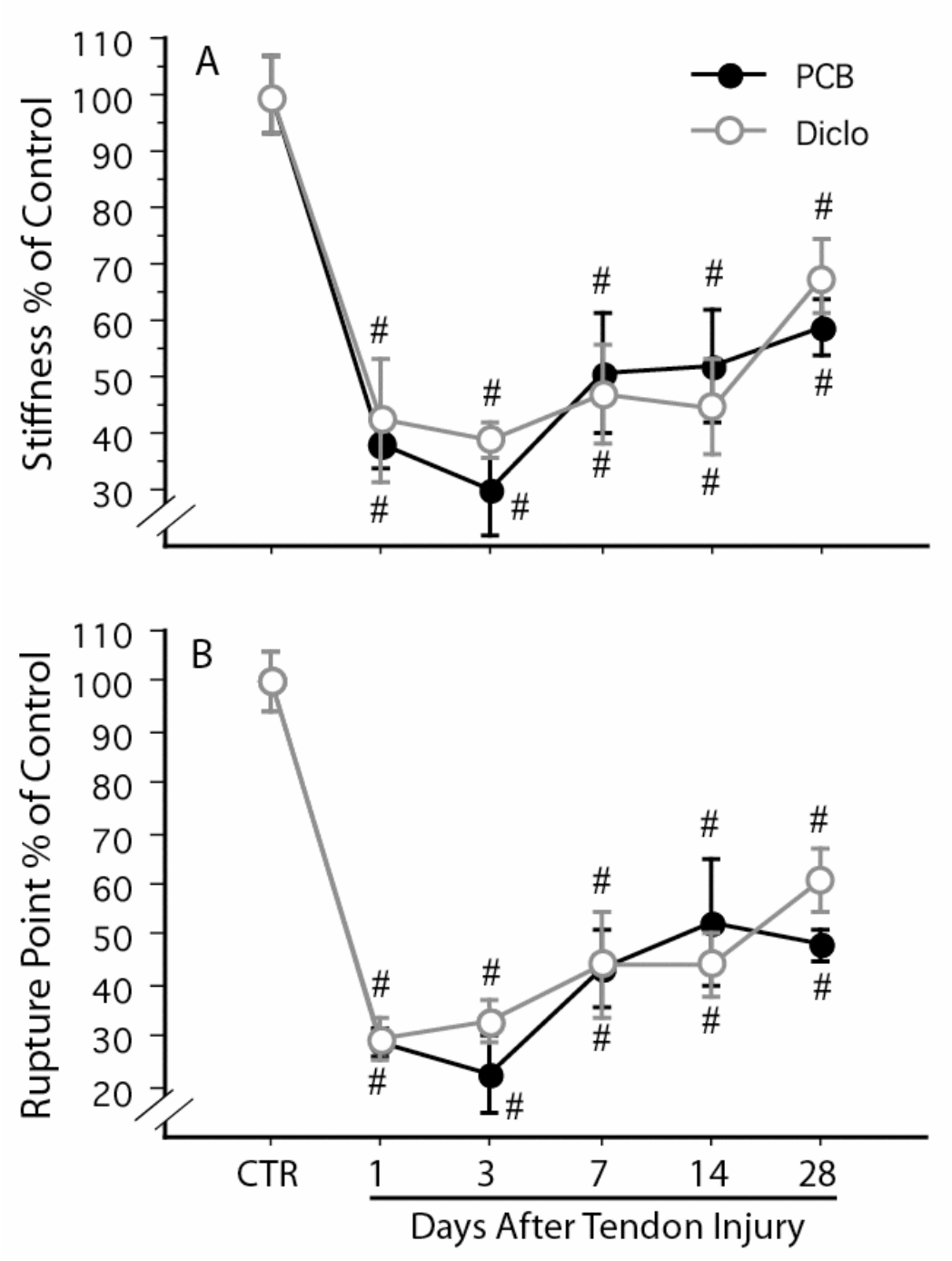

Figure 6: Mechanical properties of injured Achilles tendons. Stiffness (A) and ultimate rupture point (B) are shown in control animals and 1, 3, 7, 14 and 28 days post-collagenase injection. All points are different from control animals. Data are means ± SEMs from 5 to 8 experiments, $p < 0.05$.

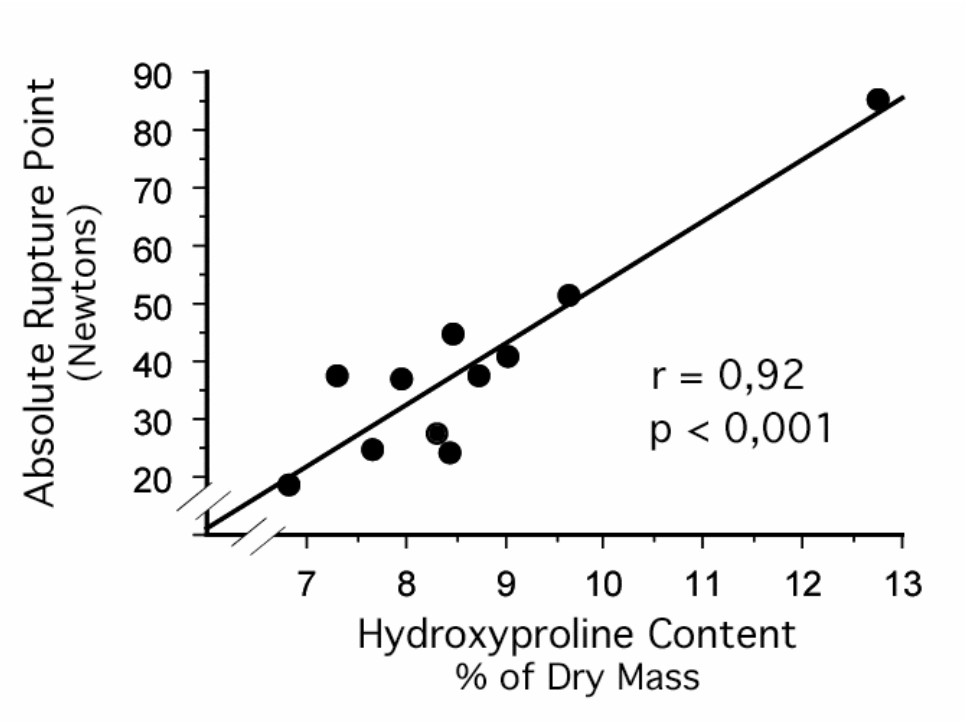

Figure 7: Relationship between hydroxyproline content and ultimate rupture points of Achilles tendons. Mean values of hydroxyproline content and ultimate rupture points for placebo and diclofenac-treated animals were analyzed using simple regression analysis. The ultimate rupture point increased linearly with hydroxyproline content, $r = 0.92$, $p < 0.001$.

3.6 References

1. Vane, J.R., Introduction: mechanism of action of NSAIDs. Br J Rheumatol, 1996. 35 Suppl 1: p. 1-3.

2. Lehmann, J.M., et al., Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. J Biol Chem, 1997. 272(6): p. 3406-10.

3. Cronstein, B.N., et al., Nonsteroidal antiinflammatory agents inhibit stimulated neutrophil adhesion to endothelium: adenosine dependent and independent mechanisms. Inflammation, 1994. 18(3): p. 323-35.

4. Kaplan, H.B., et al., Effects of non-steroidal anti-inflammatory agents on human neutrophil functions *in vitro* and *in vivo*. Biochem Pharmacol, 1984. 33(3): p. 371-8.

5. Diaz-Gonzalez, F., et al., Prevention of *in vitro* neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. J Clin Invest, 1995. 95(4): p. 1756-65.

6. Perianin, A., et al., Diclofenac sodium, a negative chemokinetic factor for neutrophil locomotion. Biochem Pharmacol, 1985. 34(19): p. 3433-8.

7. Elder, C.L., L.E. Dahners, and P.S. Weinhold, A cyclooxygenase-2 inhibitor impairs ligament healing in the rat. Am J Sports Med, 2001. 29(6): p. 801-5.

8. Lapointe, B.M., P. Frémont, and C.H. Côté, Adaptation to lengthening contractions is independent of voluntary muscle recruitment but relies on inflammation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. 282(1): p. R323-9.

9. Cowin, A.J., et al., Hepatocyte growth factor and macrophage-stimulating protein are upregulated during excisional wound repair in rats. Cell Tissue Res, 2001. 306(2): p. 239-50.

10. Li, M., et al., An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. J Immunol, 2001. 166(12): p. 7128-35.

11. Marsolais, D., C.H. Côté, and J. Frenette, Neutrophils and macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. J Orthop Res, 2001. 19(6): p. 1203-9.

12. Palmgren, M.S., et al., Mechanisms of neutrophil damage to human alveolar extracellular matrix: the role of serine and metalloproteases. J Allergy Clin Immunol, 1992. 89(4): p. 905-15.

13. Frisen, J., M. Risling, and K. Fried, Distribution and axonal relations of macrophages in a neuroma. Neuroscience, 1993. 55(4): p. 1003-13.

14. Swift, M.E., H.K. Kleinman, and L.A. DiPietro, Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. Lab Invest, 1999. 79(12): p. 1479-87.

15. Khalil, N., et al., Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. J Exp Med, 1989. 170(3): p. 727-37.

16. Beckstead, J.H., A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. J Histochem Cytochem, 1994. 42(8): p. 1127-34.

17. Wang, X.T. and R.F. Ker, Creep rupture of wallaby tail tendons. J Exp Biol, 1995. 198(3): p. 831-45.

18. Takacs, I. and F. Verzar, Macromolecular aging of collagen. II. The role of water content, solubility and swelling capacity of tendon fibers during aging and storage. Gerontologia, 1968. 14(1): p. 24-34.

19. Woessner, J.F., The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. Arch. Biochem. Biophys., 1961. 93: p. 440 -447.

20. Frenette, J., et al., Muscle impairment occurs rapidly and precedes inflammatory cell accumulation after mechanical loading. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. 282(2): p. R351-7.

21. Gelberman, R.H., et al., Healing of digital flexor tendons: importance of the interval from injury to repair. A biomechanical, biochemical, and morphological study in dogs. J Bone Joint Surg Am, 1991. 73(1): p. 66-75.

22. Cowin, A.J., et al., Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse. Dev Dyn, 1998. 212(3): p. 385-93.

23. Adolph, V.R., et al., The potential role of the lymphocyte in fetal wound healing. J Pediatr Surg, 1993. 28(10): p. 1316-20.

24. Almekinders, L.C. and J.A. Gilbert, Healing of experimental muscle strains and the effects of nonsteroidal antiinflammatory medication. Am J Sports Med, 1986. 14(4): p. 303-8.

25. Minns, R.J. and D.S. Muckle, Mechanical properties of traumatized rat tendo-achilles and the effect of an anti-inflammatory drug on the repair properties. J Biomech, 1982. 15(10): p. 783-7.

26. Thomas, J., et al., The effect of indomethacin on Achilles tendon healing in rabbits. Clin Orthop, 1991(272): p. 308-11.

27. Obremsky, W.T., et al., Biomechanical and histologic assessment of a controlled muscle strain injury treated with piroxicam. Am J Sports Med, 1994. 22(4): p. 558-61.

28. Dahners, L.E., et al., The effect of a nonsteroidal antiinflammatory drug on the healing of ligaments. Am J Sports Med, 1988. 16(6): p. 641-6.

29. Langberg, H., et al., Metabolism and inflammatory mediators in the peritendinous space measured by microdialysis during intermittent isometric exercise in humans. J Physiol, 1999. 515 (Pt 3): p. 919-27.

30. Clish, C.B., Y.P. Sun, and C.N. Serhan, Identification of dual cyclooxygenase-eicosanoid oxidoreductase inhibitors: NSAIDs that inhibit PG-LX reductase/LTB(4) dehydrogenase. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 288(4): p. 868-74.

31. Vailas, A.C., et al., Adaptation of bone and tendon to prolonged hindlimb suspension in rats. J Appl Physiol, 1988. 65(1): p. 373-6.

32. Vailas, A.C., et al., Patellar tendon matrix changes associated with aging and voluntary exercise. J Appl Physiol, 1985. 58(5): p. 1572-6.

33. Garner, W.L., et al., Identification of the collagen-producing cells in healing flexor tendons. Plast Reconstr Surg, 1989. 83(5): p. 875-9.

34. Danon, D., M.A. Kowatch, and G.S. Roth, Promotion of wound repair in old mice by local injection of macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(6): p. 2018-20.

35. Kinbara, T., et al., Transforming growth factor-beta isoforms differently stimulate proalpha2 (I) collagen gene expression during wound healing process in transgenic mice. J Cell Physiol, 2002. 190(3): p. 375-81.

36. Cordeiro, M.F., et al., TGF-beta1, -beta2, and -beta3 *in vitro*: biphasic effects on Tenon's fibroblast contraction, proliferation, and migration. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. 41(3): p. 756-63.

37. Almeida-Silveira, M.I., et al., Changes in stiffness induced by hindlimb suspension in rat Achilles tendon. Eur J Appl Physiol, 2000. 81(3): p. 252-7.

38. Zhu, Y., et al., Collaborative interactions between neutrophil elastase and metalloproteinases in extracellular matrix degradation in three- dimensional collagen gels. Respir Res, 2001. 2(5): p. 300-305.

39. Archambault, J.M., J.P. Wiley, and R.C. Bray, Exercise loading of tendons and the development of overuse injuries. A review of current literature. Sports Med, 1995. 20(2): p. 77-89.

40. Gilroy, D.W., et al., Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. Nat Med, 1999. 5(6): p. 698-701.

41. Lapointe, B.M., J. Frenette, and C.H. Côté, Lengthening contraction-induced inflammation is linked to secondary damage but devoid of neutrophil invasion. J Appl Physiol, 2002. 92(5): p. 1995-2004.

42. Futagami, A., et al., Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. Lab Invest, 2002. 82(11): p. 1503-13.

43. Savla, U., et al., Prostaglandin E(2) regulates wound closure in airway epithelium. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. 280(3): p. L421-31.

Chapitre IV:

Pifithrin-α interfère avec le processus inflammatoire et retarde la guérison suivant une blessure aiguë

Pifithrin-α Alleviates Inflammation and Delays Tendon Healing Following Acute Injury

David Marsolais, Claude H. Côté and Jérôme Frenette

CHUL Research Center
Department of Rehabilitation
Faculty of Medicine
Laval University

Running title:
Pifithrin-α and Tendon Healing

Address for correspondence:

Jérôme Frenette
Laval University Hospital Research Center
RC-9500, 2705 Blvd Laurier, Ste-Foy, Québec
Canada G1V 4G2

AJP Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, en révision, 2005.

Résumé

p53, un facteur de transcription impliqué dans plusieurs cancers, pourrait réguler l'inflammation ainsi que l'homéostasie de la matrice extracellulaire, qui sont deux processus impliqués dans la réparation tendineuse. Le but de cette étude était donc d'évaluer l'effet d'un inhibiteur de l'activité transactivationnelle de p53 sur la séquence physiopathologique suivant une blessure tendineuse induite par injection de collagénase. L'administration de pifithrin-α durant la phase inflammatoire a réduit l'accumulation des neutrophiles et des macrophages par 30 % et 50%, respectivement, 3 jours suivant l'induction de la blessure. Ces résultats sont supportés par le fait que pifithrin-α diminue l'expression de la fractalkine dans les ténoblastes soumis à un stress pro-inflammatoire *in vitro*. Pifithrin-α n'a pas réduit le pourcentage de cellules apoptotiques suivant l'injection de collagénase, mais a retardé la guérison au point de vue fonctionnel et a augmenté l'activité gélatinolytique des extraits de tendons sains par un facteur de 2,4. D'ailleurs le contenu en collagène de ces tendons était diminué comparativement aux tendons prélevés chez des rats traités avec le placebo. Globalement, nos résultats suggèrent que pifithrin-α diminue le processus inflammatoire en diminuant le recrutement des cellules inflammatoires et supportent l'hypothèse que p53 est impliquée dans la régulation de la matrice extracellulaire *in vivo*.

Summary

Transcription factor p53, which was initially associated with cancer, has now emerged as an important regulator of inflammation and extracellular matrix homeostasis, two processes that are highly relevant to tendon repair. The goal of this study was to evaluate the effect of a p53 transactivation inhibitor, namely pifithrin-α, on the pathophysiological sequence following collagenase-induced tendon injury. Administration of pifithrin-α during the inflammatory phase reduced the accumulation of neutrophils and macrophages by 30% and 50%, respectively, on day 3 post-injury. These results were supported by *in vitro* experiments where pifithrin-α diminished the expression of the chemokine fractalkine in isolated tenoblasts subjected to proinflammatory stimuli. Pifithrin-α also failed to reduce the percentage of apoptotic cells following collagenase injection, delayed functional recovery, increased gelatinolytic activity 2.4-fold, and reduced the collagen content of intact Achilles tendons. Overall, our results suggest that pifithrin-α alleviates the inflammatory process by reducing the recruitment of inflammatory cells and support the hypothesis that p53 can regulate extracellular matrix homeostasis *in vivo*.

4.1 Introduction

Tendon healing can take several years following an acute trauma (1). Prolonged alteration of tendons is associated with muscular atrophy, accumulation of intra-muscular connective tissue, formation of adherences, and a persistent reduction of functional capacity (2), which ultimately have an impact on the quality of life and health care costs (3). The socio-economic costs of tendon injuries have progressed steadily over the last twenty years, presumably as a consequence of our contemporary lifestyle (4). To date, there are few or no therapies that significantly accelerate tendon healing. A better understanding of the interplay between cells and the extracellular matrix may provide a solid foundation for developing more effective treatments for tendon injuries.

Recent advances in the fields of oncology and pathology strongly suggest that transcription factor p53, which is a powerful tumor suppressor and apoptotic promoter (5), may also be an important regulator of extracellular matrix homeostasis and inflammation. For example, *in vitro* experiments showed that p53 can reduce the expression of human matrix metalloproteases (MMP) 1 and 3, as well as type I collagen in different cell types (reviewed by Ghosh et. al. (6)). Moreover, a putative p53 binding sequence has been identified in human and rat MMP-2 promoters (7, 8). In addition to its putative regulatory activity on extracellular matrix turnover, p53 can activate inducible cyclooxygenase-2 (COX-2). A consensus region for p53 has also been identified in the promoter region of fractalkine (CX3CL1) (9), a chemotactic chemokine for macrophage (10) and, to a lesser extent, neutrophils (11). *In vivo* experiments indicate that the administration of pifithrin-α (PFT), a chemical inhibitor of p53 transactivation, reduces leukocyte accumulation and adherence on the endothelium following an acute trauma (12). PFT also reduces the rate of cell death in skin wound and endotoxic shock models (13). However, these results have never been duplicated and the mechanisms by which PFT reduces the accumulation of inflammatory cells at the site of injury remain obscure (14, 15).

A plethora of molecules can modulate inflammatory reactions, including those induced by COX-2-derived prostaglandins and chemokines that are involved in endothelium activation as well as in the recruitment of neutrophils and macrophages to the site of the injury (11,

16-18). These subsets of leukocytes may produce reactive oxygen and nitrogen species and induce cell death, presumably by necrosis and apoptosis (19). In addition, inflammatory cells release a variety of MMPs that are thought to damage the extracellular matrix (20). Following this catabolic phase, macrophages phagocyte apoptotic neutrophils and release different growth factors such as transforming growth factor, basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, and MMPs that are essential for later initiation of tissue healing and remodeling (21, 22). Because of the putative effect of p53 on extracellular matrix homeostasis, inflammation, and cell death, we postulated that it plays a central role in the repair process that follows an acute tendon trauma.

