

Titre: Comparaison in vitro de la réponse mécanobiologique d'explants de plaques de croissance porcines sous chargements statique et dynamique.
Title:

Auteur: Kim Sergerie
Author:

Date: 2010

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Sergerie, K. (2010). Comparaison in vitro de la réponse mécanobiologique d'explants de plaques de croissance porcines sous chargements statique et dynamique. [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/334/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/334/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Isabelle Villemure, & Stefan Parent
Advisors:

Programme: Génie mécanique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

COMPARAISON *IN VITRO* DE LA RÉPONSE MÉCANOBIOLOGIQUE
D'EXPLANTS DE PLAQUES DE CROISSANCE PORCINES SOUS
CHARGEMENTS STATIQUE ET DYNAMIQUE

KIM SERGERIE

DÉPARTEMENT DE GÉNIE MÉCANIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE MÉCANIQUE)

JUIN 2010

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

COMPARAISON *IN VITRO* DE LA RÉPONSE MÉCANOBIOLOGIQUE D'EXPLANTS DE
PLAQUES DE CROISSANCE PORCINES SOUS CHARGEMENTS STATIQUE ET
DYNAMIQUE

Présenté par : SERGERIE Kim

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. YAHIA L'Hocine, Ph.D., président

Mme VILLEMURE Isabelle, Ph.D., membre et directrice de recherche

M. PARENT Stefan, MD, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. LAVIGNE Patrick, MD, Ph.D., membre

DÉDICACE

À grand-maman Adèle.

Merci au p'tit génie en toi de m'avoir transmis ta curiosité et ta soif de connaissances.

REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à la réalisation de ce projet ainsi qu'à la réussite de ces années aux études supérieures.

Je tiens à remercier sincèrement Dre Isabelle Villemure, qui, en tant que directrice de recherche, s'est toujours montrée disponible et à l'écoute. Sa rigueur scientifique et son implication marquée lors des dernières années se sont avérées essentielles à la réalisation de ce projet de recherche.

Également merci au Dr Stefan Parent, co-directeur de recherche, qui a su aux bons moments, questionner et remettre en perspective chacune des étapes du projet. Je remercie aussi Dre Florina Moldovan, collaboratrice particulière, pour sa participation active au projet ainsi que pour ses nombreux conseils.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux membres des laboratoires des Dre Isabelle Villemure et Dre Florina Moldovan pour leur contribution, leur soutien et leur patience. Je remercie particulièrement Pierre-François Beauchemin et Irène Londoño pour leur considérable contribution dans les analyses histomorphométriques et les essais d'immunohistochimie. Merci à Vinciane Bocquet pour son travail de programmation pour la prise de mesures histomorphométriques semi-automatisées. Merci aussi à Michelle Dion, David Hamel, Gabriel Kaufman et Raphaëlle Lambert pour leur aide précieuse dans le développement des protocoles d'extraction d'ARN. Finalement, merci à Samira Amini, Martin Cousineau, Khaled Fendri, Martin Garon, Marc-Olivier Lacoursière, Thierry Lafrance, Dominique Leboeuf, Souad Rhalmi, Barthélémy Valteau, Yaroslav Wakula et Charlotte Zaouter pour leur aide et leur présence.

Je n'oublie pas ma famille et mes proches pour leur soutien et leurs encouragements. Merci à maman, papa, Audrey, Vincent, Hugo, Marc-Alexandre, Simon, Jonathan, Sylvain, Josette, Maude, Laurence et Jérôme.

Merci à tous et à toutes.

RÉSUMÉ

L'environnement et les forces mécaniques peuvent moduler le taux de croissance des os. Ce phénomène constitue un concept clé dans la progression des malformations musculosquelettiques infantiles et juvéniles. La modulation mécanique de la croissance est d'un intérêt grandissant dans le développement et l'amélioration des approches minimalement invasives qui visent la modulation de la croissance de manière locale tout en préservant la croissance naturelle des os et les fonctions des différents segments osseux. La croissance longitudinale des os s'opère au droit des plaques de croissance. Bien que plusieurs approches préconisées en orthopédie pédiatrique soient basées sur la modulation de la croissance, les paramètres de chargement optimaux, permettant un meilleur contrôle sur la modulation de la croissance, ne sont pas clairement définis. Des études récentes ont investigué les effets d'un chargement statique vs dynamique appliqué sur des plaques de croissance, mais ont utilisé des paramètres de chargement non contrôlés, non équivalents en terme de chargement moyen résultant, ou non normalisés. Cette étude vise à déterminer les effets différentiels entre chargements statiques ou cycliques contrôlés, équivalents et normalisés sur la plaque de croissance, afin de déterminer le type de chargement offrant le meilleur potentiel de modulation de croissance.

Des explants de plaques de croissance porcines provenant de porcs âgés de 4 semaines ont été divisés en 4 groupes : baseline, contrôle, chargement statique et chargement cyclique équivalent. Une déformation en compression appliquée à un taux de $1.5E-03 \text{ s}^{-1}$ puis maintenue constante à 10% est appliquée sur les explants du groupe statique et une déformation en compression sinusoïdale (0.1 Hz) variant de 7% à 13% (moyenne de 10%) est utilisée pour le groupe dynamique. Les chargements sont réalisés sur une période de 48 heures à l'aide d'un système de microchargement installé dans un incubateur (37 °C, 5% CO₂). Le groupe contrôle est incubé dans les mêmes conditions, mais sans chargement. Pour le groupe baseline, les explants sont traités immédiatement après la dissection. Suite aux tests, l'histomorphométrie des plaques de croissance est caractérisée à partir de fragment d'explants enrobés dans le méthylmétacrylate. L'épaisseur totale de la plaque de croissance ainsi que la hauteur combinée des zones proliférative et hypertrophique sont mesurées sur des coupes histologiques colorées au bleu de Toluidine, puis le ratio combiné des deux zones inférieures par rapport à l'épaisseur totale est

évalué. Des analyses statistiques sont complétées afin de comparer les chargements statique et dynamique. L'expression de l'aggrécane, du collagène de type II, du collagène de type X et du MMP13 dans la matrice extracellulaire est caractérisée par immunohistochimie sur des sections de paraffine. Des analyses qualitatives permettent d'évaluer le niveau d'expression de chacune des protéines de même que sa localisation dans la plaque de croissance. Une analyse comparative montre les tendances et les différences entre les groupes.

Les résultats indiquent que la compression statique engendre une diminution importante du ratio combiné des zones proliférative et hypertrophique par rapport à l'épaisseur totale de la plaque de croissance. Dans le cas des échantillons chargés dynamiquement, ce ratio est conservé lorsque comparé aux échantillons contrôle. Une désorganisation importante des colonnes de chondrocytes est cependant observée dans les zones proliférative et hypertrophique des échantillons chargés dynamiquement alors que l'organisation structurale des chondrocytes est conservée dans les échantillons chargés statiquement. Cette perturbation de l'arrangement colonnaire dans les échantillons chargés dynamiquement pourrait vraisemblablement être reliée à une augmentation de la prolifération cellulaire, qui aurait forcé l'accommodement de matériel cellulaire et/ou extracellulaire ajouté dans la zone proliférative. Les résultats montrent également une réduction de l'expression de l'aggrécane, du collagène de type II et du collagène de type X suite au chargement statique. En revanche, la compression dynamique contribue à la synthèse de l'aggrécane et du collagène de type II dans la matrice extracellulaire de la plaque de croissance, suggérant que les charges dynamiques préservent la composition de la plaque de croissance. Considérant que la matrice extracellulaire ainsi que la prolifération et l'hypertrophie des chondrocytes sont étroitement liées au processus de croissance longitudinale, la croissance pourrait possiblement reprendre normalement après un traitement orthopédique de modulation de croissance impliquant des charges dynamiques.

Les principales limites du projet résident dans l'utilisation d'un modèle expérimental *in vitro* et dans la taille limitée de l'échantillonnage. En contrepartie, cette étude est la première à compléter une analyse comparative normalisée qui fournit des indications pertinentes sur les effets différentiels des charges statiques et dynamiques équivalentes en terme de déformation moyenne.

L'hypothèse de recherche, selon laquelle des chargements statiques et cycliques équivalents entraînent des changements distincts dans l'histomorphométrie de la plaque de croissance et dans les modes d'expression de protéines de sa matrice extracellulaire, est confirmée. Le type de chargement joue un rôle important dans la réponse mécanobiologique des plaques de croissance et le processus de croissance longitudinale est affecté différemment par une compression statique ou dynamique. La réalisation d'une future étude *in vivo* permettra entre autres de mesurer la prolifération cellulaire, l'hypertrophie des chondrocytes ainsi que le taux de croissance. Le potentiel de modulation de croissance des charges dynamiques versus les charges statiques pourrait être démontré concrètement.

Mots-clés : plaque de croissance, compression statique/dynamique, mécanobiologie, histomorphométrie, immunohistochimie

ABSTRACT

The environment and mechanical forces may modulate the rate of bone growth. This is a key concept in the progression of infantile and juvenile musculoskeletal deformities. The mechanical modulation of growth is an increasing interest in the development and improvement of minimally invasive approaches that aim at modulating local growth while preserving the natural growth and functions of bone and bone segments. Bone longitudinal growth occurs in the growth plate. Although several approaches advocated in pediatric orthopedics are based on growth modulation, optimal loading parameters, allowing better control over the growth modulation, are not clearly defined. Recent studies have investigated the effects of dynamic versus static loads applied to growth plates, but have used uncontrolled loading parameters that were nonequivalent in terms of average strain or not standardized. This study aims to determine the differential effects between static and cyclic loadings, equivalent and standardized, on the growth plate to determine which type of loading has the greatest potential for growth modulation.

Growth plate explants from 4-week-old swine were divided into four groups: baseline, control, static loading and equivalent cyclic loading. A 10% compressive strain is applied on the explants at a rate of $1.5\text{E-}03\text{ s}^{-1}$ and then kept constant. A sinusoidal compressive strain (0.1 Hz) ranging from 7% to 13% (mean of 10%) is used for the dynamic group. The loads are maintained over a 48 hours period using a micromechanical testing system installed in an incubator (37 ° C, 5% CO₂). The control group is incubated under the same conditions but without loading. For the baseline group, the explants were treated immediately after dissection. Following the tests, histomorphometry of growth plates is characterized from explants fragment embedded in the methylmethacrylate. The total thickness of the growth plate and the combined height of the proliferative and hypertrophic zones are measured on histological sections stained with Toluidine blue, and the combined ratio of the two lower zones compared to the total thickness is evaluated. Statistical analyses are conducted to compare the response to static and dynamic loads. The expression of aggrecan, type II collagen, type X collagen and MMP13 in the extracellular matrix is characterized by immunohistochemistry on paraffin sections. Qualitative analyses are completed to assess the level of expression of each protein as well as its location in the growth plate. A comparative analysis shows trends and differences between groups.

