

Ingénierie tissulaire du ligament : polymères dégradables et cellules souches au service de la régénération

Adrien Leroy, Benjamin Nottelet, Xavier Garric, Danièle Noël et Jean Coudane

Résumé À l'interface des sciences des matériaux, de la biologie et de la médecine, l'ingénierie tissulaire a pour vocation de régénérer des tissus lésés, voire détruits. Cette discipline présente un intérêt tout particulier pour la réparation du ligament croisé antérieur, ligament du genou doté d'une faible capacité de cicatrisation. Cet article introduit un projet d'ingénierie tissulaire du ligament reposant d'une part sur la conception d'une matrice de régénération textile à base de polymères dégradables originaux et sélectionnés en fonction de leurs propriétés mécaniques, et d'autre part sur l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses qui, associées à la matrice, doivent permettre la régénération des tissus.

Mots-clés **Ligament, biomatériaux, ingénierie tissulaire, matrice de régénération, polylactide, cellules souches mésenchymateuses, stimulation mécanique.**

Abstract **Ligament tissue engineering: association of degradable polymers and stem cells for regeneration**
At the interface between materials sciences, biology and medicine, tissue engineering is dedicated to the regeneration of wounded or destroyed tissues. This discipline is of particular interest for the anterior cruciate ligament repair, a ligament of the knee with a poor healing capacity. This article introduces a ligament tissue engineering project lying on the one hand on the design of a textile regeneration scaffold based on original degradable polymers selected for their mechanical properties, and on the other hand on the use of mesenchymal stem cells, which in association with the scaffold should allow the regeneration of tissues.

Keywords **Ligament, biomaterials, tissue engineering, regeneration scaffold, polylactide, mesenchymal stem cells, mechanical stimulation.**

Rupture du ligament croisé : à la recherche du remède miracle

Ligaments et tendons jouent un rôle primordial au sein du corps humain et du système musculo-squelettique, en assurant notamment la transmission des forces et la stabilité des articulations. Parmi eux, le ligament croisé antérieur du genou (LCA) est particulièrement sollicité et sa rupture est de plus en plus fréquente. Le vieillissement de la population et l'intensification des pratiques sportives sont à l'origine de la hausse du nombre de déchirures du LCA, la fameuse « rupture du croisé ». La faible capacité de cicatrisation spontanée du LCA a poussé les chirurgiens à développer et améliorer les techniques de réparation qui permettent aujourd'hui d'obtenir de très bons résultats, en particulier grâce aux autogreffes. Ces techniques opératoires consistent à reconstruire le LCA à l'aide de tissus prélevés sur le patient (tendon rotulien, tendons de la patte d'oie). Néanmoins, ces procédures comportent encore des inconvénients, notamment des risques liés au prélèvement du greffon et à la morbidité du site donneur, ce qui motive la quête actuelle vers un substitut ligamentaire idéal.

Avec l'essor des biomatériaux, une première tentative de développement de prothèses synthétiques définitives a été menée dans les années 1980-90. L'omission de la prise en

compte du comportement mécanique à long terme de ces structures a conduit à l'implantation de prothèses bien souvent inadaptées et à de nombreuses ruptures engendrant des complications et nécessitant de nouvelles opérations. Ces dernières années, une nouvelle stratégie ne cherchant plus seulement à remplacer le ligament mais à le reconstruire a vu le jour : il s'agit de l'ingénierie tissulaire [1-2]. Cette discipline d'interface repose généralement sur deux fondements : la conception d'une matrice résorbable qui joue le rôle de support temporaire de régénération, et l'apport cellulaire qui permet la reformation des tissus.

La matrice : un support indispensable

Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, le premier défi pour la reconstruction du LCA réside dans la conception de la matrice. Idéalement, celle-ci doit non seulement favoriser la colonisation cellulaire nécessaire à la formation des tissus, mais aussi être capable de jouer le rôle du ligament pendant sa régénération. En d'autres termes, la matrice doit reproduire au mieux les propriétés mécaniques si particulières du LCA (figure 1) liées à sa structure hiérarchisée constituée, entre autres, de faisceaux de fibres ondulées de collagène.