In this study, we used *in vitro* and *in vivo* models to gain a better understanding of the role of p53 in tendon homeostasis and repair. The first objective was to evaluate *in vivo* the effect of PFT during the inflammatory phase following a collagenase-induced injury. The second objective was to pinpoint how PFT can influence primary cultures of tenoblasts at the cellular level. We hypothesized that the administration of PFT during the inflammatory phase would 1- reduce the accumulation of inflammatory cells, 2- inhibit caspase-3-dependent apoptosis, and 3- ultimately accelerate tendon healing. We report here that the administration of PFT during the inflammatory phase reduced the accumulation of leukocytes following collagenase-induced injury. Unexpectedly, it also lowered hydroxyproline content and delayed the onset of healing in rat Achilles tendons.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Tendon Injury

The animals were cared for and handled as per Canadian Council of Animal Protection guidelines. Female Wistar rats (Charles River) weighing 180-200 g were used for these experiments. Upon arrival, the rats underwent a five-day acclimatization period and were paired in standard 20 by 40 cm cages. They were allowed normal cage activity and provided with chow and water ad libitum. Surgical procedures for the induction of tendon injury were conducted as previously described (23). Briefly, anesthesia was performed with an intraperitoneal injection of ketamine-xylazine (87.5 and 12.5 mg/kg, respectively), after which 5 ml of lactated Ringer's was injected subcutaneously to prevent dehydration. The

rats were injected with 30 µl of crude collagenase (Sigma) in both Achilles tendons at a concentration of 10 mg/ml in sterile phosphate buffered saline (PBS). They were sacrificed at various time points by cervical dislocation under anesthesia for mechanical testing or by CO2 inhalation for histological analyses.

4.2.2 Drug Administration

To inhibit p53 transactivation during the inflammatory phase, 2.2 mg/kg of PFT (Alexis Biochemicals) was injected intraperitoneally at 24 h intervals for five days starting 25 h before the induction of acute tendon injury. The placebo group received identical volumes of the vehicle, that is, 1 µl per gram of bodyweight of an aqueous solution containing 0.9% sodium chloride and 4.4% dimethyl sulfoxide (DMSO). This dose of PFT exerts protective and anti-inflammatory effects in various models (12, 13).

4.2.3 Histology

After the rats were sacrificed, their hindlimbs were immediately removed, immobilized in a dorsiflexion position, and submerged in a zinc-based fixing solution for up to 48 h (24). Thereafter, the tendons were isolated, submitted to routine histological processing, and embedded in paraffin (23). Two random longitudinal sections were cut and immunolabeled for neutrophils (anti-neutrophil, Accurate Chemical) and macrophages (anti-CD68, Serotec Inc.). To evaluate the density of the neutrophils and macrophages, the cells were counted and expressed as a function of the volume of tissue examined, as previously described. (23-25)

4.2.4 Mechanical Testing

To measure functional properties, the Achilles tendons were excised with the calcaneus and the inferior portion of the triceps surae. The muscle tissue was gently removed from the aponeurosis and the tendons were installed on a MTS 858 Mini Bionix II device (MTS Systems Corporation) consisting of a hydraulic-driven linear voltage differential transformer connected to a 0.5 kN load cell (24), The initial length (l0) was manually set at a tensional force of 1 to 2 N. Tension-elongation curves were performed using a strain rate of 10% of l0 per second until tendon failure. Tension and elongation were monitored at a

frequency of 10 Hz and curves were plotted using Excel software (Microsoft Corporation). Specimens were discarded if slippage or absence of a clear rupture point were observed, which explains the variation in the number of animals in each group.

4.2.5 Hydroxyproline Determination

The Achilles tendons were dehydrated for 24 h at 60°C to determine their dry mass (26). They were then hydrolyzed in 6 N HCl at 130°C for 3 h, neutralized with NaOH, and diluted in water. The concentration of hydroxyproline in the tendon samples was determined as previously described (24, 27).

4.2.6 Western Blots

In another set of experiments, the tendons were excised between the osteotendinous and musculotendinous junctions, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80°C until they were homogenized. The tendons were transversally minced with a sharp blade and homogenized in lysis buffer using a Polytron apparatus (Kinematica). The homogenates were incubated for 30 min and centrifuged for the same period of time at 16,000 x g(28). All the procedures were conducted on ice or at 4°C. The protein concentrations in the supernatants were determined using the BCA protein assay (Pierce) to ensure equal gel loading. Ten µg of protein was subjected to 12% SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride membranes, and labeled overnight at 4°C with a rabbit anti-human/mouse activated caspase-3 (0.2 µg/ml) (R&D Systems Inc.). After incubating the membranes with the primary antibody, they were incubated with horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences) and revealed with the Western Lightning™ (Perkin-Elmer) chemiluminescent substrate. The films were scanned and the optical densities of the bands were quantified using MetaMorph software (Universal Imaging Corporation) and were expressed relative to a same reference sample loaded on each gel.

4.2.7 Gelatin Zymography

Proteins were extracted using the same protocol as for Western blots, although tendons were homogenized in non reducing sample buffer containing 10% glycerol, 2% SDS and

0.5M Tris pH 6.5. Gelatin zymography was performed by submitting equal amount of proteins to a SDS-PAGE in 9% polyacrylamide gel containing 1 mg/ml gelatin. After migration, gels were washed in 2.5% Triton X-100 to remove SDS and allow renaturation of proteins. Gels were then washed 3 times with digestion buffer consisting in 50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM CaCl, 1 mM ZnCl and incubated for at least 4 hours at 37°C. Gels were stained in 0.25% Coomassie Brilliant Blue R250 (BioRad) and destained in Coomassie blue solvant. Lysis bands were quantified using MetaMorph software (29).

4.2.8 *In vitro* Assays

Tendon cells (tenoblasts) were enzymatically isolated from female Wistar rat Achilles tendons as previously described (30) and were proliferated for 2-3 passages in Dulbecco's modified eagle medium (Gibco), 10% fetal bovine serum (Wisent Inc.), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Gibco). The cultures were digested in trypsin, frozen in culture medium containing 10% cell culture-grade DMSO, and stored in liquid nitrogen until used.

Tenoblasts in culture were allowed to reach confluence in DMEM containing 10% FBS to assess the impact of PFT on the level of fractalkine. On the day of the experiment, PFT was diluted in DMSO to a final concentration of 20 µM. Vehicle-treated cells were administered an equal amount of DMSO, that is, 1 µl per 10 ml. For the fractalkine experiments, the PFT was added 15 min prior to the addition of the proinflammatory stimulus (1µg/ml of lipopolysaccharide (LPS) (Sigma)). Six hours following the addition of the PFT, the cells were washed in cold PBS and lysed in Trizol (Invitrogen). The cell lysates were stored at –20°C for subsequent RNA isolation.

4.2.9 RNA Isolation and Semiquantitative RT-PCR

RNA was isolated from the tenoblasts using the Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). DNAse (Ambion) was added to degrade contaminating DNA and clean the RNA prior to RT-PCR. DNA-free RNA was isolated by adding phenol-chloroform-isoamyl alcohol (Sigma). A cDNA library was created using an Omniscript RT Kit (Qiagen) with 1 µM oligo(dT) and 1µg of RNA template. The cDNA

template was then used for PCR amplification of various genes using the following conditions. For each experiment, equal concentrations of template were added to 200 μM DNTPs, 300 μM forward and reverse primers, 1 unit of Taq polymerase (New England Biolabs), and 100 μM DMSO in a reaction volume of 50 μl. The reaction was performed using a PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research Inc.). The templates were submitted to an initial 2 min denaturation step at 94°C. Thereafter, 30 amplification cycles were performed under the following conditions: denaturation (15 s at 94°C), annealing (30 s at 60°C), and elongation (45 s at 72°C). A single final elongation was done for 10 min at 72°C. The PCR products were separated by electrophoresis on 1.2% agarose gels prestained with ethidium bromide, captured under UV illumination, and quantified using MetaMorph software. All the genes were expressed relative to the housekeeping gene GAPDH (see Table I for the list of primers). PCR was performed on non-retro transcribed RNA to ensure the absence of contaminating DNA.

4.2.10 Statistical Analysis

For *in vivo* experiments, all the data for the concentrations of neutrophils and macrophages were assessed by two-way ANOVA. Fischer's protected least square difference test was used to compare means when a significant F ratio was obtained. Unpaired Student's t-tests were performed for all *in vitro* experiments. A p value below 0.05 was considered to be significant unless otherwise specified. All data are presented as means ± standard error.

4.3 Results

4.3.1 Inflammatory Cell Accumulation

Injection of collagenase into the Achilles tendon induced a significant accumulation of neutrophils and macrophages that peaked on day 3 and decreased thereafter (Figure 1). The neutrophil and macrophage densities returned to control values by days 14 and 28, respectively. Relative to the placebo, PFT diminished the accumulation of both neutrophils and macrophages by 35% and 50%, respectively, on day 3. The concentrations of both subsets of inflammatory cells in the PFT and placebo groups were identical starting from day 7 until the end of the time course. The administration of five doses of PFT to

ambulatory control animals did not affect baseline levels of neutrophils and macrophages compared to the placebo. To get a further insight into the anti-inflammatory mechanisms of PFT, we tested the possibility that PFT might interfere with the mRNA expression of fractalkine in isolated tenoblasts, which do not express fractalkine under basal conditions. The expression of fractalkine in tenoblasts stimulated with LPS was significantly reduced by PFT compared to vehicle-treated tenoblasts (Figure 2). The administration of PFT thus led to a transient anti-inflammatory effect that may be partially attributable to the down-regulation of fractalkine mRNA expression.

4.3.2 Influence of Pifithrin-α on Apoptosis

To determine whether the administration of PFT influences apoptotic cell death, we compared the levels of activated caspase-3 in placebo- and PFT-treated animals at days 3 and 5 following tendon injury. We used these time points because 1- apoptosis is known to peak when the accumulation of inflammatory cells begins to decline and 2- we also intended to evaluate apoptosis shortly after the end of PFT treatment. The PFT treatment did not influence the amount of activated caspase-3 detected by Western blot in control and injured tendons (Figure 3). We confirmed these results using an immunohistochemical approach where the number of activated caspase-3 positive cells was expressed as a percentage of total nuclei (Figure 4). Together, these observations clearly indicated that PFT does not modulate caspase-3-dependent apoptosis 3 and 5 days following the injection of collagenase.

4.3.3 Influence of Pifithrin-α on Healing

While PFT did not significantly attenuate the functional deficit during the inflammatory phase assessed through the measurement of load to failure (Figure 5), the administration of this compound delayed the onset of the healing phase. Collagenase injection induced a significant and maximal functional deficit of 50% at day 3 compared to ambulatory control animals. Interestingly, maximal functional loss was delayed and occurred around day 7 in PFT-treated animals. Moreover, the placebo group returned to control values 14 days earlier than PFT group. These results strongly suggest that there was a delay in the onset of the recovery phase. In fact, PFT significantly reduced the amount of hydroxyproline, a

marker of collagen content, in both injured and intact tendons (Figure 6A). These results are also supported by the increased gelatinolytic activity of tendons excised from control animals treated with PFT for 5 days compared to the placebo (Figure 6B).

4.4 Discussion

p53 is involved in various acute pathological conditions such as skin wounds (12), burns (31), cerebral ischemia (32), and hepatic (13) and renal injuries (33). This protein, also called guardian of the genome (34), mediates many cellular events following acute injuries such as inflammatory cell accumulation (12, 13), transcription-dependent and -independent cell death (35), proliferation (36, 37), and angiogenesis (38). A growing body of evidence also supports the idea that p53 might play key roles in extracellular matrix homeostasis. For example, the modulation of p53 *in vitro* influences the expression of collagen (6) and various MMPs (39-41). Our findings suggest that p53 has a central role in the regulation of tendon extracellular matrix homeostasis and the recruitment of inflammatory cells following an acute trauma. We clearly show that the inhibition of p53 transactivation reduced the accumulation of neutrophils and macrophages and delayed the onset of healing in collagenase-induced tendon damage.

4.4.1 Pifithrin-α Reduces Inflammatory Cell Accumulation

The present findings show that the accumulation of neutrophils and macrophages triggered by the injection of collagenase was reduced in presence of PFT. These results are in agreement with the work of Schafer et al. (13) who observed, in a model of hepatotoxicity induced by endotoxemia, that leukocyte transmigration into liver sinusoids is diminished following the administration of PFT. They hypothesized that blockage of p53-dependent cell death alleviates tissue injury thereby limiting inflammatory cell recruitment. Because PFT had no significant effect on the amount of activated caspase-3-positive cells in our study, we tested the possibility that another mechanism, independent of cell death, inhibits inflammatory cell invasion following PFT treatment. Our results clearly show that the chemotactic molecule, fractalkine, which possesses a p53 DNA-binding consensus sequence, was downregulated by PFT in cultured tenoblasts exposed to LPS. In addition, the pleiotrophic action of PFT can also abolish the induction of intercellular adhesion

molecule 1 (ICAM-1), a crucial receptor for leukocyte adhesion and diapedesis. A similar reduction of ICAM-1 expression has also been obtained in p53-deficient cell lines (42). Our results, combined with others, indicate that PFT may inhibit inflammatory cell recruitment by interfering directly with chemotactic or adhesion molecules at the site of injury.

4.4.2 Pifithrin-α Delays Tendon Recovery

We hypothesized that the attenuation of the inflammatory process by PFT during the inflammatory phase accelerates tendon healing by reducing the rate of apoptosis and non-specific damage to the extracellular matrix. Surprisingly, PFT did not accelerate healing and even delayed the onset of tendon repair. These results were, however, consistent with our observation that p53 transactivation inhibition did not result in a reduction in caspase-3-dependent apoptosis, suggesting that genomic damage may play a minor role in cell death in this model of collagenase-induced tendon injury. Another possibility is that the mechanisms by which p53 induces apoptosis do not require gene transactivation. These two possibilities are supported by a number of observations. Cells at the site of an injury produce endogenous anti-oxidant enzymes (43) that prevent reactive species from causing DNA damage (44) and apoptosis (45). Furthermore, p53 can directly interact with the mitochondria to induce apoptosis by the release of cytochrome C, a pathway that is independent of gene transactivation (46, 47). The delay in healing was also consistent with the increase in gelatinolytic activity and the reduction in the amount of hydroxyproline in the tendon extracts. Similarly, overexpression of p53 results in a major reduction in the production of proMMP-13 (collagenase-3) (41) and MMP-1 (collagenase-1) (48). While the expression levels of type I and III collagen mRNA *in vitro* (data not shown) were not modified, it is possible that PFT may also interfere with collagen synthesis at the post-transcriptional level. For example, the inhibition of p53 by PFT can suppress the expression of heat shock proteins (HSP) that serve as either molecular chaperones or proteases (49). HSP-47 is one member of the HSP family that may be essential for promoting procollagen formation and preventing aggregation in the endoplasmic reticulum and Golgi compartment. In addition to its effect on extracellular matrix homeostasis, PFT diminished the concentrations of neutrophils and macrophages in injured tendon. Neutrophils and macrophages are thought to play both deleterious and beneficial roles in tissue healing.

They can either exacerbate tissue injury by releasing proteases and reactive oxygen and nitrogen species (50-52) or promote tissue repair by phagocytosing cellular debris and releasing essential cytokines for tissue healing (22, 53-55). Recent reports also indicate that macrophage depletion during the injury phase results in an extensive loss of matrix components in the liver. However, the depletion of macrophages during the recovery phase attenuates matrix degradation (56). The dual role of macrophages is further supported by our findings where a reduction in neutrophil and macrophage concentrations in PFT-treated animals appeared to delay both the maximal functional loss and the recovery period. The inhibition of the inflammatory processes during the catabolic phase may diminish the phagocytosis of cellular and matrix debris rather than reducing non-specific damage to the intact extracellular matrix. The perturbation of the phagocytic process would thus limit the synthesis of key molecules normally released by macrophages following the engulfment of apoptotic neutrophils, eventually promoting the resolution of the inflammation, the initiation of healing, and the synthesis of collagen (22, 54, 57, 58).

The regulation of tendon pathophysiology is still poorly understood and no therapeutic strategy has yet proven to be really effective in accelerating tendon healing. Our results are the first to identify p53 as a regulator of tendon extracellular matrix homeostasis and inflammatory responses following an acute trauma. (Figure 7) We show that p53 alleviates inflammatory cell accumulation through a mechanism that may rely on the inhibition of fractalkine expression. Our findings also indicate that the inhibition of p53 transactivation increases collagen degradation and delayes tendon healing. These results should improve our understanding of the regulation of tendon healing and may help delineate future therapeutic strategies to optimize recovery following acute tendon trauma.

4.5 Acknowledgements

We would like to thank Élise Duchesne, Patrice Bouchard, Marie-Hélène Tremblay, and Andrée-Anne Dussault for their expertise and technical assistance.

4.6 Sources of Support

This work was supported by the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Canadian Foundation for Innovation (CFI), and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

4.7 Figures, Legends and Tables

Table I: List of primers used for the PCR

Gene	Sequence I.D.	Position on Sequence	Primers
GAPDH	AB017801	249-427	5'-aaacccatcaccatcttcca-3' 5'-gtggttcacacccatcacaa-3'
CX3CL1	NM_134455	402-581	5'-aagcctgagtcagccacagt-3' 5'-tagagacagcagccacctca-3'
COL1α1 (data not shown)	Z78279	3917-4099	5'-accccaaggagaaaaagcat-3' 5'-aggttgccagtctgttggtc-3'
COL3α1 (data not shown)	AJ005395	741-937	5'-ctcctgggaaagatggatca-3' 5'-gccagacttttcacctccaa-3'

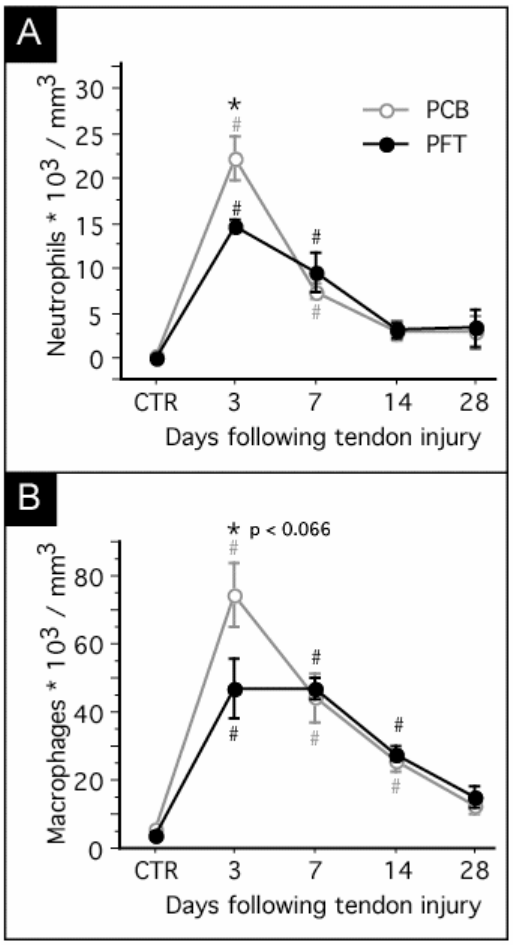

Figure 1: Pifithrin-α reduced the accumulation of inflammatory cells following collagenase-induced tendon injury. Neutrophil (A) and macrophage (B) concentrations were quantified in ambulatory control animals (CTR) that received five doses of placebo (PCB) (gray stroke, open dots) or PFT (black stroke, filled dots). Tendons were also examined 3, 7, 14, and 28 days after the collagenase injection. Means of five to seven animals ± standard error of the mean (SEM). # Significantly different from the ambulatory control. * Significantly different from the placebo. $p<0.05$ unless otherwise stated.

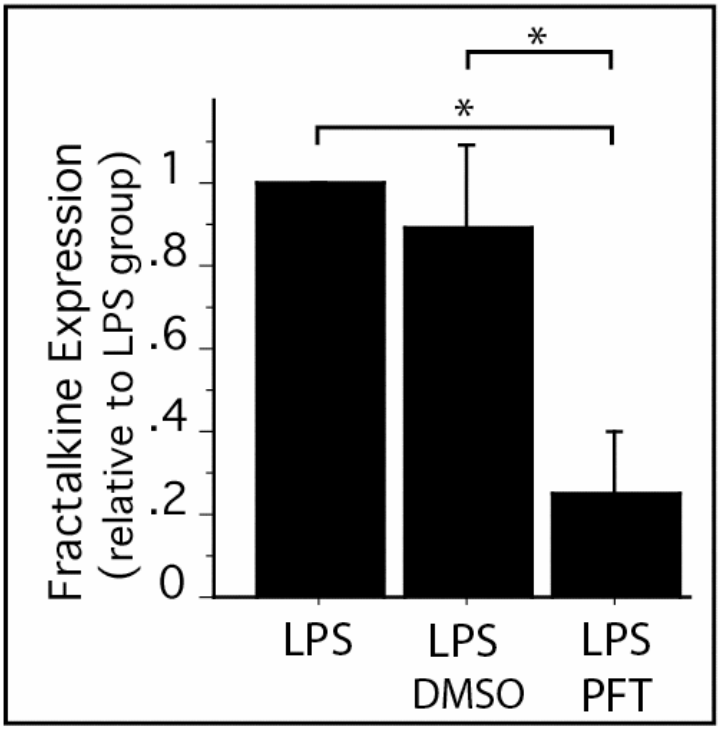

Figure 2: Pifithrin-α reduced fractalkine expression *in vitro*. Fractalkine expression was not detectable when tenocytes/tenoblasts were not stimulated (basal) or when vehicle was added to unstimulated tenocytes/tenoblasts (DMSO). Adding 1 μg/ml of LPS induced a significant expression of fractalkine (LPS) that was not greatly affected by the addition of the vehicle (LPS-DMSO). When 20μM PFT was added (LPS-PFT), fractalkine expression was significantly reduced compared to the LPS and LPS-DMSO groups. Means from three different samples in duplicate ± SEM. *Significantly different. $p<0.05$.