The results indicate that static compression leads to a significant decrease in the combined ratio of the proliferative and hypertrophic zones relative to the total thickness of the growth plate. In the case of dynamically loaded samples, this ratio is preserved when compared with control samples. A major disruption of the columnar organization of chondrocytes is observed in the proliferative and hypertrophic zones of dynamically loaded samples, however the structural organization of chondrocytes is retained in the statistically loaded samples. This disruption of the columnar arrangement in the dynamically loaded samples could probably be related to increased cell proliferation, which would force the accommodation of additional cellular and/or extracellular material added to the proliferative zone. The results also show a reduction in the expression of aggrecan, type II collagen and type X collagen after static loading. In contrast, dynamic compression contributes to the synthesis of aggrecan and type II collagen in the extracellular matrix of growth plate, suggesting that dynamic loads preserve the composition of the growth plate. Considering that the extracellular matrix and the proliferation and hypertrophy of chondrocytes are intimately related to the longitudinal growth process, growth could possibly return to normal after orthopedic treatment involving growth modulation based on dynamic loads.

The main limitations of the project are the use of an experimental *in vitro* model and the limited size of the samples. In return, this study is the first to complete a standard benchmarking that provides relevant information on the differential effects of static and dynamic loading equivalent in terms of average strain.

The research hypothesis that static and equivalent cyclic loads result in distinct changes in histomorphometry of the growth plate and in the expression pattern of the extracellular matrix proteins is confirmed. The type of loading plays an important role in the mechanobiological response of the growth plates and the longitudinal growth process is affected differently by a static or dynamic compression. The realization of a future *in vivo* study will include measurement of cell proliferation, chondrocytes hypertrophy and growth rate. The growth modulation potential of dynamic versus static loads could be demonstrated in concrete terms.

Keywords : growth plate, static/dynamic compression, mechanobiology, histomorphometry, immunohistochemistry

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VIII
TABLE DES MATIÈRES	X
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XV
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DES CONNAISSANCES	3
1.1 Le système musculosquelettique	3
1.1.1 Rôle du système musculosquelettique	3
1.1.2 Composition du système musculosquelettique	3
1.2 La plaque de croissance et la croissance longitudinale	9
1.2.1 La plaque de croissance	9
1.2.2 La croissance longitudinale des os	15
1.3 Mécanobiologie de la plaque de croissance	20
1.3.1 Modulation de la croissance	20
1.3.2 Pathologies musculosquelettique reliées à la croissance longitudinale des os	21
1.3.3 Effets d'un chargement mécanique sur le taux de croissance	27
1.3.4 Effets d'un chargement mécanique sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance	29
1.3.5 Effets d'un chargement mécanique sur la biologie de la plaque de croissance	30

1.3.6 Comparaison des effets de charges statique ou dynamique sur la mécanobiologie de la plaque de croissance.....	34
CHAPITRE 2 RATIONNELLE DU PROJET ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	36
CHAPITRE 3 ARTICLE SCIENTIFIQUE	39
3.1 Growth plate explants respond differently to <i>in vitro</i> static and dynamic loadings	39
3.1.1 Abstract (219 words).....	40
3.1.2 Introduction.....	41
3.1.3 Methods.....	43
3.1.4 Results.....	46
3.1.5 Discussion.....	50
3.1.6 Acknowledgments.....	53
3.1.7 References.....	54
CHAPITRE 4 ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES ET RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	57
4.1 Analyses RT-qPCR.....	57
4.1.1 Méthodologie	57
4.1.2 Résultats.....	63
4.1.3 Précautions lors des manipulations.....	68
CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE	70
CONCLUSION.....	77
BIBLIOGRAPHIE.....	80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Stimulation et inhibition de l'expression des différents constituants de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance.....	18
Tableau 1.2 : Tableau récapitulatif des principaux composants et dégradants de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance.....	19
Tableau 3.1 : Histomorphological measurements of porcine distal ulna growth plates under static or dynamic compression (mean values \pm standard deviations).	48

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Structure des os longs (A) vue antérieure avec coupe frontale (B) coupe transversale agrandie (image adaptée de [22]).....	5
Figure 1.2 : Apparence de l'os spongieux (license libre autorisée par Patrick Siemer, San Francisco, Wikimedia Commons)	7
Figure 1.3 : Composition et structure interne des os longs (A) schéma en coupe de l'os cortical et de l'os spongieux (B) schéma en coupe d'un ostéon agrandi (image adaptée de [22])	7
Figure 1.4 : Représentation schématique de l'orientation des fibres dans le cartilage articulaire (image adaptée de [24])	9
Figure 1.5 : Section histologique de plaque de croissance porcine (imprégnation en paraffine, coloration au bleu de Toluidine – grossissement 100x).....	12
Figure 1.6 : Ossification endochondrale des os longs (image adaptée de [22])	16
Figure 1.7 : Contribution relative des zones proliférative et hypertrophique dans la croissance longitudinale quotidienne d'os de rats (figure adaptée de [56]).....	17
Figure 1.8 : Représentation schématique des patrons de déformation scoliotiques (image adaptée de [92]).....	21
Figure 1.9 : Représentation schématique d'une cyphose normale (gauche) et d'une cyphose anormale (droite).....	22
Figure 1.10 : Représentation schématique d'un spondylolisthésis (image tirée de [97]).....	23
Figure 1.11 : Représentation schématique de <i>genu valgum</i> et <i>genu varum</i>	24
Figure 1.12 : <i>Talipes equinovarus</i> et pied normal (image tirée de [98])	24
Figure 2.1 : Représentation schématique de la méthodologie de l'étude	38
Figure 3.1 : Histological section showing the growth plate structure as well as the reserve, proliferative and hypertrophic zones.	41
Figure 3.2 : Growth plate cylindrical sample extraction using a 6 mm diameter biopsy punch. The growth plate is located between the metaphysis and epiphysis.	43

Figure 3.3 : Schematic of the unconfined compression test. Samples were submitted to static or dynamic compression for 48h. All samples were bathed in DMEM (supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics) throughout the test.	44
Figure 3.4 : Representative growth plate sections (methyl methacrylate embedding, toluidine blue staining) showing the columnar arrangements of the chondrocytes under static or dynamic compression. Scale bar represents 200 μ m in lower magnifications and 100 μ m in higher magnifications.	47
Figure 3.5 : Histomorphological measurements of porcine distal ulna growth plates under static or dynamic compression (mean values + standard deviations). Asterisks represent significant differences compared to control (\dagger p-value < 0.05, * p-value < 0.10).	48
Figure 3.6 : Immunohistochemistries showing aggrecan, type II collagen, type X collagen and MMP13 staining for the baseline, control, static and dynamic groups (paraffin embedding, hematoxylin staining). Scale bar represents 200 μ m.	50
Figure 4.1 : Principales étapes de l'extraction d'ARN (image adaptée de [119])	57
Figure 4.2 : Homogénéiseur de tissu biologique (www.precellys.com)	58
Figure 4.3 : Homogénéiseur manuel de tissus biologiques (Omni International 2000). Gros plan sur le rotor et le stator.	59
Figure 4.4 : Pilon et mortier de laboratoire	60
Figure 4.5 : ARN dégradée vs ARN intacte (image tirée de [122])	62
Figure 4.6 : Résultats d'une électrophorèse d'ARN sur gel d'agarose. ARN présente, mais dégradée.	62
Figure 4.7 : Sommaire de l'électrophorèse au Bioanalyzer	64
Figure 4.8 : Sommaire final de l'électrophorèse au Bioanalyzer (1 de 3)	65
Figure 4.9 : Sommaire final de l'électrophorèse au Bioanalyzer (2 de 3)	66
Figure 4.10 : Sommaire final de l'électrophorèse au Bioanalyzer (3 de 3)	67

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

La liste des sigles et abréviations utilisés dans le mémoire est présentée en ordre alphabétique.

ADAMTS	aggrécanases, signifie <i>adamalysin-thrombospondins</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ANOVA	analysis of variance
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CO ₂	dioxyde de carbone
DAB	diaminobenzidine
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
FGFs	<i>fibroblast growth factors</i>
GAG	glycosaminoglycanes
GH	hormone de croissance (growth hormone)
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HIS	hybridation <i>in situ</i>
IGF-I, II	<i>insulin-like growth factor</i> –I et –II
IGFs	<i>insulin-like growth factor</i>
IgG	immunoglobuline G
IHC	immunohistochimie, <i>immunohistochemistry</i>

ISH	<i>in situ hybridization</i>
KCl	chlorure de potassium
MgCl ₂	chlorure de magnésium
MMPs	métalloprotéinases
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MPa	méga Pascal
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
PBS	<i>phosphate buffered solution</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	potentiel hydrogène
PTH	hormone parathyroïdienne
PTHrP	peptide liée à l'hormone parathyroïdienne
RA	<i>retinoic acids</i> (acides rétinoïques)
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNases	ribonucléases
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RT-qPCR	<i>quantitative real-time polymerase chain réaction</i>
TGF- β 1	<i>type 1 transforming growth factors</i>
TGF β s	<i>transforming growth factors</i>
TIMPs	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>

INTRODUCTION

En plus des facteurs de croissance, des hormones, des nutriments et de la génétique, l'environnement et les forces mécaniques peuvent moduler le taux de croissance des os [1-11]. Ce phénomène constitue un concept clé dans la progression des malformations musculosquelettiques infantiles et juvéniles, comme la scoliose idiopathique adolescente, les maladies neuromusculaires, le spondylolisthésis, le *genu varum* / *valgum* et autres déformations [5; 12; 13]. La modulation mécanique de la croissance est aussi d'un intérêt grandissant dans le développement et l'amélioration des approches minimalement invasives qui visent la modulation de la croissance de manière locale tout en préservant la croissance naturelle des os et les fonctions des différents segments osseux.

La croissance longitudinale des vertèbres et des os longs s'opère via un processus d'expansion interstitielle et d'ossification endochondrale des plaques de croissance cartilagineuses. La forme, la taille et l'arrangement des cellules de la plaque de croissance, les chondrocytes, définissent trois zones morphologiques distinctes : la zone de réserve, la zone proliférative et la zone hypertrophique [14; 15]. La différenciation et la croissance des chondrocytes est le résultat d'un processus spatio-temporel complexe qui s'opère à travers ces trois zones, où les colonnes de chondrocytes servent d'unités fonctionnelles à la croissance en longueur des os [16; 17]. Bien qu'à ce jour, la contribution relative de chacune des trois zones ne soit pas complètement établie, l'hypertrophie des chondrocytes serait un régulateur plus efficace de la croissance endochondrale que la prolifération cellulaire [17].

La mécanobiologie de la plaque de croissance, ou l'étude de l'effet des charges mécaniques sur la biologie moléculaire et de la génétique des tissus biologiques, a été étudiée *in vivo* sur différents modèles animaux [2; 4; 6; 8-10]. Il existe des preuves convaincantes que des forces statiques altèrent la croissance longitudinale des os; une pression accrue sur les plaques retarde la croissance et une pression réduite l'accélère [5; 8]. Bon nombre d'auteurs font référence à ce phénomène en le désignant par la loi Hueter-Volkman [5; 6]. Des études comparatives plus récentes ont investigué les effets d'un chargement statique comparativement à un chargement dynamique appliqué sur les plaques de croissance [1; 3; 7; 11]. Toutefois, ces études comparatives statique/dynamique *in vivo* utilisent souvent des paramètres de chargement qui ne sont pas rigoureusement définis en terme d'amplitude [3], qui sont non équivalents en

terme de chargement moyen résultant [1; 3; 11] ou qui sont simplement non normalisés par rapport à l'épaisseur de l'échantillon [1; 3; 7; 11].

