



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/
Eprints ID : 17532](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 17532)

To cite this version :

Jorieux, Pauline. *Évaluation de la migration de cellules souches mésenchymateuses équine dans un caillot de fibrine riche en plaquette*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 72 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

EVALUATION DE LA MIGRATION DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES EQUINES DANS UN CAILOT DE FIBRINE RICHE EN PLAQUETTE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

JORIEUX PAULINE

Née, le 20 juillet 1990 à Saint-Michel (16)

Directeur de thèse : M. Gabriel CUEVAS RAMOS

JURY

PRESIDENT :

M. Philippe KEMOUN

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :

M. Gabriel CUEVAS RAMOS

M. Isabelle RAYMOND-LETRON

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.

Mise à jour : 06/09/2016

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p>Responsable : M. SANS</p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES-MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VETERINAIRE :</u> M. PICAUVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIOSTATISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

À Monsieur le Professeur Philippe KEMOUN

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier d'Odontologie

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la Présidence du jury de thèse.

À Monsieur le Docteur Gabriel CUEVAS RAMOS

Maître de Conférences de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse - Chirurgie équine

Qui a accepté d'être mon directeur de thèse.

Merci pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, pour votre grande disponibilité et votre réactivité lors de la réalisation de ce projet.

À Madame le Docteur Isabelle RAYMOND-LETRON

Maître de Conférences de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse - Histologie- Anatomie Pathologique

Qui a accepté d'être mon assesseur de thèse.

Sincères remerciements.

Aux personnes ayant participé à la réalisation du projet

Je remercie toute l'équipe de l'IRSD de Purpan qui a permis d'accueillir dans ses locaux les expériences de ce projet. Je remercie particulièrement Marie Pénary pour son aide précieuse, sa compétence et sa disponibilité lors de la réalisation des expériences. Je remercie également Privil Pokharel pour son aide et sa gentillesse.

Je remercie Christian Tasca pour avoir pris le temps de me montrer le fonctionnement du matériel.

Je remercie Béa de la Clinique équine pour sa réactivité et sa disponibilité et pour tous les soins qu'elle procure aux chevaux de l'ENVT

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	4
LISTE DES ABREVIATIONS.....	6
INTRODUCTION	7
Partie I : Les thérapeutiques régénératives dans l'espèce équine : étude bibliographique des concentrés plaquettaires et particulièrement de la Fibrine Riche en Plaquette ainsi que des Cellules Souches Mésoenchymateuses	9
I-Définitions	9
1-Fibrine et inflammation	9
2-Les cytokines	10
II-Fibrine Riche en Plaquette (« Platelet rich fibrin » ou PRF)	11
1-Principes généraux de formation des concentrés plaquettaires	11
A-Historique des concentrés plaquettaires	11
B-Protocole de réalisation des PRP.....	12
C-Composition et usage des PRP	14
2-Un concentré plaquettaire original : le PRF ou Fibrine Riche en Plaquette	15
3-Importance de la centrifugation	17
4-Une composition originale en fibrine et en glycosaminoglycane.....	18
5-Structure et propriétés mécaniques des membranes de PRF	19
6-Une composition originale en plaquettes, cytokines et leucocytes	20
7-Capacités de cicatrisation du PRF	24
8-Applications cliniques	26
III-Les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM)	30
1-Définitions	30
2-Essais cliniques chez le cheval	31
A-Réparation osseuse et cartilagineuse	31

B-Réparations tendineuses	32
3-Mode de culture	34
A- Les CSM dérivées de moelle osseuse	34
B- Les CSM dérivées du tissu adipeux	35
4-Mode de réimplantation.....	36
IV- Notion de « Scaffold »	37
Partie II : Evaluation expérimentale de la migration de Cellule Souche Mésoenchymateuse équine au sein de Fibrine Riche en Plaquette	40
I-Récolte des CSM.....	40
II- Mise en culture des CSM	41
III- Réalisation du PRF	43
IV- Mise en culture d'une suspension de CSM avec du PRF	43
1-Protocole général	43
2-Mise en culture de CSM (quantité= 30×10^4 cellules) et du PRF avec récolte à J3, J8 et J15	45
4-Recoupe des échantillons congelés à J3, J8 et J15 et lecture de lame sous microscopie à fluorescence	49
5-Mise en culture des CSM (quantité= 30×10^4 cellules) et du PRF recoupé avec récolte à J5	50
V-Discussion.....	55
1-Protocole.....	55
A-Qualité des PRF	55
B-Récolte des CSM.....	55
C-Paramètres fixés pour la culture de CSM au sein des puits contenant du PRF.....	56
2-Interprétation des résultats.....	56
A-Qualité des observations	56
B-Migration des CSM dans la fibrine et ses conséquences	57
C-Coloration et marquage des CSM	58
D-Perspectives d'utilisation	59

CONCLUSION	61
ANNEXES	62
Annexe 1 : Liste des différents PRP utilisables dans le commerce d'après Smets et al. 2012	62
Annexe 2 : Protocole de changement de milieu.....	63
Annexe 3 : Protocole de réensemencement des CSM avec trypsination...	63
Annexe 4 : Protocole de coloration des puits de p6 au Giemsa	64
Annexe 5 : Protocole de coloration des lames au DAPI et à la Rhodamine	64
Annexe 6 : Poster présenté au congrès annuel du Collège Européen de Chirurgie.....	65
BIBLIOGRAPHIE	67

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Concept de formation du Plasma Riche en Plaquette (PRP) d'après Dohan et al. 2006a.

Figure 2: Schéma et photo de l'obtention du PRF immédiatement après centrifugation du sang sur tube sec d'après Dohan et al. 2006a.

Figure 3: Modélisation théorique des jonctions de fibrine Dohan et al. 2006a.

Figure 4: Séparation du culot érythrocytaire et du PRF et obtention de la membrane de PRF après élimination du sérum d'après Dohan et al. 2006a.

Figure 5: Coupe histologique en coloration hématoxyline-éosine du PRF d'après Dohan et al. 2006b.

Figure 6: Représentation schématique des différentes parties composant le PRF d'après Dohan et al. 2006b.

Figure 7: Modélisation théorique du réseau de fibrine au sein de 3 types de composés d'après Dohan et al. 2006b.

Figure 8: Coupes histologiques en coloration hématoxyline-éosine de section de tendon sain et cicatriciel d'après Richardson et al. 2007.

Figure 9: Temps idéal de dégradation pour le « scaffold » d'après Koch et al. 2009.

Figure 10: Outils et repères pour la réalisation de ponction de moelle osseuse chez le cheval.

Figure 11: Boîte de cytoculture contenant les CSM dans leur milieu.

Figure 12: Observation microscopique directe (x400, sans coloration) des CSM après 8 jours dans la boîte de cytoculture.

Figure 13: Photographie du contenu d'un tube de sang sec après centrifugation à 140g pendant 10min.

Figure 14: Photographie d'une boîte p6 en cours d'expérience.

Figure 15: Observation microscopique directe à J2 (x400, sans coloration) de PRF mis en culture avec les CSM.

Figure 16: Observation microscopique d'une coupe histologique à J3 (x400, coloration HE) de PRF mis en culture avec des CSM.

Figure 17: Photographies d'un puits contenant le PRF en culture avec les CSM à J3 et J8.

Figure 18: Observation microscopique directe à J3 (x200, coloration Giemsa) de PRF mis en culture avec les CSM.

Figure 19: Observation microscopique directe à J8 (x400, coloration Giemsa) de PRF mis en culture avec les CSM.

Figure 20: Observation microscopique directe à J15 (x400, coloration Giemsa) de PRF mis en culture avec les CSM.

Figure 21: Observation microscopique directe à J15 (x600, coloration Giemsa) de PRF mis en culture avec les CSM.

Figure 22: Observations microscopiques de coupes histologiques à J3 et J15 (x400, coloration DAPI et Rhodamine) de PRF mis en culture avec les CSM.

Figure 23: Observation microscopique directe à J4 (x400, sans coloration) de PRF recoupé longitudinalement mis en culture avec les CSM.

Figure 24: Observations microscopiques de coupes histologiques à J5 (x400, coloration HE) de PRF recoupé longitudinalement mis en culture avec les CSM.

Figure 25: Observation microscopique de coupe histologique à J5 (x400, coloration HE) de PRF percé de trous mis en culture avec les CSM.

Figure 26: Observations microscopiques de coupes histologiques à J5 (x400, coloration avec marqueur Ki-67 et anti-vimentine) de PRF recoupés mis en culture avec les CSM.

Figure 27: Une possible application en tant que « scaffold » du PRF contenant les cellules souches mésenchymateuses.

LISTE DES ABREVIATIONS

CD : Cluster de Différenciation

CSM : Cellule Souche Méenchymateuse

DFDBA : Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

EGF : Epidermal Growth Factor

HE : Hématoxyline- Eosine

IFG : Insuline like Growth Factor

IL : Interleukine

OCT : Optimal Cutting Temperature

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PPP : Platelet Poor Plasma (Plasma Pauvre en Plaquette)

PRF : Platelet Rich Fibrine (Fibrine Riche en Plaquette)

PRP : Platelet Rich Plasma (Plasma Riche en Plaquette)

TGF- β : Transforming Growth Factor bêta

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

VEGF : Vascular endothelial Growth Factor

INTRODUCTION

Les lésions musculo-squelettiques sont très fréquentes chez le cheval, particulièrement les lésions articulaires, tendineuses et ligamentaires. Elles constituent une cause non négligeable de mise à la retraite anticipée chez le cheval de sport. Elles apparaissent néanmoins également dans une population de chevaux non-athlétiques. Le problème de ce type d'affection est qu'elle atteint des entités dont la cicatrisation est difficile : ou bien parce que l'on a affaire à une maladie dégénérative atteignant un tissu qui ne se renouvelle pas ou peu comme c'est le cas dans l'arthrose par exemple, ou bien parce que la lésion entraîne une cicatrisation de mauvaise qualité avec obtention d'un tissu dont les propriétés ne sont pas celles du tissu originel. C'est le cas lors de tendinite par exemple ce qui explique la lenteur de la guérison avec un taux de récurrence élevé.

Plusieurs possibilités et combinaisons de traitements, qu'ils soient conservatifs, orthopédiques, médicamenteux et/ou chirurgicaux s'offrent à nous. Le choix du traitement se fera au cas par cas en fonction de différents facteurs médicaux, environnementaux et économiques. Il est admis qu'un seul type de traitement n'est souvent pas suffisant pour une prise en charge correcte de la maladie ou de la lésion, mais une combinaison adaptée de plusieurs voies thérapeutiques permet une guérison plus efficace. Depuis quelques années de nouvelles thérapeutiques ont fait leur apparition, elles appartiennent à la branche de la « thérapie régénérative ». La médecine régénérative est un domaine de la médecine qui vise à traiter les maladies en remplaçant le tissu endommagé par des cellules ou des tissus créés à partir de cellules souches ou de matériaux biologiques modifiés. L'utilisation des cellules souches mésenchymateuses pour le traitement des lésions musculo-squelettiques commence à être bien connue. Plus récemment, la thérapie régénérative à base de concentré plaquettaire a fait son apparition.

La première partie est une étude bibliographique qui présente l'avènement des concentrés plaquettaires et qui s'intéresse particulièrement à la Fibrine Riche en Plaquette, un concentré plaquettaire récemment mis au point et à la composition originale. Cette partie présente également les Cellules Souches Mésenchymateuses équine et leurs utilisations dans la thérapie locomotrice équine.

La deuxième partie est consacrée à une étude expérimentale où l'on étudie les interactions entre les Cellules Souches Mésenchymateuses équine et la Fibrine Riche en Plaquette lorsque ces deux composés sont mis en culture plusieurs jours. On s'intéresse particulièrement à la migration des cellules au sein du biomatériau en s'appuyant essentiellement sur des

observations qualitatives des cellules au sein de cette Fibrine Riche en Plaquette. Cette partie se termine sur les éventuelles perspectives d'utilisation d'un tel composé dont la construction relève de l'ingénierie tissulaire.

Partie I : Les thérapeutiques régénératives dans l'espèce équine : étude bibliographique des concentrés plaquettaires et particulièrement de la Fibrine Riche en Plaquette ainsi que des Cellules Souches Mésenchymateuses

I-Définitions

1-Fibrine et inflammation

La fibrine est la forme activée du fibrinogène, une molécule fibrillaire soluble présente en grande quantité dans le plasma et dans les granules α des plaquettes et qui joue un rôle déterminant dans l'agrégation plaquettaire durant le processus d'hémostase. Le fibrinogène est le substrat final des réactions de coagulation. Étant une protéine soluble, le fibrinogène se transforme en fibrine insoluble par réaction avec la thrombine et ce gel de polymère de fibrine constitue la première matrice cicatricielle du site lésé, c'est une véritable glue biologique qui est capable de consolider le caillot plaquettaire initial (Dohan et al. 2006a).

L'inflammation est définie comme tout phénomène réactionnel à une agression spécifique. Dans le processus inflammatoire, on peut décrire 3 phases successives : la phase vasculaire, la phase cellulaire et la phase de cicatrisation (Dohan et al. 2006c).

La phase vasculaire est caractérisée par le développement de l'hémostase, soit la constitution d'une matrice cicatricielle en grande partie formée de fibrine. Les processus d'hémostase permettent la coagulation le long des brèches vasculaires par la formation de caillots de fibrine. Le phénomène vaso-exsudatif permet l'extravasation de sérum et l'apport d'anticorps et de cytokine inflammatoire via l'activation du complément.

Enfin le phénomène vaso-exsudatif sur le site lésé permet aux leucocytes de migrer jusqu'au site inflammatoire constituant la couverture anti-infectieuse de la première phase de la guérison : c'est la phase cellulaire. Les premières cellules sont les leucocytes polynucléaires, qui sont remplacés peu à peu par des cellules mononucléaires : par des monocytes ou macrophages à haut pouvoir de phagocytoses et les lymphocytes et plasmocytes qui jouent un rôle dans l'immunité spécifique. La détersion peut être comparée à un nettoyage du foyer lésionnel : c'est l'élimination des tissus nécrosés (issus de l'agression initiale ou du processus inflammatoire lui-même), des agents pathogènes et de l'exsudat. La détersion prépare

obligatoirement la phase terminale de réparation-cicatrisation. Si la détersion est incomplète, l'inflammation aiguë va évoluer en inflammation chronique.

La réparation tissulaire suit une détersion complète. Elle aboutit à une cicatrice si le tissu lésé ne peut être totalement régénéré ou lorsque la destruction tissulaire a été très importante ou prolongée. La réparation peut aboutir à une restitution intégrale du tissu : il ne persiste alors plus aucune trace de l'agression initiale et de l'inflammation qui a suivi. Cette évolution très favorable est observée lors d'agressions limitées, brèves, peu destructrices dans un tissu capable de régénération. Le processus de réparation implique de nombreux facteurs de croissance et des interactions complexes entre les cellules et la matrice extracellulaire pour réguler les proliférations et biosynthèses cellulaires.

2-Les cytokines

Toutes les cellules de la lignée blanche sont activées lorsqu'elles sont sur le site inflammatoire et vont sécréter de nombreuses cytokines. Ces molécules médiatrices de l'inflammation ont un rôle dans le recrutement fibroblastique et stimulent l'activité biosynthétique, on dit également que ce sont des facteurs de croissance (Dohan et al. 2006a).

Les principales cytokines pro-inflammatoires sont :

- les interleukines (IL-1béta et IL-6) dont l'action principale réside en la stimulation de cellules immunitaires à médiation humorale ou à médiation cellulaire,
- les facteurs de nécrose tumorale (TNF α) permettant l'activation des monocytes et stimulant les capacités de remodelage des fibroblastes.

Les principales cytokines cicatrisantes sont :

- l'interleukine 4 (IL-4) par son action inhibitrice des signaux pro-inflammatoires
- le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) qui joue un rôle dans le contrôle du comportement des cellules endothéliales, leur prolifération, leur migration, leur spécialisation ou encore leur survie.

Formées dans la moelle épinière à partir des mégacaryocytes, les plaquettes sont des cellules anucléées et discoïdes de durée de vie de 8 à 10 jours. Leur cytoplasme contient des granules dont le contenu est sécrété lors de l'activation des plaquettes. Les granules contiennent en majeure partie des protéines qui sont plus ou moins spécifiques aux plaquettes. L'activation des

plaquettes est fondamentale pour initier et dérouler le processus d'hémostase permettant l'agrégation au site lésé et les interactions avec les autres mécanismes de la coagulation. La dégranulation permet également de préparer les premières étapes de la cicatrisation par le relargage des cytokines qui sont des molécules clés dans la stimulation de la migration et de la prolifération cellulaire (Dohan et al. 2006b).

Les cytokines plaquettaires sont les suivantes :

-Transforming Growth Factor (TGF β) est un agent de fibrose dont les effets sont dépendants de la quantité présente de ce facteur. Le TGF est considéré comme un régulateur de l'inflammation de par ses capacités à induire une cicatrisation fibreuse.

-Platelet Derived Growth Factor (PDGF) est un agent stimulant les lignées cellulaires mésenchymateuses. C'est un régulateur de la migration, de la prolifération, et de la survie des cellules mésenchymateuses. Ce facteur joue un rôle essentiel dans les mécanismes de cicatrisation physiologiques et pathologiques comme l'athérosclérose ou autres maladies fibroprolifératives.

-Insuline Like Growth Factor (IFG) est un agent positif de la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. L'IFG est le principal agent de régulation de la mort cellulaire programmée (apoptose), induisant un signal de protection cellulaire bloquant les stimuli d'apoptose. Même si les IGF sont libérées lors de la dégranulation plaquettaire, elles sont initialement massivement présentes dans la circulation sanguine.

II-Fibrine Riche en Plaquette (« Platelet rich fibrin » ou PRF)

1-Principes généraux de formation des concentrés plaquettaires

A-Historique des concentrés plaquettaires

A l'origine, on utilisait en médecine humaine les concentrés plaquettaires pour la prévention ou le traitement des hémorragies dues à une thrombopénie sévère (souvent causées par des aplasies médullaires). C'est ce premier concentré plaquettaire que l'on a nommé Platelet Rich Plasma (PRP) ou Plasma Riche en Plaquette.

Il y a une quarantaine d'années, on a utilisé pour la première fois des produits de dérivés sanguins tels que les colles de fibrine (« fibrin glue »). L'utilisation clinique de ces colles s'est

limitée pendant de nombreuses années au traitement des hémorragies micro-vasculaires en chirurgie cardio-thoracique et vasculaire. Les colles de fibrine sont uniquement efficaces pour contrôler des foyers de saignement lents et diffus et ne peuvent remplacer les techniques conventionnelles d'hémostase dans les hémorragies artério-veineuses. De nouvelles indications apparaissent en chirurgie plastique et générale pour le scellement des plaies et des revêtements cutanés. Leur intérêt est d'éviter la formation de cicatrices chéloïdes. Les chirurgiens constatent que ces colles de fibrine accélèrent le processus de cicatrisation cutanée. Dans l'ensemble les colles ont deux principales fonctions : l'adhérence aux tissus et la biodégradabilité.

Face au risque de transmission de maladies, les colles de fibrine sont interdites aux États-Unis dès 1978. La gestion des risques s'améliore grâce à l'apparition de colles thermotraitées comme le TISSEEL® (BAXTER) mais un risque de transmission viral demeure présent. Dès lors, les tentatives de mise au point de colles de fibrine autologues sont de plus en plus nombreuses, mais avec des succès mitigés. En effet, il est difficile d'obtenir des taux de fibrinogène élevés sans un protocole complexe avec un coût élevé (Simonpieri et al. 2006).

Puis, il a été proposé par Whitman (Whitman et al. 1997) de remplacer l'utilisation de colle de fibrine par des concentrés plaquettaires sous forme de gel (« platelet gel ») pour améliorer la cicatrisation des plaies. Suite à cela, de nombreux protocoles de réalisation de concentrés plaquettaires que l'on a appelés communément PRP ont été mis au point : une utilisation plus systématique du PRP est possible avec un accès à de nombreux kits du commerce. L'utilisation de tels produits s'est avérée plus facile : un protocole simple et rapide qui peut être réalisé avant une opération chirurgicale par exemple.

B-Protocole de réalisation des PRP

De nombreuses techniques de PRP sont utilisables, elles ont en commun les grands principes de fabrication : du sang est collecté avec un anticoagulant, il est immédiatement centrifugé à vitesse lente (« soft spin »). On obtient 3 phases :

- un culot avec les globules rouges qui constituent 55% environ du volume total
- au milieu, le « buffy coat » avec le concentré de plaquettes qui constitue 5% environ du volume mais qui représente une partie majeure du futur PRP
- un surnageant acellulaire appelé PPP pour Platelet Poor Plasma qui contient des molécules plasmatiques circulantes (en particulier le fibrinogène) qui représente 40% environ du volume.