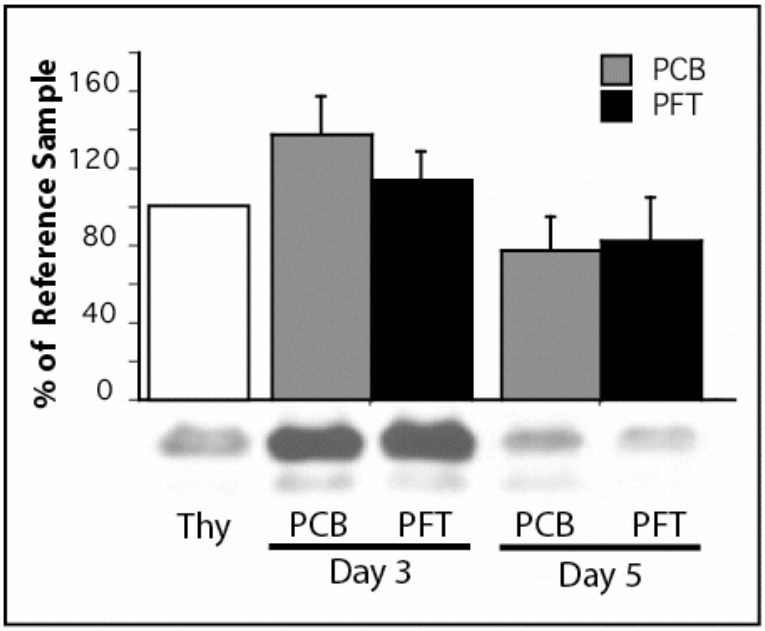

Figure 3: The level of activated caspase-3 was not influenced by pifithrin-α. The pifithrin-α was administered and the collagenase was injected as described in the Material and Methods section. The representative immunoblot and subsequent quantification show that the levels of activated caspase-3 did not differ significantly between the placebo (gray lanes) and the PFT-treated (black lanes) animals on days 3 and 5 the following collagenase injection. The same reference sample (thymus, Thy) was loaded on each gel. Means of five to six animals ± SEM. Immunoblots were performed in duplicate. *Significantly different. $p<0.05$.

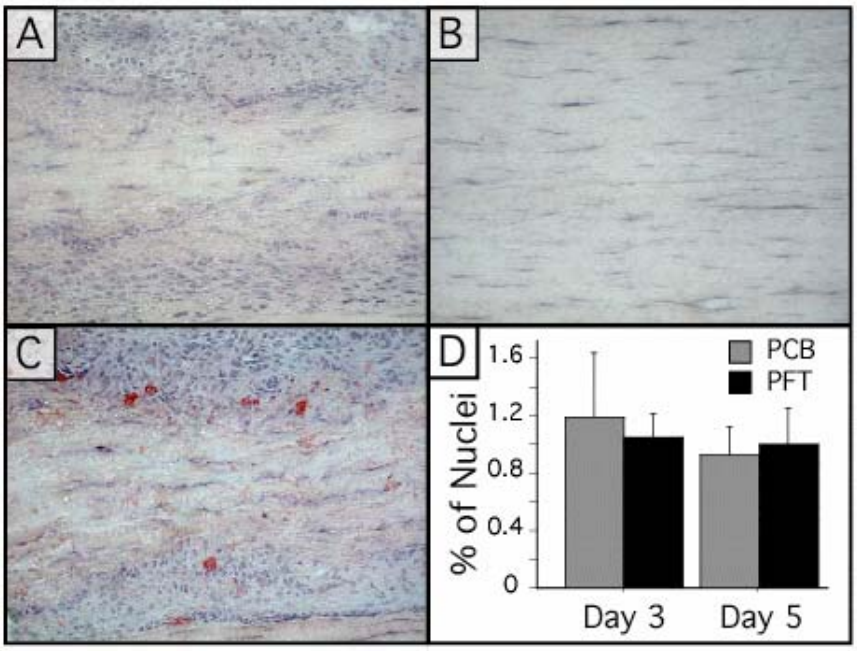

Figure 4: The percentage of activated caspase-3-positive cells was not affected by pifithrin-α following acute tendon injury. Tendons were immunolabeled with anti-activated caspase-3 following collagenase injection. The omission of the primary antibody produced no labeling (A). No positive cells were detected in tendons harvested from ambulatory control animals (B). However, several activated caspase-3-positive cells were detected three days after the collagenase injection (C). The percentage of positive cells was not affected by the administration of PFT (black bars) compared to the placebo (gray bars) (D). Means of five to six animals ± SEM. $p<0.05$.

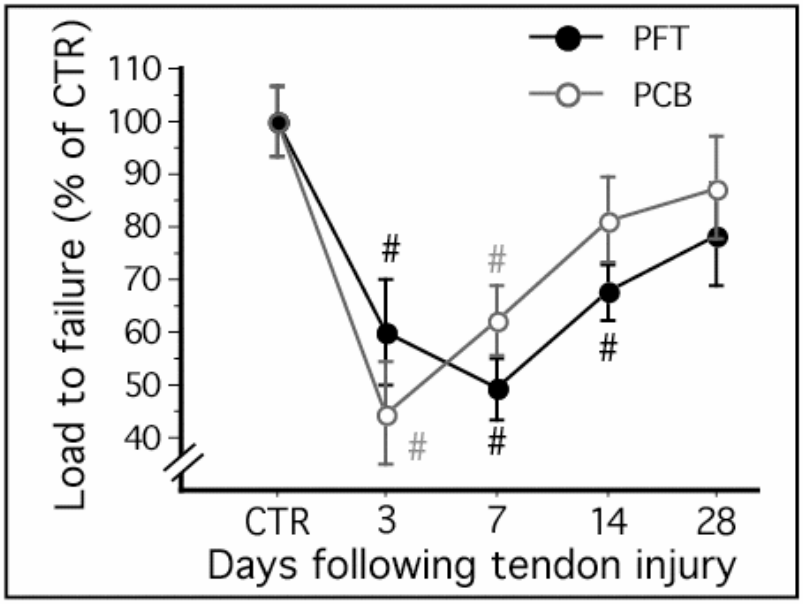

Figure 5: Pifithrin-α delayed the onset of tendon healing. Load to failure was evaluated in ambulatory control animals (CTR) (n = 4) that received five doses of placebo (gray stroke, open dots) or PFT (black stroke, filled dots). Mechanical properties were evaluated 3, 7, 14, and 28 days after the collagenase injection. Means of 8 to 14 animals ± SEM. # Significantly different from the ambulatory control. $p < 0.05$.

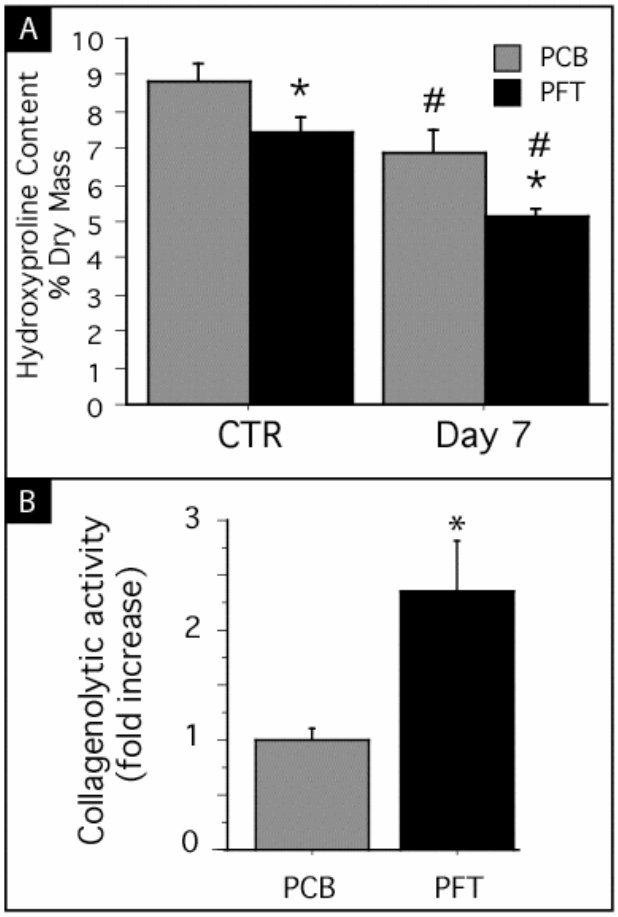

Figure 6: Pifithrin-α reduced the amount of hydroxyproline and increased the endogenous gelatinolytic activity of rat Achilles tendons. Hydroxyproline content was evaluated and normalized for dry mass in tendons harvested from ambulatory control animals (CTR) on day 7 days after the collagenase injection. The rats were treated with five doses of placebo (gray bars) or PFT (black bars) as described in Material and Methods. Means of five to six animals ± SEM. # Significantly different from the ambulatory control. * Significantly different from the placebo. $p<0.05$. (A) Tendons from ambulatory control animals were harvested following the administration of five doses of placebo (gray bars) of PFT (black bars) as described in Material and Methods. Means of five to six animals ± SEM. * Significantly different from the placebo. $p<0.05$. (B)

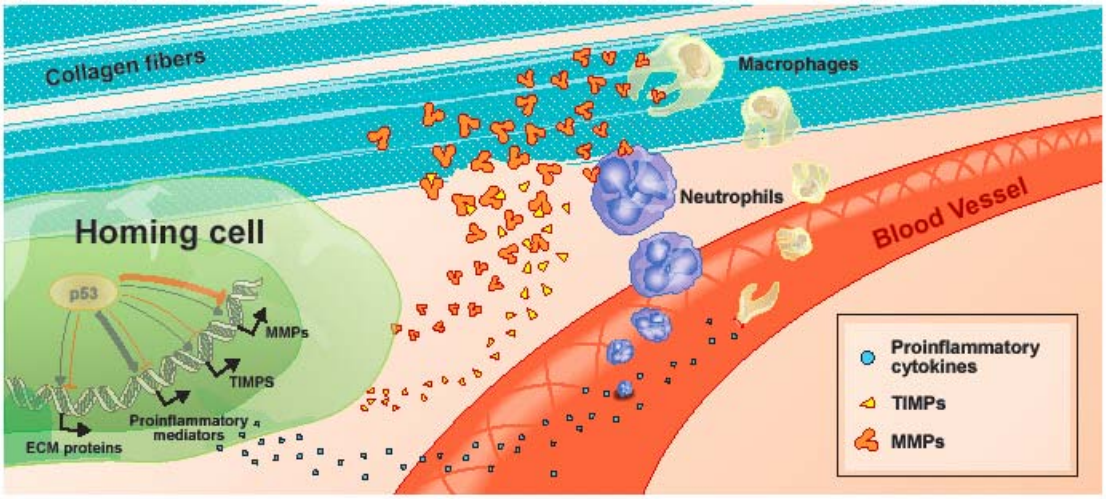

Figure 7: p53 plays a central role in the pathophysiological sequence following tendon injury. ECM homeostasis is regulated by different mechanisms. Inflammatory cells and homing cells release different MMPs and TIMPs whose interactions inhibit MMP activity. p53 modulates many groups of genes before and after tendon injury, including those encoding ECM proteins, MMPs, TIMPs, and proinflammatory molecules. Our results suggest that (bold linkers) p53 promotes the expression of proinflammatory mediators and modulates the equilibrium between MMPs and TIMPs *in vivo*, resulting in tendon collagen degradation.

4.8 References

1. Woo, S.L., et al., Tissue engineering of ligament and tendon healing. Clin Orthop, 1999(367 Suppl): p. S312-23.

2. Jamali, A.A., et al., Skeletal muscle response to tenotomy. Muscle Nerve, 2000. 23(6): p. 851-62.

3. Coyte, P.C., et al., The economic cost of musculoskeletal disorders in Canada. Arthritis Care Res, 1998. 11(5): p. 315-25.

4. Houshian, S., T. Tscherning, and P. Riegels-Nielsen, The epidemiology of Achilles tendon rupture in a Danish county. Injury, 1998. 29(9): p. 651-4.

5. Vousden, K.H. and X. Lu, Live or let die: the cell's response to p53. Nat Rev Cancer, 2002. 2(8): p. 594-604.

6. Ghosh, A.K., S. Bhattacharyya, and J. Varga, The tumor suppressor p53 abrogates Smad-dependent collagen gene induction in mesenchymal cells. J Biol Chem, 2004. 279(46): p. 47455-63.

7. Mertens, P.R., et al., Combinatorial interactions of p53, activating protein-2, and YB-1 with a single enhancer element regulate gelatinase A expression in neoplastic cells. J Biol Chem, 2002. 277(28): p. 24875-82.

8. Bian, J. and Y. Sun, Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. Mol Cell Biol, 1997. 17(11): p. 6330-8.

9. Shiraishi, K., et al., Identification of fractalkine, a CX3C-type chemokine, as a direct target of p53. Cancer Res, 2000. 60(14): p. 3722-6.

10. Blaschke, S., et al., Proinflammatory role of fractalkine (CX3CL1) in rheumatoid arthritis. J Rheumatol, 2003. 30(9): p. 1918-27.

11. Beck, G., et al., Fractalkine is not a major chemoattractant for the migration of neutrophils across microvascular endothelium. Scand J Immunol, 2003. 58(2): p. 180-7.

12. Vollmar, B., et al., Acceleration of cutaneous wound healing by transient p53 inhibition. Lab Invest, 2002. 82(8): p. 1063-71.

13. Schafer, T., et al., Inhibition of p53 protects liver tissue against endotoxin-induced apoptotic and necrotic cell death. Faseb J, 2003. 17(6): p. 660-7.

14. Elder, C.L., L.E. Dahners, and P.S. Weinhold, A cyclooxygenase-2 inhibitor impairs ligament healing in the rat. Am J Sports Med, 2001. 29(6): p. 801-5.

15. Bogatov, V.B., P. Weinhold, and L.E. Dahners, The influence of a cyclooxygenase-1 inhibitor on injured and uninjured ligaments in the rat. Am J Sports Med, 2003. 31(4): p. 574-6.

16. Tsuzaki, M., et al., IL-1 beta induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 beta and IL-6 in human tendon cells. J Orthop Res, 2003. 21(2): p. 256-64.

17. Takano, K. and H. Nakagawa, Contribution of cytokine-induced neutrophil chemoattractant CINC-2 and CINC-3 to neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. Inflamm Res, 2001. 50(10): p. 503-8.

18. Ruth, J.H., et al., Fractalkine, a novel chemokine in rheumatoid arthritis and in rat adjuvant-induced arthritis. Arthritis Rheum, 2001. 44(7): p. 1568-81.

19. Nguyen, H.X. and J.G. Tidball, Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells *in vitro*. J Physiol, 2003. 547(Pt 1): p. 125-32.

20. Lee, W., et al., Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction *in vivo*: role of active enzyme in human periodontitis. J Periodontal Res, 1995. 30(1): p. 23-33.

21. Savill, J.S., et al., Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. J Clin Invest, 1989. 83(3): p. 865-75.

22. Huynh, M.L., V.A. Fadok, and P.M. Henson, Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- beta1 secretion and the resolution of inflammation. J Clin Invest, 2002. 109(1): p. 41-50.

23. Marsolais, D., C.H. Côté, and J. Frenette, Neutrophils and macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. J Orthop Res, 2001. 19(6): p. 1203-9.

24. Marsolais, D., C.H. Côté, and J. Frenette, Nonsteroidal anti-inflammatory drug reduces neutrophil and macrophage accumulation but does not improve tendon regeneration. Lab Invest, 2003. 83(7): p. 991-9.

25. Chbinou, N. and J. Frenette, Insulin-dependent diabetes impairs the inflammatory response and delays angiogenesis following Achilles tendon injury. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. 286(5): p. R952-7.

26. Takacs, I. and F. Verzar, Macromolecular aging of collagen. II. The role of water content, solubility and swelling capacity of tendon fibers during aging and storage. Gerontologia, 1968. 14(1): p. 24-34.

27. Woessner, J.F., The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. Arch. Biochem. Biophys., 1961. 93: p. 440 -447.

28. El-Gibaly, A.M., et al., Improvement of rat liver graft quality by pifithrin-alpha-mediated inhibition of hepatocyte necrapoptosis. Hepatology, 2004. 39(6): p. 1553-62.

29. Riley, G.P., et al., Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. Matrix Biol, 2002. 21(2): p. 185-95.

30. Freshney, R.I., Tumour cells disaggregated in collagenase. Lancet, 1972. 2(7775): p. 488-9.

31. Nagata, M., et al., Apoptosis and p53 protein expression increase in the process of burn wound healing in guinea-pig skin. Br J Dermatol, 1999. 140(5): p. 829-38.

32. Leker, R.R., et al., The role of p53-induced apoptosis in cerebral ischemia: effects of the p53 inhibitor pifithrin alpha. Exp Neurol, 2004. 187(2): p. 478-86.

33. Dagher, P.C., Apoptosis in ischemic renal injury: roles of GTP depletion and p53. Kidney Int, 2004. 66(2): p. 506-9.

34. Sigal, A. and V. Rotter, Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. Cancer Res, 2000. 60(24): p. 6788-93.

35. Jiang, M., et al., Role of p53 in cisplatin-induced tubular cell apoptosis: dependence on p53 transcriptional activity. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. 287(6): p. F1140-7.

36. Inoue, Y., et al., p53 May positively regulate hepatocyte proliferation in rats. Hepatology, 2002. 36(2): p. 336-44.

37. Kane, C.D. and D.G. Greenhalgh, Expression and localization of p53 and bcl-2 in healing wounds in diabetic and nondiabetic mice. Wound Repair Regen, 2000. 8(1): p. 45-58.

38. Zhang, L., et al., Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. Cancer Res, 2000. 60(13): p. 3655-61.

39. Wang, J.L., Y. Sun, and S. Wu, Gamma-irradiation induces matrix metalloproteinase II expression in a p53-dependent manner. Mol Carcinog, 2000. 27(4): p. 252-8.

40. Sun, Y., et al., P53 down-regulates matrix metalloproteinase-1 by targeting the communications between AP-1 and the basal transcription complex. J Cell Biochem, 2004. 92(2): p. 258-69.

41. Sun, Y., et al., Wild type and mutant p53 differentially regulate the gene expression of human collagenase-3 (hMMP-13). J Biol Chem, 2000. 275(15): p. 11327-32.

42. Gorgoulis, V.G., et al., p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-kappaB-independent manner. Embo J, 2003. 22(7): p. 1567-78.

43. Szymonik-Lesiuk, S., et al., Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2003. 10(4): p. 309-15.

44. Chlopkiewicz, B. and B. Gruber, The *in vitro* study on genotoxic activity of adriamycin and bleomycin in cells of mice with different catalase and superoxide dismutase activity. Acta Pol Pharm, 1997. 54(6): p. 437-41.

45. Fujimura, M., et al., The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. J Neurosci, 2000. 20(8): p. 2817-24.

46. Arima, Y., et al., Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. J Biol Chem, 2005.

47. Erster, S., et al., *In vivo* mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. Mol Cell Biol, 2004. 24(15): p. 6728-41.