Pour parvenir à ce résultat, plusieurs stratégies ont d'ores et déjà été explorées [3-5]. Certains polymères naturels

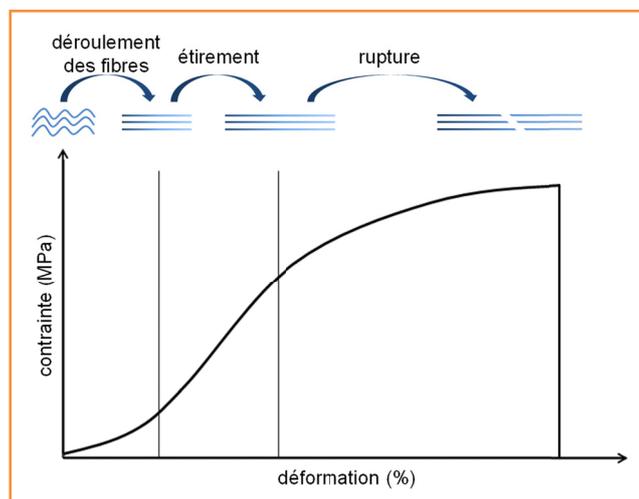


Figure 1 - Profil déformation-contrainte en traction d'un ligament.

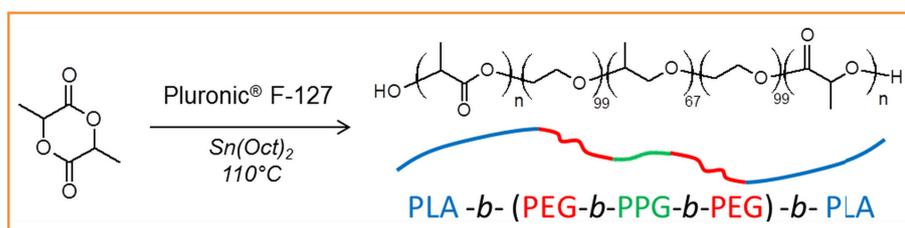


Figure 2 - Synthèse du copolymère à blocs PLA-Pluronic®-PLA.

comme la soie ou le collagène ont conduit à des résultats prometteurs, mais leur comportement mécanique reste souvent éloigné de celui du LCA. Le collagène est par exemple particulièrement sensible à la dégradation, même après avoir été réticulé. Les caractéristiques des polymères synthétiques comme le polylactide (PLA), le polyglycolide (PGA), la poly(ϵ -caprolactone) (PCL) et leurs copolymères sont, quant à elles, plus facilement modulables. À l'instar de certaines équipes travaillant sur cette thématique [5-6], nous avons choisi le PLA comme matériau de base. Historiquement étudié au sein de notre laboratoire, ce polymère très répandu dans le domaine biomédical a la particularité d'être biocompatible et entièrement biorésorbable en milieu physiologique. Nous avons

cependant choisi d'associer par copolymérisation le PLA au Pluronic® F-127, un copolymère de poly(éthylène glycol) (PEG) et de poly(propylène glycol) (PPG). Cette association réalisée grâce à la polymérisation par ouverture de cycle (POC) du lactide amorcée par les hydroxyles terminaux du Pluronic® (figure 2) permet de moduler les propriétés du PLA, polymère rigide et hydrophobe. L'apport des blocs de PEG et PPG donne en effet une certaine flexibilité et permet ainsi de se rapprocher des propriétés mécaniques du LCA tout en augmentant l'hydrophilie du matériau pour moduler la cinétique de dégradation.

Une série de copolymères triblocs PLA-Pluronic®-PLA a été synthétisée en contrôlant les paramètres macromoléculaires critiques (masses molaires, cristallinité et hydrophilie). Une étude de dégradation *in vitro* a été menée afin de sélectionner les meilleurs d'entre eux, en particulier grâce au suivi de l'évolution de leurs propriétés mécaniques au cours de la dégradation [7]. Enfin, le copolymère sélectionné (PLA₉₄-Pluronic®-PLA₉₄, masse molaire de 200 kg/mol)⁽¹⁾ a été mis en forme. Des fibres d'un diamètre de 150 μ m ont été obtenues par micro-extrusion, puis un procédé combinant torsadage et tresage des fibres a permis d'aboutir à une matrice présentant une architecture textile (figure 3).