L'étape suivante varie selon le protocole, elle permet globalement de jeter le culot de cellules rouges et de ne garder que le « buffy coat » ainsi qu'une partie du PPP qui sont alors transférés dans un tube sans anticoagulant (l'anticoagulant étant déjà mélangé à l'échantillon). Une nouvelle étape de centrifugation un peu plus forte et plus longue (« hard spin ») est réalisée ce qui permet de concentrer les plaquettes. On obtient à nouveau 3 phases :

- Au fond du tube, un culot de globule rouge résiduel
- Au milieu, le « buffy coat » riche en plaquette
- un surnageant acellulaire qui fait 80% environ du volume total

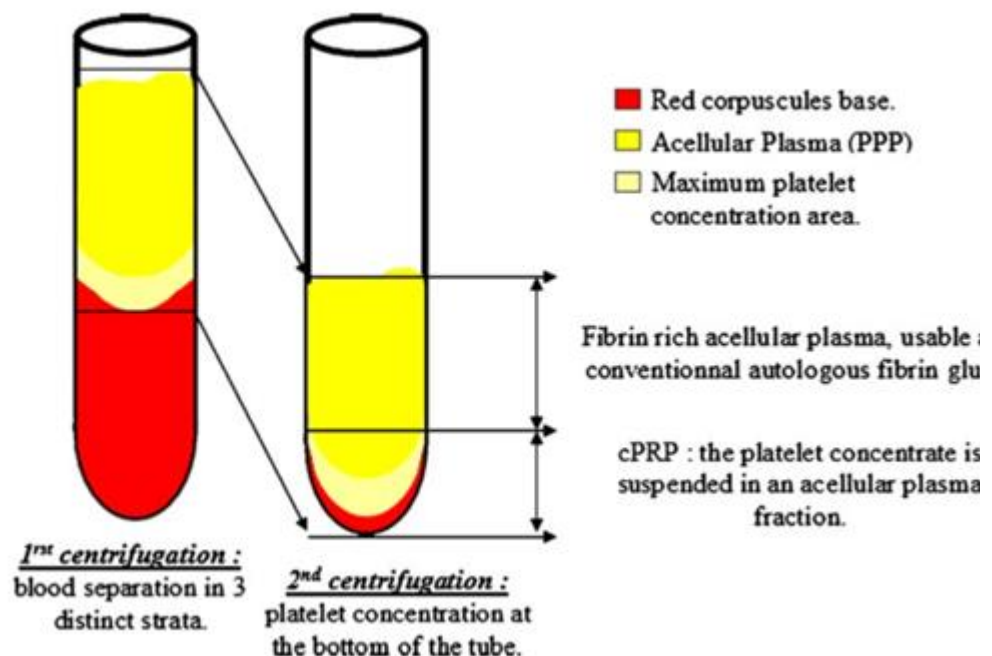


Figure 1 : Concept de formation du Plasma Riche en Plaquette (PRP) d'après Dohan et al. 2006a.

Une première centrifugation permet la séparation en 3 strates, le « buffy coat » et le PPP sont gardés pour subir une deuxième centrifugation permettant d'obtenir le PRP.

Il est, à cette étape, plus facile de récupérer le « buffy coat » qui sera mis en suspension avec du surnageant résiduel pour obtenir le PRP. Enfin le PRP peut être mélangé avec de la thrombine bovine ou avec du chlorure de Calcium juste avant son utilisation, ce qui permet une activation des plaquettes avec libération de facteurs plaquettaires et la polymérisation du fibrinogène qui se transforme en une matrice de fibrine (Dohan et al. 2006a).

On trouve actuellement sur le marché de nombreux kits du commerce qui permettent une réalisation de PRP rapide. Les protocoles varient selon les laboratoires qui les fabriquent (par exemple une centrifugation simple ou double selon les cas), mais les grands principes de formation ont été présentés dans ce paragraphe. Dans l'article Smets et al. 2012, on retrouve un tableau exhaustif présentant les types de PRP disponibles dans le commerce (Cf Annexe 1).

C-Composition et usage des PRP

Le PRP exerce son effet biologique par l'activation et la dégranulation des plaquettes. Les granules α des plaquettes sont abondants et présentent un intérêt particulier, car ils contiennent un grand nombre de facteurs de croissance. Les facteurs de croissance TGF- β , PDGF, VEGF sont quelques-uns des facteurs de croissance libérés. Il a été montré que ces facteurs de croissance jouent un rôle important dans toutes les phases de la cicatrisation. La sécrétion active de ces protéines par les plaquettes commence dans les 10 minutes après la coagulation, avec plus de 95% des facteurs de croissance pré-synthétisés et sécrétés en 1 heure. Après cette explosion initiale, les plaquettes synthétisent et sécrètent des protéines supplémentaires pour les 5 à 10 jours suivants (Sutter, 2007). La matrice de fibrine formée suite à l'activation des plaquettes permet ensuite une libération lente des facteurs de croissance tout en fournissant une matrice provisoire qui apporte un support physique pour la migration cellulaire.

Les premiers essais thérapeutiques dans l'espèce équine du PRP ont été réalisés pour les traitements des plaies cutanées. Les facteurs de croissance exercent un effet stimulant sur la cicatrisation des plaies et la matrice de fibrine est un support pour les fibroblastes qui colonisent les lésions. En 2003, Carter et ses collaborateurs ont comparé l'évolution de plaies de pleine épaisseur chez le cheval traitées avec du gel de PRP sous compresse et pansement ou traitées avec des applications de solution saline sous compresse et pansement ou bien traitées avec compresse et pansement seuls. L'étude porte jusqu'à 79 jours après l'initiation du traitement et les auteurs concluent que le traitement des plaies avec du gel de PRP a induit une accélération de la différenciation épithéliale et produit un tissu de cicatrisation où les fibres de collagène sont mieux organisées (Carter et al. 2003).

Le PRP est actuellement « classiquement » utilisé dans la régénération du tissu tendineux à la suite d'une tendinite. Il existe de nombreuses études chez le cheval ou chez l'homme à des échelles plus ou moins importantes qui concluent à une efficacité du PRP, présentant parfois même des résultats miraculeux, et ne rapportant quasiment jamais d'effet secondaire quant à

son utilisation. Smets et ses collaborateurs rapportent que le PRP est à l'origine d'une stimulation de l'angiogenèse, du remodelage et de la cicatrisation tissulaire, des phénomènes capitaux étant donné que les tendons ne présentent pas un index métabolique élevé et que leur capacité de guérison et de régénération est lente. L'utilisation de PRP serait donc à l'origine d'une accélération dans les processus de guérison et de régénération. Par ailleurs, les plaquettes réduiraient les phénomènes douloureux, par des mécanismes encore inconnus, mais nécessitant d'être étudiés. L'hypothèse admise à ce jour serait la libération de protéases aux propriétés antalgiques par les plaquettes (Smets et al. 2012). La plupart des études concernant le sujet démontrent une amélioration de la symptomatologie suite au traitement par PRP sur les lésions tendineuses, mais les nombreux biais introduits en raison par exemple du manque d'effectif, de l'absence de groupe témoin ou encore du type variable de produit utilisé ne leur confèrent pas un niveau d'évidence assez élevé. À ce jour donc, les résultats obtenus in vivo ne permettent pas de recommander formellement l'utilisation du PRP dans le cadre du traitement des tendinopathies (Smets et al. 2012).

Même si les lésions tendineuses restent la principale indication d'utilisation du PRP dans l'espèce équine, des études plus récentes tentent d'évaluer son efficacité dans le traitement de lésions musculo-squelettiques au sens large et notamment en injection intra articulaire lors d'arthropathie dégénérative avec des résultats encourageants (Pichereau et al. 2013).

Les conclusions de l'article de Brossi en 2015 vont également dans ce sens. Cet article est une revue des différentes publications sur l'utilisation du PRP dans le traitement des lésions musculo-squelettiques chez l'homme ou le cheval depuis juillet 2013. La plupart des études expérimentales rapportent un effet positif du PRP sur ce type de lésions. La majorité des études cliniques équines prônent ses résultats positifs alors que les essais cliniques rigoureux en médecine humaine ne permettent pas de conclure quant à l'efficacité du PRP. Dans les deux espèces, les effets positifs du PRP sont plus fréquemment observés dans les études où un fort biais est présent (Brossi et al. 2015). L'avenir du PRP devra donc passer par une standardisation dans la fabrication de celui-ci ainsi que par la réalisation de protocoles d'études standards permettant de comparer les futurs travaux.

2-Un concentré plaquettaire original : le PRF ou Fibrine Riche en Plaquette

Dohan et al. 2009 ont publié une classification des différents concentrés plaquettaires en fonction de 2 critères : leur contenu en leucocyte et en fibrine. Il en ressort 4 groupes :

1) P-PRP (pure platelet rich plasma) : pauvre en leucocyte et en fibrine

- 2) L-PRP (leucocyte and platelet rich plasma) : riche en leucocyte et pauvre en fibrine
- 3) P-PRF (pure platelet rich fibrin) : pauvre en leucocyte et riche en fibrine
- 4) L-PRF (leucocyte and platelet rich fibrin) : riche en leucocyte et en fibrine ; c'est ce dernier qui nous intéressera par la suite que l'on notera simplement PRF dont l'abréviation française signifie Fibrine Riche en Plaquette.

Ce dernier concentré plaquettaire, le PRF, est le plus récemment développé par Choukroun. Le protocole est simplifié au maximum : le sang est récolté sans anticoagulant sur tube sec et est immédiatement centrifugé (tube de 10ml centrifugé pendant 10min, à 3000 rpm soit approximativement 400g à température ambiante). Un processus naturel de coagulation s'effectue et on peut recueillir facilement après la centrifugation un caillot de fibrine riche en plaquette et en leucocyte (Dohan et al. 2006a).

Quelle que soit la nature du contenant, du verre ou du plastique avec des particules de silice, cela n'affecte pas l'architecture ni la qualité du PRF (Dohan et al. 2010). L'absence d'anticoagulant permet l'activation des plaquettes dès que celles-ci sont en contact avec les parois du tube et c'est le taux de thrombine circulante naturellement présente dans le plasma qui permet une polymérisation du fibrinogène en fibrine (il n'y a pas de rajout de thrombine bovine).

C'est une technique extrêmement simple à réaliser, facilement reproductible et peu coûteuse.

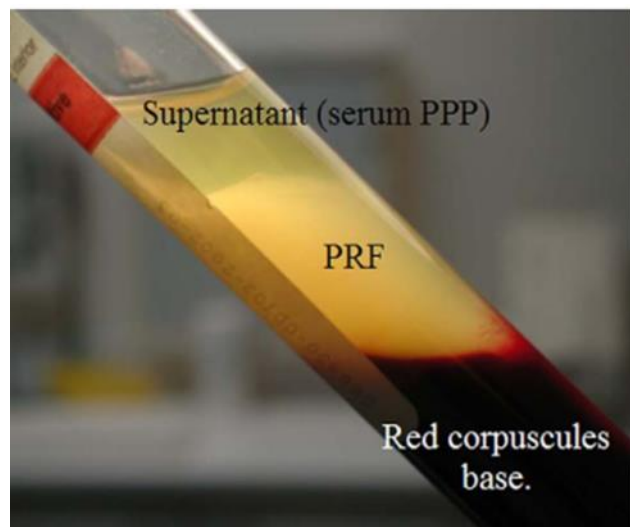
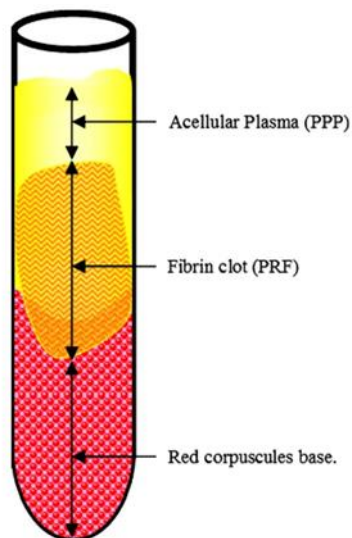


Figure 2 : Schéma et photo de l'obtention du PRF immédiatement après centrifugation du sang sur tube sec d'après Dohan et al. 2006a.

Après la centrifugation du tube, on obtient trois phases : un culot érythrocytaire en rouge, un surnageant acellulaire et au milieu le PRF de coloration jaune.

3-Importance de la centrifugation

La force de centrifugation g se calcule de la manière suivante :

$$g = w^2 r = 1,119 \times 10^{-5} \times r \times n^2$$

- w : vitesse angulaire (rad/s)
- r : distance à l'axe de rotation
- n : nombre de rotations par minute (rpm).

L'interprétation de cette équation, permet de comprendre que la force de centrifugation ne s'exerce pas de la même manière d'un bout à l'autre du tube, plus on s'éloigne de l'axe de rotation, plus la force de centrifugation est importante ; c'est pour cela qu'il faut raisonner en termes de force moyenne ou relative. Chaque rotor a une force de centrifugation différente, car le rayon de rotation est différent. Ainsi la force de centrifugation maximale se calcule avec le rayon au fond du tube, la force moyenne avec le rayon au milieu du tube et la force minimale avec le rayon au sommet du tube. Généralement, lorsqu'aucune indication n'est donnée, on utilise le rayon au fond du tube.

Certaines plaquettes sont piégées entre les hématies : pour affiner la séparation, il faudrait augmenter la force de centrifugation, si cette dernière est trop importante, un pourcentage conséquent de plaquettes va s'activer et libérer immédiatement les facteurs de croissance. A

400g le pourcentage d'activation des plaquettes est de l'ordre de 5 % seulement contre 40 à 70% à 3000g. Les protocoles essayent donc de maintenir des forces modestes comprises entre 160 g et 800 g. Il en est de même pour les temps de centrifugation, ces derniers doivent rester suffisamment longs pour permettre la séparation des éléments sanguins, soit environ une dizaine de minutes, mais un temps de centrifugation excessif entraîne une activation des plaquettes. Il existe peu de corrélation entre les critères de centrifugation et la qualité des concentrés plaquettaires. Les différences entre les qualités des PRF s'expliqueraient davantage par les grandes variations interindividuelles qui existent dans la constitution du sang (Simonpieri et al. 2005).

4-Une composition originale en fibrine et en glycosaminoglycane

La densité du réseau de fibrine est en grande partie déterminée par la concentration en fibrinogène lors de la préparation du concentré plaquettaire. La plupart des concentrés plaquettaires aboutissent à des gels de densité faible en fibrine dont la matrice de fibrine manque de support. Au contraire, avec un réseau de densité élevé en fibrine, comme c'est le cas pour le PRF, on obtient un biomatériau solide.

Il existe deux modes architecturaux de polymérisation de la fibrine (Figure 3) : une condensation tétramoléculaire (ou encore jonctions bilatérales) ou une condensation trimoléculaire (ou encore jonctions équilatérales). Les jonctions bilatérales sont provoquées par une activation intense du fibrinogène (lors d'un fort taux de thrombine par exemple) et une forte polymérisation de la fibrine qui mènent à un réseau dense en monofibre similaire à des glues de fibrine, réseau qui n'est pas particulièrement favorable à l'enchevêtrement des cytokines et au support de la migration cellulaire.

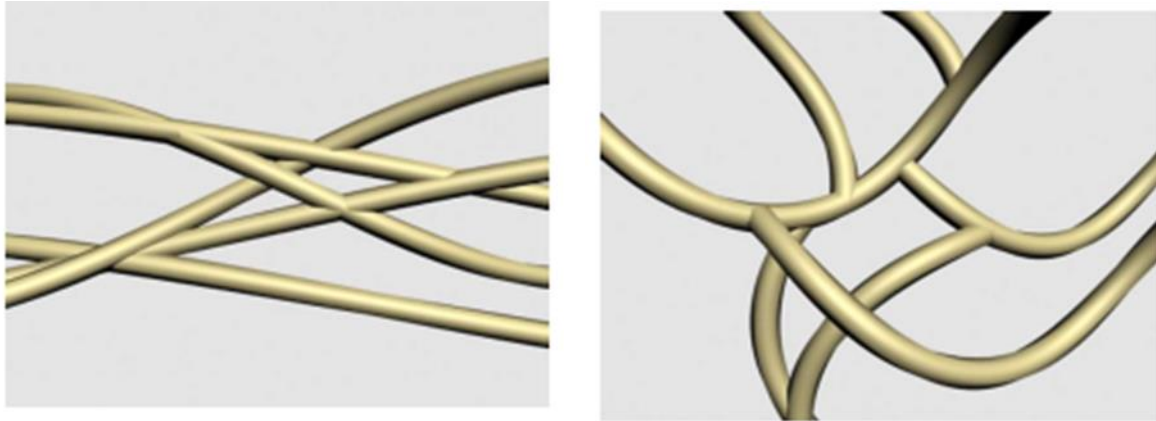


Figure 3 : Modélisation théorique des jonctions de fibrine d'après Dohan et al. 2006a.

La modélisation de jonctions tétramoléculaires ou bilatérales est à gauche et celle de jonctions trimoléculaires ou équilatérales est à droite.

Dans le cas du PRF, la polymérisation physiologique lente du fibrinogène en fibrine conduit à un fort pourcentage de jonction équilatérale qui permet l'obtention d'un réseau de fibrine flexible permettant une association avec des cytokines et une bonne migration cellulaire (Dohan et al. 2006a ; Dohan et al. 2009).

Un des grands intérêts de la matrice du PRF, c'est son enchevêtrement avec des glycosaminoglycanes (GAG tels que l'héparine, l'acide hyaluronique). En coupe histologique, les GAG suivent rigoureusement l'architecture des fibres de fibrine, ce qui signifie que les GAG sont incorporés aux polymères de fibrine. L'intérêt de ces GAG réside dans le fait qu'ils ont une forte affinité pour des molécules plasmatiques circulantes telles que les cytokines et améliorent les possibilités de migration cellulaire et les procédés de cicatrisation (Dohan et al. 2006b).

5-Structure et propriétés mécaniques des membranes de PRF

Lorsqu'il se forme, le caillot de fibrine est gorgé de sérum, et si l'on évacue ce sérum (PRF laissé 10min à l'air libre posé dans une boîte de pétri), on obtient une membrane de fibrine flexible, élastique et très résistante. D'après Dohan et al. 2010, une élimination passive du sérum ou active avec compression du PRF suite à sa récolte ne change pas l'architecture de la membrane de fibrine.

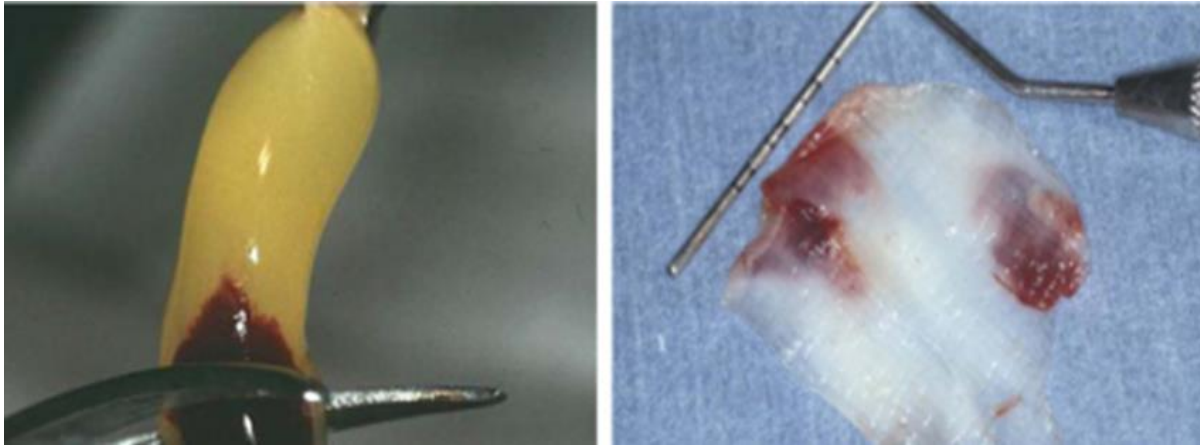


Figure 4 : Séparation du culot érythrocytaire et du PRF et obtention de la membrane de PRF après élimination du sérum d'après Dohan et al. 2006a.

Sur l'image de gauche on sépare par incision la partie érythrocytaire du PRF, si on laisse 10 minutes à l'air libre le PRF on obtient une membrane rigide suite à l'élimination du sérum que l'on voit sur l'image de droite.

Dans l'article de Textor et al. 2014, on étudie la taille des pores et le diamètre des fibres de fibrine au sein de gel de fibrine riche en plaquette équin où la concentration en plaquette est un paramètre que l'on fait varier. Pour construire un tel biomatériau, des gels de fibrine autologue sont élaborés à partir de sang d'équin et il est additionné du PRP avec des concentrations en plaquette définies pour obtenir ces gels de fibrine à concentration plaquettaire variable. Il semblerait que plus la concentration en plaquette est grande plus la taille des fibres augmente et plus les pores sont petits, ainsi la présence de plaquettes altère la structure de la matrice de fibrine. Un tel type de structure serait en faveur d'une résistance augmentée de la matrice de fibrine même si l'article ne le prouve pas ici. De plus la présence de pores plus petits permet une amélioration de l'attachement cellulaire par une augmentation de surface. Au contraire des pores de plus grande taille permettent une meilleure croissance et prolifération cellulaire.

6- Une composition originale en plaquettes, cytokines et leucocytes

Le protocole atypique de formation du PRF permet une récolte efficace et sans dommage des leucocytes et des plaquettes (Dohan et al. 2009).

D'après une analyse histologique du caillot de fibrine du PRF, les plaquettes sont accumulées dans la partie inférieure du culot de fibrine et plus particulièrement à la jonction entre le thrombus de globule rouge et le PRF au sens strict, on observe par microscopie des travées riches en plaquette qui prennent leurs origines dans ce « buffy coat » et qui structure cette matrice de fibrine acellulaire (Dohan et al. 2006b ; Dohan et al. 2010).

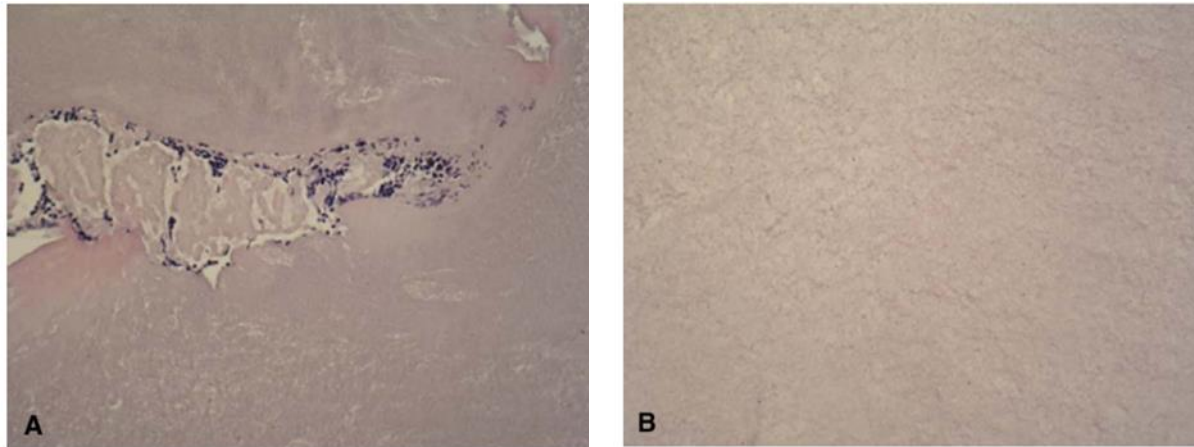


Figure 5 : Coupe histologique en coloration hématoxyline-éosine du PRF d'après Dohan et al. 2006b.