48. Ala-aho, R., et al., Adenoviral delivery of p53 gene suppresses expression of collagenase-3 (MMP-13) in squamous carcinoma cells. Oncogene, 2002. 21(8): p. 1187-95.

49. Komarova, E.A., et al., p53 inhibitor pifithrin alpha can suppress heat shock and glucocorticoid signaling pathways. J Biol Chem, 2003. 278(18): p. 15465-8.

50. Palatianos, G.M., et al., Neutrophil depletion reduces myocardial reperfusion morbidity. Ann Thorac Surg, 2004. 77(3): p. 956-61.

51. Bhatia, M., et al., The effects of neutrophil depletion on a completely noninvasive model of acute pancreatitis-associated lung injury. Int J Pancreatol, 1998. 24(2): p. 77-83.

52. Dovi, J.V., L.K. He, and L.A. DiPietro, Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. J Leukoc Biol, 2003. 73(4): p. 448-55.

53. McDonald, P.P., et al., Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. J Immunol, 1999. 163(11): p. 6164-72.

54. Fadok, V.A., et al., Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE_2, and PAF. J Clin Invest, 1998. 101(4): p. 890-8.

55. Lauber, K., et al., Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. Cell, 2003. 113(6): p. 717-30.

56. Duffield, J.S., et al., Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. J Clin Invest, 2005. 115(1): p. 56-65.

57. Fadok, V.A., et al., Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. J Immunol, 2001. 166(11): p. 6847-54.

58. Xiao, Y.Q., et al., Cross-talk between ERK and p38 MAPK mediates selective suppression of Pro-inflammatory cytokines by TGF-beta. J Biol Chem, 2002. 12: p. 12.

Chapitre V :

Conclusion générale et perspectives

Les traumatismes tendineux aigus ne constituent qu'une petite fraction des tendinopathies. L'étude de ce type de pathologie prend cependant tout son sens si l'on considère que plusieurs acteurs du processus inflammatoire sont impliqués dans la physiopathologie de l'ensemble des tendinopathies. Conséquemment, la compréhension du rôle des médiateurs cellulaires et moléculaires de l'inflammation, en regard de la dégénérescence et de la réparation tendineuse *in vivo*, pourrait permettre d'identifier différentes cibles thérapeutiques prometteuses, voire même modifier notre conception du rôle de l'inflammation dans la physiopathologie des tendinopathies. Ainsi, nous avons caractérisé la séquence d'accumulation des neutrophiles et des macrophages dans un modèle standardisé de blessure tendineuse induite par injection de collagénase. Ce modèle nous a par la suite permis d'étudier différents médiateurs clés impliqués dans l'organisation spatiotemporelle de la séquence d'accumulation des cellules inflammatoires. Dans une optique physiologique, nous avons aussi évalué l'impact fonctionnel des différents traitements expérimentaux par la mesure des propriétés mécaniques tendineuses ex vivo.

5.1 L'injection de collagénase induit une séquence classique d'accumulation de cellules inflammatoires

Sur la base des travaux effectués dans le champ des blessures musculaires, nous avons pu démontrer, dans le chapitre II intitulé « Les neutrophiles et les macrophages s'accumulent séquentiellement suivant une blessure au tendon d'Achille », que l'injection de collagénase induit une séquence classique d'accumulation des cellules inflammatoires. Cette séquence s'opère par une accumulation rapide et massive de neutrophiles qui est maximale au jour 1 et diminue très rapidement au jour 3. Les macrophages $CD68^+$ ($ED1^+$) s'accumulent dans une fenêtre temporelle allant du jour 1 au jour 14, avec une accumulation maximale au jour 3. La concentration des macrophages $CD163^+$ ($ED2^+$) n'est cependant pas influencée suivant le traumatisme tendineux selon la méthode EAT où le tendon est exposé. Cette observation est surprenante considérant que la concentration des macrophages $CD163^+$ augmente tardivement suivant un traumatisme musculaire en raison de leur rôle possible durant les phases de réparation. Il semblerait toutefois que la nature de la blessure influence non seulement quantitativement la réponse inflammatoire, mais également qualitativement

puisque l'injection de collagénase selon la procédure NEAT (injection percutanée) a causé une accumulation significative de macrophages $CD163^+$ au jour 3.

Nos résultats de cette époque suggéraient que, tout comme dans le muscle squelettique, les neutrophiles et les macrophages $CD68^+$ pourraient jouer des rôles cataboliques comme la phagocytose des débris tissulaires et cellulaires. Le fait que la concentration des $CD163^+$ augmente suivant la modalité la moins traumatisante NEAT pourrait signifier que les processus de réparation sont mis en place de manière plus précoce que suivant la procédure chirurgicale plus agressive EAT, ou bien que les mécanismes assurant la réparation du tendon sont différents dans ces deux modèles. Nous sommes aussi en droit de nous demander si la stabilité de la densité des macrophages $CD163^+$ après la procédure EAT reflète vraiment une inaction dans la réparation tendineuse. Nous n'avons pas de réponse claire à cette question. Cependant, nous avons pu observer que le volume des tendons augmente considérablement pendant la phase de réparation, ce qui implique indéniablement que la quantité de macrophages $CD163^+$ doit être augmentée afin de maintenir une concentration stable. Il semble donc probable que ces derniers soient également influencés par le processus de réparation suivant la procédure EAT. La nature de leur implication reste toutefois à déterminer concernant la réparation tendineuse. Un protocole où les rats seraient irradiés localement de manière à neutraliser l'implication des cellules résidentes dans les processus inflammatoire et de réparation tendineuse pourrait contribuer à éclaircir ce point. La possibilité d'injecter localement des liposomes contenant du chlodronate pourrait également être une avenue intéressante afin d'induire sélectivement la mort des macrophages résidents. De manière spéculative, les macrophages $CD163^+$ pourraient être impliqués dans : 1- le remodelage du tissus conjonctif 2- la coordination de la migration cellulaire à l'intérieur du tendon et 3- la synthèse d'une matrice extracellulaire provisoire. L'injection de collagénase entraîne donc une phase catabolique où sont impliqués les neutrophiles et les macrophages $CD68^+$. L'implication des macrophages $CD163^+$ suivant un traumatisme tendineux serait quant à elle influencée par l'intensité ou la nature de la blessure.

5.2 L'injection de collagénase induit une perte fonctionnelle

Au chapitre III, qui visait à déterminer l'effet d'un AINS sur la séquence physiopathologique suivant un traumatisme tendineux aigu, nous avons étendu la caractérisation du modèle de blessure induite par injection de collagénase en y ajoutant un volet fonctionnel. Nos résultats montrent que l'injection de collagénase cause une diminution de plus de 50% du point de rupture et de la rigidité du tendon ainsi que la diminution du contenu en collagène. La perte fonctionnelle et l'altération du contenu de la MEC sont des signes communs de la dégénérescence tendineuse. La perte fonctionnelle rapide est suivie d'une longue période de réparation, ce qui est en accord avec le processus physiopathologique observé chez l'humain. Nos résultats montrent que cette période de récupération se caractérise par une augmentation lente du contenu en hydroxyproline et par une amélioration proportionnelle des propriétés biomécaniques. Nous avons d'ailleurs constaté une bonne corrélation entre ces deux paramètres, ce qui confirme que le contenu en collagène est déterminant en regard de la fonction tendineuse. Le fait que le contenu en eau reste élevé lors des phases tardives de la réparation tendineuse suggère fortement que des molécules hydrophiles sont présentes. Les glycosaminoglycanes et le protéoglycanes sont des candidats favorables. En accord avec leur rôle important dans l'homéostasie des tendons et dans le processus de réparation suivant différents traumatismes, le rôle de ces molécules devrait être investigué lors d'études à venir. Ces travaux se voulaient donc une des premières caractérisations temporelles des composantes fonctionnelles tendineuses suivant un traumatisme aigu causé par injection de collagénase. La combinaison des analyses histologiques, biochimiques et fonctionnelles nous a d'ailleurs permis de conclure que l'injection de collagénase entraînait un processus inflammatoire classique, une dégénérescence tendineuse ainsi qu'un processus de réparation relativement lent mais semblable à ce qui est rencontré chez l'humain.

5.3 Le modèle d'injection de collagénase possède plusieurs limites

Nous avons ainsi mis au point un modèle valide, reproductible et peu invasif de traumatisme tendineux. Cependant, ce modèle comporte certaines limites. Quelle est l'influence de la collagénase en tant que molécule exogène dans la nature de la réponse inflammatoire? Quelle est l'influence du saignement et des dommages aux tissus avoisinants? Quelle est la nature de l'interaction entre la blessure faite par l'aiguille et celle faite par la collagénase? À partir de quel moment la collagénase est-elle désactivée et comment? Le fait qu'une collagénase, une protéase, soit injectée peut-il influencer singulièrement le comportement TIMPs comparativement à d'autres modalités? Ces questions restent pour l'instant sans réponse, ce qui est d'autant plus déplorable considérant que la réaction immunitaire innée comporte une certaine spécificité et que les mécanismes impliqués dans l'initiation de la réparation tissulaire pourraient, de ce fait, différer selon le type de traumatisme (stérile versus aseptique). Un exemple parfait de cette situation nous est offert dans le secteur des dommages musculaires induits par l'exercice (DMIE). En effet, les groupes de recherche employant une méthode invasive pour induire les DMIE constatent une accumulation de neutrophiles et de macrophages tandis que l'utilisation d'une méthode prévenant toute incision locale ne produit qu'une accumulation de macrophages. Les corollaires physiologiques de ces processus inflammatoires différents restent encore à déterminer. Il est cependant clair que la mise au point de modèles de désorganisation tendineuse non invasifs et stériles pourrait offrir un contexte plus physiologique pour l'étude future de la physiopathologie des tendinopathies. Malgré ses limites, le modèle de blessure tendineuse par injection de collagénase demeure bien accepté par la communauté scientifique.

5.4 L'administration d'un anti-inflammatoire non stéroïdien perturbe l'accumulation des cellules inflammatoires

Les cellules inflammatoires ainsi que les PGs possèdent plusieurs rôles physiologiques. Suivant un traumatisme aigu, il est reconnu que la production des PGs par les COX stimule le processus inflammatoire et ce faisant, promeut l'accumulation de cellules inflammatoires au site de la blessure. Nos travaux sont les premiers à montrer que l'administration d'un AINS comme le diclofénac en phase inflammatoire, influence spatiotemporellement l'accumulation des neutrophiles et des macrophages suivant une blessure tendineuse aiguë. En effet, nous avons démontré que l'inhibition de l'accumulation des cellules inflammatoires s'effectue préférentiellement où le système vasculaire est bien développé. C'est à dire dans le paraténon et non dans la partie hypovasculaire centrale où se retrouvent principalement les faisceaux de collagène. Ces résultats, en combinaison avec la diminution de l'œdème induite par l'administration de diclofénac, confirment le rôle de vasodilatateur des PGs dans l'orchestration du processus inflammatoire.

Nos résultats remettent en question la pertinence de l'utilisation des AINS suivant un traumatisme tendineux puisqu'aucun effet protecteur et curatif n'a été observé. D'un point de vue clinique, tout laisse croire que la plupart des AINS n'exerceraient pas leurs effets dans les parties avasculaires du tendon. L'administration des AINS dans le but de diminuer les dommages non spécifiques suivant un traumatisme tendineux aigu serait donc tout simplement inutile. D'ailleurs, la connaissance de l'éventail des rôles des PGs s'est élargie au fil des années et la modulation de leur métabolisme a le potentiel d'interférer à plusieurs stades de la réparation tendineuse. À cet effet, la lectrice ou le lecteur est invité à lire l'article de revue en annexe 1 de cette thèse. L'observation que l'administration du diclofénac en phase inflammatoire n'interfère pas outre mesure avec les processus de réparation tendineuse suggère que cette modalité serait toutefois indiquée pour des fins d'analgésie.

5.5 La protéine p53 est impliquée dans l'organisation de la réponse inflammatoire et dans l'homéostasie tendineuse

Le manque de connaissance des médiateurs impliqués dans la séquence physiopathologique suivant un traumatisme tendineux aigu est un frein majeur au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cette trame nous a guidés vers l'identification de médiateurs centraux de la réparation tendineuse. La protéine p53 apparaît comme un régulateur important de l'homéostasie de la matrice extracellulaire et du processus inflammatoire. Les résultats présentés au chapitre IV sont les premiers à confirmer ces rôles dans le tendon *in vivo*. L'investigation du rôle de p53 suivant un traumatisme tendineux aigu a été réalisable grâce à la récente élaboration d'un inhibiteur pharmacologique de la transactivation des gènes cibles de p53, c'est-à-dire pifithrin-α. Une certaine prudence est de mise concernant l'interprétation des résultats générés à l'aide de cet inhibiteur car, comme tout inhibiteur, il possède certains effets non spécifiques. Parmi ces derniers, on compte l'interférence avec la voie de signalisation des récepteurs aux glucocorticoïdes ainsi qu'avec le transport nucléaire de certaines protéines de choc thermique.

L'inhibition de la transcription des gènes ciblés par p53 a induit une diminution du contenu en hydroxyproline, vraisemblablement due à l'augmentation du catabolisme du collagène causée par une augmentation de l'activité protéolytique. En plus d'influencer directement le contenu en collagène des tendons, PFT diminue l'accumulation des cellules inflammatoires suivant un traumatisme aigu. Jusqu'à maintenant, les mécanismes anti-inflammatoires de pifithrin-α étaient totalement inconnus. Nos résultats fournissent une première piste mécanistique de l'effet anti-inflammatoire puisque nous avons démontré que PFT induit une diminution de l'expression d'une chimiokine nommée fractalkine. En raison de l'implication mineure de la fractalkine sur le recrutement des neutrophiles, nous croyons que des processus encore indéterminés seraient également influencés par l'administration de PFT et expliqueraient la diminution de l'accumulation des neutrophiles. À cet effet, Vollmar et collègues ont montré que la PFT peut réduire l'incidence de la nécrose suivant une agression tissulaire. Puisque les produits de la nécrose peuvent être à l'origine de

l'accumulation de neutrophiles, ce phénomène pourrait possiblement expliquer la diminution de leur accumulation dans notre modèle.

Les raisons pour lesquelles PFT induit une diminution pan tendineuse de l'accumulation des cellules inflammatoires, comparativement à l'effet périphériques du diclofénac, restent un mystère. Une explication potentielle pourrait résider dans la nature des effets pro-inflammatoires des cibles respectives de la PFT et du diclofénac. Il est par exemple bien connu que la chimiokine fractalkine peut être libérée par différents types cellulaires dont les fibroblastes et les cellules dendritiques. L'administration de PFT pourrait ainsi briser le gradient chimiotactique au cœur du tendon tandis que les prostaglandines joueraient principalement le rôle de vasodilatateurs, et ainsi périphérique, dans le contexte de l'inflammation du tendon.

5.6 Le processus inflammatoire n'induit pas de dommages non spécifiques à la matrice extracellulaire des tendons

Les résultats du chapitre IV nous montrent également que, malgré un effet anti-inflammatoire généralisé à tout le tendon, l'administration de PFT n'a pas atténué significativement la perte fonctionnelle suivant l'injection de collagénase. Cette observation jette un doute sérieux sur le dogme stipulant que les cellules inflammatoires puissent causer des dommages non spécifiques à la portion intacte de la MEC tendineuse suivant un traumatisme aigu. Le processus inflammatoire peut induire des altérations histologiques et fonctionnelles dans le myocarde, le muscle squelettique et le tissu nerveux. Cependant, peu d'évidences démontrent clairement que ce phénomène puisse se concrétiser dans le tendon.

Des expériences d'un projet en cours, présentées à l'annexe 2, suggèrent fortement que le processus inflammatoire ne cause pas de dommages non spécifiques à la matrice extracellulaire des tendons. En effet, l'injection intratendineuse de 200 µg de carraghénine induit une accumulation massive de neutrophiles et de macrophages (Annexe 2, Figure 1) mais celle-ci n'est pas associée à la diminution de contenu en hydroxyproline (Annexe 2, Figure 2) ni à l'altération des propriétés mécaniques (Annexe 2, Figure 3) des tendons. Ainsi, l'accumulation des cellules inflammatoires induite par un corps étranger n'est pas associée à l'induction de dommages non spécifiques à la MEC des tendons.

En résumé de cette thèse, nous pouvons affirmer avoir caractérisé de manière immunohistochimique et fonctionnelle un modèle utile visant à étudier la physiopathologie des tendinopathies. L'utilisation de ce modèle nous a permis d'étudier différents médiateurs de l'inflammation tendineuse comme les PGs et p53. Nous avons d'ailleurs démontré que l'effet du diclofénac, un AINS qui inhibe la production des PGs, pourrait se localiser dans le paraténon et que son administration en phase inflammatoire n'avait aucun impact fonctionnel. De plus, nous avons identifié un nouveau joueur, p53, dans l'homéostasie ainsi que dans la physiopathologie des tendinopathies. L'absence d'effet bénéfique des thérapies à nature anti-inflammatoire nous a poussés à déterminer si les cellules inflammatoires pouvaient à elles seules induire des dommages aux tendons. Nos travaux ne supportent pas cette hypothèse. Les résultats présentés dans cette thèse apportent ainsi une nuance à la vision de l'inflammation en tant que processus délétère suivant un traumatisme tendineux aigu.

Bibliographie :

1. McCormack, R.R., Jr., et al., Prevalence of tendinitis and related disorders of the upper extremity in a manufacturing workforce. J Rheumatol, 1990. 17(7): p. 958-64.
2. Kurppa, K., et al., Incidence of tenosynovitis or peritendinitis and epicondylitis in a meat-processing factory. Scand J Work Environ Health, 1991. 17(1): p. 32-7.
3. Luopajarvi, T., et al., Prevalence of tenosynovitis and other injuries of the upper extremities in repetitive work. Scand J Work Environ Health, 1979. 5 suppl 3: p. 48-55.
4. Leadbetter, W.B., Cell-matrix response in tendon injury. Clin Sports Med, 1992. 11(3): p. 533-78.
5. Józsa, L.G. and P. Kannus, Human tendons : anatomy, physiology, and pathology. 1997, Champaign, IL: Human Kinetics. ix, 574.
6. Jamali, A.A., et al., Skeletal muscle response to tenotomy. Muscle Nerve, 2000. 23(6): p. 851-62.
7. Coyte, P.C., et al., The economic cost of musculoskeletal disorders in Canada. Arthritis Care Res, 1998. 11(5): p. 315-25.
8. Elliott, D.H., Structure and Function of Mammalian Tendon. Biol Rev Camb Philos Soc, 1965. 40: p. 392-421.
9. Trotter, J.A., Functional morphology of force transmission in skeletal muscle. A brief review. Acta Anat (Basel), 1993. 146(4): p. 205-22.
10. Grady, R.M., et al., Tyrosine-phosphorylated and nonphosphorylated isoforms of alpha-dystrobrevin: roles in skeletal muscle and its neuromuscular and myotendinous junctions. J Cell Biol, 2003. 160(5): p. 741-52.
11. Cohn, R.D. and K.P. Campbell, Molecular basis of muscular dystrophies. Muscle Nerve, 2000. 23(10): p. 1456-71.
12. Jannapureddy, S.R., et al., Genetic Models in Applied Physiology. Merosin deficiency leads to alterations in passive and active skeletal muscle mechanics. J Appl Physiol, 2003. 94(6): p. 2524-33; discussion 2523.
13. Tunggal, P., et al., Laminins: structure and genetic regulation. Microsc Res Tech, 2000. 51(3): p. 214-27.
14. Denzer, A.J., et al., Agrin binds to the nerve-muscle basal lamina via laminin. J Cell Biol, 1997. 137(3): p. 671-83.
15. Hoffman, M.P., et al., Laminin-1 and laminin-2 G-domain synthetic peptides bind syndecan-1 and are involved in acinar formation of a human submandibular gland cell line. J Biol Chem, 1998. 273(44): p. 28633-41.
16. Riley, G., Chronic tendon pathology: molecular basis and therapeutic implications. Expert Rev Mol Med, 2005. 7(5): p. 1-25.
17. Boudreau, N.J. and P.L. Jones, Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. Biochem J, 1999. 339(Pt 3): p. 481-8.
18. Miosge, N., et al., Organization of the myotendinous junction is dependent on the presence of alpha7beta1 integrin. Lab Invest, 1999. 79(12): p. 1591-9.
19. Le grand dictionnaire terminologique. 2005, Gouvernement du Québec, Office québécois de la langue française.