Les intérêts d'une telle structure sont multiples : l'agencement textile confère aux fibres une certaine mobilité, une capacité à glisser les unes par rapport aux autres qui va engendrer des propriétés mécaniques améliorées, notamment en termes d'élasticité (figure 3). Le profil

mécanique en traction d'une matrice textile est d'ailleurs très similaire à celle d'un ligament (figure 1).

Le moment de vérité : la régénération tissulaire

Le second avantage de l'architecture textile réside dans sa porosité. Il faut garder à l'esprit que la matrice a un rôle temporaire et est destinée à être éliminée de l'organisme. Or la porosité inhérente à cette structure est favorable à la colonisation cellulaire. Afin de mettre cet avantage à profit, ces matrices ont étéensemencées avec des cellules souches mésenchymateuses (CSM). Ces cellules adultes possèdent un vaste potentiel de différenciation, notamment vers le type cellulaire fibroblastique qui est le principal type constitutif des ligaments. Une importante colonisation et prolifération cellulaire au sein de l'architecture textile a été mise en évidence suite à cet ensemencement (figure 4). Après la colonisation cellulaire, une seconde étape a consisté en une stimulation de la différenciation des CSM. Pour cela, un milieu de différenciation favorisant le phénotype ligamentaire a été sélectionné et associé à un dispositif de stimulation mécanique cyclique des matrices. Sous l'effet combiné de ces deux facteurs, nous avons pu constater par RT-qPCR l'expression de marqueurs de différenciation [8], notamment la *ténascine-C*, la *ténomoduline* et *scleraxis*, des protéines caractéristiques de la matrice extracellulaire des fibroblastes ligamentaires.

L'approche retenue en combinant biomatériaux originaux et CSM permet ainsi, en accord avec nos objectifs, d'obtenir un ensemble de propriétés (mécaniques, de dégradation et de prolifération/différenciation)

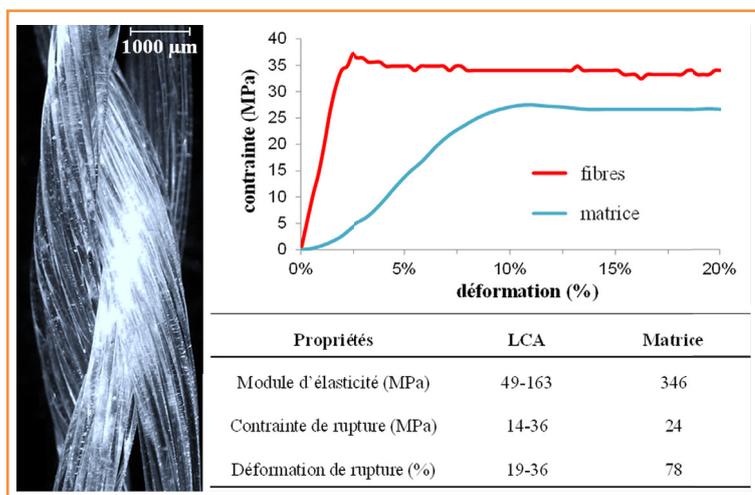


Figure 3 - Une matrice textile et ses propriétés mécaniques.

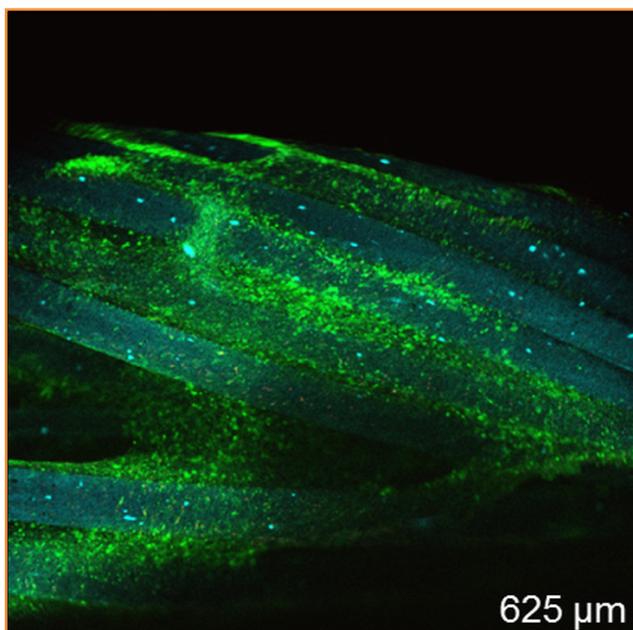


Figure 4 - Marquage fluorescent de CSM colonisant une matrice.