L'image A est une coupe histologique du "buffy coat" (on note la présence d'une travée plaquettaire) ; l'image B est une coupe de la partie supérieure du PRF acellulaire (on note l'absence de plaquette). Les deux images sont au grossissement x52.

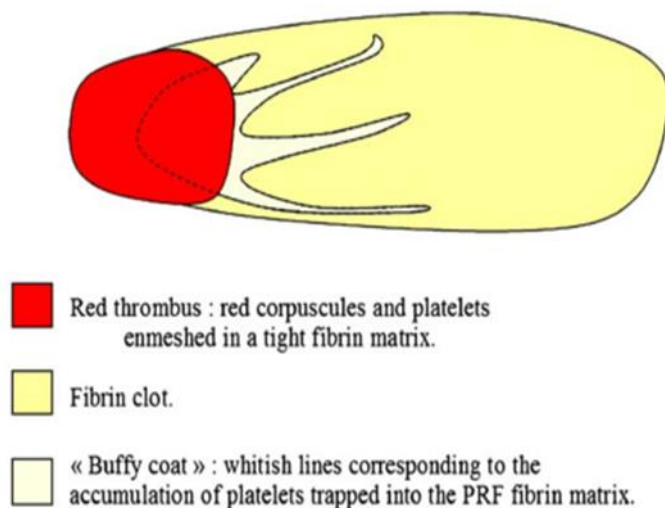


Figure 6 : Représentation schématique des différentes parties composant le PRF d'après Dohan et al. 2006b.

On observe en rouge le caillot érythrocytaire en contact étroit dans sa partie supérieure avec la matrice de fibrine en jaune et le « buffy coat » en blanc qui contient une forte concentration plaquettaire

Dans l'article Dohan et al. 2006b, un dosage quantitatif par ELISA de différentes cytokines plaquettaires (PDGF, TGF- β , IGF1) a été réalisé dans le PPP et dans l'exsudat séreux du PRF et dans le sang total activé ou non. Les analyses comparatives montrent que le PPP et l'exsudat séreux ont une quantité de cytokine plus faible par rapport au sang total ce qui signifie que les cytokines restent prises au piège dans le caillot de fibrine. L'enchevêtrement des cytokines

plaquettaires au sein même de la matrice de fibrine se révèle être plus important pour le PRF que pour les différentes formes de PRP. Cela peut s'expliquer par le fait que dans le PRP, les cytokines seraient libérées trop rapidement lors de l'activation des plaquettes pour être intimement insérées dans la matrice de fibrine. Au contraire, dans le PRF du fait de la présence de jonctions équilatérales de fibrine associées aux GAG on trouve les cytokines plaquettaires liées au réseau de fibrine.

Dans l'article Dohan et al. 2006c, un dosage quantitatif par ELISA de différentes cytokines leucocytaires pro- inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α) et cicatrisantes (IL-4, VEGF) a été réalisé dans le PPP et dans l'exsudat séreux du PRF et dans le sang total activé ou non. On constate une concentration supérieure des cytokines leucocytaires dans le PPP ou dans l'exsudat séreux du PRF par rapport au sang activé ou non. Ceci montre que le protocole de fabrication du PRF induit une dégranulation leucocytaire accrue, augmentant la présence de cytokines leucocytaires. Comme les cytokines plaquettaires, les cytokines leucocytaires sont probablement pour une grande partie imbriquées dans le réseau de fibrine du PRF (Dohan et al. 2006c).

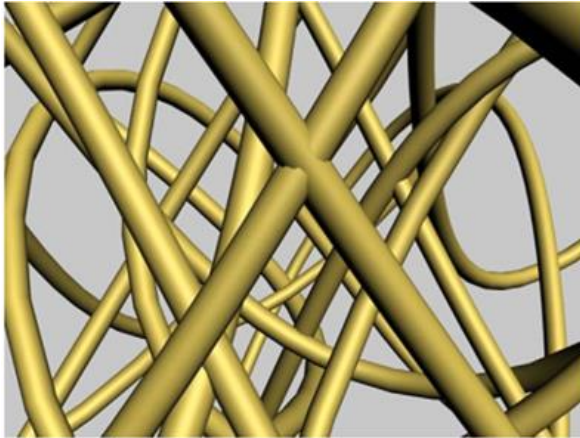
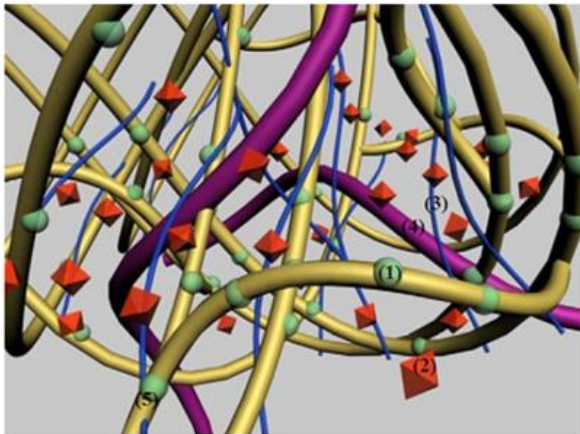
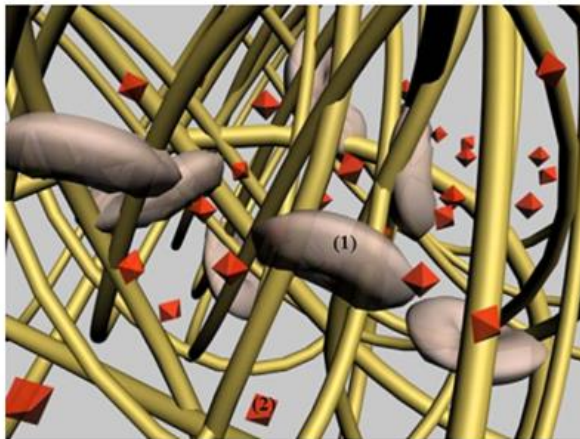


Figure 7 : Modélisation théorique du réseau de fibrine au sein de 3 types de composés d'après Dohan et al. 2006b.

L'image du haut modélise le réseau de fibrine au sein de la glue de fibrine, on note l'absence d'élément figuré au sein du réseau. L'image du milieu modélise le réseau de fibrine au sein du PRP, les plaquettes (1) sont enchevêtrées dans les mèches de fibrine et de nombreuses cytokines (2) sont extrinsèquement retenues dans le réseau de fibrine. L'image du bas modélise le réseau de fibrine au sein du PRF, les cytokines plaquettaires sont intrinsèquement (1) et extrinsèquement (2) retenues dans le réseau de fibrine, les mèches de fibrine sont associées à des chaînes de glycane (3), des protéines circulantes telles que la fibronectine sont présentes (4) et des associations fibrine, cytokine intrinsèque et chaîne de glycane sont possibles (5).



La présence de cytokines liées au réseau de fibrine a pour conséquence une augmentation de la durée de vie des cytokines. De plus, leur libération dans le milieu se fera plus tard au moment du remodelage de la matrice de fibrine par les cellules de l'organisme, c'est-à-dire au moment même où ces cellules ont besoin d'être stimulées pour que la reconstruction cicatricielle soit complète et correcte. Ainsi les propriétés biologiques des cytokines sont pleinement efficaces dans le cas où elles sont associées au PRF.

L'hypothèse de Dohan (Dohan et al. 2006b ; Dohan et al. 2006c) énonçant que les cytokines sont imbriquées dans le réseau de fibrine de PRF avec une libération tardive est confirmée par d'autres études en particulier celle de He et al. 2009. Dans cette expérience, on évalue la concentration de deux facteurs de croissance TGF β 1 et PDGF-AB dans les exsudats de PRP et de PRF à J1, J7, J14, J21 et J28. Selon cette étude, les facteurs de croissance du PRF sont libérés progressivement et le pic de libération est retardé par rapport au PRP. En effet, le pic de libération est obtenu à J1 pour le PRP, et à J14 pour le PRF. Le PRP atteint un niveau maximal de libération de TGF β 1 et PDGF-AB au bout d'une heure avec une décroissance rapide. En revanche, pour le PRF le niveau maximal de TGF β 1 et PDGF-AB est obtenu à J14. A 14 jours, le PRF conserve des niveaux statistiquement plus élevés de TGF β 1 et PDGF-AB que le PRP. Enfin les facteurs de croissance libérés par le PRF ont un effet plus durable et plus fort sur la prolifération et la différenciation des ostéoblastes de rat in vitro par rapport aux facteurs de croissance libérés par le PRP (He et al. 2009).

Une autre étude de Su et al. 2009 évalue les concentrations en facteurs de croissance (PDGF-AB, TGF-1, VEGF, EGF, et IGF1) de l'exsudat du PRF au cours des premières minutes jusqu'à 5 heures (5, 60, 120 et 300 minutes). Les données montrent également une augmentation de la teneur de PDGF-AB, TGF β 1, VEGF, et de EGF au cours du temps, seule la concentration en IGF1 est restée stable durant la période d'observation. En se basant sur l'étude de Burnouf et al. 2008 qui détermine le dosage de PDGF-AB, TGF β 1, de EGF, Su et al. 2009, suggèrent que respectivement 17%, 55% et 82% de la teneur totale plaquettaire de PDGF-AB, TGF β 1, de EGF est libéré dans les moins de 300 minutes.

De plus, le PRF contient des leucocytes qui sont correctement préservés par la force de centrifugation faible. Le PRF possède donc un pouvoir immunitaire qui lui est propre comme des capacités de lutte contre l'infection (Dohan et al. 2006c). Dohan et al. 2010 confirment que plus de la moitié des leucocytes, dont beaucoup de lymphocytes, sont piégés dans le PRF. Comme les plaquettes, les leucocytes sont concentrés dans une couche intermédiaire située entre les hématies et le caillot de PRF et sont présents dans des travées cellulaires au milieu de la matrice acellulaire de fibrine.

7-Capacités de cicatrisation du PRF

Les propriétés structurelles et moléculaires du PRF permettent une amélioration de 4 phénomènes participant à la cicatrisation : l'angiogenèse, le contrôle immunitaire, le captage des cellules souches mésenchymateuses et la couverture épithéliale (Choukroun et al. 2006a).

L'angiogenèse consiste en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au sein du tissu lésé. Pour que celle-ci se fasse correctement, la présence d'une matrice extra cellulaire est indispensable, permettant la migration des cellules endothéliales, leur division, et leur changement de phénotype. Il a été clairement établi que la matrice de fibrine du PRF intervient directement dans le phénomène d'angiogenèse, s'expliquant par le réseau tridimensionnel particulier du PRF composé de jonctions équilatérales et par la présence des nombreux facteurs de croissance enchevêtrés dans la fibrine (FGF, VEGF, et PDGF). De plus la rigidité de la matrice stimule la formation des capillaires vasculaires. Enfin, le contrôle de la régulation de l'intégrine $\alpha\beta 3$ est essentiel, cette molécule permet l'attachement des cellules aux éléments de la matrice extracellulaire (fibrine, fibronectine, vitronectine). La régulation de l'expression de cette intégrine est en grande partie faite directement par la fibrine. La matrice de fibrine est donc un guide naturel de l'angiogenèse (Choukroun et al. 2006a).

La fibrine et les produits de dégradation du fibrinogène stimulent la migration des neutrophiles et stimulent l'expression du récepteur CD11c/CD18 qui permet l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium. De plus il a été démontré que la colonisation secondaire du site inflammatoire par les monocytes et macrophages est contrôlée par la fibronectine via les propriétés physico-chimiques de la fibrine et par les molécules médiatrices imbriquées dans celle-ci. Ainsi la fibrine constitue un support naturel de l'immunité.

Durant le phénomène d'hémostase physiologique, le caillot de fibrine qui se forme naturellement capte les cellules souches circulantes et elles sont amenées jusqu'au site lésé par la néovascularisation qui s'est initiée. Le PRF, comme une matrice de fibrine physiologique sert de filet à cellule souche puis il est le support de la différenciation cellulaire des cellules souches. L'effet bénéfique de la fibrine en lien avec les cellules souches est d'autant plus démontré que l'on se trouve dans un contexte de lésion osseuse (Dohan et al. 2006b).

La fibrine modifie le métabolisme des cellules épithéliales et fibroblastiques et supporte la migration de celles-ci. Plus qu'une simple migration cellulaire, ce passage de cellules provoque une dégradation de la fibrine, ce n'est qu'après cela que les fibroblastes débutent leur synthèse de collagène. Encore une fois la fibrine et les facteurs de croissance qui lui sont associés sont essentiels dans la régulation de l'expression des intégrines qui contrôlent la prolifération des fibroblastes et leur migration. Le PRF améliore donc la couverture épithéliale lors de la phase de cicatrisation.

8-Applications cliniques

Le PRF peut être considéré comme un biomatériau naturel de fibrine favorable au développement de la microvascularisation et capable de guider la migration de cellules épithéliales en sa surface. L'intérêt d'une telle membrane de fibrine apparaît évident dans le but de protéger des plaies ouvertes et d'accélérer leur cicatrisation. De plus, cette matrice contient des leucocytes et stimule leur migration, l'utilisation de PRF dans le cas de plaie infectée apparaît donc intéressante. Par exemple dans le cas clinique de Desai et al. 2013, on utilise le PRF pour la cicatrisation d'une plaie par seconde intention au niveau de la lèvre inférieure d'un homme. On espère la minoration de la formation d'un tissu cicatriciel fibreux et non esthétique. Ici le PRF a joué son rôle à la perfection, aucune surinfection n'est notée et la régénération tissulaire est très bonne pour cette cicatrisation par seconde intention modifiée qui prendra six semaines environ.

Les recherches actuelles sur l'utilisation de PRF sont largement orientées dans le domaine de la chirurgie dentaire. De nombreux cas dans la littérature rapportent l'utilisation de PRF dans le traitement des défauts parodontaux intra-osseux, comme moyen de comblement osseux, comme membrane résorbable dans les régénérations osseuses guidées ou encore dans la prévention et le traitement d'ostéonécrose des maxillaires associé à l'utilisation des biphosphonates. Il en ressort que le PRF n'a aucun effet secondaire ou effet néfaste et que c'est un matériau sûr d'utilisation. De plus, son utilisation apporterait un réel avantage par rapport à des méthodes de traitement sans utilisation de biomatériau. Mais son efficacité reste encore controversée, et des études statistiques probantes manquent quant à son efficacité supérieure vis-à-vis d'autres biomatériaux comme des xéno greffes ou allogreffes osseuses. Néanmoins, l'association de PRF avec un biomatériau type allogreffe osseuse apparaîtrait comme une combinaison intéressante et démontrerait un avantage supérieur dans les traitements de certaines pathologies dentaires.

Choukroun en 2006 (Choukroun et al. 2006b), analyse l'utilisation de PRF en association avec un matériau de comblement osseux. Neuf augmentations du plancher sinusal ont été réalisées. Dans 6 sites, de l'os de banque humain TBF® est associé au PRF (groupe test), et dans 3 sites le TBF® n'est pas associé au PRF (groupe témoin). Des prélèvements osseux sont réalisés à quatre mois pour le groupe test et à 8 mois pour le groupe témoin. Les évaluations histologiques révèlent la présence de particules de TBF® entourées par de l'os nouvellement formé et du tissu conjonctif. Après 4 mois de cicatrisation, la maturation histologique du groupe test semble identique à celle du groupe contrôle après une période de 8 mois. La néoformation osseuse est

équivalente entre les deux groupes. Selon les auteurs, l'association de PRF avec du TBF®, conduirait à une réduction du temps de guérison. Dès lors, la pose des implants peut se faire plus rapidement grâce au PRF.

Une autre étude de 2012 (Zhang et al. 2012) vise à évaluer l'influence du PRF sur la régénération osseuse dans l'élévation de la membrane sinusienne en combinaison à une xéno greffe d'os bovin déprotéinisé (Bio-Oss®). Dix patients ont été sélectionnés pour l'étude : onze « sinus-lift » ont été réalisés, six avec un mélange de Bio-Oss et de PRF (groupe test), cinq avec du Bio-Oss seul (groupe contrôle). Les examens cliniques et radiologiques sont effectués avant et après opération. Une biopsie est réalisée à 6 mois lors de la pose des implants. L'examen histologique montre des caractéristiques morphologiques similaires pour le groupe test et le groupe contrôle et les pourcentages de néoformation osseuse dans les groupes tests et les groupes témoins ne sont pas significativement différents. Les auteurs concluent que l'usage de PRF ne semble pas influencer la régénération osseuse des xéno greffes d'origine bovine dans les procédures d'élévation de la membrane sinusienne. Dans ce cas le PRF n'apporte aucun avantage supplémentaire ni de désavantage.

Une étude clinique (Shah et al. 2015) porte sur 40 patients choisis au hasard et compare l'efficacité d'une allogreffe osseuse « demineralized freeze-dried bone allograft (DFDBA) » et du PRF dans le traitement des défauts parodontaux intra-osseux. L'étude conclut à un pouvoir de guérison similaire des deux matériaux concernant des paramètres cliniques uniquement (profondeur de poche, perte d'attache, hauteur de gencive marginale). Le comblement ou la régénération osseuse ne sont pas évalués dans cette étude. Les auteurs indiquent que le PRF est un traitement de choix dans les défauts intra-osseux, assurant une cicatrisation clinique de même qualité que le DFDBA et apportant des avantages en termes de coût et de praticité par rapport à celui-ci.

Dans son article de 2015, Yuanzheng compare l'efficacité de la cicatrisation d'une encoche provoquée chirurgicalement dans l'os alvéolaire de chien lors d'addition de moelle osseuse (groupe témoin), de CSM et moelle osseuse, de PRF et moelle osseuse ou d'un mélange de CSM, PRF et moelle osseuse. Les résultats montrent que les CSM dérivées de moelle osseuse et le PRF sont capables d'améliorer la réparation de fissure de l'os alvéolaire par rapport au groupe témoin en termes de densité osseuse minérale (visible au scanner) et de structure histologique (lame coloration hématoxyline-éosine sur biopsie) après 6 mois. L'utilisation d'un

mélange de CSM et de PRF avec la moelle osseuse apporte un avantage supérieur à l'utilisation des composés séparément dans la réparation osseuse (Yuanzheng et al. 2015).

Même si l'utilisation du PRF est plus largement étudiée dans le domaine de l'implantologie chirurgico-dentaire, de plus en plus d'études expérimentales testent son efficacité dans les domaines où la régénération tissulaire et cellulaire au sens large est nécessaire et fait parfois défaut avec des techniques classiques.

Dans l'article de Sun et al. 2014, on compare l'utilisation d'une implantation directe de cellule souche mésenchymateuse (CSM) à une greffe de CSM incorporée au PRF dans le traitement de l'infarctus cardiaque induit par ligature de l'artère coronaire chez le rat. Les CSM sont isolées à partir de prélèvement de tissus graisseux quinze jours avant le début de l'expérience (induction de l'infarctus). L'échafaudage comprenant les CSM et le PRF a été réalisé de la manière suivante : le PRF est formé, coupé en deux et mis dans le fond de deux tubes Eppendorff puis recouvert par la solution marquée de CSM ($0,5 \times 10^6$ CSM marquées au CM-DIL (Vybrantnd)) et le tout est centrifugé à 800g pendant 20 minutes. Le PRF additionné de CSM (groupe test), est ensuite fixé par suture au niveau de la zone d'infarctus, zone qui se reconnaît par sa modification de couleur ou bien une injection de CSM directe dans la zone d'infarctus du myocarde est réalisée (groupe témoin). Dans les deux types de traitement, il y a une amélioration par rapport au groupe non traité. L'amélioration s'explique par la meilleure vascularisation, la diminution de fibrose, la réduction de l'apoptose, et la diminution de l'inflammation. L'utilisation du PRF contenant les CSM apporte une amélioration dans le traitement de l'infarctus aigue par rapport à l'implantation seule de CSM : on observe une augmentation du nombre de cellules souches cardiaques, une augmentation de la néovascularisation, la dilatation cardiaque en zone d'infarctus est diminuée et la force de raccourcissement du cœur est augmentée. Les auteurs ne donnent pas d'explication sur le choix d'un tel protocole et ne précisent pas si l'élaboration d'un échafaudage semblable de CSM marquées au Vybrantnd avec le PRF avait fait l'objet d'étude préliminaire. Les auteurs n'émettent pas d'hypothèse sur les mécanismes qui pourraient expliquer que le PRF associé aux CSM améliorerait le traitement des infarctus mais font de simples constatations cliniques et biologiques. Les auteurs avancent seulement que peut-être la répartition et la diffusion des CSM est meilleure grâce au PRF, permettant une amélioration globale du traitement.

Dans l'article de Matsunaga et al. 2013, les auteurs évaluent l'efficacité d'un biomatériau de fibrine dans le traitement des lésions tendineuse et ligamentaire chez un modèle animal (le

lapin). Pour cela, ils créaient des biomatériaux de fibrine à partir de sang citraté et de gluconate de calcium qui serviront d'allogreffes. Le protocole n'est pas le même que pour la formation du PRF de Choukroun, c'est un protocole plus complexe nécessitant plusieurs étapes de centrifugation et aboutissant à la formation d'un biomatériau de fibrine riche en plaquette et résistant aux forces de traction. Sur un premier lot de lapins, une section du tendon fémoral des deux membres pelviens est réalisée ; un membre est traité à l'aide du biomatériau de fibrine et l'autre non. Sur un deuxième lot de lapins, une section du ligament collatéral médial sur les deux membres est réalisée ; un membre est traité avec de le biomatériau de fibrine et l'autre non. La réparation du tendon fémoral et du ligament collatéral du grasset est améliorée par le biomatériau de fibrine sur ce modèle lapin en comparaison à l'absence de traitement, en termes de support de poids et de raideur de l'articulation. Les auteurs concluent sur une utilisation potentielle de greffes de fibrine pouvant accélérer la cicatrisation des tendons et des ligaments.