20. Trotter, J.A., Structure-function considerations of muscle-tendon junctions. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2002. 133(4): p. 1127-33.
21. Ahmed, I.M., et al., Blood supply of the Achilles tendon. J Orthop Res, 1998. 16(5): p. 591-6.
22. Vailas, A.C., et al., Adaptation of bone and tendon to prolonged hindlimb suspension in rats. J Appl Physiol, 1988. 65(1): p. 373-6.
23. Vailas, A.C., et al., Patellar tendon matrix changes associated with aging and voluntary exercise. J Appl Physiol, 1985. 58(5): p. 1572-6.
24. Elliott, D.H. and G.N. Crawford, The Thickness and Collagen Content of Tendon Relative to the Cross-Sectional Area of Muscle During Growth. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1965. 162: p. 198-202.
25. Rollhäuser, H., Konstruktions- und Altersunterschiede in Festigkeit kollagener Fibrillen. Morph, 1950. 90: p. 157-79.
26. Vogel, H.G., Mechanical and chemical properties of various connective tissue organs in rats as influenced by non-steroidal antirheumatic drugs. Connect Tissue Res, 1977. 5(2): p. 91-5.
27. Vogel, H.G., Influence of maturation and age on mechanical and biochemical parameters of connective tissue of various organs in the rat. Connect Tissue Res, 1978. 6(3): p. 161-6.
28. Vogel, H.G., Influence of maturation and aging on mechanical and biochemical properties of connective tissue in rats. Mech Ageing Dev, 1980. 14(3-4): p. 283-92.
29. Takacs, I. and F. Verzar, Macromolecular aging of collagen. II. The role of water content, solubility and swelling capacity of tendon fibers during aging and storage. Gerontologia, 1968. 14(1): p. 24-34.
30. Kjaer, M., Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. Physiol Rev, 2004. 84(2): p. 649-98.
31. Reichert, D., et al., A solid-state NMR study of the fast and slow dynamics of collagen fibrils at varying hydration levels. Magn Reson Chem, 2004. 42(2): p. 276-84.
32. Haut, T.L. and R.C. Haut, The state of tissue hydration determines the strain-rate-sensitive stiffness of human patellar tendon. J Biomech, 1997. 30(1): p. 79-81.
33. Thornton, G.M., N.G. Shrive, and C.B. Frank, Altering ligament water content affects ligament pre-stress and creep behaviour. J Orthop Res, 2001. 19(5): p. 845-51.
34. Chimich, D., et al., Water content alters viscoelastic behaviour of the normal adolescent rabbit medial collateral ligament. J Biomech, 1992. 25(8): p. 831-7.
35. Sasaki, N. and S. Odajima, Stress-strain curve and Young's modulus of a collagen molecule as determined by the X-ray diffraction technique. J Biomech, 1996. 29(5): p. 655-8.
36. Riley, G.P., et al., Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. Ann Rheum Dis, 1994. 53(6): p. 359-66.
37. Todhunter, I. and K. Pearson, A History of the Theory of elasticity and of the Strength of Materials, From Galilei to Lord Kelvin. Vol. I. 1960: Dover Publications, Inc. 936.
38. Wang, X.T. and R.F. Ker, Creep rupture of wallaby tail tendons. J Exp Biol, 1995. 198(3): p. 831-45.

39. Pioletti, D.P. and L.R. Rakotomanana, On the independence of time and strain effects in the stress relaxation of ligaments and tendons. J Biomech, 2000. 33(12): p. 1729-32.
40. Roberts, T.J., The integrated function of muscles and tendons during locomotion. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2002. 133(4): p. 1087-99.
41. Maganaris, C.N., Tensile properties of *in vivo* human tendinous tissue. J Biomech, 2002. 35(8): p. 1019-27.
42. Thornton, G.M., N.G. Shrive, and C.B. Frank, Healing ligaments have decreased cyclic modulus compared to normal ligaments and immobilization further compromises healing ligament response to cyclic loading. J Orthop Res, 2003. 21(4): p. 716-22.
43. Ker, R.F., X.T. Wang, and A.V. Pike, Fatigue quality of mammalian tendons. J Exp Biol, 2000. 203 Pt 8: p. 1317-27.
44. Kubo, K., et al., Influence of static stretching on viscoelastic properties of human tendon structures *in vivo*. J Appl Physiol, 2001. 90(2): p. 520-7.
45. Kurtz, C.A., et al., Insulin-like growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model. Am J Sports Med, 1999. 27(3): p. 363-9.
46. Simonsen, E.B., H. Klitgaard, and F. Bojsen-Moller, The influence of strength training, swim training and ageing on the Achilles tendon and m. soleus of the rat. J Sports Sci, 1995. 13(4): p. 291-5.
47. Jackson, B.A., J.A. Schwane, and B.C. Starcher, Effect of ultrasound therapy on the repair of Achilles tendon injuries in rats. Med Sci Sports Exerc, 1991. 23(2): p. 171-6.
48. Jarvinen, M., et al., Histopathological findings in chronic tendon disorders. Scand J Med Sci Sports, 1997. 7(2): p. 86-95.
49. Fratzl, P., et al., Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. J Struct Biol, 1998. 122(1-2): p. 119-22.
50. Almeida-Silveira, M.I., et al., Changes in stiffness induced by hindlimb suspension in rat Achilles tendon. Eur J Appl Physiol, 2000. 81(3): p. 252-7.
51. Halder, A., et al., Mechanical properties of the posterior rotator cuff. Clin Biomech (Bristol, Avon), 2000. 15(6): p. 456-62.
52. Ker, R.F., X.T. Wang, and A.V. Pike, Fatigue quality of mammalian tendons. J Exp Biol, 2000. 203 Pt 8: p. 1317-27.
53. Best, T.M., et al., Achilles tendon healing: a correlation between functional and mechanical performance in the rat. J Orthop Res, 1993. 11(6): p. 897-906.
54. Murrell, G.A., et al., Effects of immobilization on Achilles tendon healing in a rat model. J Orthop Res, 1994. 12(4): p. 582-91.
55. Probst, A., et al., A new clamping technique for biomechanical testing of tendons in small animals. J Invest Surg, 2000. 13(6): p. 313-8.
56. Elder, C.L., L.E. Dahners, and P.S. Weinhold, A cyclooxygenase-2 inhibitor impairs ligament healing in the rat. Am J Sports Med, 2001. 29(6): p. 801-5.
57. Forslund, C. and P. Aspenberg, Tendon healing stimulated by injected CDMP-2. Med Sci Sports Exerc, 2001. 33(5): p. 685-7.
58. Kannus, P., Structure of the tendon connective tissue. Scand J Med Sci Sports, 2000. 10(6): p. 312-20.
59. McNeilly, C.M., et al., Tendon cells *in vivo* form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. J Anat, 1996. 189 (Pt 3): p. 593-600.

60. Banes, A.J., et al., Gap junctions regulate responses of tendon cells ex vivo to mechanical loading. Clin Orthop Relat Res, 1999(367 Suppl): p. S356-70.
61. Gelse, K., E. Poschl, and T. Aigner, Collagens--structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev, 2003. 55(12): p. 1531-46.
62. Lamande, S.R. and J.F. Bateman, Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. Semin Cell Dev Biol, 1999. 10(5): p. 455-64.
63. Sauk, J.J., et al., Hsp47 and the translation-translocation machinery cooperate in the production of alpha 1(I) chains of type I procollagen. J Biol Chem, 1994. 269(6): p. 3941-6.
64. Hosokawa, N., et al., HSP47, a collagen-specific molecular chaperone, delays the secretion of type III procollagen transfected in human embryonic kidney cell line 293: a possible role for HSP47 in collagen modification. J Biochem (Tokyo), 1998. 124(3): p. 654-62.
65. Woessner, J.F., The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. Arch. Biochem. Biophys., 1961. 93: p. 440 -447.
66. Wang, W.M., et al., Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase. J Biol Chem, 2003. 278(21): p. 19549-57.
67. Hartigan, N., L. Garrigue-Antar, and K.E. Kadler, Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1). Identification of the minimal domain structure for procollagen C-proteinase activity. J Biol Chem, 2003. 278(20): p. 18045-9.
68. Reddi, A.H., BMP-1: resurrection as procollagen C-proteinase. Science, 1996. 271(5248): p. 463.
69. Reed, C.C. and R.V. Iozzo, The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. Glycoconj J, 2002. 19(4-5): p. 249-55.
70. Kinbara, T., et al., Transforming growth factor-beta isoforms differently stimulate proalpha2 (I) collagen gene expression during wound healing process in transgenic mice. J Cell Physiol, 2002. 190(3): p. 375-81.
71. Molloy, T., Y. Wang, and G. Murrell, The roles of growth factors in tendon and ligament healing. Sports Med, 2003. 33(5): p. 381-94.
72. Murata, H., et al., TGF-beta3 stimulates and regulates collagen synthesis through TGF-beta1- dependent and independent mechanisms. J Invest Dermatol, 1997. 108(3): p. 258-62.
73. Rossert, J., C. Terraz, and S. Dupont, Regulation of type I collagen genes expression. Nephrol Dial Transplant, 2000. 15 Suppl 6: p. 66-8.
74. Tang, J.B., et al., Tendon healing *in vitro*: promotion of collagen gene expression by bFGF with NF-kappaB gene activation. J Hand Surg [Am], 2003. 28(2): p. 215-20.
75. Cilli, F., et al., Prostaglandin E2 affects proliferation and collagen synthesis by human patellar tendon fibroblasts. Clin J Sport Med, 2004. 14(4): p. 232-6.
76. O'Callaghan, C.J. and B. Williams, Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta(1). Hypertension, 2000. 36(3): p. 319-24.
77. Schild, C. and B. Trueb, Mechanical stress is required for high-level expression of connective tissue growth factor. Exp Cell Res, 2002. 274(1): p. 83-91.

78. Skutek, M., et al., Cyclic mechanical stretching modulates secretion pattern of growth factors in human tendon fibroblasts. Eur J Appl Physiol, 2001. 86(1): p. 48-52.
79. Lindahl, G.E., et al., Activation of fibroblast procollagen alpha 1(I) transcription by mechanical strain is transforming growth factor-beta-dependent and involves increased binding of CCAAT-binding factor (CBF/NF-Y) at the proximal promoter. J Biol Chem, 2002. 277(8): p. 6153-61.
80. Gutierrez, J.A. and H.A. Perr, Mechanical stretch modulates TGF-beta1 and alpha1(I) collagen expression in fetal human intestinal smooth muscle cells. Am J Physiol, 1999. 277(5 Pt 1): p. G1074-80.
81. Duncan, M.R., et al., Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. Faseb J, 1999. 13(13): p. 1774-86.
82. Strutz, F., et al., TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). Kidney Int, 2001. 59(2): p. 579-92.
83. Sato, M., et al., Lysophosphatidic acid inhibits TGF-beta-mediated stimulation of type I collagen mRNA stability via an ERK-dependent pathway in dermal fibroblasts. Matrix Biol, 2004. 23(6): p. 353-61.
84. Wang, J.H., et al., Cyclic mechanical stretching of human tendon fibroblasts increases the production of prostaglandin E2 and levels of cyclooxygenase expression: a novel *in vitro* model study. Connect Tissue Res, 2003. 44(3-4): p. 128-33.
85. Langberg, H., et al., Type I collagen synthesis and degradation in peritendinous tissue after exercise determined by microdialysis in humans. J Physiol, 1999. 521 Pt 1: p. 299-306.
86. Hui, A.Y., et al., Prostaglandin E2 inhibits transforming growth factor beta 1-mediated induction of collagen alpha 1(I) in hepatic stellate cells. J Hepatol, 2004. 41(2): p. 251-8.
87. Opas, E.E., et al., Parathyroid hormone and prostaglandin E2 preferentially increase luciferase levels in bone of mice harboring a luciferase transgene controlled by elements of the pro-alpha1(I) collagen promoter. Bone, 2000. 26(1): p. 27-32.
88. Sagara, T., et al., Topical prostaglandin F2alpha treatment reduces collagen types I, III, and IV in the monkey uveoscleral outflow pathway. Arch Ophthalmol, 1999. 117(6): p. 794-801.
89. Choung, J., et al., Role of EP2 receptors and cAMP in prostaglandin E2 regulated expression of type I collagen alpha1, lysyl oxidase, and cyclooxygenase-1 genes in human embryo lung fibroblasts. J Cell Biochem, 1998. 71(2): p. 254-63.
90. Fine, A., et al., The differential effect of prostaglandin E2 on transforming growth factor-beta and insulin-induced collagen formation in lung fibroblasts. J Biol Chem, 1989. 264(29): p. 16988-91.
91. Bos, C.L., et al., Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. Int J Biochem Cell Biol, 2004. 36(7): p. 1187-205.
92. Rapala, K., et al., The effects of interleukin-1 and prostaglandin E2 on accumulation of collagen and steady-state levels of pro alpha 1(I) collagen messenger RNA in experimental granulation tissue in rats. Arch Dermatol Res, 1997. 289(4): p. 219-23.

93. Somasundaram, K., Tumor suppressor p53: regulation and function. Front Biosci, 2000. 5: p. D424-37.
94. Hojo, S., et al., Heterogeneous point mutations of the p53 gene in pulmonary fibrosis. Eur Respir J, 1998. 12(6): p. 1404-8.
95. Kaur, J., et al., Alterations in expression of retinoid receptor beta and p53 in oral submucous fibrosis. Oral Dis, 2004. 10(4): p. 201-6.
96. Ghosh, S., et al., Bleomycin sensitivity of mice expressing dominant-negative p53 in the lung epithelium. Am J Respir Crit Care Med, 2002. 166(6): p. 890-7.
97. Dupont, S., et al., Convergence of p53 and TGF-beta signaling networks. Cancer Lett, 2004. 213(2): p. 129-38.
98. Ghosh, A.K., S. Bhattacharyya, and J. Varga, The tumor suppressor p53 abrogates Smad-dependent collagen gene induction in mesenchymal cells. J Biol Chem, 2004. 279(46): p. 47455-63.
99. Visse, R. and H. Nagase, Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res, 2003. 92(8): p. 827-39.
100. Vincenti, M.P., The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression. Methods Mol Biol, 2001. 151: p. 121-48.
101. Chakraborti, S., et al., Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. Mol Cell Biochem, 2003. 253(1-2): p. 269-85.
102. Archambault, J., et al., Stretch and interleukin-1beta induce matrix metalloproteinases in rabbit tendon cells *in vitro*. J Orthop Res, 2002. 20(1): p. 36-9.
103. Archambault, J.M., D.A. Hart, and W. Herzog, Response of rabbit Achilles tendon to chronic repetitive loading. Connect Tissue Res, 2001. 42(1): p. 13-23.
104. Arnoczky, S.P., et al., Ex vivo static tensile loading inhibits MMP-1 expression in rat tail tendon cells through a cytoskeletally based mechanotransduction mechanism. J Orthop Res, 2004. 22(2): p. 328-33.
105. Corps, A.N., et al., Inhibition of interleukin-1beta-stimulated collagenase and stromelysin expression in human tendon fibroblasts by epigallocatechin gallate ester. Matrix Biol, 2004. 23(3): p. 163-9.
106. Ireland, D., et al., Multiple changes in gene expression in chronic human Achilles tendinopathy. Matrix Biol, 2001. 20(3): p. 159-69.
107. Koskinen, S.O., et al., Physical exercise can influence local levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tendon-related connective tissue. J Appl Physiol, 2004. 96(3): p. 861-4.
108. Lo, I.K., et al., Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase mRNA levels are specifically altered in torn rotator cuff tendons. Am J Sports Med, 2004. 32(5): p. 1223-9.
109. Lavagnino, M., et al., Effect of amplitude and frequency of cyclic tensile strain on the inhibition of MMP-1 mRNA expression in tendon cells: an *in vitro* study. Connect Tissue Res, 2003. 44(3-4): p. 181-7.
110. Riley, G.P., et al., Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. Matrix Biol, 2002. 21(2): p. 185-95.
111. Ritty, T.M. and J. Herzog, Tendon cells produce gelatinases in response to type I collagen attachment. J Orthop Res, 2003. 21(3): p. 442-50.

112. Siwik, D.A., D.L. Chang, and W.S. Colucci, Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts *in vitro*. Circ Res, 2000. 86(12): p. 1259-65.
113. Bolcato-Bellemin, A.L., et al., Expression of mRNAs encoding for alpha and beta integrin subunits, MMPs, and TIMPs in stretched human periodontal ligament and gingival fibroblasts. J Dent Res, 2000. 79(9): p. 1712-6.
114. Mudera, V.C., et al., Molecular responses of human dermal fibroblasts to dual cues: contact guidance and mechanical load. Cell Motil Cytoskeleton, 2000. 45(1): p. 1-9.
115. Kim, M.P., et al., Chlamydia pneumoniae enhances cytokine-stimulated human monocyte matrix metalloproteinases through a prostaglandin E2-dependent mechanism. Infect Immun, 2005. 73(1): p. 632-4.
116. Ito, H., et al., Prostaglandin E2 enhances pancreatic cancer invasiveness through an Ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2. Cancer Res, 2004. 64(20): p. 7439-46.
117. Choi, Y.A., et al., Interleukin-1beta stimulates matrix metalloproteinase-2 expression via a prostaglandin E2-dependent mechanism in human chondrocytes. Exp Mol Med, 2004. 36(3): p. 226-32.
118. Tung, J.T., et al., Evaluation of the influence of prostaglandin E2 on recombinant equine interleukin-1beta-stimulated matrix metalloproteinases 1, 3, and 13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 expression in equine chondrocyte cultures. Am J Vet Res, 2002. 63(7): p. 987-93.
119. Nishikawa, M., et al., Effects of TNFalpha and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. J Periodontal Res, 2002. 37(3): p. 167-76.
120. Mix, K.S., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent repression of collagenase gene expression by 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid and prostaglandin 15-deoxy-delta(12,14) J2: a role for Smad signaling. Mol Pharmacol, 2004. 65(2): p. 309-18.
121. Jozsa, L., et al., Alterations in dry mass content of collagen fibers in degenerative tendinopathy and tendon-rupture. Matrix, 1989. 9(2): p. 140-6.
122. Yamamoto, T., et al., Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. J Immunol, 2000. 164(12): p. 6174-9.
123. Chase, A.J. and A.C. Newby, Regulation of matrix metalloproteinase (matrixin) genes in blood vessels: a multi-step recruitment model for pathological remodelling. J Vasc Res, 2003. 40(4): p. 329-43.
124. Attiga, F.A., et al., Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. Cancer Res, 2000. 60(16): p. 4629-37.
125. Blaschke, S., et al., Proinflammatory role of fractalkine (CX3CL1) in rheumatoid arthritis. J Rheumatol, 2003. 30(9): p. 1918-27.
126. Onodera, S., et al., Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. Relevance to intracellular signaling pathways. J Biol Chem, 2002. 277(10): p. 7865-74.
127. White, L.A. and C.E. Brinckerhoff, Two activator protein-1 elements in the matrix metalloproteinase-1 promoter have different effects on transcription and bind Jun D, c-Fos, and Fra-2. Matrix Biol, 1995. 14(9): p. 715-25.