L'objectif principal du présent projet est de mener une étude comparative des effets encourus par des chargements statiques et cycliques appliqués sur des explants de plaques de croissance. Le développement des différents protocoles expérimentaux et l'implémentation de quatre groupes d'études (baseline, contrôle, statique, dynamique) fait également partie intégrante du projet. Le projet est reconduit suivant deux objectifs spécifiques : la caractérisation de l'histomorphométrie des plaques de croissance et des modes d'expression de certaines molécules clés de la matrice extracellulaire ainsi que la complétion d'une analyse comparative afin d'évaluer les effets d'un chargement statique versus un chargement dynamique. En répondant à l'hypothèse que des chargements statiques et cycliques équivalents (comparable en terme de déformation moyenne) engendrent des variations dans l'histomorphométrie ainsi que des modes d'expression de protéines distincts dans la matrice extracellulaire, il est démontré que les explants de plaques de croissance répondent différemment à la compression *in vitro* statique et dynamique. En plus de servir aux études mécanobiologiques permettant de comprendre comment les chargements mécaniques peuvent altérer pathologiquement la croissance et le développement des tissus osseux, ces connaissances pourront ultérieurement servir au développement de nouvelles approches orthopédiques basées sur la modulation de la croissance.

Ce mémoire par article est divisé en quatre chapitres. Le premier chapitre présente une revue des connaissances nécessaires à la bonne compréhension du projet. Il contient des notions sur le système musculosquelettique et la plaque de croissance ainsi que sur la croissance longitudinale des os. L'état des connaissances sur la mécanobiologie de la plaque de croissance y est aussi résumé. Le second chapitre décrit la rationnelle du projet, l'hypothèse de recherche et les objectifs spécifiques. Le corps du mémoire est constitué d'un article scientifique présenté au troisième chapitre. L'article regroupe l'ensemble des résultats obtenus en lien avec l'histomorphométrie de la plaque de croissance et les modes d'expression des protéines de la matrice extracellulaire. Le dernier chapitre contient des résultats complémentaires relatifs à l'extraction d'ARN et à la quantification de l'expression des gènes de la matrice. Une discussion générale sur le projet est par la suite présentée, suivie d'une conclusion et de recommandations pour des projets connexes futurs.

CHAPITRE 1 REVUE DES CONNAISSANCES

1.1 Le système musculosquelettique

Le système musculosquelettique donne aux êtres vertébrés la capacité de bouger. Il assure la forme, la stabilité et le mouvement du corps. Le système musculosquelettique est constitué des os, des muscles, du cartilage, des tendons et ligaments, des articulations et d'autres tissus conjonctifs.

1.1.1 Rôle du système musculosquelettique

En terme de structure, les os assurent un support au corps humain, agissent en tant que levier rigide lors d'actions musculaires et servent de protection pour plusieurs organes vitaux internes tels que le cœur et le cerveau [18]. Le corps humain est constamment soumis à l'effet de son propre poids, de l'action musculaire et à des forces externes telles des levées de charges, des forces d'impact ou autres. C'est le système musculosquelettique qui, contrôlé par le système nerveux central et le système nerveux périphérique, gouverne les mouvements du corps et de ses articulations. Les différents groupes musculaires travaillent pour générer des forces qui sont transmises par les os et les articulations pour permettre aux individus de maintenir une position volontaire et contrôlée. Le système musculosquelettique génère (via les muscles) et transmet (via les os et articulation) continuellement des forces mécaniques pour assurer la forme, la stabilité et le mouvement du corps. Maintenir une position assise ou une position debout sont deux exemples du rôle essentiel du système musculosquelettique [19]. Outre leur rôle structural au sein du système musculosquelettique, les os ont également un rôle métabolique. Ils agissent à titre de réservoir de minéraux et de production de cellules sanguines (hématopoïèse) [20].

1.1.2 Composition du système musculosquelettique

Les sections qui suivent détaillent la structure, la composition et le rôle de trois importantes composantes du système musculosquelettique, les os, le cartilage et la plaque de croissance.

1.1.2.1 Les os

Le rôle des os

Comme mentionné précédemment, les os offrent un support au corps humain, agissent en tant que levier rigide lors d'actions musculaires et servent de protection pour plusieurs organes vitaux. Les os agissent également à titre de réservoir de minéraux et de production de cellules sanguines.

La structure des os

Au nombre de 206, les os sont répartis sur le squelette axial (entourant les viscères) et le squelette appendiculaire (membres supérieurs et inférieurs), tous deux attachés à la colonne vertébrale. Il existe quatre types d'os : les os longs, les os courts, les os plats ainsi que les os irréguliers qui regroupent tous les os n'appartenant à aucune autre catégorie.

Les os longs sont nettement plus longs que larges et ils se divisent en trois parties : la diaphyse, les métaphyses ainsi que les épiphyses proximale et distale. La diaphyse constitue l'axe longitudinal des os longs et est composée d'un tissu osseux compact appelé os cortical. Le canal médullaire est une cavité qui renferme la moelle osseuse au centre de la diaphyse des os longs et il est entouré d'une membrane fibreuse riche en vaisseaux nourriciers appelé le périoste. Ce dernier contribue à la croissance osseuse en épaisseur. L'endoste est une mince couche de tissus conjonctifs qui recouvre la paroi interne du canal médullaire. Les épiphyses sont généralement plus épaisses que la diaphyse et sont constituées d'os spongieux recouvert d'os cortical et de cartilage articulaire. La métaphyse (ou ligne épiphysaire) est la région située entre la diaphyse et l'épiphyse. Chez l'adulte, il s'agit d'un vestige de la plaque de croissance, centre de la croissance longitudinale de l'os chez l'enfant. La Figure 1.1 illustre la structure des os longs.

Les os courts (carpes, tarses) ont leurs trois dimensions sensiblement égales, ils sont composés d'un noyau d'os spongieux entouré d'os cortical. Les os plats (sternum, côtes, scapula), dont la longueur et la largeur sont plus importantes que l'épaisseur, sont composés de deux couches d'os cortical qui renferment une mince couche d'os spongieux [21; 22].

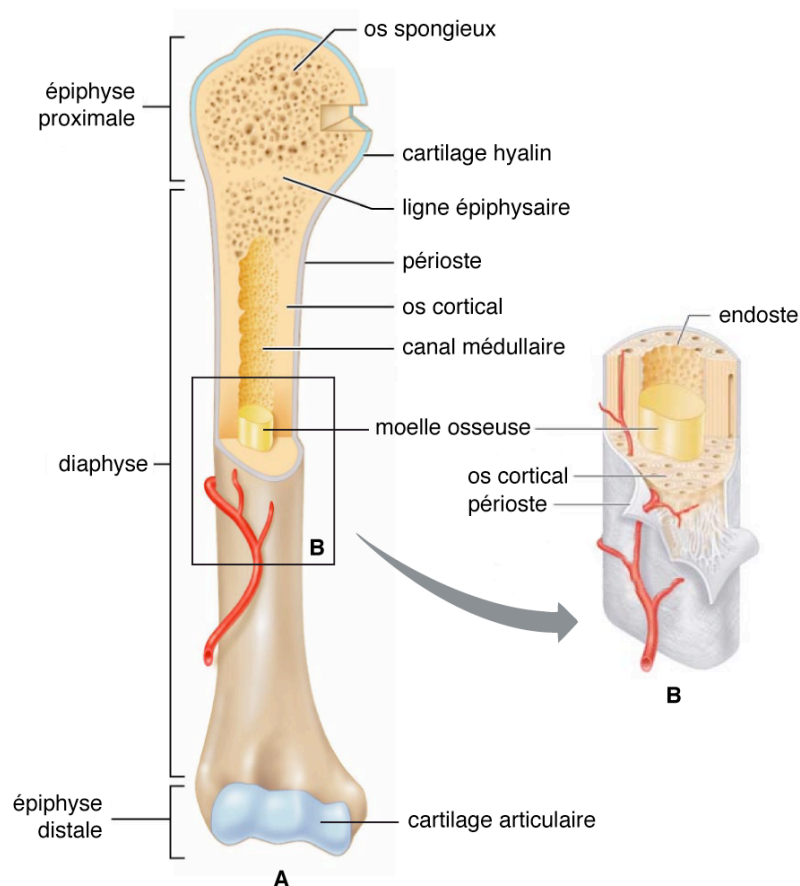


Figure 1.1 : Structure des os longs (A) vue antérieure avec coupe frontale (B) coupe transversale agrandie (image adaptée de [22])

Les vertèbres forment la colonne vertébrale et sont un exemple d'os irréguliers. Les vertèbres sont constituées d'un corps vertébral et possèdent des surfaces supérieure et inférieure relativement planes. En opposition aux os longs, les vertèbres ne présentent pas d'épiphyse. Les plateaux vertébraux sont en contact direct avec le disque intervertébral, ce dernier s'intercalant entre chaque vertèbre.

La composition des os

L'os est un tissu conjonctif vascularisé formé d'une matrice osseuse calcifiée et de cellules osseuses (ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes). Les ostéoblastes sont des cellules qui synthétisent la partie non-minérale des os et participent ensuite à la minéralisation de cette matrice. Par division cellulaire, l'ostéoblaste élabore d'abord la matrice au niveau de la surface osseuse puis autour de lui. Une fois la matrice calcifiée, il se transforme en ostéocyte. Les

ostéocytes sont alors emprisonnés dans le tissu osseux et participent au renouvellement et au maintien de la matrice extracellulaire (matrice osseuse). Les ostéoclastes sont multi-nucléés et sont responsables de la résorption osseuse au niveau du périoste et de l'endoste. L'os adapte continuellement sa structure aux contraintes auquel il est soumis : ce phénomène fait référence au remodelage osseux. En synergie avec l'activité des ostéoblastes, les ostéoclastes assurent l'optimisation entre rigidité et volume osseux.

La matrice extracellulaire calcifiée de l'os est composée d'une phase organique et d'une phase inorganique. La phase organique de l'os est constituée d'un réseau de fibres de collagène, de protéoglycanes et d'autres protéines non collagéniques spécifiques au tissu osseux. Les fibres sont localement parallèles les unes aux autres et organisées en fonction des forces externes. La phase inorganique de la matrice renferme principalement des sels et minéraux. Par le fait qu'elle soit rigide, la matrice osseuse se distingue des autres types de matrice extracellulaire.