Dans un article de Lichtenfels et al. 2013, on compare l'efficacité du PRP et du PRF dans la régénération nerveuse lors de la création d'un espace de 10mm dans le nerf sciatique chez un modèle animal (rat). L'espace est comblé soit avec un tube de silicone vide, soit avec un tube de silicone et une greffe autologue de nerf, soit avec un tube de silicone et du PRP soit avec un tube de silicone et du PRF. La greffe autologue est le gold standard du traitement de section nerveuse avec perte de substance et c'est ce traitement qui amène aux meilleurs résultats d'évaluation fonctionnel de la locomotion (avec utilisation de l'index sciatique fonctionnel) et de régénération histomorphométrique (diamètre des fibres nerveuses, épaisseur de myéline etc..). On note une amélioration équivalente avec le traitement par le PRP ou le PRF comparé au lot sans ajout de dérivé plaquettaire, cette amélioration porte sur l'évaluation fonctionnelle et il y a une absence d'amélioration significative quant aux résultats histomorphométriques. L'explication principale apportée par les auteurs est que les dérivés sanguins plaquettaires apportent des facteurs de croissance indispensables dans la régénération nerveuse permettant cette récupération fonctionnelle.

Dans un article de 2014 (kazemi et al. 2014), les auteurs évaluent l'effet du PRF dans la réparation cartilagineuse. Sur douze chiens, des défauts circulaires cartilagineux des condyles fémoraux médiaux et latéraux sur les deux pattes arrière sont réalisés. Les lésions de la patte gauche sont comblées avec le PRF, les lésions de la patte droite sont laissées telles quelles. Les chiens sont euthanasiés soit à la 4^{ème}, la 16^{ème} ou la 24^{ème} semaine après le début de l'expérience et des évaluations macroscopiques et microscopiques sont réalisées. L'article conclut en une amélioration macroscopique visible et histologique (scoring de caractéristique

histomorphologique) lors de l'utilisation de PRF. Les facteurs de croissance apportés par ce biomatériau riche en plaquette sont l'origine de l'amélioration de la cicatrisation pour les auteurs.

III-Les Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM)

1-Définitions

Il existe plusieurs types de cellules souches :

-Les cellules souches totipotentes peuvent donner tout type cellulaire et reconstituer un organisme entier ;

-les cellules souches pluripotentes peuvent donner tout type cellulaire des 3 lignées somatiques qui peuvent elle-même donner tout type cellulaire sauf les annexes embryonnaires.

Ces 2 types cités proviennent de cellules souches embryonnaires.

-Enfin, les cellules souches multipotentes sont des cellules souches adultes et qui peuvent donner différents types cellulaires mais spécifiques d'un lignage cellulaire donné. Au sein de cellules souches multipotentes on trouve les cellules souches hématopoïétiques, neuronales et mésenchymateuses. Ces dernières sont compétentes pour suivre une différenciation du mésoderme (cartilage, os, muscle, tendon et graisse).

Pour le traitement des lésions musculo-squelettiques, les cellules souches mésenchymateuses (CMS) sont utilisées. Leurs origines est triple : la moelle osseuse, la graisse et le cordon ombilical.

Chez le cheval, la moelle osseuse est prélevée au sternum ou à l'ilium, le tissu adipeux à la base de la queue et le prélèvement de cordon ombilical s'effectue au moment du poulinage (Cousty, 2013).

A partir des CMS de la moelle osseuse, il est possible de produire in vitro du tissu adipeux, tendineux, cartilagineux ou osseux. Même si les CSM dérivées de la graisse ont montré leur capacité à se différencier en cellules de tissu musculo-squelettique, il semblerait que leurs capacités de différenciation soient inférieures à celles des CSM dérivées de moelle osseuse si l'on se base sur les critères de différenciation que l'on connaît actuellement (Frisbie & Smith,

2010). Pour ces raisons, les CSM issues de la moelle osseuse sont privilégiées dans le traitement des affections musculo-squelettiques.

La comparaison de la sénescence des CSM issues de la moelle osseuse, de la graisse et du cordon ombilical a démontré que celles provenant de la graisse et du cordon ombilical se conservent plus facilement et qu'elles devraient être privilégiées pour la réalisation de banques (Vidal et al. 2012).

2-Essais cliniques chez le cheval

A-Réparation osseuse et cartilagineuse

En raison de la capacité des CSM à réaliser une différenciation chondrogénique, de nombreuses études ont été conduites ces dernières années afin de les utiliser pour potentialiser la réparation cartilagineuse. Les CSM sont douées d'affinité pour les tissus des articulations lésés, et des études récentes ont confirmé leur capacité à se localiser et à participer à la réparation de structures articulaires comme les ligaments croisés, les ménisques ou le cartilage (Frisbie & Smith, 2010).

Dans l'expérience menée par Wilke et al. 2007, des lésions cartilagineuses ont été créées dans les articulations fémoro-patellaires de chevaux et ont été traitées avec une injection de fibrine contenant des CSM ou uniquement de la fibrine seule. Il en résulte que les scores arthroscopiques à 30 jours étaient significativement meilleurs lors d'une implantation avec les CSM. En revanche, l'évaluation à long terme (8 mois) n'a pas montré de différences significatives entre les défauts traités avec les CSM et ceux traités avec la fibrine seule. En résumé, les CSM ont amélioré la cicatrisation initiale, mais n'ont pas modifié significativement l'apparence histologique et biochimique du cartilage à long terme.

En 2011, une étude (McIlwraith et al. 2011) a évalué l'effet de l'injection intra articulaire de CSM dérivées de moelle osseuse sur la qualité de la cicatrisation lors de microfractures de l'os sous chondral. Un mois après la création de défauts sur les condyles fémoraux médiaux de chevaux sous arthroscopie, des injections intra articulaire contenant 20 millions de CSM et 22mg d'acide hyaluronique ou des injections contenant l'acide hyaluronique seul sont réalisées. Bien qu'il n'y ait pas d'amélioration clinique évidente pour les articulations traitées avec les CSM, l'arthroscopie de contrôle et l'évaluation macroscopique à 6mois ont montré une densité augmentée de tissu de réparation et une tendance à une meilleure qualité du tissu de réparation dans les articulations qui ont reçu des CSM. L'analyse immunohistochimique à 12 mois a révélé

une plus grande quantité d'aggrécans (protéoglycane matriciel le plus abondant) dans le tissu de réparation sur les articulations traitées avec les CSM.

L'utilisation de CSM a été étudiée dans le traitement de l'arthropathie dégénérative. Dans une expérience de Frisbie et al. 2009, une arthropathie dégénérative a été induite en créant des débris cartilagineux. La déstabilisation de l'articulation était minimale, et l'utilisation de CSM dans ce cas n'a pas démontré d'effet clinique, radiographique, histologique ou biochimique significatif. Seule une diminution de la PGE2 (cytokine pro-inflammatoire) a pu être notée dans les articulations traitées avec CSM. Dans une autre étude (Mokbel et al. 2011), une arthrose expérimentale a été créée dans des articulations d'ânes à l'aide d'une injection d'amphotéricine qui induit une synovite et une capsulite, deux lésions qui sont responsables d'instabilité articulaire. Dans cette expérience, l'effet bénéfique clinique et radiologique est marqué pour les groupes traités avec les CSM comparé au groupe contrôle. De plus, l'examen microscopique en fluorescence de sections histologiques a montré que les CSM marquées participaient au processus de réparation du cartilage endommagé et ont intégré le cartilage existant. Il semble admis par les scientifiques que la thérapie par les CSM apporte une amélioration lors d'arthropathie dégénérative particulièrement lors d'instabilité articulaire.

B-Réparations tendineuses

L'utilisation principale des CSM reste le traitement des tendinites. Lors de la réparation naturelle du tendon, un tissu de cicatrisation se forme dont la fonctionnalité est déficiente en comparaison au tendon d'origine. Cette perte de fonctionnalité s'explique en partie par le fait que la réparation tendineuse produit du collagène de type III (20 à 30% de présence dans un tendon cicatriciel) alors que c'est du collagène de type I que l'on retrouve en plus grande quantité dans les tendons sains (le collagène de type III compose moins de 1% du tendon sain). Le collagène de type III est de qualité inférieure par rapport au collagène de type I. Cela a pour conséquence une réduction des performances du cheval et un risque très augmenté de récurrence de la tendinite. L'objectif principal recherché avec les CSM est de favoriser la mise en place d'un tissu cicatriciel à la structure proche de celle du tendon sain en stimulant la collagenèse et la néoformation de fibres tendineuses, et de limiter la formation d'une cicatrice fibreuse et la détérioration des caractéristiques biomécaniques du tendon (Richardson et al. 2007).

La lésion tendineuse du cheval se prête particulièrement bien à la thérapie par les cellules car c'est généralement une lésion qui se situe dans le corps du tendon et non en périphérie et elle est souvent bien circonscrite. Cette lésion va rapidement se combler avec un tissu de granulation

qui jouera un rôle nutritif de par sa vascularisation importante et de support mécanique pour les CSM. La localisation intra-tendineuse de la lésion permet la présence de cytokines et d'un environnement mécanique particulier qui stimulent la différenciation des CSM en ténoblastes. Richardson (Richardson et al. 2007) énonce la fonction de « scaffold » joué par ce tissu de granulation, une notion que l'on définira dans la partie IV de ce développement. L'injection de cellules souches devra donc être parfaitement intra-tendineuse et intra-lésionnelle pour permettre aux CSM de jouer pleinement leurs rôles. C'est pour cette raison que les lésions excentriques ne sont pas considérées comme les candidates idéales à la thérapie par les CSM (Verwilghen et al. 2010b).

Le traitement des tendinites par les CSM permet aux chevaux de revenir en compétition plus rapidement après une remise au travail progressive et ce avec un taux de récurrence plus faible (taux de 18 à 27% selon les études alors que le taux de rechute est autour de 55% avec des traitements plus conventionnels (Cuevas& Décor, 2013 ; Frisbie& Smith, 2010)).

Au niveau histologique, on reconnaît un tissu cicatriciel par l'alignement des fibres tendineuses qui fait défaut. En effet, on observe une matrice désorganisée avec une augmentation de la cellularité et de la vascularisation au sein d'un tendon cicatriciel (Cf Figure 8). L'utilisation de CSM dans les lésions tendineuses améliorerait le score histologique des tissus d'après les études avec des modèles de tendinite à collagénase (Frisbie& Smith, 2010).

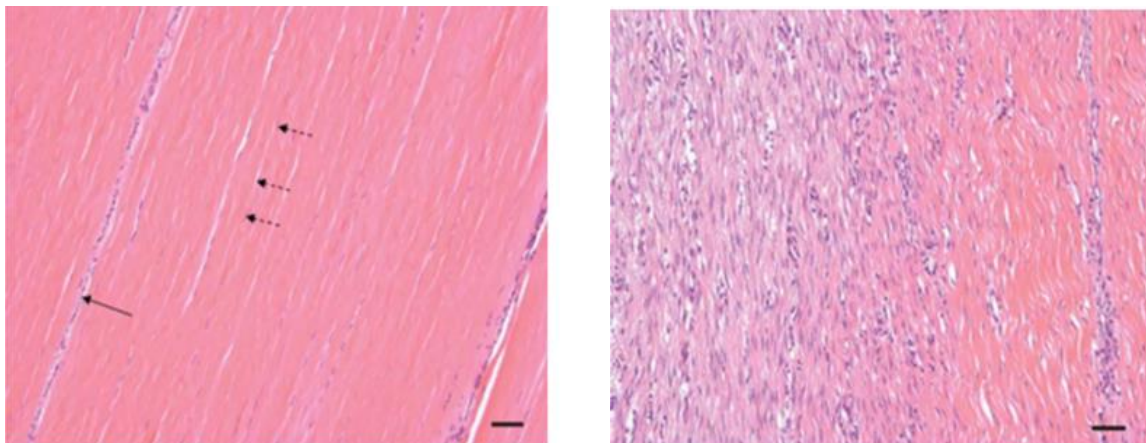


Figure 8 : Coupes histologiques en coloration hématoxyline-éosine de section de tendon sain et cicatriciel d'après Richardson et al. 2007.

L'image de gauche est une coupe de tendon sain, les flèches pointillées représentent les ténocytes alignés et la flèche pleine représente du tissu interfasciculaire. L'image de droite est une coupe de tendon cicatriciel après une blessure datant de 4 mois, on note la désorganisation des ténocytes et l'augmentation du tissu interfasciculaire et de la vascularisation.

Au niveau moléculaire, on fait difficilement la différence entre le tissu d'un tendon sain et d'un tendon cicatriciel et on ne connaît pas de marqueur spécifique du tendon qui permettrait de différencier du tissu sain avec du tissu cicatriciel. Ce manque d'analyse au niveau moléculaire, biochimique et mécanique fait défaut dans l'évaluation du traitement des tendinites par les cellules souches. Dans la littérature, Il n'y a pas de données sur la survie des CSM suite à leur implantation dans le tendon du cheval et on ne connaît pas vraiment leur implication dans le tissu de réparation car aucune étude n'a permis d'évaluer le suivi et la différenciation des CSM in vivo. De plus, dans la plupart des études cliniques, il n'y a pas de groupe contrôle ce qui s'explique par la difficulté de l'expérimentation dans l'espèce équine et par le fait que la plupart des chevaux impliqués dans les études soient des chevaux de propriétaires. Enfin, de nombreux facteurs jouent sur la guérison clinique d'une tendinite (intensité de la lésion de départ, localisation, prise en charge dans la phase aigüe, période de repos...), il en résulte une très grande difficulté dans la comparaison des résultats des différentes études cliniques présentes dans la littérature.

3-Mode de culture

A- Les CSM dérivées de moelle osseuse

Des différences fondamentales existent dans la manière dont les cliniciens utilisent les CSM (Koch et al. 2009).

Dans la plupart des études cliniques qui utilisent des CSM dérivés de moelle osseuse, une étape d'expansion in vitro avant une utilisation in vivo est réalisée. Certaines études rapportent l'utilisation directe in vivo de la fraction cellulaire mononucléaire de la moelle osseuse, cependant, même si cette méthode était initialement recommandée (Herthel, 2001), elle est maintenant considérée comme contre-indiquée pour le traitement des lésions tendineuses étant donné le risque d'induction d'ossification des tissus infiltrés et la concentration en CSM qui n'est pas suffisante (Frisbie & Smith, 2010). L'étape d'expansion in vitro peut utiliser ou non des marqueurs de surface (appelés « CD » pour Cluster de Différenciation) afin d'isoler les CSM des autres populations de cellule. Si des marqueurs de surface spécifiques aux CSM ne sont pas utilisés, on se base sur les capacités d'adhérence à la surface de la boîte de culture et à la capacité de prolifération pour isoler les CSM (Cuevas & Décorey, 2013). Cette étape permet un contrôle qualitatif et possiblement quantitatif avant la réinjection in vivo. Expérimentalement cette étape d'expansion permet d'assurer que l'effet du traitement observé est bien dû aux CSM et non à d'autres cellules.

L'article de Bourzac (Bourzac et al. 2010) compare 3 protocoles d'utilisation des CSM dérivées de moelle osseuse qui sont classiquement utilisés dans les essais cliniques de la littérature : le protocole classique qui sépare les CSM des autres cellules de la moelle osseuse par leur capacité d'adhérence au plastique des boîtes de culture et deux protocoles qui séparent les CSM par des gradients de densité (protocole Ficoll utilisé notamment par Smith (Smith et al. 2003 ; Smith et al. 2008) et protocole Percoll utilisé notamment par Wilke (Wilke et al. 2007). Le but de cet article est d'évaluer et de standardiser les protocoles d'isolation de CSM dérivées de la moelle osseuse dans l'optique de permettre des comparaisons valides entre les essais cliniques qui utilisent ces différents protocoles. En effet il est d'une importance capitale de standardiser les méthodes et de pouvoir faire des comparaisons valides car l'hypothèse que les protocoles d'isolation des CSM puissent affecter leurs capacités de différenciation a été émise. Il ressort comme conclusion de cet article que les 3 protocoles sont équivalents et que la différenciation des CSM en adipocyte, chondrocyte ou ostéocyte ne serait pas affectée par le protocole d'isolation utilisé. En revanche le taux de récolte de CSM serait supérieur avec le protocole Percoll et aboutirait à un taux d'auto-renouvellement des CSM supérieur. Les auteurs recommandent donc d'utiliser ce protocole dans l'isolation des CSM dérivés de la moelle osseuse.

En revanche, il semblerait qu'un temps de culture prolongé limiterait le potentiel de proliféricité ou de fonctionnalité des CSM de la moelle (Koch et al. 2009). De plus, lors de la phase d'expansion cellulaire, les CSM de fin d'expansion ont des caractéristiques différentes des CSM de début. Par exemple, il a été montré qu'il y a une présence significativement augmentée de cellules mononucléaires et de MSC CD34+ si la culture de CSM dérivée de moelle osseuse ne subit pas de phase d'expansion (Frisbie & Smith, 2010). En effet un début de différenciation peut s'opérer ce qui peut mener ensuite à des capacités réduites de réparation tissulaire lors de la réintroduction dans l'organisme en comparaison à des CSM qui n'auraient pas subi de phase d'expansion. Aucune étude avec de telles comparaisons n'a été menée pour l'instant mais ce phénomène de différenciation pourrait présenter des avantages thérapeutiques dans le cas où l'on sélectionnerait avec des marqueurs spécifiques des cellules précurseurs du tissu qui a été lésé afin de réaliser une thérapie plus ciblée. Le problème reste encore de connaître ces marqueurs et d'avoir un nombre suffisant de cellules désirées (Koch et al. 2009).

B- Les CSM dérivées du tissu adipeux

Dans le cas de CSM provenant du tissu adipeux, il semblerait que ce tissu d'origine contienne plus de CSM que la moelle osseuse (1/50 cellules pour 1/100000 cellules dans la moelle). De

fait, on a une possibilité de réimplantation très rapide, les tissus gras sont simplement digérés et un mélange de cellules contenant les CSM est disponible en quelques jours pour la réinjection (Verwilghen et al. 2010b).

Dans la plupart des essais cliniques qui évaluent les effets des CSM, on utilise des CSM dérivées de moelle osseuse, il y a donc moins de données concernant les protocoles d'utilisation des CSM de tissu adipeux et de surcroît de données utilisant des CSM dérivées de cordon ombilical.

4-Mode de réimplantation

Le moment optimal, la dose optimale, et la voie d'administration du traitement avec des cellules souches n'ont été déterminés pour aucun type de cellule souche, aucun type de lésion ou ni même aucune espèce.

Le moment où se fait l'injection de cellules souches est particulièrement important. En effet dans les cas de fibrose largement développée ou forte présence de tissu cicatriciel, la thérapie basée sur les cellules souches peut échouer à cause d'un manque d'apport vasculaire ou d'un microenvironnement défavorable en récepteur et en médiateur biologique (Koch et al. 2009). Dans ce cas, l'implantation de cellules est non seulement plus difficile mais aucun remodelage de la lésion ne peut plus être espéré. Le tissu d'une lésion de tendinite aigue semble être un bon milieu pour l'implantation de cellules souches au vu la présence abondante de facteurs de croissance à cette phase dans ces lésions (Verwilghen et al. 2010b). Néanmoins Smith et al. 2003 rapportent qu'il vaut mieux attendre une granulation et une vascularisation adéquates au sein de la lésion plutôt que d'injecter dans un tissu hémorragique et hautement inflammatoire.

Les signaux nécessaires à la différenciation des CSM ne sont pas encore tout à fait connus. Néanmoins le meilleur stimulus de différenciation pour une cellule est bien son environnement. Lorsqu'on réintroduit une CSM dans un organisme, c'est son environnement immédiat biochimique et mécanique qui va permettre une différenciation en cellule typique du tissu concerné (Smith et al. 2003). L'idéal est que le microenvironnement soit tel une « niche » pour favoriser et supporter la différenciation et la prolifération cellulaire.

Les sites d'injections des CSM selon la lésion du patient peuvent varier d'une injection systémique à périphérique, d'une injection directe dans le tissu atteint à une injection dans une cavité biologique (Koch et al. 2009). L'excipient avec lequel les CSM sont réinjectées varie en fonction des études cliniques, certains les injectent avec de la fibrine (Wilke et al. 2007) lors de

lésion cartilagineuse de pleine épaisseur, d'autres avec de l'acide hyaluronique (Mokbel et al. 2011) lors de lésion d'arthropathie dégénérative. Pour les lésions tendineuses, on réinjecte les CSM le plus fréquemment avec du plasma autologue (Smith et al. 2003) ou du PRP préparé avant la réinjection.

Le substrat idéal n'est pas déterminé, on introduit ici la notion de « scaffold » où le meilleur substrat est celui qui permettra aux cellules souches de jouer pleinement leur rôle, avec une bonne implantation dans le tissu lésé et une différenciation optimale par la suite espérant recréer un tissu de qualité similaire à celui d'origine.

IV- Notion de « Scaffold »

L'ingénierie tissulaire a pour but de stimuler la régénération de tissus déficients ou de créer des substituts de tissus fonctionnels qui pourront être implantés. Elle s'appuie sur 3 composants majeurs : les cellules, les facteurs biologiques et les biomatériaux qui peuvent être seuls ou associés dans cette thérapeutique. La fabrication et le design de biomatériau de greffe (« scaffold ») est un axe majeur de la recherche en ingénierie tissulaire. Les « scaffolds » sont définis comme des biomatériaux solides et poreux ayant une structure en 3 dimensions qui assure une ou plusieurs des fonctions suivantes (Dhandayuthapani et al. 2011) :

- améliorer les interactions entre matrice extra-cellulaire et biomatériau, l'adhésion cellulaire, et le dépôt de matrice extra cellulaire,
- permettre un transport des gaz, des nutriments et des facteurs de régulation pour assurer la survie cellulaire
- se dégrader à un taux contrôlable qui est du même ordre que le taux de régénération des tissus
- provoquer un degré d'inflammation ou de toxicité minimal in vivo.