adaptées à la régénération ligamentaire. Nous envisageons pour la suite de ce projet d'effectuer les premières implantations *in vivo* de nos matrices textiles dans le but de confirmer ces résultats.

Les auteurs remercient le Pr Sophie Duquesne (ENSCL) pour la mise à disposition de la micro-extrudeuse, le Dr Benoît Charlot (Institut d'Électronique du Sud) pour la conception du dispositif de stimulation mécanique, ainsi que Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche pour le financement de thèse d'Adrien Leroy.

Note et références

- (1) PLA₉₄ : PLA constitué de 94 % de motifs stéréoisomères L-lactique et 6 % de D-lactique.
- [1] Saxena A., Tissue engineering and regenerative medicine research perspectives for pediatric surgery, *Pediatr. Surg. Int.*, **2010**, 26, p. 557.
- [2] Khademhosseini A., Vacanti J., Langer R., Progress in tissue engineering, *Sci. Am.*, **2009**, 300, p. 64.
- [3] Kew S., Gwynne J., Enea D., Abu-Rub M., Pandit A., Zeugolis D., Brooks R., Rushton N., Best S., Cameron R., Regeneration and repair of tendon and ligament tissue using collagen fibre biomaterials, *Acta Biomater.*, **2011**, 7, p. 3237.
- [4] Rodrigues M., Reis R., Gomes M., Engineering tendon and ligament tissues: present developments towards successful clinical products, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **2012**, 7, p. 673.
- [5] Laurencin C., Freeman J., Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach, *Biomaterials*, **2005**, 26, p. 7530.
- [6] Surrao D., Waldman S., Amsden B., Biomimetic poly(lactide) based fibrous scaffolds for ligament tissue engineering, *Acta Biomater.*, **2012**, 8, p. 3997.
- [7] Leroy A., Pinese C., Bony C., Garric X., Noël D., Nottelet B., Coudane J., Investigation on the properties of linear PLA-ploxamer and star PLA-ploxamine block copolymers for temporary biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C*, **2013**, 33, p. 4133.
- [8] Doroski D., Brink K., Temenoff J., Techniques for biological characterization of tissue-engineered tendon and ligament, *Biomaterials*, **2007**, 28, p. 187.



A. Leroy

Adrien Leroy a réalisé son doctorat au sein de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM)* et de l'U844 (Inserm)**. Il a reçu le **prix de la Société Chimique de France pour sa communication orale** lors du Colloque Recherche de la Fédération Gay-Lussac (Paris, 4-6 décembre 2013).

Benjamin Nottelet (auteur correspondant) est maître de conférences, **Xavier Garric** et **Jean Coudane**, professeurs, à l'IBMM*.

Danièle Noël est directrice de recherche à l'Inserm**.

* Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR CNRS 5247), Département des Biopolymères artificiels, Faculté de Pharmacie, 15 avenue Charles Flahault, BP 14 491, F-34093 Montpellier Cedex 5. Courriels : leroy.adrien@gmail.com ; benjamin.nottelet@univ-montp1.fr

** Unité Inserm 844 - Cellules souches mésenchymateuses, environnement articulaire et immunothérapies de la polyarthrite rhumatoïde, ENSCM, Université Montpellier 1 et Montpellier 2.

Laboratoire Hydrazines et Composés Energétiques Polyazotés (LHCEP)

UMR 5278
CNRS/UCBL/CNES/HERAKLES- SAFRAN

Directeur H. DELALU

Université Claude Bernard Lyon
22, avenue Gaston Berger
69622 Villeurbanne Cedex
Tél. : 04.72.43.26.64
Secrétariat : 04 72 44 84 00
Email : delalu@univ-lyon1.fr