Tous les os sont constitués de deux types de tissus osseux, l'os spongieux et l'os cortical. L'os spongieux est d'apparence friable et peut s'écraser facilement sous de fortes pressions. Il est constitué de lamelles osseuses disposées en travées aussi appelées trabécules osseuses. Mécaniquement, l'organisation de l'os spongieux lui confère un maximum de force avec un minimum de matériel (Figure 1.2). L'os cortical est très dense, dur et résistant. Il forme un cylindre creux plus ou moins épais donnant naissance au canal médullaire dans la diaphyse des os longs. Les lamelles osseuses sont organisées de manière concentrique formant des complexes appelés ostéons [21; 22]. La Figure 1.3 montre la structure interne et la composition de l'os cortical et de l'os spongieux.

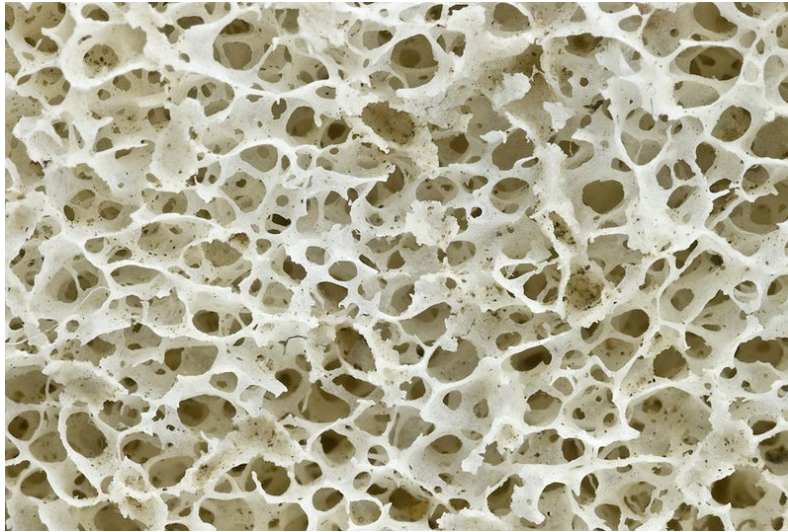


Figure 1.2 : Apparence de l'os spongieux (license libre autorisée par Patrick Siemer, San Francisco, Wikimedia Commons)

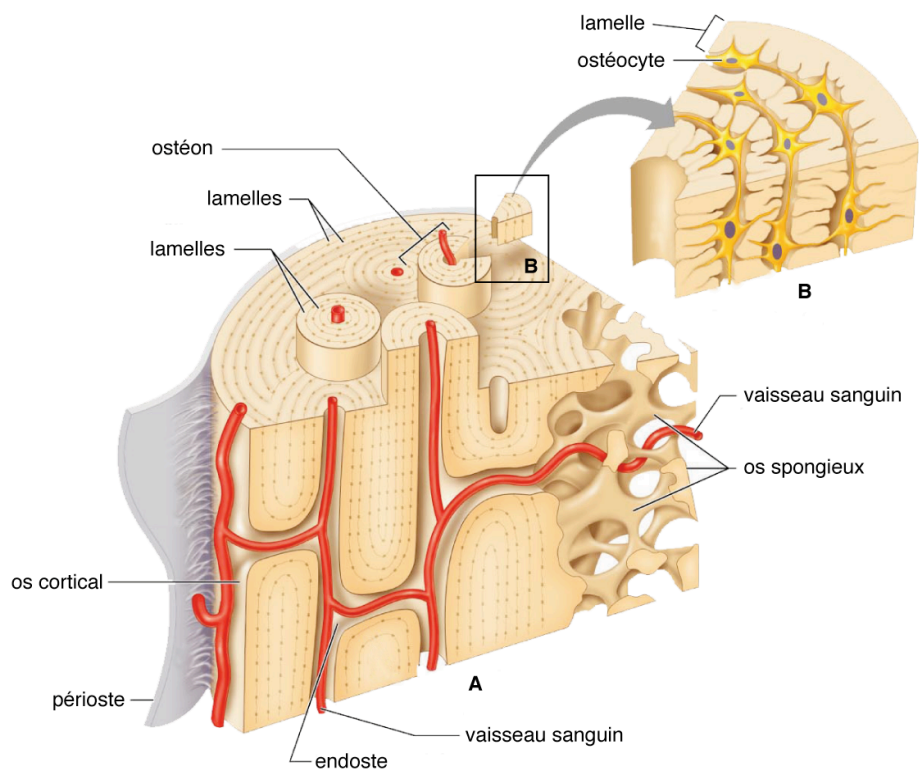


Figure 1.3 : Composition et structure interne des os longs (A) schéma en coupe de l'os cortical et de l'os spongieux (B) schéma en coupe d'un ostéon agrandi (image adaptée de [22])

1.1.2.2 Le cartilage

Le rôle du cartilage

Il existe trois types de cartilage: le cartilage élastique, le cartilage fibreux (fibrocartilage) et le cartilage hyalin. Leur composition et leur structure varient selon leur fonction. Le cartilage élastique permet à des structures flexibles de garder leur forme. Le cartilage fibreux est hautement compressible et très résistant en traction. Intermédiaire entre le cartilage élastique et le cartilage hyalin, il assure la jonction entre les os et les tendons ainsi qu'entre deux vertèbres consécutives au droit du disque intervertébral. Le cartilage hyalin (dont le cartilage articulaire) est le plus abondant dans le système musculosquelettique. Il agit en tant que support flexible et élastique. Le cartilage articulaire a pour principales fonctions de transmettre les forces entre les os articulés et de distribuer les forces dans les articulations. Il permet également un mouvement relatif avec friction minimum entre les surfaces articulaires [20; 22]. La plaque de croissance est un type particulier de cartilage hyalin qui assure la croissance longitudinale des os. Elle est située entre la métaphyse et l'épiphyse aux deux extrémités des os longs et des vertèbres [23]. La section 1.2.1 explique en détails le rôle, la structure et la composition de la plaque de croissance.

La structure du cartilage

Le cartilage est un tissu conjonctif pratiquement avascularisé. C'est l'action cyclique de compression/tension dans le cartilage qui aide la diffusion dans le tissu et permet de nourrir les cellules constitutives. Le cartilage se développe et se répare toutefois beaucoup plus lentement que les autres tissus conjonctifs [22].

La composition du cartilage

Le cartilage est composé d'eau, de cellules, de fibres élastiques et de fibres de collagène ainsi que de matrice extracellulaire. Les chondrocytes sont les seules cellules constitutives du cartilage et sont responsables de la régulation et du maintien de la matrice extracellulaire [16]. Le cartilage élastique contient des fibres élastiques et le fibrocartilage contient plus de collagène que le cartilage hyalin. Dans le cartilage hyalin, les fibres de collagène de type II constituent près de 40% du poids sec du cartilage et leur arrangement varie selon le niveau de profondeur. La Figure 1.4 montre une représentation schématique de l'orientation des fibres dans le cartilage articulaire. La zone superficielle tangentielle contient un réseau dense de fibres tissées aléatoirement dans

des plans parallèles à la surface articulaire. Dans la zone intermédiaire, les fibres sont aussi orientées aléatoirement, mais l'espace entre les fibres est plus grand et les fibres sont dispersées de manière homogène. Dans la zone profonde, les fibres se regroupent et forment des paquets orientés perpendiculairement à la surface articulaire [24]. La matrice extracellulaire, qui représente près de 90% du volume du cartilage, est principalement composée d'eau et de protéoglycanes [25-28].

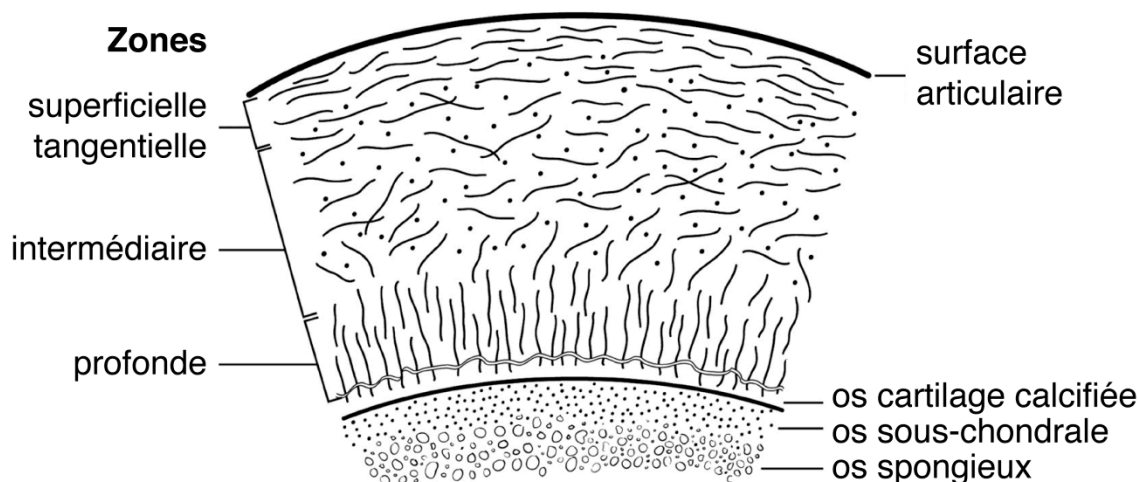


Figure 1.4 : Représentation schématique de l'orientation des fibres dans le cartilage articulaire (image adaptée de [24])

1.2 La plaque de croissance et la croissance longitudinale

1.2.1 La plaque de croissance

La croissance longitudinale des vertèbres et des os longs est due à l'expansion interstitielle et à l'ossification endochondrale des plaques de croissance cartilagineuses. Les sections qui suivent décrivent la composition et la structure de la plaque de croissance, de même que le rôle spécifique de chacune de ses trois zones; la zone de réserve, la zone proliférative et la zone hypertrophique.

1.2.1.1 Composition de la plaque de croissance

La plaque de croissance est constituée de cellules (chondrocytes) entourées de matrice extracellulaire. La matrice est un réseau de fibres de collagène agrégées dans un complexe de

protéoglycanes. La composition de la matrice varie en fonction des zones morphologiques de la plaque de croissance [16; 29; 30]. Parce que la composition est différente et que les molécules sont en concentrations inégales dans la plaque de croissance, les propriétés mécaniques varient selon les zones morphologiques [31; 32]. Le Tableau 1.2 présente un récapitulatif des éléments constitutants de la plaque de croissance ainsi que leur rôle respectif. La section 1.2.1.2 détaille la structure de la plaque de croissance pour chacune des zones; la zone de réserve, la zone proliférative et la zone hypertrophique.

Collagènes et protéoglycanes

Collagène de type II : Il s'agit du collagène fibrillaire le plus abondant dans la matrice extracellulaire [16; 29]. En plus d'inhiber la calcification [33] le collagène de type II confère un support structural à la matrice [23; 31; 34-36].

Collagène de type IX : Également un collagène de type fibrillaire, le collagène de type IX est exprimé dans la matrice extracellulaire de la plaque de croissance, mais en quantité moins importante que le collagène de type II [37]. Il est présumé que le collagène de type IX permet au collagène de type II d'interagir avec les autres composants de la matrice extracellulaire [37].