Le phénomène le plus important à étudier pour juger du succès d'une thérapie basée sur l'ingénierie tissulaire est l'interaction entre le biomatériau de greffe et les tissus environnants. Idéalement, tout biomatériau de greffe est dégradable avec un taux optimal permettant la régénération tissulaire complète et le remplacement entier par le tissu de régénération. La survie des cellules transplantées et le succès de leur intégration tissulaire repose sur la diffusion des

facteurs biologiques au sein du biomatériau. La phase de transition dépend de la force et de la fonction mécanique du biomatériau, pouvant mener à un échec thérapeutique si celui-ci se dégrade plus rapidement en comparaison à la régénération des tissus. D'un autre côté, une dégradation trop lente du biomatériau peut modifier la cicatrisation tissulaire.

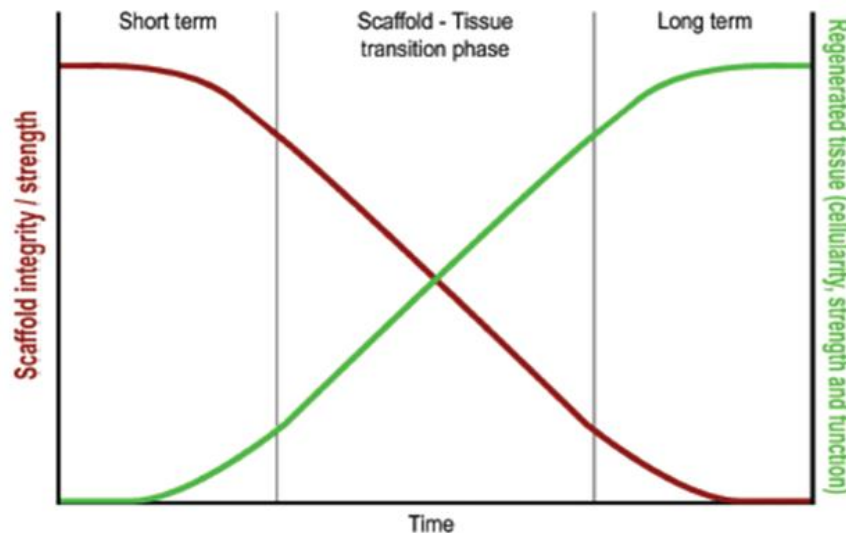


Figure 9 : Temps idéal de dégradation pour le « scaffold » d'après Koch et al. 2009.

La dégradation du « scaffold » doit être assez lente pour permettre une bonne implantation des cellules greffées et une régénération tissulaire suffisante et ne doit pas être trop lente au risque de modifier de la cicatrisation tissulaire.

Les biomatériaux peuvent être injectables, non-injectables, simples, complexes, biologiques ou synthétiques. Il en existe actuellement un grand nombre et l'on adapte le type de biomatériau à chaque situation (espèce, tissu lésé, types de lésion...).

L'utilisation de la fibrine en tant que « scaffold » est intéressante car la composition, la structure et les stimuli exercés par la fibrine se rapprochent de la matrice extra cellulaire des tissus. Enfin la fibrine libère des protéines et des facteurs de croissance qui améliorent la fonctionnalité cellulaire, à savoir un haut niveau de prolifération, une distribution uniforme des cellules dans toute la structure 3D, et une bonne adhésion cellulaire (De La Puente & Ludeña, 2013)

Plusieurs articles scientifiques étudient l'utilisation du PRF de Choukroun en tant que « scaffold » dans de nombreuses situations cliniques avec des résultats intéressants. On peut citer les deux résultats suivants :

-Dans l'article de Gassling (Gassling et al. 2013), les auteurs comparent in vitro les paramètres de vitalité, biocompatibilité et proliféricité de cellules humaines (ostéoblaste) cultivées en présence de PRF ou de membrane de collagène (BioGidend), un biomatériau classiquement utilisé dans la réparation tissulaire osseuse avec greffe de cellule ostéoblastique. Les résultats montrent que l'activité métabolique et la proliféricité des ostéoblastes est plus importante lors de culture avec le PRF.

-Dans l'article de Sun, l'utilisation du PRF en tant que « scaffold » pour l'implantation de CSM au sein de lésion d'infarctus cardiaque chez le rat apporte une amélioration des lésions comparé à de l'utilisation des cellules seules directement injectées dans les lésions myocardiques (Sun et al. 2013).

Partie II : Evaluation expérimentale de la migration de Cellule Souche Mésoenchymateuse équine au sein de Fibrine Riche en Plaquette

Dans la deuxième partie de ce développement, on souhaite étudier in vitro l'interaction de cellules souches mésoenchymateuses équines dérivées de moelle osseuse avec du PRF équin (méthode de Choukroun). Le but étant de voir si le PRF équin peut jouer le rôle de « scaffold » et pourra permettre l'implantation de CSM au sein d'un tissu lésé.

I-Récolte des CSM

Les CSM ont été récoltées sur un cheval mâle castré de 7 ans en bonne santé:

-Site de ponction: 4^{ème} sternèbre

-Matériel: Aiguille de prélèvement de moelle Jamshidi (Cf figure 10), 1 seringue de 20ml héparinée (3ml d'héparine), anesthésique local (lidocaïne), compresse et gants stériles.

-Préparation du site: Tonte large autour du sternum, contention à l'aide d'une sédation avec médétomidine (0,2 ml) butorphanol (0,2 ml), nettoyage chirurgical du site de ponction.

-Réalisation: Le cheval est au carré, on repère le site de ponction (visuellement perpendiculairement à la ligne des coudes, cf figure 10). L'aiguille de Jamshidi est enfoncée dans la 4^{ème} sternèbre avec un mouvement de rotation, puis le mandrin est retiré. Vingt millilitres de moelle osseuse sont aspirés dans la seringue héparinée. L'aiguille de Jamshidi est retirée, et une compression pour l'hémostase est réalisée pendant 5 minutes.

Les ponctions de moelle osseuse peuvent également se réaliser sous contrôle échographique.

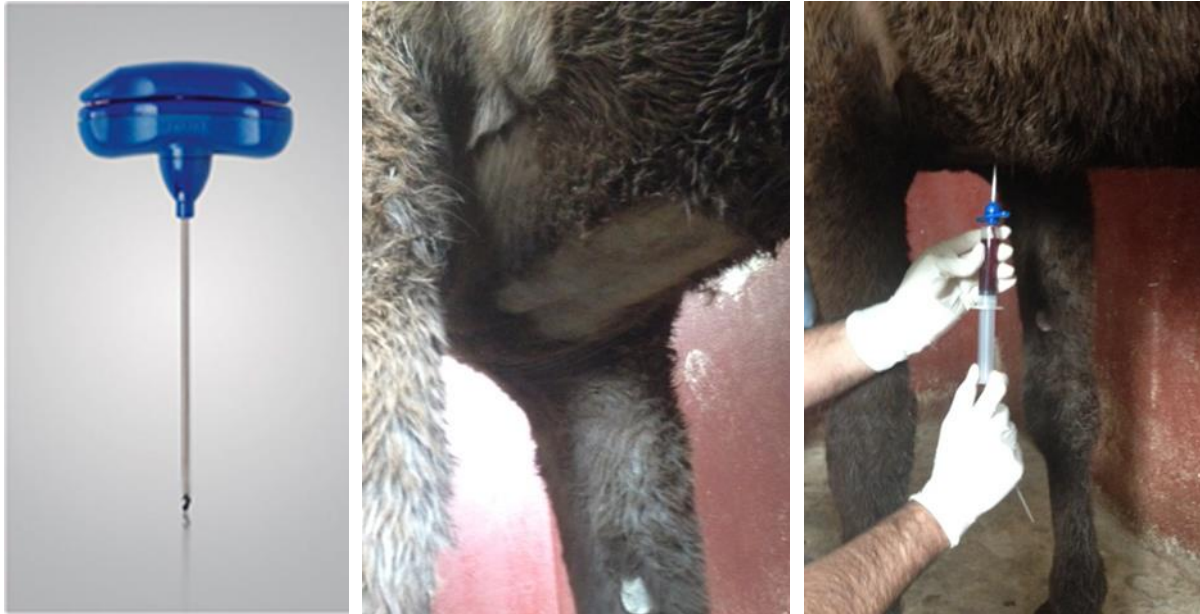


Figure 10: Outils et repères pour la réalisation de ponction de moelle osseuse chez le cheval.

L'image de gauche est une aiguille de Jamshidi permettant la ponction de moelle, la photographie du milieu montre la tonte du site de ponction au niveau des sternèbres, la photographie de droite est prise lors de la ponction de moelle osseuse.

II- Mise en culture des CSM

La mise en culture des CSM est réalisée au sein de l'IRSD (institut de recherche en santé digestive), situé dans les bâtiments de l'INSERM, Purpan.

La ponction de moelle osseuse est répartie stérilement dans deux boîtes de cytotulture de 75cm² avec 25ml de milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) additionné de sérum de veau fœtal (Cf Figure 11). Aucun antibiotique n'est ajouté au milieu car ils s'avèrent parfois toxiques pour les CSM mais les conditions de stérilité de la culture cellulaire sont optimales. Les boîtes sont mises en culture à l'étuve à 37°C.

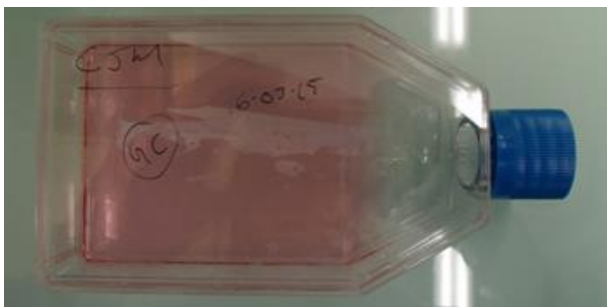


Figure 11: Boîte de cytotulture contenant les CSM dans leur milieu.

Les cellules souches sont isolées des autres cellules grâce à leur propriété d'adhésion. En effet ce sont les seules cellules de la moelle osseuse qui vont adhérer à la surface de la boîte de culture et lors du premier renouvellement de milieu (Cf Annexe 2), les autres cellules présentes dans la culture sont éliminées.

Le temps de culture des CSM doit être suffisamment long pour permettre l'amplification et la confluence des CSM. Afin de stimuler cette multiplication on change régulièrement le milieu de culture tous les trois jours en moyenne (Cf Annexe 2) et on procède à un réensemencement des CSM sur de nouvelles boîtes de cytoculture tous les 5 jours en moyenne (Cf Protocole de réensemencement avec tripsyngation en Annexe 3).

La multiplication et la croissance des CSM dans les boîtes de cytoculture sont suivies régulièrement par contrôle visuel microscopique. Les CSM sont reconnaissables grâce à leur forme caractéristique fuselée (Cf Figure 12).

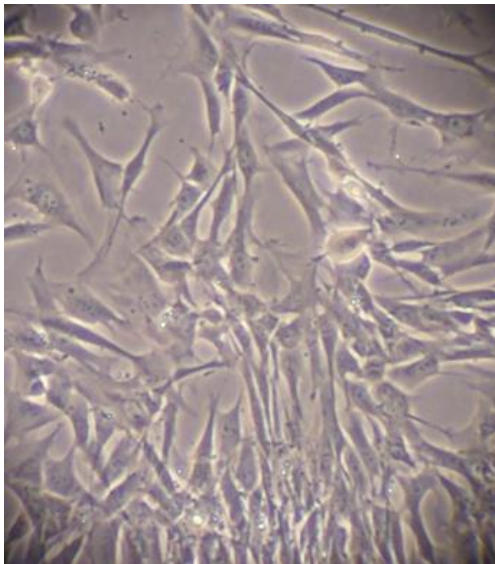


Figure 12: Observation microscopique directe (x400, sans coloration) des CSM après 8 jours dans la boîte de cytoculture.

Les CSM ont une forme caractéristique fuselée, sur cette image elles arrivent bientôt à confluence.

En deux à trois semaines, les CSM se sont suffisamment multipliées, une partie des cellules est congelée de manière à créer un stock de CSM utilisables au besoin pour des expériences plus tardives. Une autre partie des CSM est conservée en culture pour les expériences débutées immédiatement.

III- Réalisation du PRF

Cette partie du protocole a été réalisé au laboratoire de biologie cellulaire de l'ENVT avec l'aide de Christian Tasca.

Du sang provenant de chevaux en bonne santé est prélevé sur des tubes secs de 4ml. On réalise une centrifugation de ces tubes le plus rapidement possible après le prélèvement. La centrifugation se fait à 140 RCF(g) pendant 10 minutes à température ambiante. La fibrine riche en plaquette est formée à la fin de la centrifugation, elle est associée à un culot érythrocytaire (Cf Figure 13).



Figure 13: Photographie du contenu d'un tube de sang sec après centrifugation à 140g pendant 10min.

Le PRF est la partie jaune, accolée on trouve le culot érythrocytaire rouge.

Pour chaque expérience décrite ci-après, la fabrication du PRF est réalisée environ une heure avant le début de l'expérience, pour avoir une standardisation la plus correcte possible des PRF, le sang pour une même expérience provient du même cheval, les tubes sont remplis de manière équivalente. Quand on sépare par incision le culot érythrocytaire du PRF, on obtient des PRF assez homogènes dont le poids est de 1,67g +/- 0,1 grammes.

IV- Mise en culture d'une suspension de CSM avec du PRF

1-Protocole général

Les expériences qui vont être décrites par la suite ont été réalisées au sein de l'IRSD, situé dans les bâtiments de l'INSERM, Purpan.

Toutes les manipulations ont été réalisées stérilement et sous une hotte dédiée spécifiquement aux cultures cellulaires stériles.

Ces expériences sont toutes basées sur le même protocole: la mise en culture de CSM avec la fibrine riche en plaquette.

Les paramètres que l'on fixe en début d'expérience sont le temps de culture, et le nombre de CSM mis en culture avec le PRF.

La concentration d'une suspension de CSM est mesurée avec une lame de Thomas, ainsi la quantité de cellules souches dans un volume donné peut être connue.

Dans les puits d'une boîte p6, on place les PRF que l'on sépare du culot érythrocytaire par incision, puis on ajoute dans le puits la quantité voulue de CSM. Du milieu de culture DMEM additionné de sérum de veau fœtal est ajouté dans chaque puits (environ 3,5 ml) afin de recouvrir complètement le PRF (Cf Figure 14).

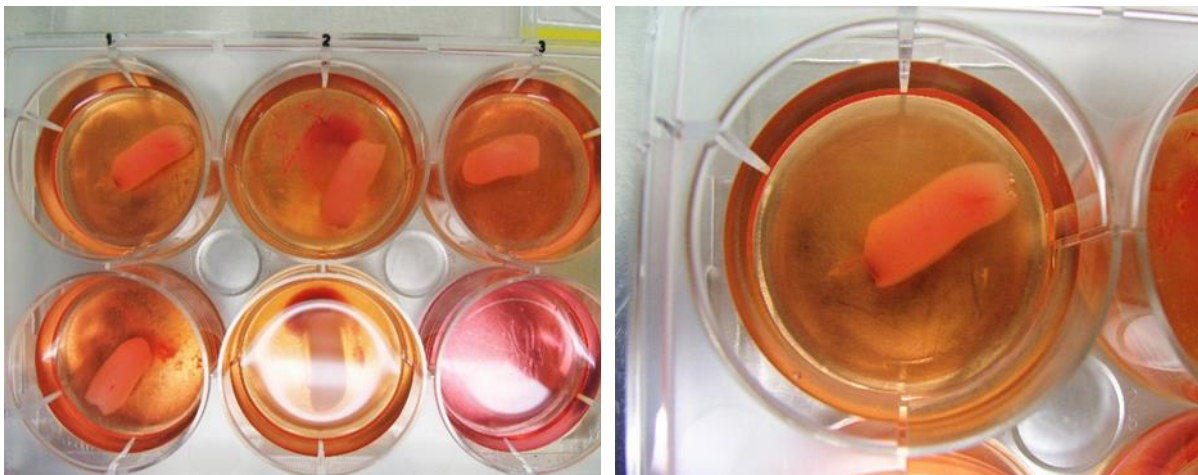


Figure 14: Photographie d'une boîte p6 en cours d'expérience.

Sur la photographie de gauche, c'est une vue d'ensemble de la boîte p6, chaque puits contient le PRF recouvert d'une suspension de CSM de quantité déterminée et additionné de 3,5 ml de milieu de culture. La photographie de droite est un zoom sur un puits de la boîte.

Pour les 6 puits d'une boîte de p6, 4 puits sont les puits tests d'une expérience aux paramètres définis (temps de culture et quantité de CSM), les 2 autres puits sont des puits contrôles: 1 puits contient le PRF et 3,5 ml milieu de culture sans CSM, 1 autre puits contient des CSM et 3,5ml de culture sans PRF.

Le PRF et les CSM sont mis en culture un nombre de jours fixé selon les expériences. Pendant ces jours de culture, des observations visuelles macroscopiques (évaluation de la taille des PRF,

constatation d'adhérence ou non des PRF à la surface de la boîte) et microscopiques (évaluation de la population des CSM et des interactions des CSM avec les PRF) sont réalisées quotidiennement. L'évaluation directe en microscopie des CSM ne peut se faire qu'en périphérie du PRF, en effet l'épaisseur du PRF est trop importante pour distinguer la présence de CSM à l'intérieur de celui-ci en microscopie directe lorsque l'expérience est en cours de réalisation.

A la fin du temps de culture imparti, les PRF sont congelés et conservés dans un congélateur à -80°C pour pouvoir réaliser des coupes histologiques *a posteriori*. Pour réaliser la congélation, chaque PRF est mis dans un moule plastique spécial congélation (cryomoldnd) et est recouvert d'OCT (Optimal Cutting Temperature compound). L'OCT est une sorte de « colle », liquide et transparente à température ambiante et blanche et dure à partir de -20°C . C'est un cryoconservateur, qui préserve le tissu des congélations/décongélations intempestives, qui protège le tissu de tout contact, qui évite la formation de cristaux dans le tissu conservé à -80°C .

2-Mise en culture de CSM (quantité= 30×10^4 cellules) et du PRF avec récolte à J3, J8 et J15

On observe dès le deuxième jour de culture que les PRF sont adhérents à la surface de la boîte de culture, et les CSM donnent l'impression de converger vers le PRF (Cf Figure 15).

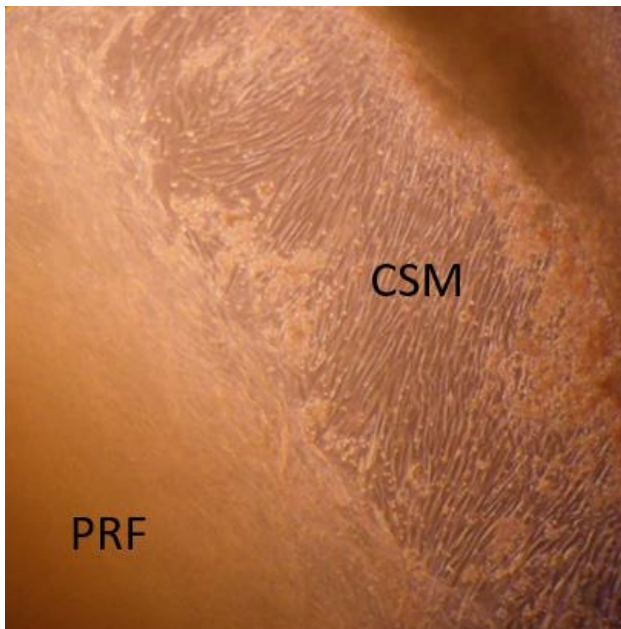


Figure 15: Observation microscopique directe à J2 ($\times 400$, sans coloration) de PRF mis en culture avec les CSM.

On observe la périphérie du PRF avec une présence massive et convergente des CSM vers la fibrine.

A J3 de culture, la taille des PRF est sensiblement la même qu'au début de leur mise en culture. Une partie des PRF est récoltée puis congelée et une des cultures de PRF est fixée au formol et

des lames de coloration hématoxyline-éosine (HE) sont réalisées. On observe que les CSM recouvrent la surface de la fibrine et certaines cellules pénètrent à l'intérieur (Cf Figure 16).

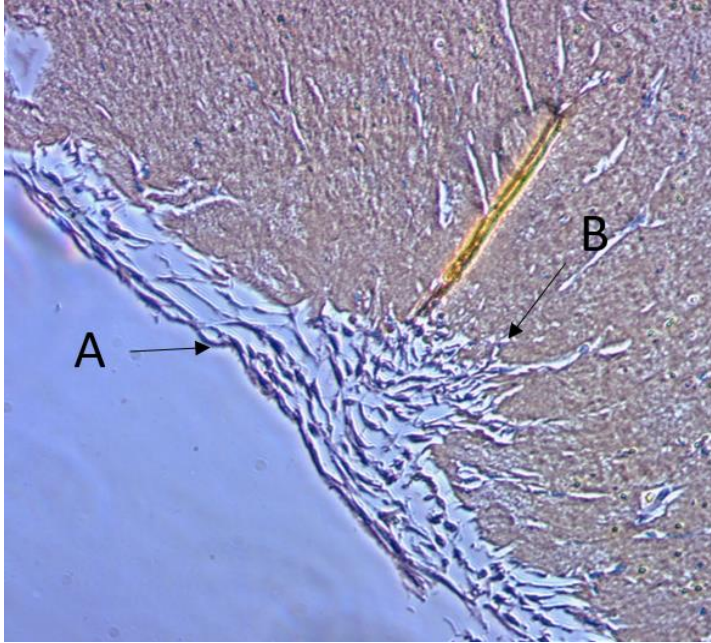


Figure 16: Observation microscopique d'une coupe histologique à J3 (x400, coloration HE) de PRF mis en culture avec des CSM.

Les CSM forment un amas en périphérie de la fibrine et on observe des CSM pénétrer dans la fibrine.

A: CSM en périphérie

B: CSM pénétrant dans la fibrine

Entre le 5^{ème} jour et le 8^{ème} jour de culture, les PRF n'adhèrent plus à la surface de la boîte de culture et la taille des PRF se réduit de deux tiers environ. Ce phénomène s'observe uniquement sur les PRF en culture avec les CSM; il n'y a pas de diminution de taille aussi conséquente sur les puits contrôles contenant les PRF sans CSM (Cf Figure 17).