128. Buttice, G., et al., Erg, an Ets-family member, differentially regulates human collagenase1 (MMP1) and stromelysin1 (MMP3) gene expression by physically interacting with the Fos/Jun complex. Oncogene, 1996. 13(11): p. 2297-306.
129. Yeh, C.H., et al., Inhibition of NF-kappaB activation can attenuate ischemia/reperfusion-induced contractility impairment via decreasing cardiomyocytic proinflammatory gene up-regulation and matrix metalloproteinase expression. J Cardiovasc Pharmacol, 2005. 45(4): p. 301-9.
130. Yoo, H.G., et al., IL-1beta induces MMP-9 via reactive oxygen species and NF-kappaB in murine macrophage RAW 264.7 cells. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 298(2): p. 251-6.
131. Philip, S., A. Bulbule, and G.C. Kundu, Matrix metalloproteinase-2: mechanism and regulation of NF-kappaB-mediated activation and its role in cell motility and ECM-invasion. Glycoconj J, 2004. 21(8-9): p. 429-41.
132. Ogawa, K., et al., Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor-beta is mediated by a nuclear factor-kappaB site. Biochem J, 2004. 381(Pt 2): p. 413-22.
133. White, L.A., T.I. Mitchell, and C.E. Brinckerhoff, Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. Biochim Biophys Acta, 2000. 1490(3): p. 259-68.
134. Kerr, L.D., D.B. Miller, and L.M. Matrisian, TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. Cell, 1990. 61(2): p. 267-78.
135. Westermarck, J. and V.M. Kahari, Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. Faseb J, 1999. 13(8): p. 781-92.
136. Sun, Y., et al., Wild type and mutant p53 differentially regulate the gene expression of human collagenase-3 (hMMP-13). J Biol Chem, 2000. 275(15): p. 11327-32.
137. Sun, Y., et al., P53 down-regulates matrix metalloproteinase-1 by targeting the communications between AP-1 and the basal transcription complex. J Cell Biochem, 2004. 92(2): p. 258-69.
138. Ala-aho, R., et al., Adenoviral delivery of p53 gene suppresses expression of collagenase-3 (MMP-13) in squamous carcinoma cells. Oncogene, 2002. 21(8): p. 1187-95.
139. Bian, J. and Y. Sun, Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. Mol Cell Biol, 1997. 17(11): p. 6330-8.
140. Mertens, P.R., et al., Combinatorial interactions of p53, activating protein-2, and YB-1 with a single enhancer element regulate gelatinase A expression in neoplastic cells. J Biol Chem, 2002. 277(28): p. 24875-82.
141. Toschi, E., et al., Wild-type p53 gene transfer inhibits invasion and reduces matrix metalloproteinase-2 levels in p53-mutated human melanoma cells. J Invest Dermatol, 2000. 114(6): p. 1188-94.
142. Yan, C., H. Wang, and D.D. Boyd, ATF3 represses 72-kDa type IV collagenase (MMP-2) expression by antagonizing p53-dependent trans-activation of the collagenase promoter. J Biol Chem, 2002. 277(13): p. 10804-12.

143. Zhang, C., et al., Transcriptional activation of the human stress-inducible transcriptional repressor ATF3 gene promoter by p53. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 297(5): p. 1302-10.
144. Bohuslav, J., et al., p53 Induces NF-kappa B activation by an Ikappa B kinase-independent mechanism involving RSK1 phosphorylation of p65. J Biol Chem, 2004.
145. Chen, H.H. and D.L. Wang, Nitric oxide inhibits matrix metalloproteinase-2 expression via the induction of activating transcription factor 3 in endothelial cells. Mol Pharmacol, 2004. 65(5): p. 1130-40.
146. Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr., Matrix metalloproteinases. J Biol Chem, 1999. 274(31): p. 21491-4.
147. Lambert, E., et al., TIMPs as multifacial proteins. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. 49(3): p. 187-98.
148. Overall, C.M., Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. Ann N Y Acad Sci, 1994. 732: p. 51-64.
149. Cross, N.A., et al., The expression and regulation of ADAMTS-1, -4, -5, -9, and -15, and TIMP-3 by TGFbeta1 in prostate cells: relevance to the accumulation of versican. Prostate, 2005. 63(3): p. 269-75.
150. Moran, A., et al., Clinical relevance of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal cancer. Oncol Rep, 2005. 13(1): p. 115-20.
151. Bian, J., et al., Characterization of a putative p53 binding site in the promoter of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) gene: TIMP-3 is not a p53 target gene. Carcinogenesis, 1996. 17(12): p. 2559-62.
152. Loging, W.T. and D. Reisman, Inhibition of the putative tumor suppressor gene TIMP-3 by tumor-derived p53 mutants and wild type p53. Oncogene, 1999. 18(52): p. 7608-15.
153. Maffulli, N., J. Wong, and L.C. Almekinders, Types and epidemiology of tendinopathy. Clin Sports Med, 2003. 22(4): p. 675-92.
154. Khan, K.M., et al., Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. Sports Med, 1999. 27(6): p. 393-408.
155. Sharma, P. and N. Maffulli, Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. J Bone Joint Surg Am, 2005. 87-A(1): p. 187-202.
156. Riley, G., The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. Rheumatology (Oxford), 2004. 43(2): p. 131-42.
157. Fredberg, U., Tendinopathy--tendinitis or tendinosis? The question is still open. Scand J Med Sci Sports, 2004. 14(4): p. 270-2.
158. Alfredson, H., Chronic midportion Achilles tendinopathy: an update on research and treatment. Clin Sports Med, 2003. 22(4): p. 727-41.
159. Archambault, J.M., J.P. Wiley, and R.C. Bray, Exercise loading of tendons and the development of overuse injuries. A review of current literature. Sports Med, 1995. 20(2): p. 77-89.
160. Birch, H.L., A.M. Wilson, and A.E. Goodship, The effect of exercise-induced localised hyperthermia on tendon cell survival. J Exp Biol, 1997. 200(Pt 11): p. 1703-8.
161. Bestwick, C.S. and N. Maffulli, Reactive oxygen species and tendinopathy: do they matter? Br J Sports Med, 2004. 38(6): p. 672-4.

162. Alfredson, H., et al., cDNA-arrays and real-time quantitative PCR techniques in the investigation of chronic Achilles tendinosis. J Orthop Res, 2003. 21(6): p. 970-5.
163. Alfredson, H., et al., *In vivo* microdialysis and immunohistochemical analyses of tendon tissue demonstrated high amounts of free glutamate and glutamate NMDAR1 receptors, but no signs of inflammation, in Jumper's knee. J Orthop Res, 2001. 19(5): p. 881-6.
164. Alfredson, H., et al., *In vivo* investigation of ECRB tendons with microdialysis technique--no signs of inflammation but high amounts of glutamate in tennis elbow. Acta Orthop Scand, 2000. 71(5): p. 475-9.
165. Alfredson, H., K. Thorsen, and R. Lorentzon, In situ microdialysis in tendon tissue: high levels of glutamate, but not prostaglandin E2 in chronic Achilles tendon pain. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 1999. 7(6): p. 378-81.
166. Soslowsky, L.J., et al., Neer Award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study. J Shoulder Elbow Surg, 2000. 9(2): p. 79-84.
167. Zamora, A.J. and J.F. Marini, Tendon and myo-tendinous junction in an overloaded skeletal muscle of the rat. Anat Embryol (Berl), 1988. 179(1): p. 89-96.
168. Alfredson, H., Letter to the Editor in Chief. Scand J Med Sci Sports, 2004. 14(4): p. 269.
169. Sullo, A., et al., The effects of prolonged peritendinous administration of PGE1 to the rat Achilles tendon: a possible animal model of chronic Achilles tendinopathy. J Orthop Sci, 2001. 6(4): p. 349-57.
170. Barbe, M.F., et al., Chronic repetitive reaching and grasping results in decreased motor performance and widespread tissue responses in a rat model of MSD. J Orthop Res, 2003. 21(1): p. 167-76.
171. Fu, S.C., et al., Increased expression of transforming growth factor-beta1 in patellar tendinosis. Clin Orthop Relat Res, 2002(400): p. 174-83.
172. Richardson, J.D. and M.R. Vasko, Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 302(3): p. 839-45.
173. Le Filliatre, G., et al., Cyclo-oxygenase and lipoxygenase pathways in mast cell dependent-neurogenic inflammation induced by electrical stimulation of the rat saphenous nerve. Br J Pharmacol, 2001. 132(7): p. 1581-9.
174. Bring, D.K., et al., Increase in sensory neuropeptides surrounding the Achilles tendon in rats with adjuvant arthritis. J Orthop Res, 2005. 23(2): p. 294-301.
175. Bjur, D., H. Alfredson, and S. Forsgren, The innervation pattern of the human Achilles tendon: studies of the normal and tendinosis tendon with markers for general and sensory innervation. Cell Tissue Res, 2005. 320(1): p. 201-6.
176. Maffulli, N., V. Barrass, and S.W. Ewen, Light microscopic histology of achilles tendon ruptures. A comparison with unruptured tendons. Am J Sports Med, 2000. 28(6): p. 857-63.
177. Enwemeka, C.S., Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation. Phys Ther, 1989. 69(10): p. 816-25.
178. Thomas, J., et al., The effect of indomethacin on Achilles tendon healing in rabbits. Clin Orthop, 1991(272): p. 308-11.
179. Kakar, S., U. Khan, and D.A. McGrouther, Differential cellular response within the rabbit tendon unit following tendon injury. J Hand Surg [Br], 1998. 23(5): p. 627-32.

180. Jones, M.E., et al., The early surface cell response to flexor tendon injury. J Hand Surg [Am], 2003. 28(2): p. 221-30.
181. Iwuagwu, F.C. and D.A. McGrouther, Early cellular response in tendon injury: the effect of loading. Plast Reconstr Surg, 1998. 102(6): p. 2064-71.
182. Davidson, C.J., et al., Rat tendon morphologic and functional changes resulting from soft tissue mobilization. Med Sci Sports Exerc, 1997. 29(3): p. 313-9.
183. Tsuzaki, M., et al., IL-1 beta induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 beta and IL-6 in human tendon cells. J Orthop Res, 2003. 21(2): p. 256-64.
184. Hata, A.N. and R.M. Breyer, Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. Pharmacol Ther, 2004. 103(2): p. 147-66.
185. Goulet, J.L., et al., E-prostanoid-3 receptors mediate the proinflammatory actions of prostaglandin E2 in acute cutaneous inflammation. J Immunol, 2004. 173(2): p. 1321-6.
186. Murata, T., et al., Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. Nature, 1997. 388(6643): p. 678-82.
187. Tromp, S.C., et al., The influence of prostaglandins on leukocyte-endothelium interactions in rabbit mesenteric venules. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2000. 60(1-3): p. 71-82.
188. Cantarow, W.D., H.T. Cheung, and G. Sundharadas, Effects of prostaglandins on the spreading, adhesion and migration of mouse peritoneal macrophages. Prostaglandins, 1978. 16(1): p. 39-46.
189. Tidball, J.G., Inflammatory cell response to acute muscle injury. Med Sci Sports Exerc, 1995. 27(7): p. 1022-32.
190. Nathan, C.F., Secretory products of macrophages. J Clin Invest, 1987. 79(2): p. 319-26.
191. Vollmar, B., et al., Acceleration of cutaneous wound healing by transient p53 inhibition. Lab Invest, 2002. 82(8): p. 1063-71.
192. Schafer, T., et al., Inhibition of p53 protects liver tissue against endotoxin-induced apoptotic and necrotic cell death. Faseb J, 2003. 17(6): p. 660-7.
193. Galleron, S., et al., Reactive oxygen species induce apoptosis of synoviocytes *in vitro*. Alpha-tocopherol provides no protection. Cell Biol Int, 1999. 23(9): p. 637-42.
194. Nguyen, H.X. and J.G. Tidball, Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells *in vitro*. J Physiol, 2003. 547(Pt 1): p. 125-32.
195. Nagata, M., et al., Apoptosis and p53 protein expression increase in the process of burn wound healing in guinea-pig skin. Br J Dermatol, 1999. 140(5): p. 829-38.
196. Kane, C.D. and D.G. Greenhalgh, Expression and localization of p53 and bcl-2 in healing wounds in diabetic and nondiabetic mice. Wound Repair Regen, 2000. 8(1): p. 45-58.
197. Vousden, K.H. and X. Lu, Live or let die: the cell's response to p53. Nat Rev Cancer, 2002. 2(8): p. 594-604.
198. Raha, S. and B.H. Robinson, Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. Am J Med Genet, 2001. 106(1): p. 62-70.

199. Li, P.F., R. Dietz, and R. von Harsdorf, p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. Embo J, 1999. 18(21): p. 6027-36.
200. Arima, Y., et al., Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. J Biol Chem, 2005.
201. Marchenko, N.D., A. Zaika, and U.M. Moll, Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. J Biol Chem, 2000. 275(21): p. 16202-12.
202. El-Gibaly, A.M., et al., Improvement of rat liver graft quality by pifithrin-alpha-mediated inhibition of hepatocyte necrapoptosis. Hepatology, 2004. 39(6): p. 1553-62.
203. Yuan, J., et al., Apoptosis in rotator cuff tendonopathy. J Orthop Res, 2002. 20(6): p. 1372-9.
204. Maeda, H., T. Okamoto, and T. Akaike, Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. Biol Chem, 1998. 379(2): p. 193-200.
205. Lee, W., et al., Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction *in vivo*: role of active enzyme in human periodontitis. J Periodontal Res, 1995. 30(1): p. 23-33.
206. Van de Louw, A., et al., Neutrophil proteinases in hydrochloric acid- and endotoxin-induced acute lung injury: evaluation of interstitial protease activity by in situ zymography. Lab Invest, 2002. 82(2): p. 133-45.
207. Langberg, H., L. Rosendal, and M. Kjaer, Training-induced changes in peritendinous type I collagen turnover determined by microdialysis in humans. J Physiol, 2001. 534(Pt 1): p. 297-302.
208. Salamone, G., et al., Promotion of neutrophil apoptosis by TNF-alpha. J Immunol, 2001. 166(5): p. 3476-83.
209. Renshaw, S.A., et al., Acceleration of human neutrophil apoptosis by TRAIL. J Immunol, 2003. 170(2): p. 1027-33.
210. Alvarado-Kristensson, M., et al., p38 Mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activities have opposite effects on human neutrophil apoptosis. Faseb J, 2002. 16(1): p. 129-31.
211. Lauber, K., et al., Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. Cell, 2003. 113(6): p. 717-30.
212. Fadok, V.A., et al., Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE_2, and PAF. J Clin Invest, 1998. 101(4): p. 890-8.
213. Huynh, M.L., V.A. Fadok, and P.M. Henson, Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- beta1 secretion and the resolution of inflammation. J Clin Invest, 2002. 109(1): p. 41-50.
214. Gilroy, D.W., et al., Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. Nat Med, 1999. 5(6): p. 698-701.
215. Kampfer, H., et al., Cyclooxygenase-1-coupled prostaglandin biosynthesis constitutes an essential prerequisite for skin repair. J Invest Dermatol, 2003. 120(5): p. 880-90.

216. Wallace, J.L., et al., Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. Gastroenterology, 1998. 115(1): p. 101-9.
217. Iniguez, M.A., et al., Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. Trends Mol Med, 2003. 9(2): p. 73-8.
218. Mazzone, M.F. and T. McCue, Common conditions of the achilles tendon. Am Fam Physician, 2002. 65(9): p. 1805-10.
219. Massimino, M.L., et al., $ED2^{+}$ macrophages increase selectively myoblast proliferation in muscle cultures. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 235(3): p. 754-9.

Annexe 1 :

Inflammation et réparation tendineuse

Inflammation et réparation tendineuse

David Marsolais & Jérôme Frenette

Centre de Recherche du CHUL
Département de Réadaptation
Faculté de Médecine
Université Laval

Adresse de correspondance:

Jérôme Frenette
Centre de Recherche du CHUL
2705 Bould Laurier, RC-9500, Ste-Foy, Québec
Canada G1V 4G2

Med Sci (Paris), 2005. 21(2): p. 181-6.

Résumé

Les tendons contiennent une grande proportion de matrice extracellulaire mais peu de cellules et de vaisseaux sanguins. Par conséquent, le processus physiologique menant à la guérison du tendon lésé dure plus longtemps que pour la plupart des autres tissus. Certains traitements empiriques sont actuellement appliqués dans le but d'accélérer le processus de réparation. Ces approches à saveur dogmatique reposent fortement sur la prémisse que l'inflammation est néfaste et que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont à prescrire durant la phase inflammatoire aiguë ou chronique. Cependant, des données récentes démontrent que certains médiateurs de la réponse inflammatoire sont essentiels à l'organisation du processus de réparation tissulaire. Cet article de synthèse s'attardera donc à la pluralité des rôles des prostaglandines et aux effets des AINS lors des différentes phases du processus de réparation.

Summary

Tendons are extracellular matrix rich structures allowing the transmission of forces generated by skeletal muscles to bones in order to produce movements. Some intrinsic characteristics of tendons, namely hypovascularity and hypocellularity, mainly explain their slow rate of healing. A growing body of evidence suggests that the inflammatory process, essential for pathogen clearance and injury scavenging, may play opposite functions in tendon healing. For instance, inflammation can lead to degradation of intact collagen and to viable cell death thereby increasing the functional deficit and recovery period. Paradoxically, many cellular and subcellular events occurring during the inflammatory response lead to the release of a plethora of growth factors that trigger the healing phase. Prostaglandins are implicated in the inflammatory process and may also contribute to the primary steps of tendon healing. Prolonged administration of non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is a common practice following musculoskeletal injuries. However, there is no clear consensus on the effect of NSAIDs on tendon healing. This review presents a contemporary vision of the inflammatory process following tendon injury and examines the roles of the constitutive and inducible COX-derived prostaglandins. The effect of COX inhibitors will be addressed and special attention will be taken to describe COX-independent effects of these pharmacological inhibitors. Together, this review is an attempt to guide readers toward a more conscientious use of NSAIDs following tendon injuries.

A1.1 Introduction

Quel que soit son degré de complexité, chaque être vivant organise une réaction inflammatoire plus ou moins complexe en réponse à un traumatisme ou à l'invasion d'un intrus. Cette réponse inflammatoire a probablement évolué en fonction de son efficacité à prolonger la survie des espèces aux prises avec un traumatisme comportant une composante infectieuse.

Il semblerait que les cellules inflammatoires activées puissent également provoquer des dommages tissulaires non spécifiques qui pourraient retarder le processus de réparation. Dans les tissus peu vascularisés et à faible concentration cellulaire comme les tendons (Figure 1), le processus de guérison peut s'étendre sur plusieurs mois. Certaines théories stipulent donc que la minimisation des dommages inflammatoires pourrait se traduire par une accélération significative du processus de guérison. De manière contradictoire, plusieurs observations cliniques suggèrent que l'inflammation jouerait un rôle important dans la réparation tissulaire. Les effets contraires de la réponse inflammatoire soulèvent ainsi plusieurs questions. La réaction inflammatoire est-elle optimale pour les blessures de nature aseptique ? Quel est le rôle de chacune des populations de cellules inflammatoires au site lésé? Le recours aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) est-il judicieux et à quel moment ? Qu'implique la modulation de la séquence d'infiltration des différentes populations de cellules inflammatoires ? Dans le but d'élucider l'effet controversé des AINS sur la récupération de la fonction tendineuse post-trauma, divers mécanismes cellulaires et subcellulaires seront abordés en particulier les activités plurivalentes des prostaglandines, la régulation de la dégradation de la matrice extracellulaire, l'induction de la mort cellulaire par le stress oxydatif, les interactions neutrophiles-macrophages, ainsi que les effets propres à chacun des différents AINS. Un regard critique sur l'utilisation des AINS suivant une blessure tendineuse sera présenté avant de conclure cette synthèse.

A1.2 Blessure et réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire vise à combattre l'agent pathogène, à débarrasser le tissu des débris cellulaires et matriciels, à établir un lien avec la réponse immunitaire acquise et à amorcer la réparation tissulaire. Les signaux de danger déclenchés par une altération

tissulaire (figure 2A) activent les cellules sentinelles du tendon, macrophages résidents, fibroblastes et mastocytes, qui libéreront une vaste gamme de molécules pro-inflammatoires (Figure 2B). Parmi ces molécules, il y a plusieurs agents vasodilatateurs principalement libérés par les mastocytes, en particulier les prostaglandines (PGs) qui résultent de la conversion de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases (COXs) constitutive (COX-1) et inductible (COX-2). L'augmentation du débit sanguin local, l'établissement du gradient chimiotactique et l'activation de l'endothélium des vaisseaux sanguins favorisent la transmigration rapide des neutrophiles. Lorsqu'ils sont activés, les neutrophiles roulent puis ils adhèrent infiltrent rapidement le site lésé (Figures 2C et 4A) pour libérer ensuite un arsenal de molécules pro-inflammatoires, parmi lesquels : chimiokines, radicaux libres et protéinases. La libération de radicaux libres de l'oxygène et de l'azote durant cette phase catabolique peut susciter des dommages cellulaires (1), ainsi que l'apoptose des cellules propres au tissu lésé (Figure 2D) (2). Il est donc probable que le stress oxydatif puisse provoquer l'apoptose des ténocytes (fibroblastes tendineux) (3) et ainsi interférer avec le processus de réparation du tendon. Les neutrophiles seront suivis par les monocytes qui infiltreront la lésion pour s'y différencier en macrophages et exercer leurs activités phagocytaires, ainsi que cytotoxiques (Figure 2E). En accord avec le processus évolutif, il semble donc que certains dommages non spécifiques aux cellules du tissu sain soient un prix à payer afin de minimiser le risque d'infection.