Collagène de type XI : Il s'agit d'un collagène de type fibrillaire qui est exprimé dans toute la plaque de croissance [37], mais en quantité moins importante que le collagène de type II [29]. Très peu est connu relativement à la structure et l'organisation des molécules de collagène de type IX dans la plaque de croissance [34].

Collagène de type X : Situé principalement dans la zone hypertrophique, le collagène de type X est non fibrillaire et joue un rôle primordial dans la minéralisation du cartilage [30; 38; 39]. Il est aussi un marqueur d'hypertrophie des chondrocytes [36].

Aggrécane : L'aggrécane et le protéoglycane le plus abondant et est exprimé dans toute la plaque de croissance [16; 29; 37]. Il joue un rôle dans la rétention d'eau, les fluides interstitiels incompressibles offrent alors à la plaque de croissance, une résistance en compression [37]. L'aggrécane offre également un support en tension [31].

Autres protéoglycanes : D'autres protéoglycanes sont présents en proportions variables dans les zones de la plaque de croissance. Le versicane, la décorine, le biglycane, la fibromoduline, la lumican, la chondroïtine et l'agrine en sont des exemples [30; 31; 37; 40].

Facteurs de croissance

La matrice extracellulaire contient également des facteurs de croissance. Se référer à la section 1.2.2.2 Régulation de la croissance par synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire pour plus de détails.

Métalloprotéinases

Les métalloprotéinases (MMPs) sont des enzymes protéolytiques (relatifs a processus de dégradation des protéines) qui contribuent au remodelage de la matrice. Il existe 4 sous-groupes de métalloprotéinases; les collagénases, les gélatinases, les stromélysines et les métalloprotéinases de type membranaire [41]. Les collagénases sont capables de rompre les liaisons peptidiques du collagène. Le MMP13 (ou collagénase 3) est une protéase impliquée dans la dégradation du collagène de type II et X ainsi que dans la dégradation de l'aggrécane et d'autres protéoglycanes [42; 43]. Le MMP13 contribue aussi au remodelage de la matrice extracellulaire lors de l'ossification endochondrale [44]. Parmi les stromélysines, le MMP3 est aussi un dégradeur des collagènes de type II et X, il dégrade également les collagènes de type IX et XI [45].

Aggrécanases

Les aggrécanases sont des enzymes protéolytiques membres de la famille de protéines ADAMTS (*a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs*). Les aggrécanases agissent sur les protéoglycanes, mais plus spécifiquement sur l'aggrécane. ADAMTS-4 (ou aggrécanase I) dégrade l'aggrécane et la versicane alors que ADAMTS-5 (ou aggrécanase II) dégrade l'aggrécane [46; 47].

Inhibiteurs de MMPs

Les TIMPs (*tissue inhibitor of MMP*) sont des inhibiteurs de métalloprotéinases. Il en existe quatre types, TIMP1, TIMP2, TIMP3 et TIMP4. TIMP1 est présent dans toute la plaque de croissance [41].

1.2.1.2 La structure de la plaque de croissance

La plaque de croissance se présente comme un disque plus ou moins ondulé d'épaisseur variable ayant des propriétés mécaniques et morphologiques qui soient anisotropes (qui varient

selon la direction) [17; 31; 48]. Chez les enfants et adolescents, elle est située entre l'épiphyse et la métaphyse des os longs. Dans les vertèbres, elle se situe tout juste sous le plateau vertébral. La plaque de croissance présente trois zones morphologiques ordonnées perpendiculairement à l'axe de croissance; la zone de réserve, la zone proliférative et la zone hypertrophique. Ces trois zones se distinguent entre autres par la forme, la grosseur et l'arrangement des cellules [5; 14; 15; 37; 49; 50]. La taille de chacune des zones ainsi que sa proportion par rapport à l'épaisseur totale de la plaque de croissance varie beaucoup selon la location physiologique, le stade de croissance et l'espèce animale [17; 49]. Sur une section de plaque de croissance, il est possible d'observer des colonnes de chondrocytes relativement ordonnées dans les zones proliférative et hypertrophique, alors que les cellules sont distribuées plus ou moins aléatoirement dans la zone de réserve. Les cellules de la zone de réserve sont plates et plus petites, elles deviennent plus rondes et plus grosses en passant de la zone proliférative à la zone hypertrophique. La Figure 1.5 montre sur une section histologique, la structure de la plaque de croissance porcine.

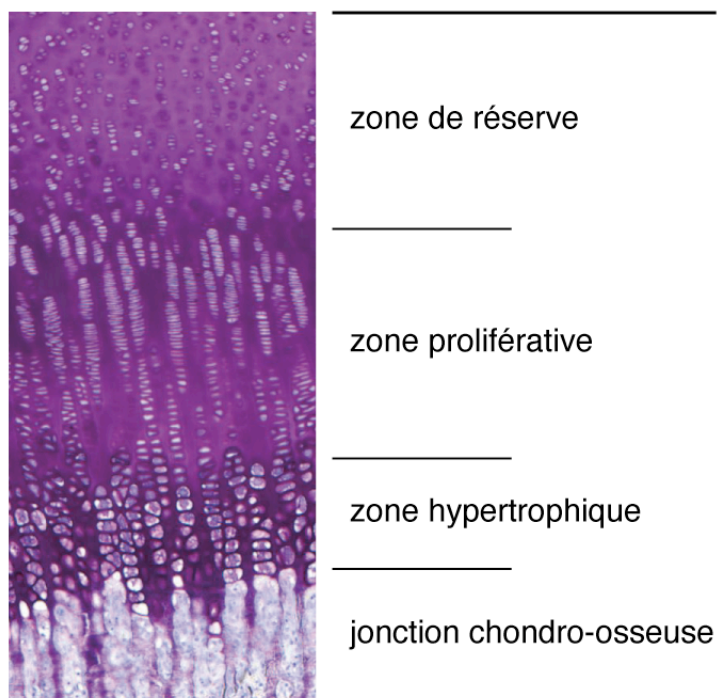


Figure 1.5 : Section histologique de plaque de croissance porcine (imprégnation en paraffine, coloration au bleu de Toluidine – grossissement 100x)

Structure de la zone de réserve

La zone de réserve s'étend de la jonction chondro-osseuse distale de l'épiphyse jusqu'à sa limite avec la zone proliférative, où les cellules tendent à s'organiser en colonnes [15; 50; 51]. La zone de réserve pourrait regrouper des cellules avec diverses fonctions physiologiques, mais il n'y a actuellement pas consensus sur le rôle exact de ces cellules [5; 49]. Les chondrocytes sont organisés aléatoirement et parfois en petits groupes [49; 50]. Les chondrocytes auraient d'abord une fonction de cellules souches [15; 48; 49; 51; 52], et seraient ensuite stimulés pour initier l'expansion clonale des cellules prolifératives [40; 48; 49]. La matrice de la zone de réserve est composée de fibres de collagène de type II orientées aléatoirement ainsi que de protéoglycanes et d'eau [16; 53; 54]. Le ratio volumique de matrice par rapport aux cellules y est beaucoup plus élevé que dans les autres zones [37; 55]. En effet, le ratio matrice/cellule diminue considérablement en s'approchant de la jonction chondro-osseuse. Le ratio atteint des valeurs supérieures à 9 dans la zone de réserve, reste borné entre 4 et 8 dans la zone proliférative et diminue substantiellement jusqu'à des valeurs inférieures à 1 dans la zone hypertrophique [55].

Structure de la zone proliférative

La densité de chondrocytes est élevée dans la zone proliférative [50] et le cycle cellulaire y est très rapide [15; 17; 33]. Le nombre de cellules varie toutefois avec le stade développemental et est fonction du taux de croissance [49; 56]. Les chondrocytes ont une forme de disque aplati et sont organisés en colonnes le long de l'axe longitudinal de croissance [15; 33; 37; 40; 50]. La zone proliférative est riche en collagène de type II et les fibres sont orientées de manière longitudinale par rapport à l'axe de croissance [29; 33]. La zone proliférative produit également des métalloprotéinases (MMPs) : MMP2 et MMP9 [41] ainsi que MMP13 [16]. Les inhibiteurs de ces MMPs sont aussi présents [41].

Structure de la zone hypertrophique

La zone hypertrophique est située entre la zone proliférative et la métaphyse de l'os. Plusieurs auteurs divisent la zone hypertrophique en deux sous-zones : la zone préhypertrophique (zone de transition) et la zone hypertrophique [29; 33; 40; 49; 51; 57]. C'est dans la zone de transition que la division cellulaire s'achève [40; 49], soit après un nombre fini de divisions [40; 51] ou par l'action d'un facteur de croissance local [37; 40; 49; 57]. L'hypertrophie des chondrocytes débute dans la zone de transition [40; 58] et cette zone est métaboliquement plus

active que la zone proliférative [17; 33]. La zone de transition, très étroite, caractérise la coordination temporelle de la différenciation cellulaire [49]. Il s'agit d'une zone riche en collagène de type IX [40] et en collagène de type II [16; 29; 59]. Le collagène de type X commence à être synthétisé [29; 33] et la présence de MMP13 contribue au remodelage de la matrice extracellulaire [16].

La différenciation cellulaire des chondrocytes se termine dans la zone hypertrophique [37; 40]. Les cellules changent alors de forme et leur volume augmente considérablement [14; 37; 40; 50; 60]. L'augmentation de volume serait consécutive à l'augmentation des fluides intracellulaires et à la modification de la matrice extracellulaire [50]. Avec des valeurs inférieures à 1, il s'agit de la zone avec le plus faible ratio matrice/cellule [55]. Il y a une importante synthèse de matrice extracellulaire dans la zone hypertrophique [40; 50], synthèse qui est beaucoup plus importante que dans la zone proliférative [17; 50]. Plus spécifiquement, les chondrocytes sécrètent du collagène de type II et de type X [16; 29; 30], du MMP13 [16; 37] et des aggrecanases [61]. Les fibres de collagènes de type II et X demeurent orientées selon l'axe longitudinal [53]. Finalement, c'est à la jonction entre la métaphyse et la zone hypertrophique que la minéralisation des cellules et de la matrice extracellulaire survient et permet la formation de nouvel os [33; 40; 51].

1.2.1.3 Rôle de la plaque de croissance

Rôle de la zone de réserve

Les chondrocytes de la zone de réserve synthétisent de la matrice extracellulaire qui emmagasine les nutriments requis pour les zones proliférative et hypertrophique [33]. La zone de réserve pourrait avoir une fonction de support mécanique, spécialement pour les espèces chez lesquels la croissance est lente et s'étend sur de longues périodes [49], i.e. les animaux de plus grandes tailles. Les premiers chondrocytes prolifératifs sont retrouvés dans la zone de réserve, de même qu'un facteur qui commanderait l'orientation columnaire des cellules et un autre facteur qui empêcherait l'hypertrophie prématurée des chondrocytes en inhibant la différenciation terminale des cellules. Ainsi, la zone de réserve jouerait un rôle important dans l'organisation de la plaque de croissance [52].