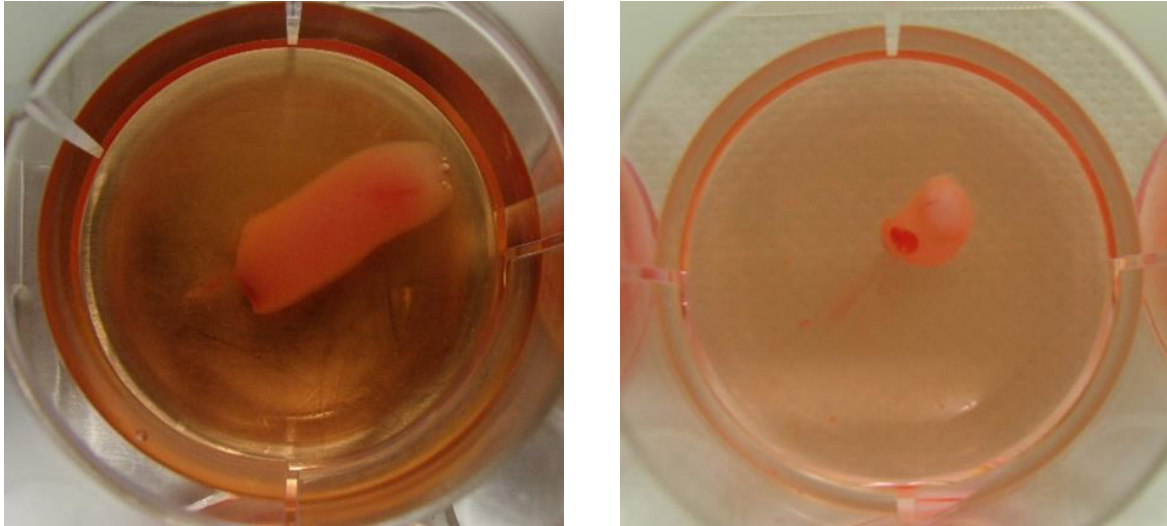


Figure 17: Photographies d'un puits contenant le PRF en culture avec les CSM à J3 et J8.

Sur ces deux photographies, les échelles sont comparables. L'image de gauche est une photographie d'un puits contenant des CSM à J3, l'image de droite est une photographie de ce même puits à J8. La diminution de taille du PRF est visible.

Des colorations au Giemsa (Cf protocole Annexe 4) des puits de p6 contenant le PRF et les CSM sont réalisées à J3, J8 et J15 de culture.

-Observation de la culture à J3: On peut voir les CSM migrées dans le culot de PRF (Cf Figure 18).

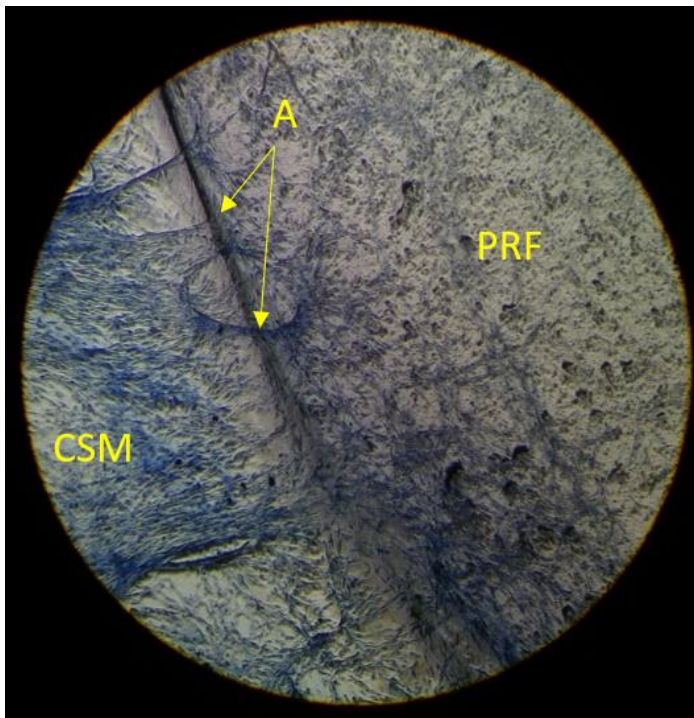


Figure 18: Observation microscopique directe à J3 (x200, coloration Giemsa) de PRF mis en culture avec les CSM.

A: On note la présence de « pont » de cellule qui pénètre au sein du PRF

-Observation de la culture à J8: Les PRF ont diminué de volume, en périphérie de ceux-ci, la présence de CSM est plus rare, par contre celles-ci sont présentes au sein de la fibrine (Cf Figure 19).

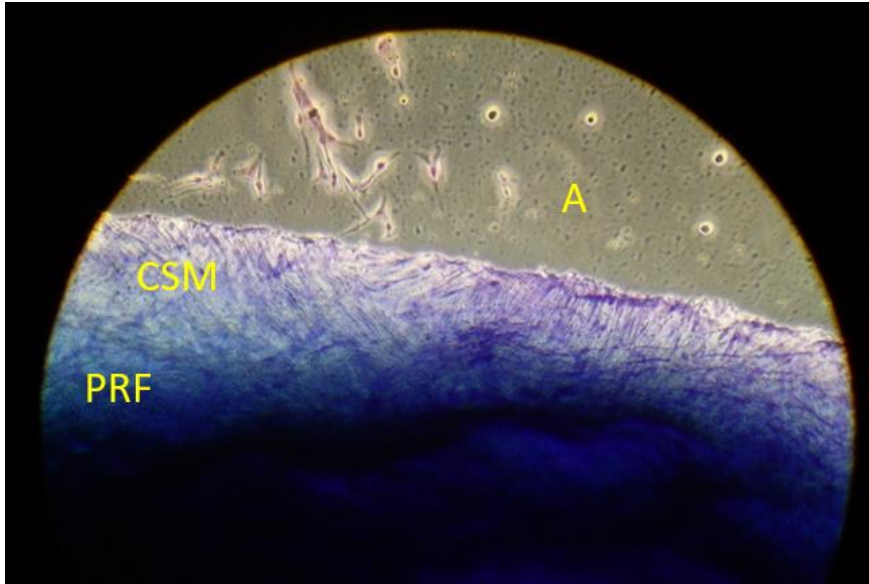


Figure 19: Observation microscopique directe à J8 (x400, coloration Giemsa) de PRF mis en culture avec les CSM.

On note la présence des CSM dans la couche périphérique du PRF

A: Emplacement du PRF rétracté, avec présence plus rare de CSM

-Observation de la culture à J15: Un fragment de fibrine s'est détaché du PRF, on voit qu'il est totalement entouré par les CSM (Cf Figure 20).



Figure 20: Observation microscopique directe à J15 (x400, coloration Giemsa) de PRF mis en culture avec les CSM.

Un fragment de fibrine s'est détaché du reste du PRF et se retrouve rapidement entouré par les CSM.

-Observation de la culture à J15: Des prolongations cytoplasmiques des CSM en direction du PRF sont observables (Cf Figure 21).

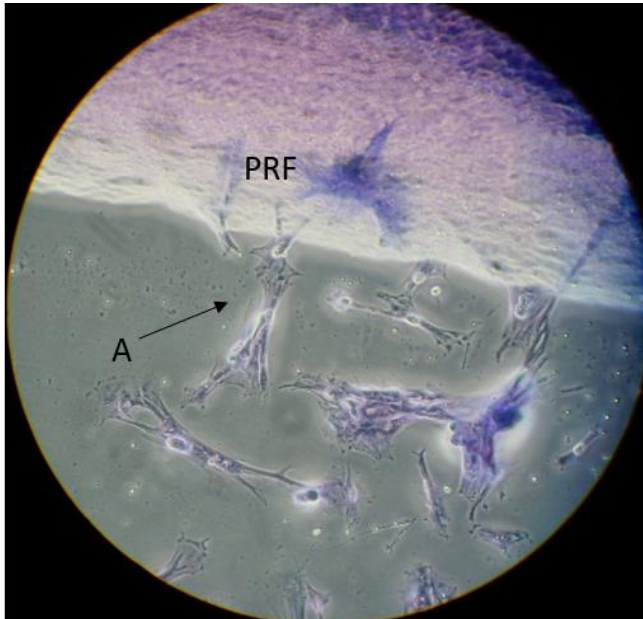


Figure 21: Observation microscopique directe à J15 (x600, coloration Giemsa) de PRF mis en culture avec les CSM.

A: Des prolongements cytoplasmiques des CSM en direction du PRF sont visibles.

3-Mise en culture des CSM (quantité= 60×10^4 cellules) et du PRF avec récolte à J5

Dans cette deuxième expérience où la quantité de CSM est multipliée par deux, on observe que dès le deuxième jour de culture, les PRF ont diminué de taille et ne sont pas adhérents à la surface de la boîte de culture. Au 3^{ème} jour de culture, leur longueur est divisée par quatre par rapport à leur longueur originale.

A l'observation microscopique des p6, les CSM semblent être en quantité inférieure par rapport aux cultures au même temps de l'expérience décrite dans le 2.

4-Recoupe des échantillons congelés à J3, J8 et J15 et lecture de lame sous microscopie à fluorescence

Les échantillons congelés lors de l'expérience 2 sont recoupés à l'aide d'un microtome et mis sur lame. Des colorations DAPI et Rhodamine (Cf Annexe 5) sont effectuées et les lames sont lues avec un microscope Apotome à fluorescence au sein des installations de l'INSERM, Purpan.

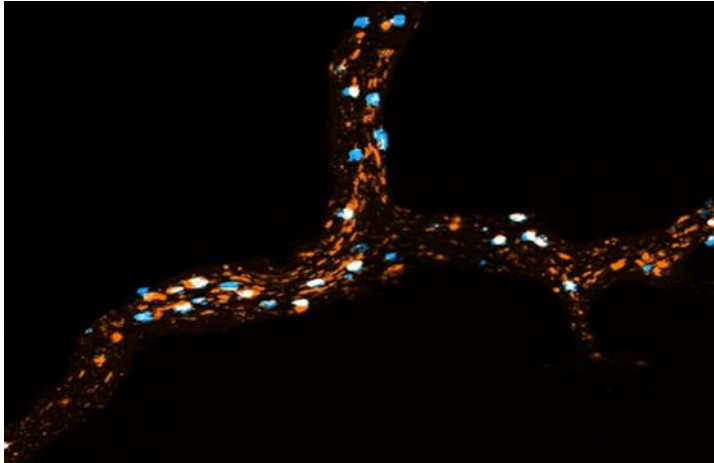
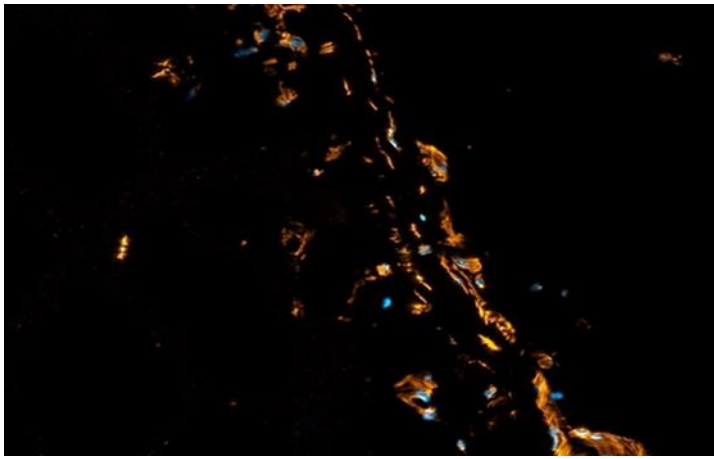


Figure 22: Observations microscopiques de coupes histologiques à J3 et J15 (x400, coloration DAPI et Rhodamine) de PRF mis en culture avec les CSM.

L'image du haut est une coupe à J3 de culture et l'image du bas est une coupe à J15 de culture obtenues par microscopie à fluorescence. La fibrine est colorée en orange, les noyaux cellulaires en bleu.



Les noyaux des cellules apparaissent en bleu à la coloration DAPI, les cellules suivent le réseau de fibrine qui apparaît en orange en coloration à la rhodamine. La fibrine semble organisée différemment à J15 qu'aux autres jours de récolte. Le nombre de cellule semble être plus important à J3 qu'à J15 (Cf Figure 22).

5-Mise en culture des CSM (quantité= 30×10^4 cellules) et du PRF recoupé avec récolte à J5

Dans cette expérience, on souhaite augmenter la surface de contact entre les CSM et le PRF. Pour ce faire, la moitié des PRF est coupée longitudinalement et l'autre moitié est transpercée avec une aiguille 18G une dizaine de fois.

Durant cette culture de cinq jours, les PRF ne sont pas adhérents à la surface de la boîte de culture et n'ont pas diminué de taille. Les CSM semblent en quantité identique par rapport à l'expérience décrite en 2 au même temps de culture.

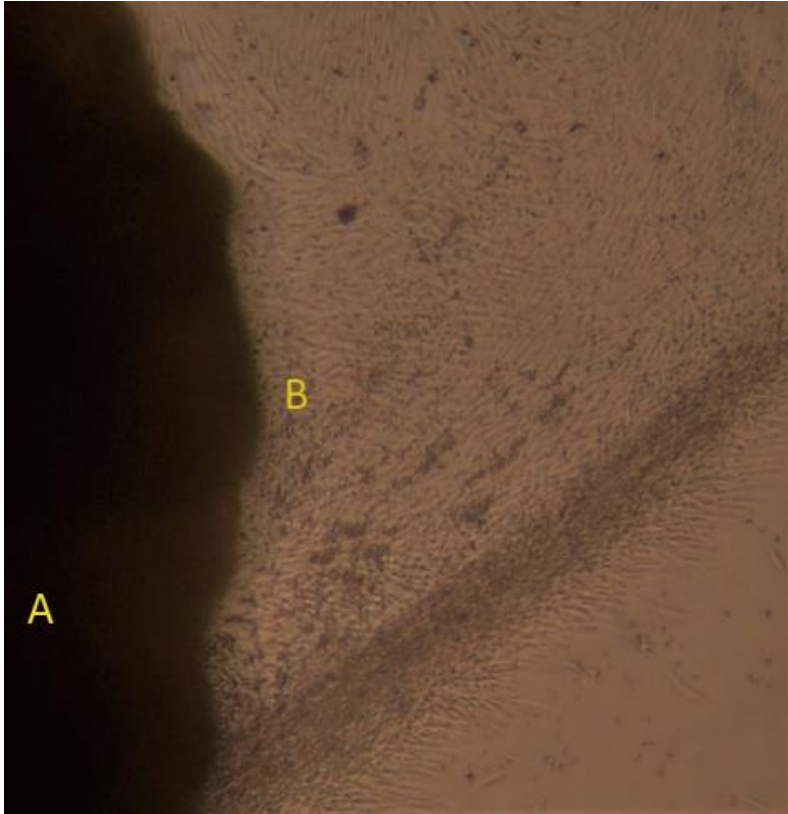


Figure 23: Observation microscopique directe à J4 (x400, sans coloration) de PRF recoupé longitudinalement mis en culture avec les CSM.

A: PRF dont l'épaisseur importante ne permet pas l'observation de CSM au sein de celui-ci

B: CSM sont agglutinées en périphérie du PRF

A J5, deux PRF coupés longitudinalement et deux PRF « à trous » sont fixés au formol et des lames de coloration hématoxyline-éosine (HE) sont réalisées au sein des infrastructures de l'INSERM, Purpan. On observe que les CSM recouvrent la superficie de la fibrine et les cellules pénètrent à l'intérieur de la fibrine particulièrement au niveau des zones de recoupe de la fibrine (Cf Figure 24).

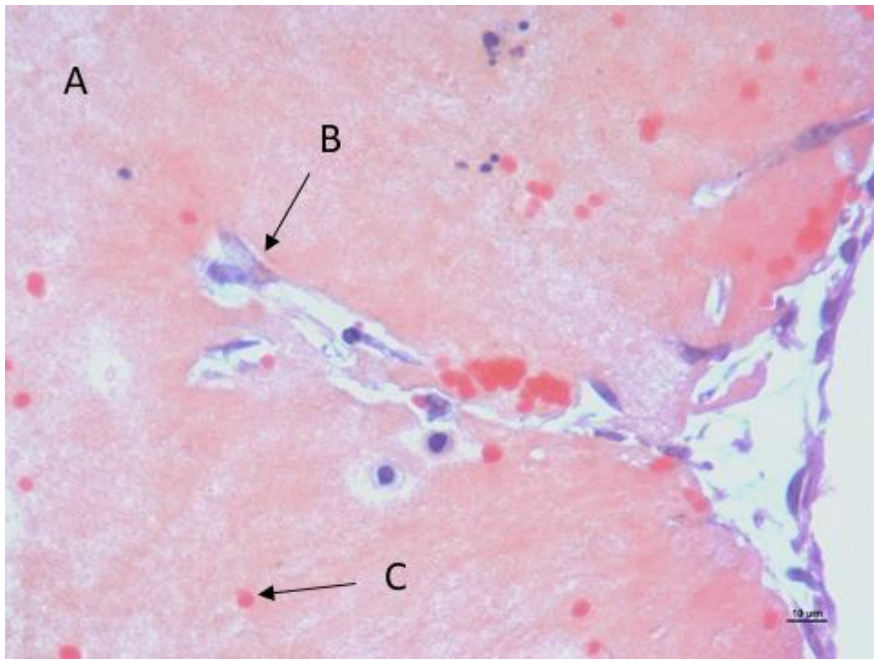
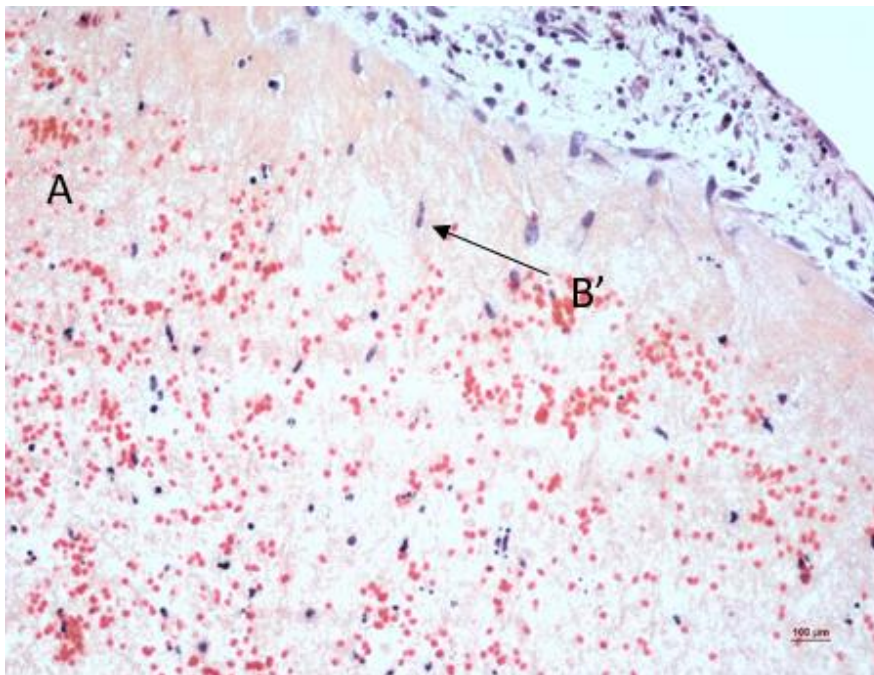


Figure 24: Observations microscopiques de coupes histologiques à J5 (x400, coloration HE) de PRF recoupé longitudinalement mis en culture avec les CSM.

Les CSM (en violet) recouvrent la périphérie de la fibrine (A, en rose) et pénètrent à l'intérieur de celle-ci au niveau des zones de recoupe (image du haut). Les éléments en rouge (present en grand nombre sur l'image du bas) sont des hématies résiduelles.



- A: PRF*
- B: CSM pénétrante au niveau d'une zone de recoupe*
- B': CSM pénétrante*
- C: hématie résiduelle*

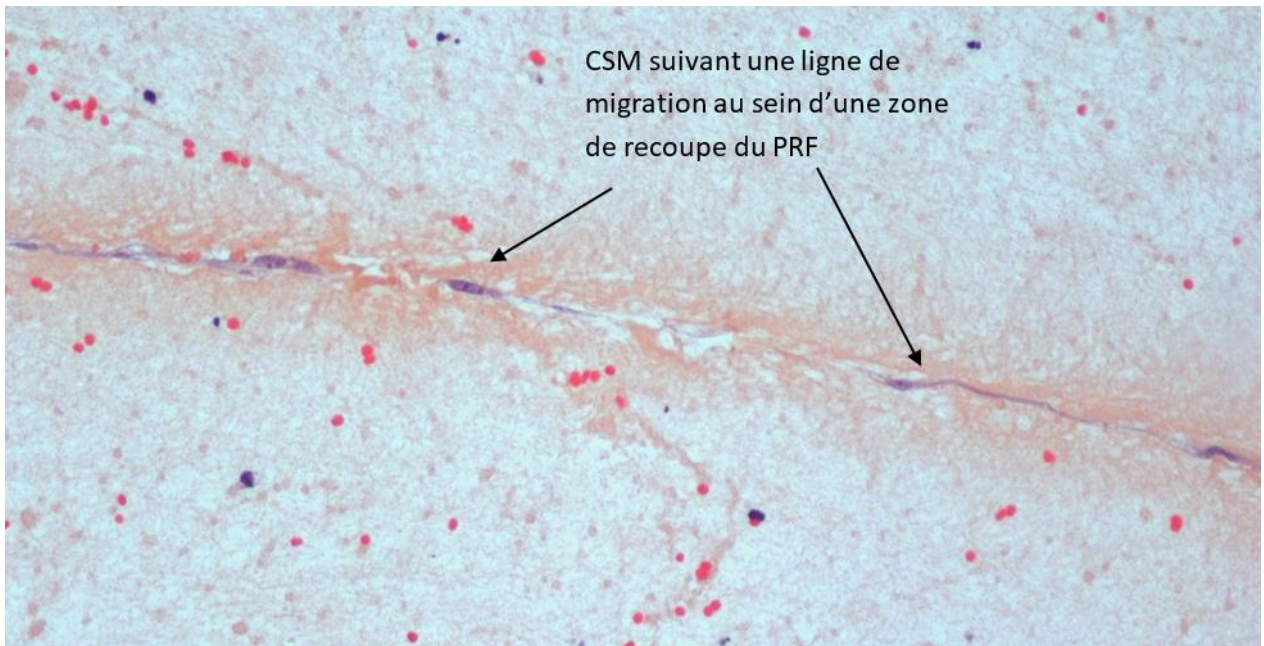


Figure 25: Observation microscopique de coupe histologique à J5 (x400, coloration HE) de PRF percé de trous mis en culture avec les CSM.