La panoplie de molécules libérées en phase inflammatoire causerait également des dommages aux composantes fonctionnelles des tendons. À titre d'exemple, les enzymes de la famille des métalloprotéinases (MMPs) ont la capacité de dégrader différents types de collagène et d'autres composés responsables de la fonction tendineuse. Ces protéinases sont, entre autres fonctions, essentielles à la migration des cellules inflammatoires et au remodelage de la matrice extracellulaire. Les MMPs produites par les cellules inflammatoires ont la capacité de dégrader le collagène *in vitro*. Cette action est potentialisée par la présence de radicaux libres qui activent certaines formes latentes de MMPs (4). L'élastase libérée par les neutrophiles augmente également l'activité de plusieurs MMPs dont la MMP-1 et 3, qui ont la capacité de dégrader le collagène. À l'exception des travaux de Lee et de ses collaborateurs qui établissent un lien entre l'activation des MMPs et la dégradation de la matrice extracellulaire (5), peu de preuves ou

d'observations directes appuient la théorie des dommages non spécifiques *in vivo*. Il semble toutefois clair que différents mécanismes puissent réduire les dommages inflammatoires (Figure 2F). Une surexpression rapide des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs) est observée à la suite d'une agression tissulaire aiguë (6). Ce mécanisme d'auto-régulation pourrait être mis en place dans le tissu tendineux. En effet, différents groupes de recherche ont observé une activation des MMPs et une expression subséquente ou concomitante de TIMPs consécutif à un stress à l'appareil tendineux (7, 8). Certaines observations suggèrent aussi que la tension axiale protège les fibres de collagène contre la dégradation protéolytique (9). Bien que le débat entourant la théorie des dommages inflammatoires ne soit pas clos, des travaux récents montrent que l'accumulation maximale des cellules inflammatoires précède le déficit fonctionnel maximal suivant un traumatisme tendineux aigu (10). Ces observations temporelles suggèrent un surpassement des mécanismes de protection intrinsèques des tendons au cours de la phase inflammatoire (Figure 4A).

A1.3 Résolution de l'inflammation

La résolution de l'inflammation, un processus hautement régulé, est à l'origine de la réparation tissulaire. Après un séjour de 24 à 48 heures, les neutrophiles s'engageront massivement vers la voie de l'apoptose (Figure 3A), en réponse à divers signaux notamment la diminution des messagers de survie, l'activation des «death receptors» et l'inhibition du facteur de transcription nucléaire-κB (NF-κB) par $\Delta 12PGJ_2$ et 15-deoxy$^{-(\Delta 12, \Delta 14)}$-$PGJ_2$ (11). Notons que la PGD_2 et ses métabolites de la famille « J » pourraient également agir comme anti-inflammatoires via l'activation des récepteurs nucléaires PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor). Par la suite, les neutrophiles apoptotiques seront rapidement phagocytés par les macrophages signalant à ces derniers de convertir la synthèse de leurs cytokines pro-inflammatoires vers la synthèse de cytokines anti-inflammatoires. L'ingestion de cellules apoptotiques par les macrophages inhibe la libération de facteur de nécrose tumorale-α (TNF-α), d'interleukine (IL)-8, de facteur de croissance granulocyte-macrophage (GMCSF), d'IL-10, d'IL-1β et de thromboxane A2(12). De plus, l'implantation de cellules apoptotiques dans un site inflammatoire stimule la libération du facteur de croissance transformant-β1 (TGF-β1) (13). Le TGF-β1 stimule la

résolution de l'inflammation, ainsi que la fibrogenèse. Fadok et ses collaborateurs(12) ont montré que la PGE_2 jouait un rôle majeur dans la commutation des cytokines pro-inflammatoires vers la synthèse de cytokines anti-inflammatoires chez les macrophages et que l'administration d'indométhacine pouvait inhiber cette commutation, suggérant ainsi que l'activité des COXs serait importante pour l'amorce du processus de guérison. De récentes observations indiquent qu'une deuxième vague d'expression de COX-2 en phase de résolution de l'inflammation serait associée à la production de PGD_2 (14). La phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages induirait également un arrêt de la prolifération et un prolongement de la survie de ces derniers(15). Il est également connu que les macrophages libéreront une panoplie de facteurs de croissance (Figure 3B) dont le TGF-β1, le facteur de croissance fibroblastique basique (b-FGF) et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), qui sont essentiels pour l'angiogenèse et le démarrage de la réparation tendineuse (Figures 3C-D). Il en découle que la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages, ainsi que l'activité des COXs joueraient des rôles déterminants lors de la résolution de l'inflammation et de la réparation tissulaire. Dans le tendon, tout comme dans la plupart des autres tissus étudiés, les neutrophiles et les macrophages envahissent séquentiellement le site de la blessure et la présence des macrophages persiste bien au-delà de la disparition des neutrophiles (Figure 4A) (16, 17). Il devient de plus en plus évident qu'une perturbation de cette séquence physiologique pourrait se traduire par des effets néfastes sur le processus de réparation du tendon (Figure 3E et 4B).

A1.4 AINS et réparation tendineuse

En dépit du fait que l'efficacité des AINS pour le traitement des pathologies tendineuses et ligamentaires soit parfois mise en doute, ces médicaments demeurent largement prescrits par le corps médical (18). En effet, certaines études ont révélé que les AINS pouvaient améliorer(19), détériorer (20) ou n'avoir aucun effet (10) sur les propriétés biomécaniques suivant un traumatisme tendineux aigu chez l'animal. De nombreux facteurs pourraient expliquer les résultats contradictoires observés, notamment 1- les effets opposés des diverses PGs qui apparaissent à différentes périodes au cours du processus de réparation, 2- la spécificité des AINS pour les différents isoformes des COXs, 3- les modalités

d'administration, 4- les effets secondaires propres à chacun des AINS et, finalement, 5- la région anatomique atteinte. À ce sujet, nous avons observé que le diclofénac diminuait la concentration des cellules inflammatoires seulement dans la région périphérique du tendon, dont la densité vasculaire est 5 à 6 fois plus élevée que la partie centrale (Figure 1). Ce traitement n'avait d'ailleurs aucun effet fonctionnel dans un modèle de tendinopathie chez le rat (10). Une observation relativement constante est que les AINS sont efficaces pour diminuer la sensation de douleur et ce, indépendamment du moment où le traitement démarre. Comme les AINS peuvent influencer une multitude de facteurs clés du processus de réparation, il est encore difficile de statuer de façon définitive sur leur utilité véritable dans le traitement des blessures tendineuses.

Les mécanismes en jeu dans la résolution de l'inflammation seraient mis en branle assez tôt, soit avant la fin de la première semaine suivant une lésion tendineuse (16, 17). De manière contradictoire, il n'est pas rare que des AINS soient prescrits pour une période de dix à quinze jours post-trauma et que le début du traitement soit tardif. Ce chevauchement pourrait perturber la libération d'une panoplie de médiateurs anti-inflammatoires et de facteurs de croissance par différents types cellulaires et en particulier par les macrophages ayant préalablement phagocyté des cellules apoptotiques (Figure 3E). Il est possible que cette perturbation puisse en fin de compte retarder la réparation tendineuse (Figure 4B). Dans un tel scénario, l'inhibition de COX-1 par la mutation de son gène retarderait la réparation tissulaire (21) et l'inhibition de COX-2 prolongerait la phase inflammatoire (22). Des percées récentes en cancérologie (23) ont également permis d'identifier un rôle primordial pour COX–2 dans le processus de l'angiogenèse qui est une condition essentielle à la réparation tissulaire. Ces données sont corroborées par les travaux de Lapointe et de ses collaborateurs (24) qui ont démontré, dans un modèle de blessure musculaire, que le réadaptation à long terme était davantage altérée par un traitement au diclofénac d'une durée de sept jours, que par un traitement échelonné sur deux jours seulement. De plus amples investigations devront cependant être menées pour clarifier le rôle des COXs et des prostaglandines dans le processus de réparation des tissus conjonctifs.

A1.5 Autres effets des AINS

Certains AINS possèdent des effets physiologiques distincts, sans que ceux-ci ne soient nécessairement liés à l'inhibition des COXs. La connaissance de ces mécanismes d'action, c'est-à-dire la connaissance des effets propres à chacune des molécules pharmacologiques, pourrait contribuer à raffiner leur utilisation. À titre d'exemple, Riley et ses collaborateurs (25) ont démontré que l'indométhacine, ainsi que le naproxène altèrent la prolifération cellulaire et la synthèse de protéoglycanes, tandis que le diclofénac et l'acéclofénac n'affectent pas ces processus. L'utilisation d'indométhacine pourrait nuire à la prolifération des ténoblastes mais favoriser la synthèse protéique suggérant ainsi que cet AINS devrait être prohibé durant la phase de prolifération cellulaire et prescrit au cours de la phase de synthèse protéique (26). Les AINS bouleversent également une variété d'événements durant la phase inflammatoire mais les corollaires physiologiques de ces perturbations ne sont pas encore compris. Par exemple, le diclofénac induirait le dépouillement de certaines molécules d'adhésion essentielles à l'infiltration des neutrophiles circulants (27) et réduirait la synthèse de leucotriènes par les macrophages (28). Autre exemple, le diclofénac et l'ibuprophène diminueraient la chimiotaxie des neutrophiles et des macrophages stimulée par le TGF-β1 (29). De surcroît, certains AINS comme le diclofénac et l'indométhacine inhiberaient l'activité d'enzymes capables de dégrader certains médiateurs de l'inflammation comme les lipoxines, tandis que l'ibuprophène, l'acide salicylique, le NS-398, le nimésulide et l'acide nifulmique n'auraient pas cette capacité (30). Ces informations mettent en évidence que les AINS devraient être utilisés avec circonspection et que la fenêtre temporelle qui permettrait un effet optimal sur le processus de réparation tendineux n'est pas encore bien définie. Il semble toutefois de plus en plus clair que les traitements prolongés aient plus de chance d'interférer avec la réparation tendineuse que les traitements se limitant à la phase inflammatoire (Figures 4B et 4C).

A1.6 Conclusion

Plusieurs données scientifiques indiquent que le processus inflammatoire joue un rôle important dans la réparation tissulaire. La modulation de l'inflammation par les AINS fait partie des pratiques médicales depuis plus de cent ans et l'on découvre encore

régulièrement de nouvelles vertus à cette classe de composés chimiques. Le manque de données fondamentales et cliniques concernant la perturbation du processus inflammatoire par les AINS fait en sorte qu'une pratique médicale empirique soit encore privilégiée par de nombreux médecins . Il est maintenant reconnu que l'inhibition prolongée des COXs puisse provoquer des effets délétères sur le processus de réparation tissulaire et que certains AINS altèrent le métabolisme des ténoblastes. L'utilisation d'AINS serait donc indiquée pour les tous premiers instants suivant le traumatisme afin de réduire les dommages inflammatoires non spécifiques (Figures 4A, 4B). Plusieurs résultats rapportés dans cette synthèse indiquent qu'une utilisation inadéquate des AINS pourrait perturber la réparation tendineuse.

A1.7 Remerciements

Nous tenons à remercier le Dr Claude H. Côté pour sa contribution intellectuelle et M. Gilles Chabot pour les illustrations. Les auteurs ont bénéficié du soutien de différents organismes dont le Fonds de recherche en santé du Québec, le Conseil de recherche en sciences naturelles et génie du Canada, la Fondation canadienne pour l'innovation et la Fondation du Dr Georges Phénix.

A1.8 Figures et Légendes

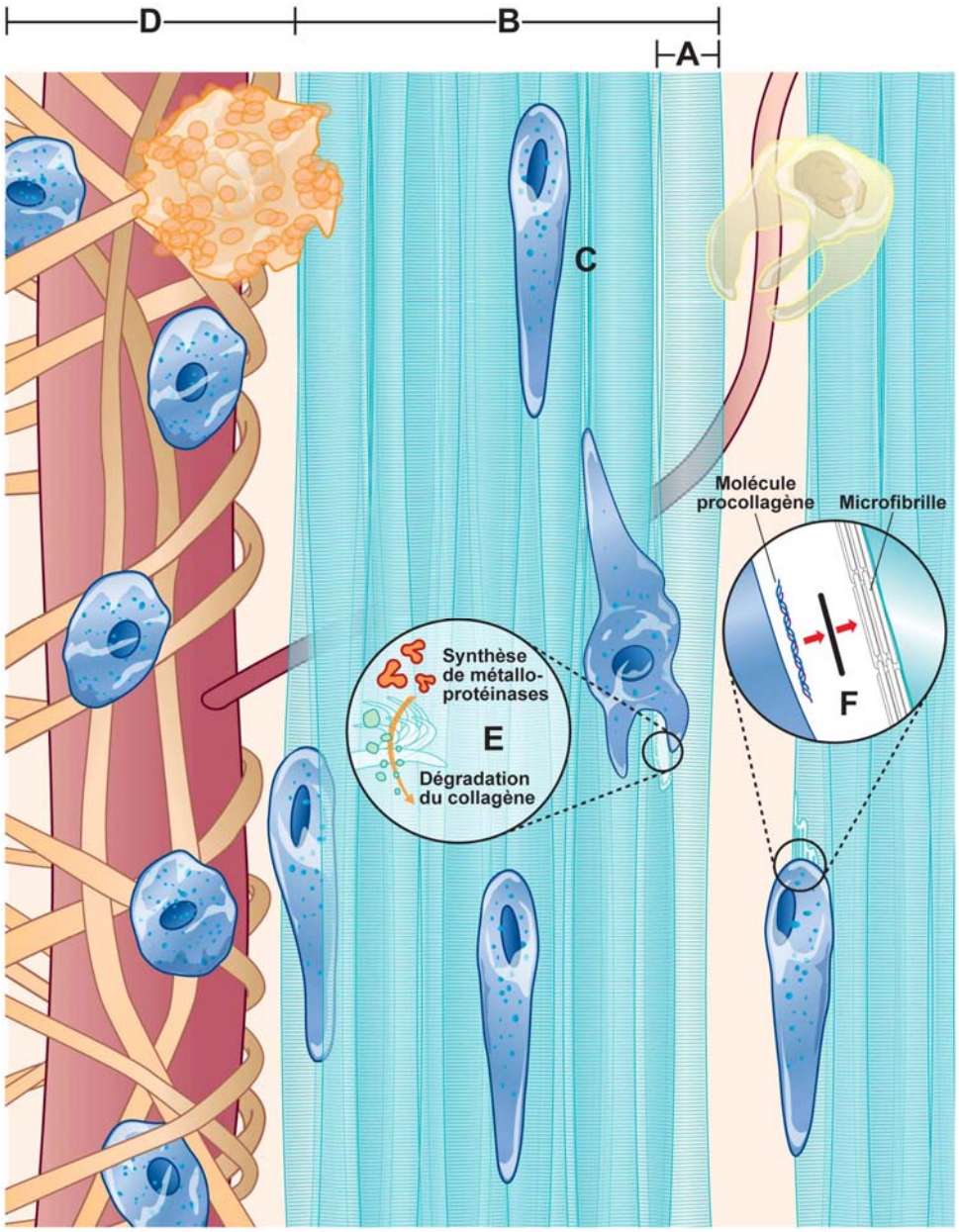

Figure 1 : Homéostasie du tendon d'Achille sain. La matrice extracellulaire du tendon est composée de collagène à 90%, majoritairement de type I. Les fibres de collagène (A) sont regroupées en faisceaux primaires (B) entre lesquels reposent des ténocytes quiescents (C) dont le noyau est fusiforme. En raison de son faible métabolisme, peu de vaisseaux sanguins irriguent la partie centrale du tendon. Le paraténon (D) est constitué de tissu conjonctif lâche parsemé de fibroblastes et de mastocytes. La densité vasculaire du paraténon est 5 à 6 fois supérieure à la partie centrale du tendon. En réponse aux stress mécaniques physiologiques, les ténocytes synthétisent à la fois des métalloprotéinases (E) et/ou des molécules de procollagène (F).

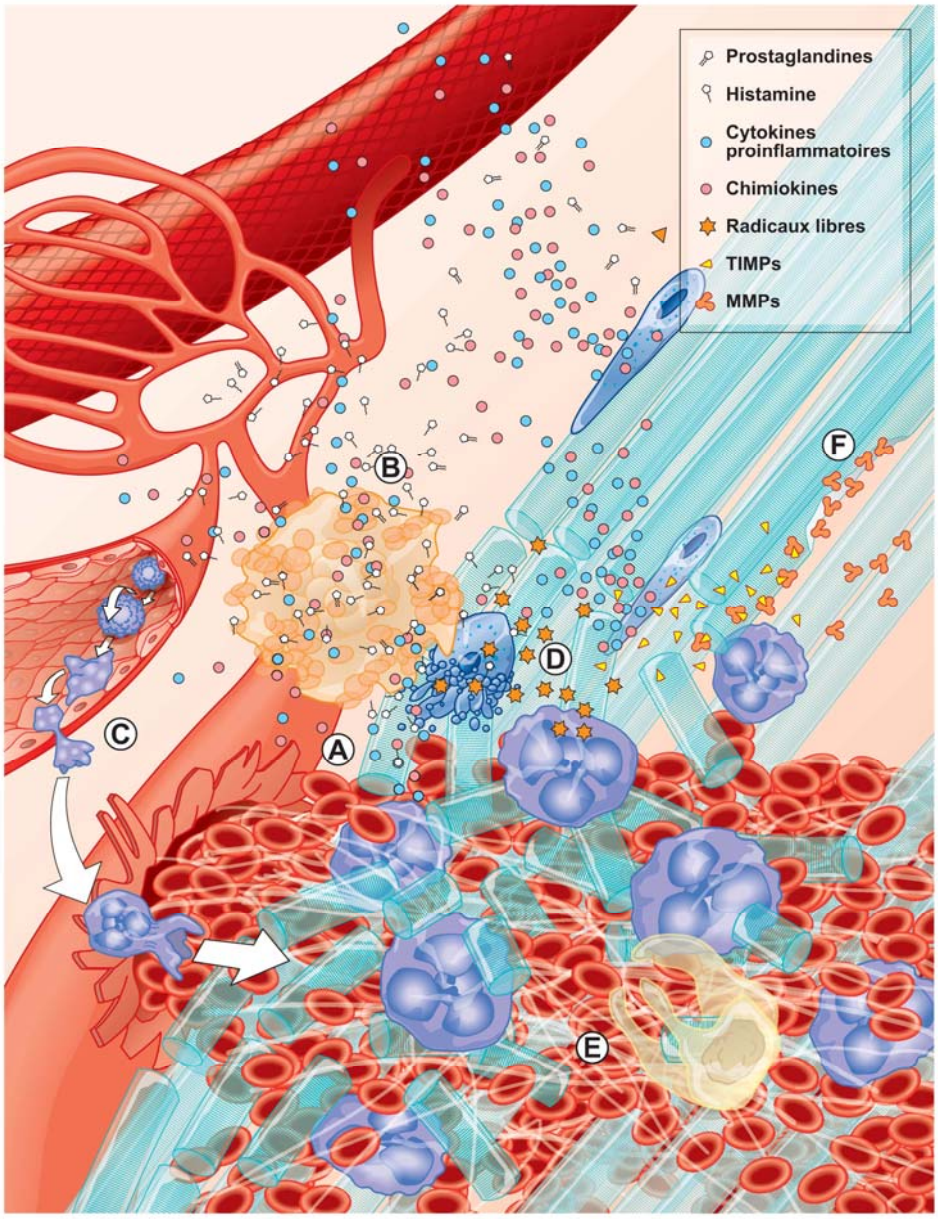

Figure 2 : Événements précoces suivant une blessure tendineuse. Un traumatisme externe entraîne une désorganisation tissulaire et un saignement (A). Des mastocytes sont activés et libèrent une variété de cytokines pro-inflammatoires en particulier l'histamine et différentes prostaglandines (B). En conséquence, les neutrophiles roulent puis adhèrent et infiltrent le site de la lésion (C) où ils libéreront divers médiateurs tels des radicaux libres, qui endommagent les ténocytes (D). Les macrophages, qui sont en nombre inférieur dans les premiers instants suivant la lésion, contribuent à promouvoir l'environnement pro-inflammatoire, phagocytent les débris et libèrent des molécules cytotoxiques (E). Les métalloprotéinases sécrétées par les cellules inflammatoires dégradent la matrice extracellulaire endommagée sans toutefois détruire les fibres saines. Cette dégradation est régulée par la libération de TIMPs (F).