Rôle de la zone proliférative

Il y a une grande production de nouveaux chondrocytes dans la zone proliférative. Ceci permet de conserver l'équilibre perturbé par les pertes cellulaires dues à la minéralisation des cellules et de la matrice extracellulaire à la jonction chondro-osseuse. Après l'hypertrophie des chondrocytes et la synthèse de la matrice extracellulaire, la prolifération cellulaire serait un autre acteur important dans la régulation du taux de croissance [56].

Rôle de la zone hypertrophique

Les changements de forme et de volume des cellules couplés à l'hypertrophie des chondrocytes permettent à la zone hypertrophique de réguler de manière très efficace la croissance longitudinale des os [17; 56]. L'efficacité et le taux d'hypertrophie varient d'une espèce à l'autre [14; 62].

1.2.2 La croissance longitudinale des os

La croissance en longueur des os longs et des vertèbres s'opère via le processus d'ossification endochondrale, i.e. par la synthèse d'un tissu cartilagineux ensuite transformé en os. Bien que chez l'humain, le taux de croissance diminue jusqu'à la maturité du squelette vers 18-20 ans, des périodes de croissance accélérée sont observées à l'enfance et à l'adolescence. La fermeture de la plaque de croissance marque l'achèvement de la croissance longitudinale, généralement vers la fin de l'adolescence [63]. La Figure 1.6 illustre le processus d'ossification endochondrale des os longs.

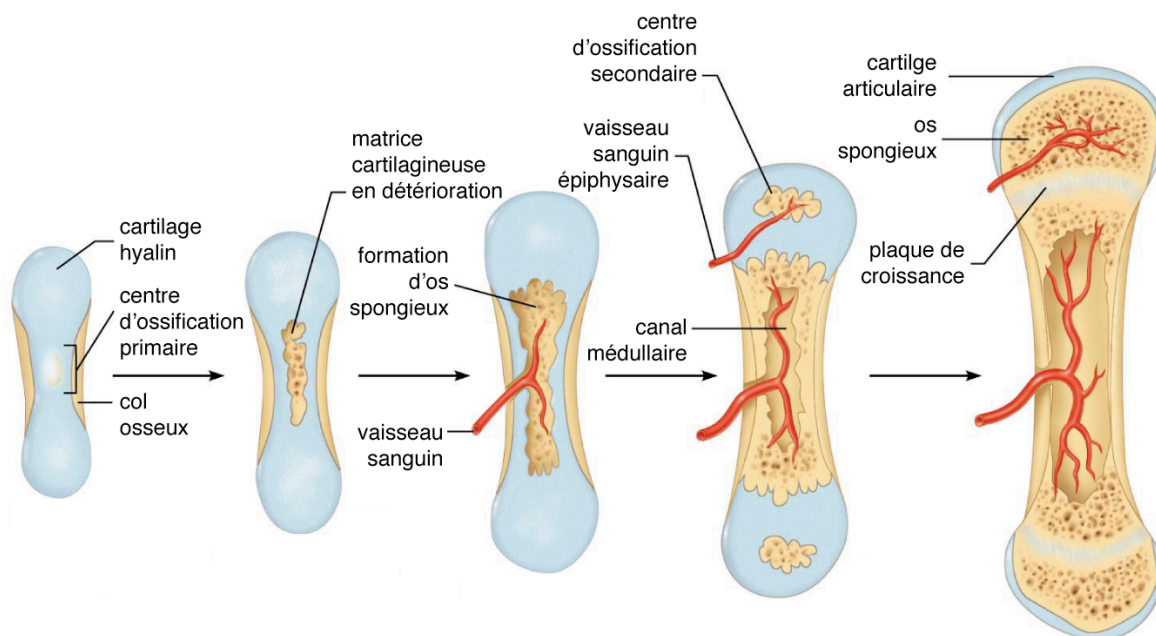


Figure 1.6 : Ossification endochondrale des os longs (image adaptée de [22])

Les mécanismes biologiques impliqués dans la croissance sont régulés par différents facteurs tels les hormones de croissance (GH) [64-67], les facteurs de croissance, les nutriments, les facteurs génétiques, les agents chimiques (médicaments) et l'environnement mécanique. La section 1.2.2.1 décrit le mécanisme général de la croissance longitudinale et la section 1.2.2.2 explique la régulation de la croissance par la synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire. L'environnement mécanique joue également un rôle primordial dans la modulation de la croissance. La section 1.3 traite de l'influence de l'environnement mécanique sur la croissance et de la mécanobiologie de la plaque de croissance. Plusieurs pathologies musculosquelettiques sont en lien avec la croissance des os; la section 1.3.2.2 présente ces principales pathologies.

1.2.2.1 Mécanisme général de croissance

La différenciation des chondrocytes et la croissance longitudinale des os sont le résultat d'un processus spatio-temporel complexe qui s'opère à travers les trois zones de la plaque de croissance, où les colonnes de chondrocytes servent d'unités fonctionnelles à la croissance en longueur des os [16; 17]. Dans la plaque de croissance, les chondrocytes s'hypertrophient et synthétisent de la matrice extracellulaire. Ce processus de croissance interstitielle s'effectue de concert avec les cellules d'une même colonne et selon un ordre prédéfini [17]. Les chondrocytes

sont en constante mitose et s'empilent face à l'épiphyse en poussant les cellules plus âgées vers la diaphyse. Alors que les chondrocytes se dégénèrent, les ostéoblastes ossifient les restes pour former du nouveau tissu osseux. Ce phénomène s'appelle l'ossification endochondrale. La prolifération et l'hypertrophie des chondrocytes [14; 15; 17; 48; 50; 56] jouent donc un rôle majeur dans le processus de croissance longitudinale. La synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire est également un élément clé de la croissance en longueur des os [14; 16; 17; 50; 51; 56; 68]. En effet, le remodelage de la matrice permet les changements de forme et de volume des cellules en plus d'assurer la séquence spatio-temporelle de la prolifération, de l'hypertrophie et de la migration des chondrocytes [16]. La contribution relative des zones proliférative et hypertrophique à l'élongation quotidienne des os est présentée à la Figure 1.7 pour 4 os différents provenant de rats [56]. L'hypertrophie demeure le facteur le plus important de la croissance longitudinale.

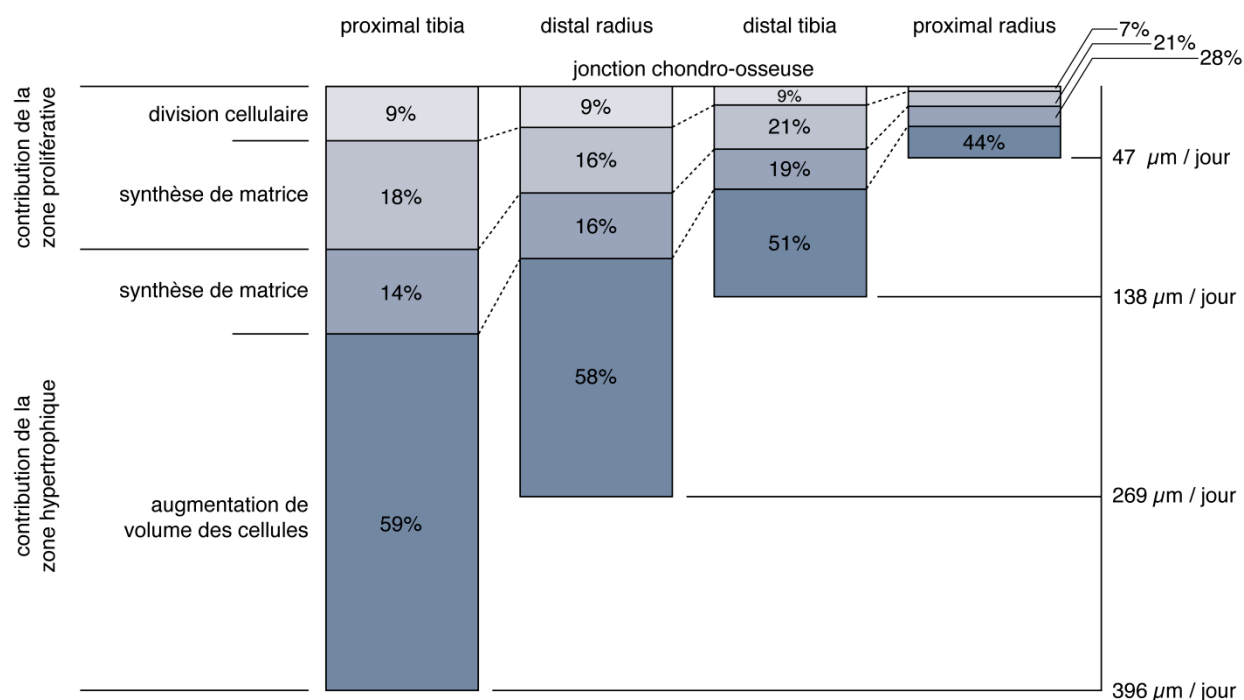


Figure 1.7 : Contribution relative des zones proliférative et hypertrophique dans la croissance longitudinale quotidienne d'os de rats (figure adaptée de [56])

1.2.2.2 Régulation de la croissance par synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire

Comme mentionné précédemment, la synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire est un élément clé de la croissance en longueur des os. Divers mécanismes biologiques aident à réguler la production de matrice extracellulaire. La production de certains composants de la matrice est stimulée par des facteurs biologiques de croissance. La protéine PTHrP (*parathyroid-hormone-related protein*) joue un rôle important dans l'ossification endochondrale en augmentant la synthèse de matrice extracellulaire dans les plaques de croissance. L'expression de la protéine PTHrP est aussi influencée par les charges mécaniques [69]. Les facteurs de croissance sont des polypeptides connus pour affecter la croissance et la différenciation cellulaire dans les os et le cartilage. Il existe quelques principaux types de facteurs de croissance : les IGFs (*insulin-like growth factors*) et les TGFβs (*transforming growth factors*) [70]. Les FGFs (*fibroblast growth factors*) sont aussi impliqués dans la régulation de la croissance longitudinale des os [71]. Finalement, il a aussi été démontré que les RA (*acides rétinoïques*) sont associés à la maturation des chondrocytes lors de ossification endochondrale [72; 73].

L'expression du collagène de type II est stimulée par IGF-I [74], TGF-β1 [75; 76] et les GH [66]. L'expression de ce même composant est toutefois inhibée par bFGF [74] et par les acides rétinoïques [77]. IGF-I et IGF-II stimulent également l'expression du collagène de type X, tout comme les acides rétinoïques [77]. L'expression du collagène de type X est inhibée par TGF-β1 [75] et PTHrP [78]. L'expression des protéoglycanes est stimulée par IGF-I et IGF-II [79], mais est inhibée par les acides rétinoïques [77] et par bFGF [80]. Le Tableau 1.1 résume le rôle des agents de régulation sur la production des différents composants de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance.