Les CSM sont à l'intérieur de la fibrine et semblent migrer selon les zones de recoupe.

Des colorations avec deux immunomarqueurs spéciaux ont été réalisées sur les PRF recoupés après 5 jours de culture. Ces immunomarquages ont été réalisés à Stromalab grâce à l'aide d'Isabelle Raymond-Letron.

Le marqueur anti-vimentine permet de repérer spécifiquement les CSM car c'est un marqueur des cellules de la lignée germinale d'origine mésenchymateuse. Cet anticorps anti-vimentine révèle l'état de multipotence des cellules qu'il marque.

L'antigène Ki-67 fait partie des marqueurs de prolifération. Cet antigène est présent au niveau du noyau des cellules prolifératives aux différentes phases de la mitose. Il est exprimé à la périphérie des chromosomes et agit comme un tensioactif qui permet de maintenir séparés les chromosomes mitotiques.

On visualise également avec ces deux immunocolorations la pénétration des CSM dans la fibrine, et on constate que celles-ci sont toujours dans un état de multipotence et gardent leurs capacités de prolifération (Cf Figure 26).

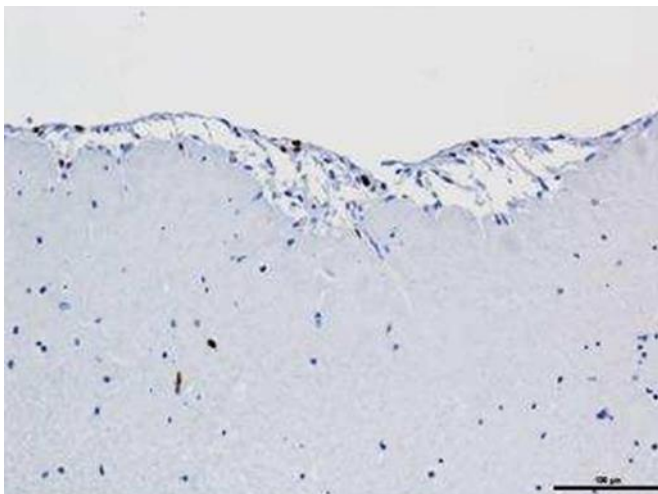
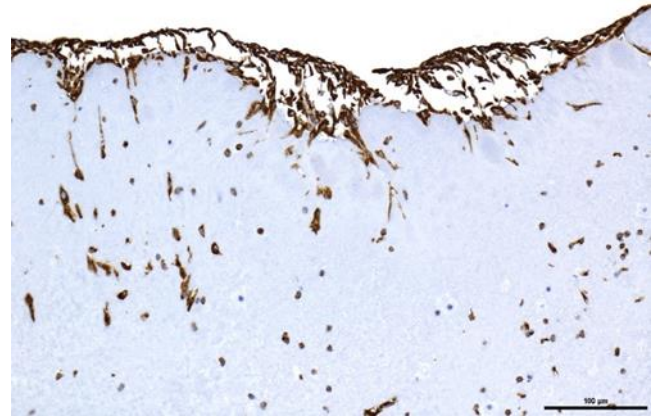
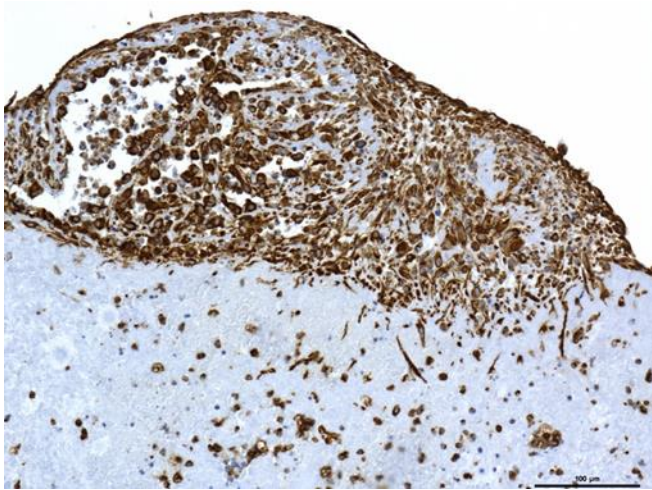


Figure 26: Observations microscopiques de coupes histologiques à J5 (x400, coloration avec marqueur Ki-67 et anti-vimentine) de PRF recoupés mis en culture avec les CSM.

Les deux images du haut sont des coupes avec marquage anti-vimentine qui est spécifique des cellules souches (les CSM apparaissent en marron) et l'image du bas à gauche est une coupe avec marquage Ki-67 (les CSM apparaissent en bleu) spécifique de la prolifération cellulaire.

Sur toutes ces coupes on observe que les CSM sont positives aux deux types de marquages et forment des amas en périphérie du PRF avec de nombreuses cellules qui pénètrent au sein de la fibrine.

V-Discussion

1-Protocole

A-Qualité des PRF

Pour que la formation du PRF soit optimale, le temps entre la récolte de sang sur tube sec et la centrifugation doit être diminué au maximum. La récolte de sang doit être rapide et la centrifugation immédiate au risque d'un échec de formation du PRF car la fibrine polymériserait de manière diffuse et seulement un caillot de taille et de consistance réduite serait obtenu (Dohan et al. 2006a). Dans le cas des expériences précédemment exposées, les lieux de récolte du sang et de centrifugation sont différents, le temps entre les deux opérations est donc augmenté. La formation des PRF n'était pas toujours optimale et il est arrivé que certains caillots de fibrine soient contaminés avec des globules rouges (globule rouge que l'on peut observer sur les coupes histologiques en coloration HE comme sur la Figure 24). De plus, le lieu de centrifugation et donc de création des PRF et le lieu de la mise en culture des PRF avec les CSM sont également différents, un certain temps s'écoule donc entre la création des PRF et leur mise en culture. Ce temps écoulé n'est pas forcément le même dans toutes les expériences et son impact n'a pas été pris en compte. Comme on le sait, le PRF est gorgé de sérum et sa mise à l'air pendant 10 minutes entraîne un relargage de sérum (Dohan et al. 2006b). Aussi, il est possible que ce phénomène ait eu lieu même si les PRF ne sont pas conservés à l'air mais restent dans les tubes secs jusqu'au moment de leur mise en culture. Cette possible variation de qualitative des PRF n'a pas été prise en compte dans ces expériences et on ne sait pas si cela a pu avoir des conséquences sur les interactions entre le PRF et les CSM.

B-Récolte des CSM

Le protocole de récolte des CSM utilisé ici se rapproche du « protocole classique » décrit par Bourzac et al. 2010, à savoir qu'on se base sur les capacités d'adhésion des CSM pour les isoler. Néanmoins, dans le « protocole classique » décrit par Bourzac, l'échantillon de moelle osseuse est d'abord centrifugé pour séparer le surnageant acellulaire du culot contenant les cellules mononuclées (dont font partie les CSM), puis le culot est rincé deux fois avant d'être placé dans la boîte de cytoculture en présence de milieu de culture. Ces étapes de préparation avant la mise en culture des cellules n'ont pas été réalisées dans nos expériences, le but de ces étapes est d'éliminer le surnageant avant la mise en culture des cellules. Dans notre cas, le surnageant a été mis en culture avec toutes les cellules mononuclées et est éliminé rapidement après le premier changement de milieu. Le surnageant est éliminé en même temps que les cellules qui n'ont pas les capacités d'adhésion aux surfaces, à savoir toutes les cellules autres que les CSM.

La préservation des CSM par le froid est un mode de conservation bien connu et utilisé depuis de nombreuses années, cela n'impacterait pas la viabilité des cellules (Rowley, 1992). En revanche, la littérature ne permet pas de dire si les capacités de multiplication des cellules sont conservées à l'identique. La migration et la multiplication des CSM au sein du PRF n'est peut être pas équivalente selon si les CSM proviennent d'un lot qui a été congelé ou non.

C-Paramètres fixés pour la culture de CSM au sein des puits contenant du PRF

Le paramètre quantité de cellule souche avec 30×10^4 ou 60×10^4 cellules mises en culture avec le PRF a été choisi en lien avec les données de la littérature. En 2003 (Smith et al. 2003), Smith réalise des injections de CSM dans le tendon fléchisseur superficiel de chevaux avec une quantité de CSM égale à 64×10^4 cellules. En 2014 (Sun et al. 2014), Sun réimplante 100×10^4 CSM seules ou avec du PRF au sein des lésions myocardiques chez le rat. L'explication de l'utilisation d'une telle quantité de cellules souches pour la réimplantation au sein des lésions tissulaires n'est en revanche pas donnée dans la littérature, il semblerait que l'utilisation d'une telle quantité soit de l'ordre de l'empirisme. Ainsi, ces expériences devraient donc être considérées comme des expériences préliminaires à une série de manipulations répétables où l'on modifie les paramètres de la culture de CSM avec le PRF. Le temps de culture et la quantité de CSM à mettre en culture avec le PRF restent encore à déterminer.

2-Interprétation des résultats

A-Qualité des observations

Pendant le temps de culture de chaque expérience, les observations macroscopiques et microscopiques sont réalisées toujours par le même opérateur mais restent subjectives. Il n'y a pas de données objectives pour mesurer « une impression de quantité de cellules inférieure entre deux expériences » (cf observation expérience 2). On ne peut pas savoir si cette diminution de cellules est due à un manque de multiplication cellulaire, à une mortalité des cellules ou bien au fait qu'elles soient en quantité « normale » mais sont localisées au sein du PRF (leur observation microscopique directe en cours d'expérience est alors impossible au sein de la fibrine qui est trop épaisse).

Les résultats obtenus pour les quatre puits tests au sein d'une même expérience sont sensiblement identiques, il ne semble pas y avoir de variabilité dans les résultats lorsqu'un même lot de PRF est mis en culture avec un même lot de CSM. Les interactions PRF et CSM lors d'une même expérience semblent donc identiques lorsque les paramètres temps de culture et nombre de cellules sont fixés. Les résultats pour une expérience donnée semblent donc

répétables même si le nombre de répétitions dans nos expériences n'est jamais supérieur à 4 (il y a toujours 4 puits tests et deux puits témoins dans une boîte p6).

B-Migration des CSM dans la fibrine et ses conséquences

Ces expériences montrent que les CSM semblent avoir un tropisme particulier pour le PRF, dans toutes les expériences réalisées, les CSM s'agglutinent largement en périphérie de la fibrine. Les observations microscopiques directes et après recoupe histologique semblent montrer qu'une certaine partie des CSM pénètrent dans la fibrine mais l'observation des CSM au cœur du PRF reste encore anecdotique. L'idée d'augmenter la surface de pénétration des CSM pour permettre une plus grande concentration de celles-ci au cœur même du PRF reste encore à développer et à optimiser. L'expérience réalisée en coupant longitudinalement le PRF ou en faisant des trous à l'intérieur de celui-ci va dans le sens de cette idée, mais seulement des observations qualitatives sur lame permettent d'observer les CSM au sein de la fibrine, il n'y a pas de résultats quantitatifs et objectifs permettant de dire que l'augmentation de la surface de contact entre le PRF et les CSM augmente la concentration des CSM au cœur de la fibrine. La forme idéale du PRF permettant la meilleure pénétration des CSM au sein de la fibrine reste encore à déterminer.

On a pu observer qu'au bout d'un certain temps de culture avec les CSM, les PRF rétrécissent de manière marquée. Cette rétraction est spécifique aux PRF en culture avec les CSM car dans les puits témoins les PRF ne se rétractent pas. De plus, dans nos expériences, lorsqu'on multiplie par deux le nombre de cellules mises en culture avec les PRF (60×10^4 dans l'expérience du IV-3) le temps au bout duquel les PRF se contracte est diminué par deux également. Dans la littérature (Textor et al. 2014), on évoque le rétrécissement des gels de fibrine que l'on explique par la déshydratation de ceux-ci. Lorsque le sérum s'échappe du gel, celui-ci peut perdre de 50 à 60% de son poids initial. Dans cet article, la taille des gels de fibrine n'est pas évoquée seulement leur poids, mais cette contraction des gels de fibrine entraîne sûrement une diminution de leur volume. L'hypothèse qui peut être avancée est que les CSM entraînent cette déshydratation et donc la rétraction de la fibrine, les mécanismes restant encore à développer. Sur les recoupe histologiques de PRF réalisées à plusieurs temps de culture et colorées par coloration DAPI et Rhodamine, il semblerait que la fibrine soit organisée différemment à J15 que par rapport aux autres temps de culture plus courts. On peut émettre l'hypothèse que la colonisation de la fibrine par les CSM entraîne une réorganisation de celle-ci, conduisant à une libération du sérum et à la contraction des PRF.

C-Coloration et marquage des CSM

L'hématoxyline éosine permet une coloration bleue violette des noyaux et en rouge du cytoplasme, la fibrine apparaît en rose pale. Les érythrocytes sont facilement repérables et apparaissent en rouge cerise (Cf Figure 24). Avec cette coloration, on repère les CSM grâce à la morphologie caractéristique fuselée ce qui permet de les différencier des autres cellules nucléées comme les leucocytes par exemple.

La coloration DAPI permet de colorer le noyau des cellules car ce colorant se fixe spécifiquement sur l'ADN. Ainsi on peut repérer facilement les CSM qui sont des cellules nucléées. Cependant, les leucocytes sont également des cellules nucléées qui sont présentes dans le PRF donc les noyaux cellulaires colorés en bleu sur les observations de lame au microscope à fluorescence ne sont pas forcément ceux d'une CSM. Cette remarque est particulièrement vraie sur des lames à J3 de culture, où la présence de leucocytes est certainement plus importante qu'à J15 de culture.

Les deux colorations citées précédemment ne sont pas spécifiques aux CSM c'est pourquoi l'on a utilisé sur certaines lames des colorations avec des marqueurs immuno-histochimiques permettant des colorations plus ciblées.

Le marquage positif au Ki67 ou à l'anticorps anti-vimentine que l'on voit sur la Figure 25 nous permet de repérer spécifiquement les CSM car au sein du PRF ce sont les seules cellules ayant des capacités de prolifération ou des caractéristiques de cellule multipotente et ces marquages positifs nous permettent d'affirmer que les CSM même au sein de la fibrine conservent leur capacité de prolifération et leur état de multipotence.

Une autre méthode serait de marquer spécifiquement les CSM avant de les mettre en culture avec le PRF, on pourrait ainsi sur les lames histologiques ne repérer que les CSM dans la fibrine. Cette méthode est utilisée dans l'article de Sun et al. 2014 où les cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu graisseux sont marquées avec du CM-DIL (Vybrantnd) qui est ajouté à la solution de CSM avant que celle-ci soient incorporées au PRF. L'observation par la suite en microscopie à fluorescence des CSM est très aisée.

Dans ce même article, avant de fixer par suture le PRF contenant les CSM sur les lésions myocardiques, Sun centrifuge le tube Eppendorf où le mélange PRF et CSM est réalisé car cela permettrait une meilleure répartition des CSM à l'intérieur du PRF. Or aucune expérience

préliminaire n'a été réalisée pour lui permettre d'affirmer cela, et si l'on pousse le raisonnement plus loin, rien ne lui permet d'affirmer que les CSM soient bien intégrées au sein du PRF.

D-Perspectives d'utilisation

Dans la littérature, il existe de nombreux protocoles d'utilisation du PRF en tant que biomatériau de comblement. En effet les propriétés mécaniques et les nombreux facteurs de croissance qu'il renferme font de ce matériau un outil très intéressant pour l'amélioration de la cicatrisation tissulaire notamment lors de perte de substance. De nombreux articles attestent de son efficacité surtout dans le domaine de la chirurgie bucco-dentaire.

Le travail effectué pour cette thèse est un début d'approche pour évaluer la possible utilisation du PRF en tant que « scaffold », il serait dans ce cas-là le vecteur de cellule souche mésenchymateuse. La structure et la composition originale du PRF ainsi que les propriétés des CSM agiraient en synergie pour œuvrer pour la réparation tissulaire. Le microenvironnement favorable manquant parfois aux CSM pour une implantation correcte au sein d'un tissu lésé, serait apporté par le PRF. Les capacités de support de migration cellulaire et les facteurs de croissance que le PRF renferme sont les éléments clés pour une adaptation totale des CSM à leur environnement. Une telle utilisation du « scaffold PRF+CSM » prendrait tout son sens pour améliorer la cicatrisation d'un tissu dont la régénération est difficile ou dont la cicatrisation entraîne une perte de fonctionnalité tissulaire, ce serait le cas par exemple lors de lésion cartilagineuse. Lorsque des lésions d'ostéochondrose sur un cheval vont être traitées par curetage sous arthroscopie, il serait peut-être envisageable de combler les lésions provoquées par le curetage avec un « scaffold » comme le suggère la Figure 27.

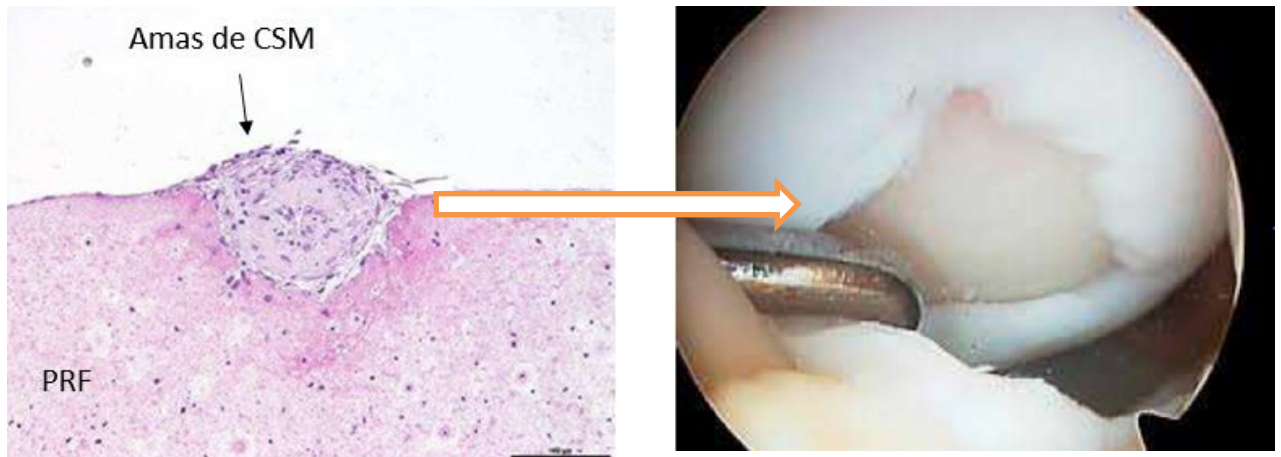


Figure 27: Une possible application en tant que « scaffold » du PRF contenant les cellules souches mésenchymateuses.

L'image de gauche est une coupe histologique (x400, coloration HE) du PRF en contact proche avec un amas de CSM. Une application d'un tel bio-matériau pourrait être de combler des lésions cartilagineuses suite à un curetage arthroscopique. Sur la photographie de droite prise lors d'une arthroscopie, la lésion est la zone plus sombre au milieu du cartilage de couleur blanche.

Si les cellules étaient intégrées « de force » au sein du PRF comme par exemple avec une injection directe dans la fibrine ou avec une force de centrifugation comme le sous-entend Sun (Sun et al. 2014), on ne sait pas comment se comporteraient les CSM une fois qu'elles seraient au cœur de la fibrine. Et c'est pourtant une question essentielle à laquelle il faudrait tenter de répondre car démontrer que les CSM ont une affinité particulière pour la fibrine est une chose, mais l'important est bien de savoir comment les cellules quittent la fibrine ou comment elles se comportent in vivo lorsque la fibrine se dégrade pour se retrouver au contact du tissu lésé, moment où les cellules pourront jouer pleinement leur rôle et permettre la régénération du tissu.

CONCLUSION

La thérapie par les cellules souches a déjà prouvé son efficacité pour le traitement des lésions ostéo-articulaire. L'utilisation de concentrés plaquettaires est une voie de traitement qui reste encore nouvelle pour les affections ostéo-articulaires, même si l'utilisation du PRP commence à s'implanter en médecine vétérinaire avec de plus en plus de laboratoires qui commercialisent des kits facilement utilisables, un tel équipement reste encore l'apanage de clinique de référé en médecine équine. L'utilisation du PRF reste de l'ordre de l'expérimentation en médecine vétérinaire et commence à faire son apparition en médecine humaine dans le domaine de la chirurgie bucco-dentaire notamment. L'utilisation de CSM et de PRF mis ensemble pour répondre au traitement d'affection ostéo-articulaire et l'étude de leurs interactions est très peu documenté dans la littérature.

Nos expériences permettent d'affirmer que les CSM présentent un tropisme pour le PRF et que la migration cellulaire au sein de la fibrine est possible. Une véritable interaction entre les CSM et la fibrine est établie, la fibrine agit comme matrice extracellulaire supportant et aidant à la migration des CSM. Ce passage des CSM au sein de la fibrine entraîne des remaniements de celle-ci : déshydratation du PRF avec perte de volume et une probable réorganisation des mèches de fibrine. Cette migration des CSM ne semble pas en revanche modifier les caractéristiques intrinsèques de ces cellules qui conservent leur état de multipotence et leur capacité de prolifération.