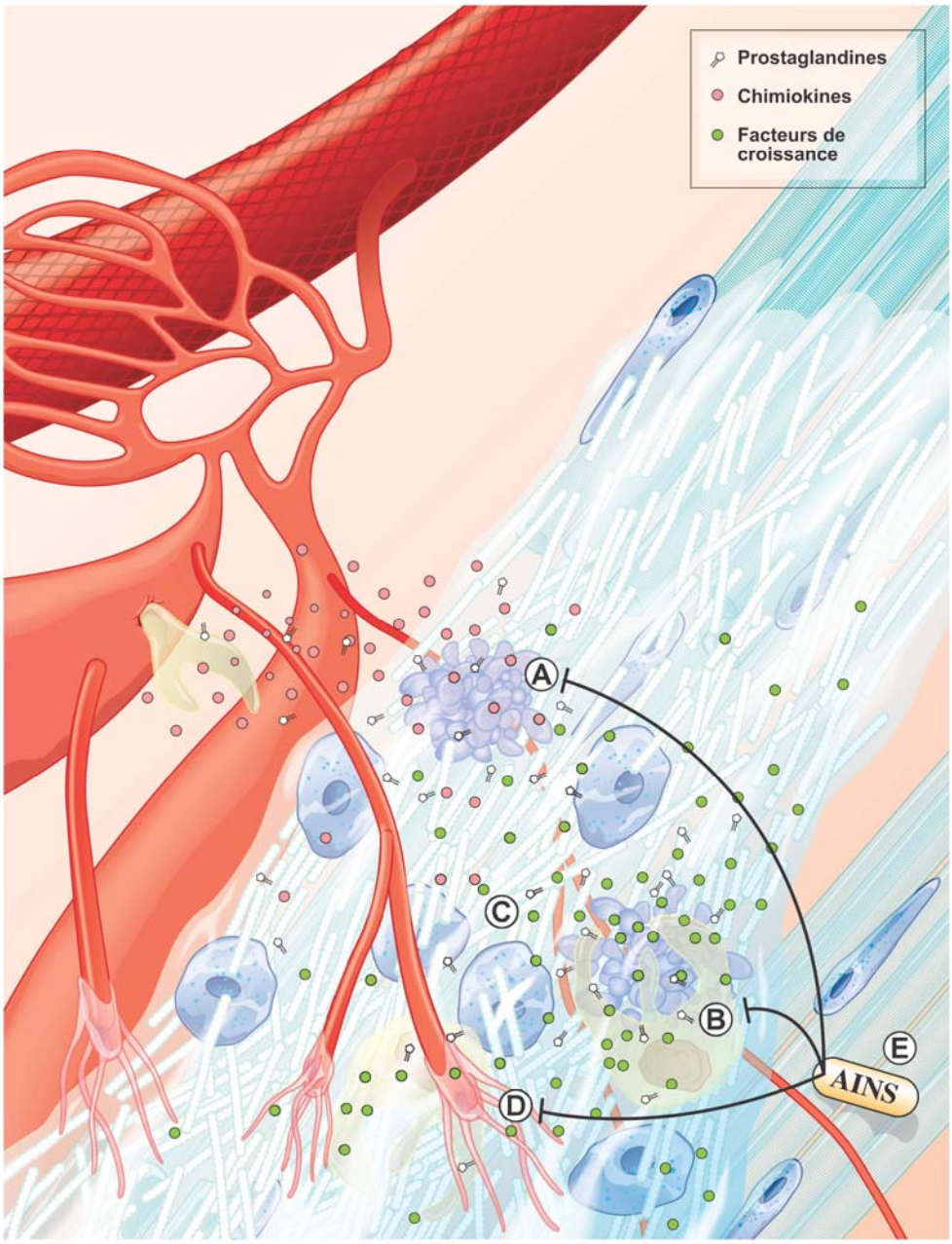

Figure 3 : Résolution de l'inflammation. Les signaux de danger ayant disparu, les neutrophiles entrent en apoptose et sabandonnent des facteurs chimiotactiques pour les macrophages (A). Les macrophages phagocytent les cellules apoptotiques et sécrètent des facteurs stimulant la résolution de l'inflammation, ainsi que le début de la réparation tissulaire (B). En réponse aux facteurs de croissance, les ténocytes prolifèrent et synthétisent une grande quantité de matrice extracellulaire (C) et simultanément, l'angiogenèse est stimulée (D). Les AINS pourraient altérer le processus de la réparation tendineuse en modulant l'apoptose, en diminuant la libération de médiateurs anti-inflammatoires et en inhibant l'angiogenèse (E).

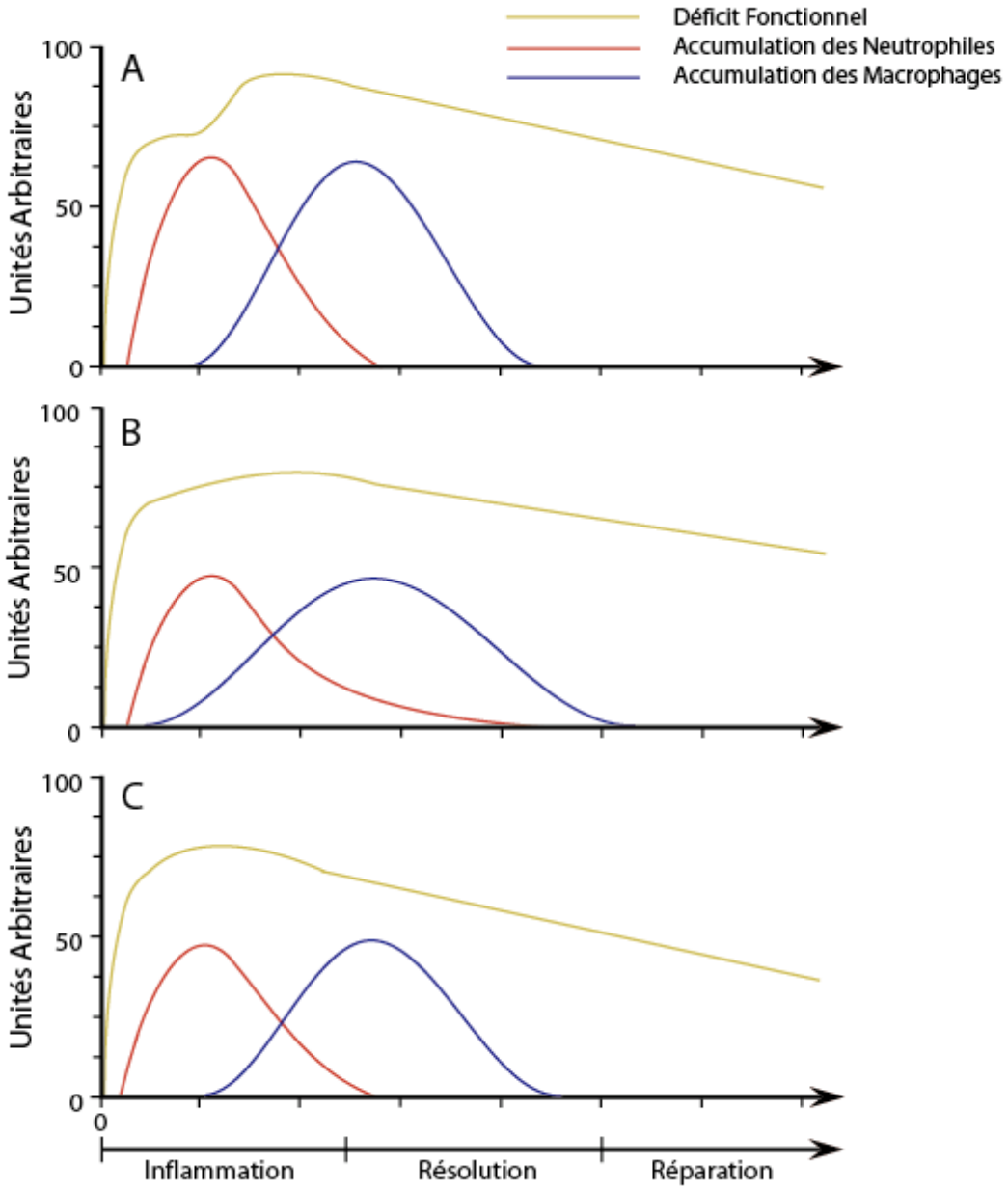

Figure 4 : Effets hypothétiques de différents traitements aux AINS. Les neutrophiles et les macrophages infiltrent de façon séquentielle le tendon traumatisé. Durant cette phase précoce, les cellules inflammatoires pourraient accroître le déficit fonctionnel. La résolution de l'inflammation et la réparation tendineuse seront alors mis en marche et le déficit fonctionnel diminuera graduellement (A). L'administration prolongée et continue d'AINS pourrait interférer avec différents processus de la réparation tissulaire et en fin de compte ralentir la récupération fonctionnelle (B). L'administration d'AINS en phase pro-inflammatoire limiterait les dommages inflammatoires sans interférer outre mesure avec le processus de réparation tendineuse (C). Légende : Jaune, déficit fonctionnel; rouge, accumulation des neutrophiles; bleu, accumulation des macrophages.

A1.9 Références

1. Nguyen, H.X. and J.G. Tidball, Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells *in vitro*. J Physiol, 2003. 547(Pt 1): p. 125-32.

2. Galleron, S., et al., Reactive oxygen species induce apoptosis of synoviocytes *in vitro*. Alpha-tocopherol provides no protection. Cell Biol Int, 1999. 23(9): p. 637-42.

3. Yuan, J., et al., Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblasts. Biochim Biophys Acta, 2003. 1641(1): p. 35-41.

4. Maeda, H., T. Okamoto, and T. Akaike, Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. Biol Chem, 1998. 379(2): p. 193-200.

5. Lee, W., et al., Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction *in vivo*: role of active enzyme in human periodontitis. J Periodontal Res, 1995. 30(1): p. 23-33.

6. Van de Louw, A., et al., Neutrophil proteinases in hydrochloric acid- and endotoxin-induced acute lung injury: evaluation of interstitial protease activity by in situ zymography. Lab Invest, 2002. 82(2): p. 133-45.

7. Langberg, H., L. Rosendal, and M. Kjaer, Training-induced changes in peritendinous type I collagen turnover determined by microdialysis in humans. J Physiol, 2001. 534(Pt 1): p. 297-302.

8. Choi, H.R., et al., Expression and enzymatic activity of MMP-2 during healing process of the acute supraspinatus tendon tear in rabbits. J Orthop Res, 2002. 20(5): p. 927-33.

9. Nabeshima, Y., et al., Uniaxial tension inhibits tendon collagen degradation by collagenase *in vitro*. J Orthop Res, 1996. 14(1): p. 123-30.

10. Marsolais, D., C.H. Côté, and J. Frenette, Nonsteroidal anti-inflammatory drug reduces neutrophil and macrophage accumulation but does not improve tendon regeneration. Lab Invest, 2003. 83(7): p. 991-9.

11. Ward, C., et al., Prostaglandin D2 and its metabolites induce caspase-dependent granulocyte apoptosis that is mediated via inhibition of I kappa B alpha degradation using a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism. J Immunol, 2002. 168(12): p. 6232-43.

12. Fadok, V.A., et al., Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE_2, and PAF. J Clin Invest, 1998. 101(4): p. 890-8.

13. Huynh, M.L., V.A. Fadok, and P.M. Henson, Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- beta1 secretion and the resolution of inflammation. J Clin Invest, 2002. 109(1): p. 41-50.

14. Gilroy, D.W., et al., Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. Nat Med, 1999. 5(6): p. 698-701.

15. Reddy, S.M., et al., Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages induces novel signaling events leading to cytokine-independent survival and inhibition of proliferation: activation of Akt and inhibition of extracellular signal- regulated kinases 1 and 2. J Immunol, 2002. 169(2): p. 702-13.

16. Marsolais, D., C.H. Côté, and J. Frenette, Neutrophils and macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. J Orthop Res, 2001. 19(6): p. 1203-9.

17. Enwemeka, C.S., Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation. Phys Ther, 1989. 69(10): p. 816-25.

18. Mazzone, M.F. and T. McCue, Common conditions of the achilles tendon. Am Fam Physician, 2002. 65(9): p. 1805-10.

19. Dahners, L.E., et al., The effect of a nonsteroidal antiinflammatory drug on the healing of ligaments. Am J Sports Med, 1988. 16(6): p. 641-6.

20. Elder, C.L., L.E. Dahners, and P.S. Weinhold, A cyclooxygenase-2 inhibitor impairs ligament healing in the rat. Am J Sports Med, 2001. 29(6): p. 801-5.

21. Kampfer, H., et al., Cyclooxygenase-1-coupled prostaglandin biosynthesis constitutes an essential prerequisite for skin repair. J Invest Dermatol, 2003. 120(5): p. 880-90.

22. Wallace, J.L., et al., Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. Gastroenterology, 1998. 115(1): p. 101-9.

23. Iniguez, M.A., et al., Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. Trends Mol Med, 2003. 9(2): p. 73-8.

24. Lapointe, B.M., P. Frémont, and C.H. Côté, Adaptation to lengthening contractions is independent of voluntary muscle recruitment but relies on inflammation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. 282(1): p. R323-9.

25. Riley, G.P., et al., Inhibition of tendon cell proliferation and matrix glycosaminoglycan synthesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs *in vitro*. J Hand Surg [Br], 2001. 26(3): p. 224-8.

26. Almekinders, L.C., A.J. Baynes, and L.W. Bracey, An *in vitro* investigation into the effects of repetitive motion and nonsteroidal antiinflammatory medication on human tendon fibroblasts. Am J Sports Med, 1995. 23(1): p. 119-23.

27. Diaz-Gonzalez, F., et al., Prevention of *in vitro* neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. J Clin Invest, 1995. 95(4): p. 1756-65.

28. Kothari, H.V., W.H. Lee, and E.C. Ku, An alternate mechanism for regulation of leukotriene production in leukocytes: studies with an anti-inflammatory drug, sodium diclofenac. Biochim Biophys Acta, 1987. 921(3): p. 502-11.

29. Locatelli, L., et al., Effect of ibuprofen and diclofenac on the chemotaxis induced by substance P and transforming growth factor-beta on human monocytes and polymorphonuclear cells. Int J Immunopharmacol, 1993. 15(7): p. 833-8.

30. Clish, C.B., Y.P. Sun, and C.N. Serhan, Identification of dual cyclooxygenase-eicosanoid oxidoreductase inhibitors: NSAIDs that inhibit PG-LX reductase/LTB(4) dehydrogenase. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 288(4): p. 868-74.

Annexe 2 :

Figures complémentaires

A2.1 Intra-tendinous injection of carrageenan induces massive accumulation of inflammatory cells.

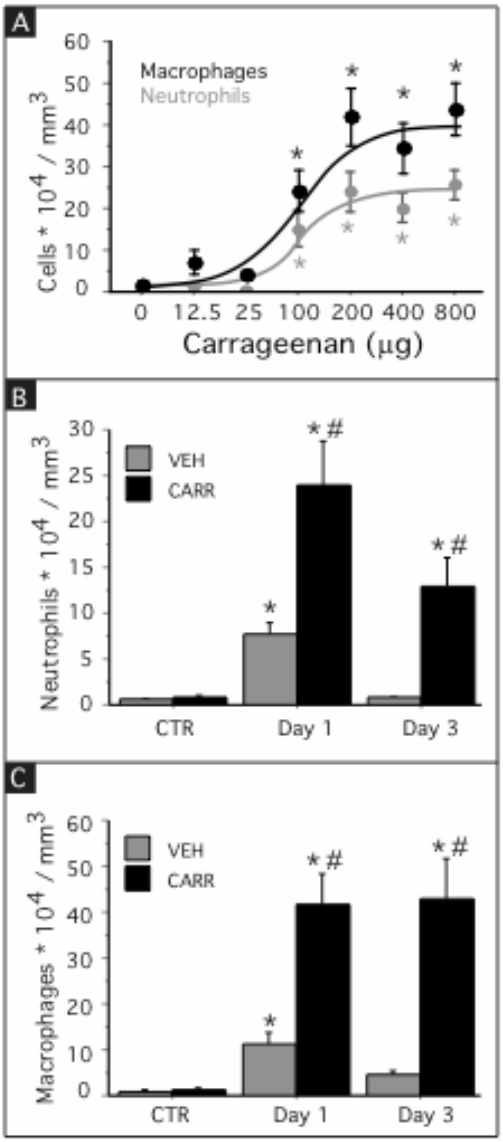

Figure 1: Intra-tendinous injection of carrageenan induces massive accumulation of inflammatory cells. A: Increasing doses of CARR were injected in the Achilles tendons of rats in a final volume of 30 µl. Because of the solubility of CARR, doses 400µg (n=2) and 800µg (n=3) were injected in final volumes of 40µl and 80µl. B&C: Neutrophil and macrophage density in ambulatory CTR tendons, tendons injected with VEH or 200 µg of CARR. Rats were sacrificed 1 and 3 days following the injection. *Significantly different from CTR # Significantly different from VEH. n = 5 to 6 where not specified.

A2.2 Carrageenan injection does not influence tendon hydroxyproline content

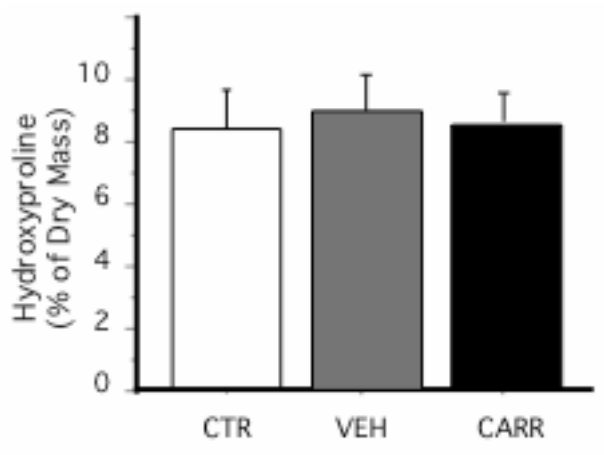

Figure 2: Carrageenan injection does not influence tendon hydroxyproline content. Hydroxyproline content was expressed relatively to dry mass in CTR, VEH- and CARR-injected tendons 3 days following the surgical procedure. n = 6. *Significantly different from CTR #Significantly different from VEH group.

A2.3 Carrageenan injection does not influence biomechanical properties.

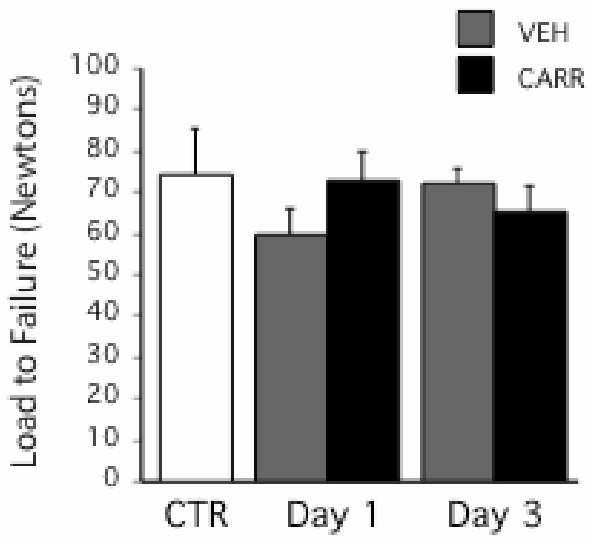

Figure 3: Carrageenan injection does not influence biomechanical properties. Absolute load to failure was measured in CTR, VEH- and CARR-injected tendons 1 and 3 days following the surgical procedure. n = 5 to 7. *Significantly different from CTR # Significantly different from VEH group.