Tableau 1.1 : Stimulation et inhibition de l'expression des différents constituants de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance

Composants	Expression stimulée par	Expression inhibée par
Collagène de type II	IGF-I, TGF-β1, GH	bFGF, acides rétinoïques
Collagène de type X	IGF-I, IGF-II, acides rétinoïques	TGF-β1, PTHrP
Protéoglycanes	IGF-I, IGF-II	bFGF, acides rétinoïques

Tableau 1.2 : Tableau récapitulatif des principaux composants et dégradants de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance

Composants de la matrice	Rôle
<i>Collagènes</i>	
Collagène type II	Support structural, résistance à la tension et à la compression Inhibe la calcification
Collagène type IX	Liaison entre le collagène de type II et d'autres composants de la matrice extracellulaire Contrôle de la croissance et du diamètre des fibres de collagène de type II
Collagène type X	Facilite la calcification de la matrice Rôle structurant et de support à la matrice
Collagène type XI	Contrôle de la croissance et du diamètre des fibres de collagène de type II
<i>Protéoglycanes</i>	
Aggrécane	Permet par rétention d'eau, une résistance de la plaque de croissance à la tension et à la compression
Dégradeurs de la matrice	Rôle
<i>Métalloprotéinases</i>	
MMP3 (<i>stromélysine 1</i>)	Dégrade les collagènes de type II, IX, X, XI Active les collagénases
MMP13 (<i>collagénase 3</i>)	Dégrade le collagène de type II, le collagène de type X et l'aggrécane
<i>Aggrécanasés</i>	
ADAMTS-4, ADAMTS-5	Dégradent l'aggrécane
Inhibiteurs de MMPs	Rôle
TIMP1	Inhibiteur de MMPs
Facteurs de croissance	Rôle
IGF-I	Stimule le collagène de type II, le collagène de type X et les protéoglycanes
IGF-II	Stimule le collagène de type X et les protéoglycanes
Régulateurs de croissance	Rôle
PTHrP	Augmente la synthèse de matrice extracellulaire Stimule les MMPs et inhibe le collagène de type X

1.3 Mécanobiologie de la plaque de croissance

La mécanobiologie est définie comme la science qui étudie les effets des forces mécaniques sur les tissus biologiques et les organes, en relation avec des problèmes biologiques ou médicaux. Contrairement au terme « biomécanique », le terme « mécanobiologie » met l'emphasis sur la biologie par rapport à la mécanique. La mécanobiologie est un concept prometteur pour la contribution au progrès clinique. En effet, le développement d'organes et de tissus synthétiques ou artificiels (ingénierie tissulaire) dépendra des progrès réalisés en mécanobiologie [81].

1.3.1 Modulation de la croissance

Il est reconnu que des forces statiques (constantes dans le temps) altèrent la croissance longitudinale des os; une pression augmentée sur les plaques retarde la croissance et une pression diminuée l'accélère [5; 8]. Bon nombre d'auteurs font référence à ce phénomène en le désignant par la loi Hueter-Volkmann [5; 6; 8; 9; 12; 82; 83]. Les chargements mécaniques sont caractérisés par trois paramètres principaux : Le type de chargement, l'amplitude du chargement et la durée du chargement. Le chargement peut être statique ou dynamique, en compression, en tension, en torsion ou en cisaillement. Son amplitude peut varier, allant de très petites amplitudes à des amplitudes complètement non physiologiques. Finalement, le chargement peut être appliqué pour une courte période de temps ou pour une période prolongée. Alors qu'une compression minimale semble requise pour permettre la croissance et l'ossification normales [84], un chargement trop élevé peut entraîner l'arrêt de la croissance longitudinale des os. Il semble également que plus un chargement est maintenu longtemps, plus la modulation de la croissance est importante [2; 12; 85-87].

La modulation de la croissance est donc un concept clé dans la progression des malformations musculosquelettiques infantiles et juvéniles, comme la scoliose idiopathique adolescente et les maladies neuromusculaires [5; 12; 13]. La modulation mécanique de la croissance est aussi d'un intérêt grandissant dans le développement et l'amélioration des approches minimalement invasives qui visent la modulation de la croissance de manière locale tout en préservant la croissance naturelle des os, les fonctions des différents segments osseux et la mobilité. Bien que plusieurs approches préconisées en orthopédie pédiatrique soient basées sur la

modulation de la croissance, les paramètres de chargement optimaux, permettant un meilleur contrôle sur la modulation de la croissance, ne sont pas clairement définis.

1.3.2 Pathologies musculosquelettique reliées à la croissance longitudinale des os

Il est connu que toutes forces appliquées sur les os en période de croissance, et ce, même pour un court laps de temps, sont susceptibles d'engendrer des déformations osseuses permanentes [8; 12; 13; 84; 88-90]. Il existe plusieurs pathologies musculosquelettiques reliées à la croissance longitudinale des os. Les pages suivantes présentent les principales déformations musculosquelettiques progressives causées par des forces mécaniques. Ces malformations sont susceptibles d'être corrigées par une intervention mécanique (modulation de la croissance), chirurgicale ou thérapeutique [13].

1.3.2.1 Pathologies musculosquelettique affectant la colonne vertébrale

La scoliose idiopathique adolescente

La scoliose idiopathique adolescente est une déformation musculosquelettique progressive de la colonne vertébrale très répandue chez les adolescents [82; 91]. La colonne vertébrale tend à se déformer tridimensionnellement de manière asymétrique (Figure 1.8), engendrant par le fait même un état de contraintes non équilibré qui contribue lui aussi à la déformation de la colonne. Cette boucle de causes et effets est un phénomène de cercle vicieux.

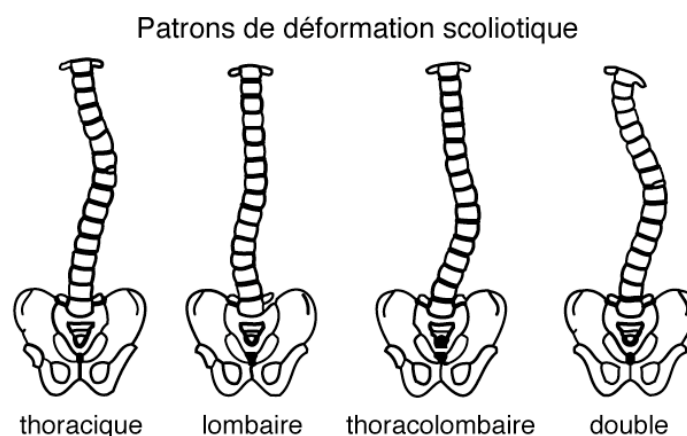


Figure 1.8 : Représentation schématique des patrons de déformation scoliotiques (image adaptée de [92])

La cyphose

Une cyphose congénitale est une malformation peu commune caractérisée par une angulation postérieure convexe anormale d'un segment de la colonne vertébrale due (Figure 1.9) à des anomalies développementales des vertèbres qui nuisent à la croissance longitudinale. Une cyphose peut être le résultat d'une maladie dégénérative, d'un trouble développemental ou d'un trauma. La cyphose peut aussi causer une compression de la moelle épinière et éventuellement la paraplégie. [93]. Un phénomène d'auto-amplification intervient également dans la progression de cette déformation.

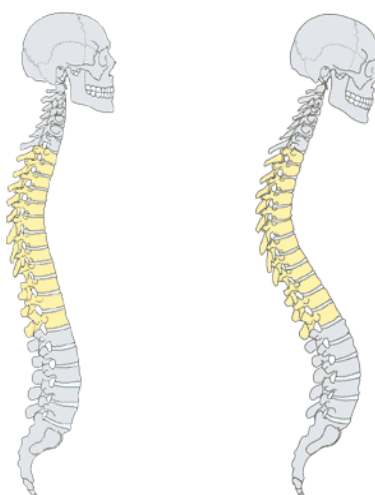


Figure 1.9 : Représentation schématisée d'une cyphose normale (gauche) et d'une cyphose anormale (droite)

Spondylolisthésis / spondylolyse

Le spondylolisthésis est un déplacement permanent du corps vertébral en avant sur le corps vertébral sous jacent. Les vertèbres les plus souvent concernées sont la quatrième et la cinquième vertèbre lombaire. [94]. Une étude par Fredrickson a confirmé que l'anomalie de l'isthme est le résultat d'un défaut dans l'ébauche cartilagineuse de la vertèbre, qui n'est pas apparente à la naissance. Il est possible que le défaut se développe à partir de petites fractures de stress qui ne parviennent pas à guérir. Il a été rapporté que cette déformation est plus fréquente chez les athlètes qui participent à des sports avec hyperextension répétées, telles que la gymnastique, le ballet et le football [95].

La spondylolyse est une perte de continuité de l'isthme articulaire (segment osseux postérieur qui réunit les facettes articulaires supérieures et inférieures d'un corps vertébral), situé entre les deux apophyses articulaires supérieure et inférieure de l'arc vertébral postérieur. La spondylolyse est généralement causée par une fracture de stress de l'os, et est particulièrement fréquente chez les adolescents. Il s'agit également de la cause la plus fréquente de spondylolisthésis chez les patients pédiatriques [96].

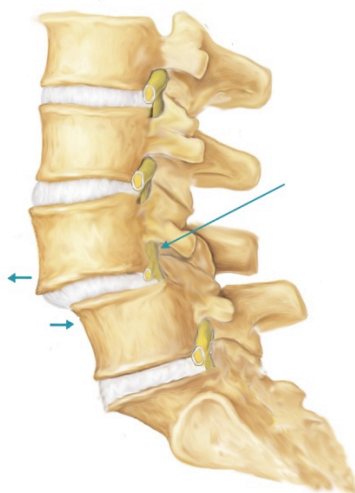


Figure 1.10 : Représentation schématique d'un spondylolisthésis (image tirée de [97])

1.3.2.2 Pathologies musculosquelettique affectant les articulations

Luxation congénitale de la hanche

La luxation congénitale de la hanche est une déformation congénitale ou acquise du mauvais alignement de la hanche. Elle peut être causée par une incongruité de l'articulation ou un chargement anormal de l'articulation. L'amplitude et la direction des charges appliquées à une hanche positionnée de manière atypique détermineront une croissance anormale [13].

Genu recurvatum, genu varum / valgum et chondropathie rotulienne

La présence de forces anormales pendant le développement peut créer de nombreuses malformations au niveau du genou. Le *genu recurvatum* est dû à une mauvaise position *in utero* qui force les genoux à se développer en extension plutôt qu'en flexion. Le *genu varum* est une déformation marquée par une angulation médiale de la jambe par rapport à la cuisse, donnant l'apparence d'un arc (Figure 1.11). Il y a habituellement courbure vers l'extérieur du fémur et du

tibia. Le *genu valgum* est une déviation vers l'extérieur de l'axe du membre inférieur qui force les genoux à se toucher alors que les chevilles sont écartées (Figure 1.11). Cette condition est plus fréquente chez les femmes qui ont le bassin plus large et les fémurs plus courts que les hommes. La chondropathie rotulienne est un trouble développemental du genou très fréquent. Cette malformation est souvent causée par un défaut embryologique dans le cartilage articulaire qui prédispose l'articulation à une incongruité patellofémorale et à un mauvais alignement [13].