La perspective d'un tel biomatériau qui possède de manière intrinsèque des capacités de cicatrisation et de régénération tissulaire et qui serait de plus vecteur de cellules souches est intéressante. Ce serait un biomatériau de comblement idéal notamment pour des tissus dont la cicatrisation est de mauvaise qualité comme cela peut être le cas pour du cartilage par exemple. Le poster en annexe 5 présenté au congrès annuel du collège européen de chirurgie vétérinaire à Lisbonne résume les expériences et les résultats qui en ont découlé et présente des perspectives pour l'utilisation d'un tel biomatériau en tant que « scaffold ».

ANNEXES

Annexe 1: Liste des différents PRP utilisables dans le commerce d'après Smets et al. 2012

Méthode utilisée	Nom de l'appareil	Produit obtenu	Concentration plaquettaire par rapport à la normale	Récupération plaquettaire (%)	Contenu du produit obtenu
Technique « bouée flottante »	Biomet GPS	PCP	6 – 9 x	70	Buffy coat : plaquettes hyper concentrées, fractions de GB, nombre de GR minimal
	Harvest	PRP	4,6 x	72	
	SmartPrep 2	PRP	4,0 x		
	BMACDepuy Symphony II	PRP	4,0 x		
Système basé sur le <i>cell saver</i>	Electa, Haemonetics, CATS, BRAT	PRP	4 – 6 x	75	Concentré plaquettaire uniquement
Système assisté par l'informatique	Sorin Angel	PRP	4,3 x	70	Buffy coat : plaquettes hyper concentrées, fractions de GB, nombre de GR minimal
	Arteriocyte Medical (Magellan)	PRP	5,1 x	76	
Centrifugation standard	Autogel system Smart PReP	PRP	1 – 2 x	78	Plaquettes peu concentrées dans une suspension plasmatique, nombre de GB minimal
	Cascade PRFM fibrinet system	PRFM	1 – 2 x	78	Membrane de fibrine riche en plaquettes
	Choukroun's PRF	PRF	1 – 2 x	70	Leucocytes et fibrine riche en plaquettes
	PRGF system	PRGF	3 – 4 x	80	Bon équilibre entre nombre de plaquettes et quantité de plasma nombre de GB et GR minimal
Système d'aphérèse	COM.TEC Fresenius	PRP	*	-	Concentré plaquettaire uniquement
Siphonnage direct	Genesis CS	PRP	6 x	68	Concentré plaquettaire, GB à travers le siphon
Aspiration directe	Secquire	PRP	1,6 x	31	Aspiration manuelle du plasma et des plaquettes après centrifugation
	Arthrex ACP	ACP	2,0 x		
Séparation plaquettaire	Vivostat	PRF	6,0 x	65	Fibrine riche en plaquettes Membrane de fibrine
Filtration plaquettaire	Caption	CP	4,3 x	-	Concentré plaquettaire sans plasma

Annexe 2: Protocole de changement de milieu

Le protocole suivant est réalisé stérilement, sous une hotte spécifiquement dédiée aux manipulations de culture cellulaire stérile.

Le protocole de changement de milieu est réalisé tous les 3 jours en moyenne:

- aspirer le milieu de culture à l'aide d'une pipetteuse automatique et le jeter
- Ajouter 25ml de milieu de culture à 37°C (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) additionné de sérum de veau fœtal)

Annexe 3: Protocole de réensemencement des CSM avec trypsination

Le protocole suivant est réalisé stérilement, sous une hotte spécifiquement dédiée aux manipulations de culture cellulaire stérile.

Le protocole de réensemencement est réalisé tous les 5 jours en moyenne:

- aspirer le milieu de culture à l'aide d'une pipetteuse automatique et le jeter
- rincer avec 25 ml de PBS (tampon phosphate salin ou « phosphate buffered saline »)
- Ajouter 3 ml de trypsine et homogénéiser afin de décoller les CSM
- Ajouter 10 ml de DMEM
- Transférer le contenu de la boîte de cytoculture dans un tube
- Centrifuger à 300g pendant 5min
- Eliminer le surnageant, conserver le culot cellulaire
- Mettre en solution les cellules avec 5 ml de DMEM
- Transférer sur une nouvelle boîte de cytoculture
- Compléter avec 20 ml de milieu DMEM

Les CSM adhèrent à nouveau à la surface de la boîte en quelques heures.

Annexe 4: Protocole de coloration des puits de p6 au Giemsa

Tous les puits de p6 en fin d'expérimentation sont colorés avec la coloration Giemsa, cela permet une meilleure visualisation du tapis cellulaire de CSM en fin d'expérimentation et éventuellement la coloration du PRF s'il n'est pas utilisé pour la réalisation de lame histologique.

-lavage des puits au PBS x2

-Ajout 5 ml de méthanol sous hotte aspirante

-laisser agir 7 à 10 min

-jeter le méthanol

-mélanger 12ml d'eau stérile, 360µl de méthanol et 360µl de Giemsa et recouvrir la surface du puits avec la solution

-laisser agir plusieurs heures

-rincer à l'eau

-laisser sécher

Annexe 5: Protocole de coloration des lames au DAPI et à la Rhodamine

Après avoir fait une recoupe sur lame au micotome des PRF mis en contact avec les CSM qui avait été conservé par congélation à -80°C, on réalise une coloration au DAPI et à la rhodamine de ces lames. Le DAPI (Di Aminido Phenyl Indol) colore exclusivement les noyaux cellulaires et la rhodamine colore la fibrine qui apparaissent respectivement en bleu et en orange sous microscopie à fluorescence.

-repérer les tissus sur la lame

-recouvrir de formol 1 min

-rincer à l'eau

-recouvrir de colorant DAPI et Rhodamine 5 min

-rincer à l'eau

-recouvrir d'une lame et la fixer avec du vernis

Annexe 6: Poster présenté au congrès annuel du Collège Européen de Chirurgie Vétérinaire (ECVS de Lisbonne)

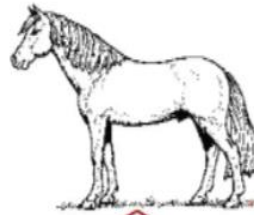
Mesenchymal stem cells (EQ-BM MSC) colonize platelet rich fibrin (PRF), a preliminary step for bio-scaffold applications

Gabriel Cuevas Ramos^{1,3,4}, Isabelle Raymond Letron², Pauline Jorieux¹, Marta Prades³

1. Clinique Equine, Université de Toulouse, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, INP-ENVT, France, g.cuevas@envt.fr
2. STROMALab, Université de Toulouse, CNRS ERL5311, EFS, ENVT, Inserm U1031, UPS, Toulouse, France
3. Unitat Equina, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain
4. IRSD, Inserm-INRA-ENVT-Université de Toulouse, France

Introduction

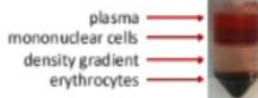
Platelet rich fibrin (PRF) is a blood product obtained from slow centrifugation of fresh blood. The clot formed is composed of a strong fibrin matrix in which platelets and leucocytes are trapped. Platelet growth factors are eluted from this clot giving it the ideal characteristic to be potentially used as a bio-scaffold for regenerative medicine.



Hypothesis

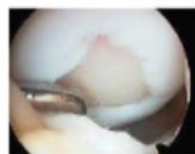
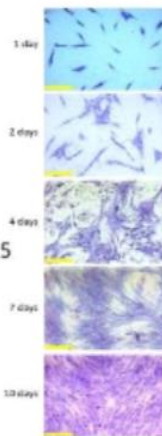
Administration of EQ-BM MSC augments tissue regeneration although local homing is often times ephemeral. Introducing cells already proliferating within a scaffold into the injured tissues may improve healing potential. In this preliminary study we propose that EQ-BM MSC will colonize and proliferate within PRF offering an attractive possibility for longer effects of treatment.

Mononuclear cells recovery



Culture flask

Figure 1
EQ-BM MSC 10 to 15
days of culture for
amplification



Possible bio-scaffold?

Materials and Methods

PRF was either left intact, opened through its longitudinal axis without separating it into two parts, or perforated by 6 holes with an 18G needle. Then, 30×10^4 MSC were added for each PRF, and left in culture for 5, 10 or 15 days

Results

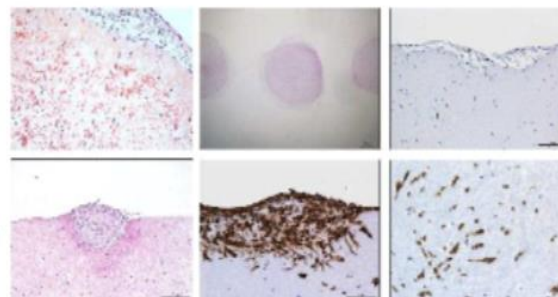


Figure 2. Immunohistochemistry analysis of PRF colonized by EQ-BM MSC
Top left: haematoxylin-eosine staining of PRF in co-culture with EQ-BM MSC that are colonizing the fibrin clot. Bottom left: haematoxylin-eosine staining, showing a cluster of EQ-BM MSC in close contact with the PRF. Middle top: overview of a PRF. Top right: positive cells to Ki67 marker. Middle and right bottom: positive cells to anti-vimentin marker.

Conclusions

PRF shrank if kept under culture for longer than five days, EQ-BM MSC cells (anti-vimentin positive) were in close contact with the PRF and inside it, even along the channels made with the needles. Cells colonized the PRF, and also proliferated within as shown by specific staining with Ki67 as marker of proliferation. EQ-BM MSC colonize PRF within 5 days which implies a first step in the investigation of stem cell delivery to tissues in this bio-scaffold.

BIBLIOGRAPHIE

- Bourzac, C., Smith, L. C., Vincent, P., Beauchamp, G., Lavoie, J. P., & Laverty, S. (2010). Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Veterinary Journal*, *42*(6), 519–527.
- Brossi, P. M., Moreira, J. J., Machado, T. S. L., & Baccarin, R. Y. A. (2015). Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Veterinary Research*, *11*(98), 1–17.
- Burnouf, T., Tseng, Y. H., Kuo, Y. P., & Su, C. Y. (2008). Solvent/detergent treatment of platelet concentrates enhances the release of growth factors. *Transfusion*, *48*, 1090–1098.
- Carter, C. A., Jolly, D. G., Worden, C. E., Hendren, D. G., & Kane, C. J. M. (2003). Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Experimental and Molecular Pathology*, *74*, 244–255.
- Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M. O., Schoeffler, C., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., Dohan, D. M. (2006a). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, *101*(3), 56–60 .
- Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M. O., Schoeffler, C., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., Dohan, D. M. (2006b). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, *101*(3), 299–303.
- Cousty, M. (2013). Actualités sur l ’ utilisation des cellules souches mésenchymateuses en thérapeutique articulaire chez le cheval. *Pratique Vétérinaire équine*, *179*, 42–46.
- Cuevas, G., & Décory, M. (2013). Cellules souches mésenchymateuses, de leur identification en laboratoire au traitement des tendinites. *Pratique Vétérinaire équine*, *179*, 48–52.

- De La Puente, P., & Ludeña, D. (2013). Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Experimental Cell Research*, 322(1), 1–11.
- Desai, C., Kini, Y., Mahindra, U., & Bakshi, M. (2013). Use of platelet-rich fibrin over skin wounds: Modified secondary intention healing. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 6(1), 35.
- Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Kumar, D. S. (2011). Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application : A Review. *International Journal of Polymer Science*, 2011(ii), 1–19.
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006a). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 101(3).
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006b). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 101(3), e45–e50.
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006c). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 101(3).
- Dohan Ehrenfest, D. M., Rasmusson, L., & Albrektsson, T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*, 27(3), 158–167.
- Dohan Ehrenfest, D. M., Del Corso, M., Diss, A., Mouhyi, J., & Charrier, J.-B. (2010). Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *The Journal of Periodontology*, 81(4), 546–555.
- Frisbie, D. D., Kisiday, J. D., Kawcak, C. E., Werpy, N. M., & McIlwraith, C. W. (2009). Evaluation of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction or Bone Marrow-Derived

- Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, 27(12),
- Frisbie, D. D., & Smith, R. K. W. (2010). Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Veterinary Journal*, 42(1), 86–89.
- Gassling, V., Hedderich, J., Açı, Y., Purcz, N., Wiltfang, J., & Douglas, T. (2013). Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. *Clinical Oral Implants Research*, 24(3), 320–328.
- He, L., Lin, Y., Hu, X., Zhang, Y., & Wu, H. (2009). A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 108(5), 707–713.
- Herthel, D. J. (2001). Enhanced Suspensory Ligament Healing in 100 Horses by Stem Cells and Other Bone Marrow Components. *Proceeding of the Annual Meeting of the American Association of Equine Practitioners*, 47, 319–321.
- Kazemi, D., Fakhrjou, A., Mirzazadeh Dizaji, V., & Khanzadeh Alishahi, M. (2014). Effect of autologous platelet rich fibrin on the healing of experimental articular cartilage defects of the knee in an animal model. *BioMed Research International*, 2014, 8–10.
- Koch, T. G., Berg, L. C., & Betts, D. H. (2009). Current and future regenerative medicine — Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Canadian Veterinary Journal*, 50, 155–165.
- Lichtenfels, M., Colomé, L., Deise Sebben, A., & Braga-Silva, J. (2013). Effect of platelet rich plasma and platelet rich fibrin on sciatic nerve regeneration in a rat model. *Microsurgery*, 30(3), 242–248.
- Matsunaga, D., Akizuki, S., Takizawa, T., Omae, S., & Kato, H. (2013). Compact platelet-rich fibrin scaffold to improve healing of patellar tendon defects and for medial collateral ligament reconstruction. *Knee*, 20(6), 545–550.

- McIlwraith, C. W., Frisbie, D. D., Rodkey, W. G., Kisiday, J. D., Werpy, N. M., Kawcak, C. E., & Steadman, J. R. (2011). Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy*, *27*(11), 1552–1561.
- Mokbel, A. N., El Tookhy, O. S., Shamaa, A. A., Rashed, L. A., Sabry, D., & El Sayed, A. M. (2011). Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *Musculoskeletal Disorders*, *12*–259.
- Pichereau, F., Décory, M., & Cuevas, G. (2014). Autologous Platelet Concentrate as a Treatment for Horses with Refractory Fetlock Osteoarthritis. *Journal of Equine Veterinary Science*, *34*(4), 489–493.
- Richardson, L. E., Dudhia, J., Clegg, P. D., & Smith, R. (2007). Stem cells in veterinary medicine - attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends in Biotechnology*, *25*(9), 409–416.
- Rowley, S. D. (1992). Hematopoietic Stem Cell Cryopreservation: Current Techniques A Review of Cryopreservation. *Journal of Hematotherapy*, *1*, 233–250.
- Shah, M., Patel, J., Dave, D., & Shah, S. (2015). Comparative evaluation of platelet-rich fibrin with demineralized freeze-dried bone allograft in periodontal infrabony defects: A randomized controlled clinical study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, *19*(1), 56–60.
- Simonpieri, A., Girard, M., & Dohan, D. (2005). De l'usage des concentrés plaquettaires autologues en application topique Autologous platelet concentrates for topical use. *Odontologie*, *1*, 141–180.
- Smets, F., Croisier, J., Forthomme, B., Crielaard, J., & Kaux, J. (2012). Applications cliniques du plasma riche en plaquettes (PRP) dans les lésions tendineuses : revue de la littérature. *Science et Sports*, *27*(3), 141–153.
- Smith, R. K. W., Korda, M., Blunn, G. W., & Goodship, A. E. (2003). Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the


- superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Veterinary Journal*, 35(1), 99–102.
- Smith, R. K. W. (2008). Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disability and Rehabilitation*, 30, 1752–1758.
- Su, C. Y., Kuo, Y. P., Tseng, Y. H., Su, C., & Burnouf, T. (2009). In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): A proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 108(1), 56–61.
- Sun, C. K., Zhen, Y. Y., Leu, S., Tsai, T. H., Chang, L. T., Sheu, J. J., Chen, Y. L., Chua, S., Chai, H. T., Lu, H. I., Chang, H. W., Lee, F. Y., Yip, H. K. (2014). Direct implantation versus platelet-rich fibrin-embedded adipose-derived mesenchymal stem cells in treating rat acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, 173(3), 410–423.
- Sutter, W. (2007). PRP : Platelet Rich Plasma.
- Textor, J. A., Murphy, K. C., Leach, J. K., & Tablin, F. (2014). Ultrastructure and growth factor content of equine platelet-rich fibrin gels. *American Journal of Veterinary Research*, 75(4), 392–401.
- Verwilghen, D., Gabriel, V., G, Van Galen G., Gabriel, A., Grulke, S., & Sertheyn, D. (2010). Les tendinopathies et desmopathies de la région métacarpienne et tarsienne : une revue des thérapies actuelles. Première partie : la structure, les lésions du tendon et le diagnostic. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 154, 1–15.
- Verwilghen, D., Caudron, I., Van Galen, G., Gabriel, A., Grulke, S., & Sertheyn, D. (2010). Les tendinopathies et desmopathies de la région métacarpienne et tarsienne : une revue des thérapies actuelles. Seconde partie : les traitements. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 154, 1–15.
- Vidal, M. A., Walker, N. J., Napoli, E., & Borjesson, D. L. (2012). Evaluation of Senescence in Mesenchymal Stem Cells and Umbilical Cord Tissue. *Stem Cells and Development*, 21(2), 273–283.

- Whitman, D. H., Green, D. M., & Berry, R. L. (1997). Platelet Gel : An Autologous Alternative to Fibrin Glue With Applications in Oral and Maxillofacial Surgery. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 55, 1294–1299.
- Wilke, M. M., Nydam, D. V., & Nixon, A. J. (2007). Enhanced Early Chondrogenesis in Articular Defects following Arthroscopic Mesenchymal Stem Cell Implantation in an Equine Model. *Journal Of Orthopaedic Research*, 25, 913–925.
- Yuanzheng, C., Yan, G., Ting, L., Yanjie, F., Peng, W., & Nan, B. (2015). Enhancement of the Repair of Dog Alveolar Cleft by an Autologous Iliac Bone, Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cell, and Platelet-Rich Fibrin Mixture. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 135(5), 1405–1412.
- Zhang, Y., Tangl, S., Huber, C. D., Lin, Y., Qiu, L., & Rausch-Fan, X. (2012). Effects of Choukroun’s platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: A histological and histomorphometric study. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 40(4), 321–328.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

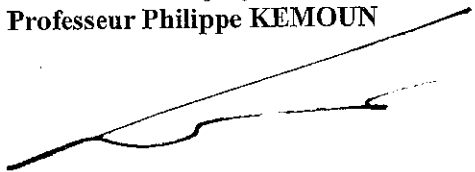
Je soussigné, Gabriel CUEVAS RAMOS, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **JORIEUX Pauline** intitulée « Evaluation de la migration de cellules souches mésenchymateuses équine dans un caillot de fibrine riche en plaquette » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.


Fait à Toulouse, le 2 novembre 2016
Docteur Gabriel CUEVAS RAMOS
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITZELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Philippe KEMOUN



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier

Le ~~Président de l'Université~~ **Monsieur Jean-Benoît MATHIEU**
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU


Régine ANDRE-OBRECHT

Mlle JORIEUX Pauline
a été admis(e) sur concours en : 2011
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015
a validé son année d'approfondissement le : 23/06/2016
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

NOM: JORIEUX

PRENOM: Pauline

TITRE: EVALUATION DE LA MIGRATION DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES EQUINES DANS UN CAILLOT DE FIBRINE RICHE EN PLAQUETTE

RESUME: Les lésions musculo-squelettiques sont fréquentes chez le cheval. La cicatrisation de ce type de lésion est souvent de mauvaise qualité ce qui entraîne un fort taux de récurrence. Par exemple, c'est le cas pour la tendinite ou pour la dégénérescence du cartilage articulaire. Les traitements classiques sont parfois insuffisants pour guérir de telles affections. Ces dernières années, les traitements appartenant à la branche de la médecine régénérative ont fait leur apparition. La thérapie par les cellules souches mésenchymateuses (CSM) a déjà prouvé son efficacité dans le traitement des lésions ostéo-articulaires et l'utilisation des concentrés plaquettaire commence à se démocratiser. Le PRF (fibrine riche en plaquette) est un composé plaquettaire original, composé d'un réseau tridimensionnel de fibrine permettant l'enchevêtrement de plaquettes, leucocytes et facteurs de croissance en grande quantité. L'utilisation conjointe de CSM et de PRF pour répondre au traitement d'affection ostéo-articulaire et l'étude de leurs interactions sont très peu documentées dans la littérature. Nos expériences permettent d'affirmer que les CSM présentent un tropisme pour le PRF et que la migration cellulaire au sein de la fibrine est possible. Cet assemblage pourrait être un biomatériau de comblement idéal notamment pour des tissus dont la cicatrisation est incomplète et/ou de mauvaise qualité.

MOTS-CLES: Cellule souche, Equine, Fibrine riche en plaquette, Migration cellulaire

TITLE: EVALUATION OF EQUINE MESENCHYMAL STEM CELL MIGRATION IN A PLATELET RICH FIBRIN CLOT

ABSTRACT: Musculoskeletal injuries are common in horses. This type of lesion is often associated with poor healing quality causing a high rate of recurrence. That is the case of tendonitis and of joint cartilage degeneration. Sometimes conventional treatments are not efficient to cure such diseases. In recent years, regenerative medicine treatments have emerged. Therapy with mesenchymal stem cells (MSC) has already proven its efficiency in the treatment of musculoskeletal injuries and use of platelet concentrates has appeared. PRF (platelet rich fibrin) is an original platelet compound, consisting of a three-dimensional fibrin network which traps platelets, leukocytes and growth factors in large quantities. PRF and CSM association to cure musculoskeletal diseases and the study of their interactions are poorly documented in literature. Our experiments show that MSCs have a tropism for PRF and cell migration within fibrin is possible. This biomaterial could be an ideal scaffold to regenerate tissue with incomplete healing and/or poor healing quality.

KEY WORDS: Stem cell, Equine, Platelet rich fibrin, Cell migration