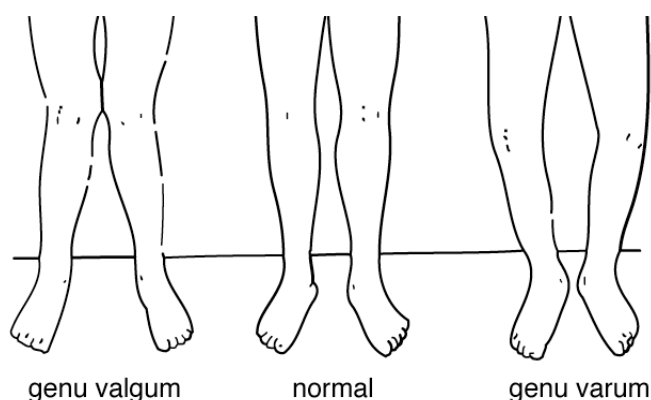


Figure 1.11 : Représentation schématique de *genu valgum* et *genu varum*

Talipes equinovarus (pied-bot)

Le pied-bot est une malformation congénitale qui peut être unilatérale ou bilatérale. Les patients touchés semblent avoir les pieds tournés vers l'intérieur au niveau de la cheville (Figure 1.12). Cette malformation peut être causée par des facteurs génétiques, une mauvaise position *in utero* ou une croissance anormale suite à un déséquilibre musculaire [13].



Figure 1.12 : *Talipes equinovarus* et pied normal (image tirée de [98])

1.3.2.3 Rôle de la modulation de la croissance dans les traitements orthopédiques des pathologies musculosquelettiques

La modulation locale de la croissance vise le développement d'approches minimalement invasives pour le traitement des pathologies musculosquelettiques. Les traitements orthopédiques actuellement utilisés sont basés, de manière peu rigoureuse, sur de simples observations et la réponse physiologique exacte à des stimuli externes demeure inconnue. Les vis et ligaments [99; 100] (Figure 1.13) ainsi que les agrafes [101-103] (Figure 1.14 et Figure 1.15) sont deux exemples d'approches minimalement invasives pour le traitement de la scoliose idiopathique. Dans les deux cas, les implants sont insérés entre deux vertèbres dans le but de moduler la croissance localement et de rétablir la symétrie des corps vertébraux. Le principe de ces deux types d'implants repose donc sur la réponse mécanobiologique des corps vertébraux immatures (loi Hueter-Volkman) soumis à des charges mécaniques statiques. Chaque technique ayant démontré son efficacité, il apparaît que les vis et ligaments seraient préférables aux agrafes puisqu'ils permettent une meilleure rectification de la scoliose et une ostéointégration plus élevée. La procédure chirurgicale s'avère toutefois plus invasive pour les vis et ligaments que pour les agrafes.



Figure 1.13 : Vis et ligaments insérés entre plusieurs corps vertébraux [99]



Figure 1.14 : Agrafes implantées entre plusieurs corps vertébraux [102]



Figure 1.15 : Agrafes implantées entre plusieurs corps vertébraux [103]

Les chargements dynamiques, en opposition aux chargements statiques, sont une représentation plus fidèle des contraintes quotidiennes auxquelles est soumis le corps humain. La marche, les mouvements répétitifs, se lever, ou s'asseoir sont tous des exemples où les contraintes imposées sur le corps ne sont pas statiques. La réponse exacte de la physiologie à ces contraintes aiderait à améliorer les traitements actuels et pourrait éventuellement aider au développement de nouvelles approches basées sur les chargements dynamiques.

1.3.3 Effets d'un chargement mécanique sur le taux de croissance

Le taux de croissance est un indicatif de la vitesse de croissance des os. Dans le cas de la croissance longitudinale, le taux de croissance peut s'exprimer comme une variation de longueur divisée par un intervalle de temps. En plus des facteurs de croissance, des hormones, des nutriments et de la génétique, l'environnement et les forces mécaniques peuvent aussi moduler le taux de croissance des os [1-11]. Le taux de croissance est souvent mesuré à l'aide de fluorochromes, tels la calcéine, qui se lie de manière spécifique à la matrice extracellulaire en cours de minéralisation [6; 8; 14; 16; 17; 48; 56; 85; 89; 104]. Il existe plusieurs méthodes pour mesurer le taux de croissance des os. À l'aide d'injections multiples et de techniques histologiques, il est possible de déterminer le taux de croissance en mesurant la distance qui sépare les deux marquages ou entre un marquage simple et le front osseux. Il est également possible de mesurer la longueur des os sur des radiographies ou directement sur les sujets *post mortem*. Nombreuses sont les études *in vivo* qui, dans le but de quantifier la modulation mécanique de la croissance, ont utilisé des dispositifs de chargement pour appliquer des forces sur des os en croissance ou directement sur des plaques de croissance immatures.

Les charges dynamiques appliquées en compression ou en tension sur des os en développement affectent le taux de croissance. En appliquant une compression *in vivo* sur des plaques de croissance fémorales distales chez le lapin, Bonnel a démontré que, lorsque la compression n'entraîne pas de dommages irréversibles sur les chondrocytes de la plaque de croissance, le taux de croissance longitudinale est inversement proportionnel à l'amplitude de la compression [87]. Une étude sans intervention chirurgicale menée par Reich en 2005 a permis d'analyser l'élongation des os sous des chargements physiologiques. En attachant des sacs de sable de 10% de leur poids sur le dos des poulets, la longueur et le diamètre des tibias étaient significativement diminués après 4 jours de chargement [105]. Il est reconnu que des contraintes élevées en compression sont susceptibles de supprimer la croissance. Une étude menée par Mark R. Simon en 1978 a permis de conclure que l'amplitude et le type de chargement sont des paramètres déterminants dans la stimulation de la croissance de l'épiphyse [106]. En mesurant le taux de minéralisation longitudinale *in vivo* chez des rats dont les ulnas étaient soumis à un chargement dynamique, Ohashi a démontré un lien entre l'amplitude de la force appliquée et la capacité de reprise suite à une suppression de croissance. En effet, le taux de minéralisation longitudinale a complètement été aboli par un chargement dynamique de 17N, ralenti de 17% et

8% respectivement pour un chargement dynamique de 8.5N ou 4N [86].

Le chargement statique *in vivo* en compression ou en tension prolongée affecte également le taux de croissance. Stokes a montré une réduction significative dans le taux de croissance des vertèbres de rats comprimées, différence qui n'était pas significative pour les vertèbres chargées en tension. Cette variation du taux de croissance est due aux chargements mécaniques, mais aussi aux changements dans l'activité métabolique de la plaque de croissance comme l'élargissement des chondrocytes [9]. Plus récemment, Cancell a démontré une diminution significative du taux de croissance de vertèbres caudales de rats soumises à un chargement statique *in vivo* en compression. [90].

La distraction des os long influence aussi le taux de croissance. Une distraction *in vivo* appliquée sur des tibias de lapin pour une période de 5 ou 10 jours a mené à une augmentation significative de la longueur du tibia pour un chargement de 10 jours. Cette augmentation était cependant attribuable à l'intervalle de fracture de la plaque de croissance [4] démontrant par le fait même que certaines techniques de distraction peuvent endommager de manière permanente la plaque de croissance et le processus de croissance osseuse. Le cartilage de la base du crâne est comparable à la plaque de croissance de par sa morphologie et sa fonction. Lorsque soumises à un chargement dynamique en tension, une augmentation significative de l'aire et de la longueur des mandibules a été observée en comparaison avec un chargement statique et ce, sans observation de fractures. Ces chargements étaient appliqués environ 1% du temps de jour sur une période totale de 12 jours. Ainsi, la réponse anabolique du cartilage de la base du crâne est apparemment due à la prolifération/différenciation des cellules et à la synthèse de la matrice extracellulaire activée par un chargement mécanique plutôt qu'à la tension mécanique en soi [35]. Des plaques de croissance vertébrales et tibiales de rats, bovins et lapins ont été soumises à différentes amplitudes de chargement, altérant significativement le taux de croissance. La réduction du taux de croissance associée à la compression et l'augmentation du taux de croissance associé à la distraction sont aussi reliées à des changements dans le nombre de chondrocytes en prolifération par unité de largeur de la plaque de croissance et à la hauteur maximale des chondrocytes dans la zone hypertrophique [89].

1.3.4 Effets d'un chargement mécanique sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance

L'histomorphométrie de la plaque de croissance est l'analyse histologique de ses caractéristiques morphologiques et inclut des mesures définissant l'arrangement et l'organisation générale des chondrocytes, la hauteur totale de la plaque de croissance, la hauteur des zones, etc. L'histomorphométrie de la plaque de croissance chargée mécaniquement a été étudiée *in vivo* sur différents modèles animaux [2; 4; 6; 8-10; 89].

Un chargement en compression affecte les zones proliférative et hypertrophique de même que la forme des cellules. Une pression augmentée a causé un amincissement de la plaque de croissance dans les deux zones inférieures [2; 6; 9; 84; 85; 89; 105; 107] ainsi qu'une perte d'arrangement colonnaire des chondrocytes [2; 84; 85; 105; 108].

À l'opposé, une distraction de la plaque de croissance cause un épaissement de la hauteur de la plaque de croissance [2; 4; 9; 89], qui est souvent le résultat d'une augmentation de l'épaisseur de la zone hypertrophique [2; 4; 9; 10; 84; 89]. Une distraction de la plaque cause aussi une perturbation de l'arrangement colonnaire des chondrocytes [2; 4]. Un épaissement de la zone proliférative survient également, mais reste indépendant de l'augmentation de la division cellulaire [2; 4].

Les effets d'un chargement dynamique sur les paramètres histomorphométriques de la plaque de croissance ne sont pas concluants. Des queues de rat ont été soumises *in vivo* à un chargement répétitif d'ordre physiologique. Dans le groupe chargé, il a été observé que la plaque de croissance était d'épaisseur inégale et présentait des chondrocytes plus gros et plus nombreux. Le nombre de colonnes de chondrocytes organisées par unité d'aire de même que le nombre absolu de colonnes ont diminué lorsque comparés aux résultats du groupe contrôle. Ces résultats suggèrent qu'une perturbation du métabolisme des chondrocytes mènerait à la synthèse d'une matrice extracellulaire altérée incapable de donner un cadre solide et stable pour l'organisation longitudinale de la plaque de croissance [109]. Une diminution significative de la hauteur de la plaque de croissance, principalement concentrée dans les zones proliférative et hypertrophique, a été observée sur des plaques de croissance fémorales de rat suite à un exercice volontaire [23]. De plus, une augmentation de la hauteur de la plaque de croissance et de la zone proliférative a été

rapportée suite à une compression intermittente *in vivo* d'ulnas de rat [86]. Des résultats semblables ont été obtenus lors du chargement cyclique intermittent en tension de cartilage de la base du crâne. Une augmentation significative de l'épaisseur de la plaque de croissance dans les zones proliférative et hypertrophique a été observée [1]. Finalement, une autre étude menée par Othman a montré une augmentation de l'épaisseur de la plaque de croissance et de la synthèse de la matrice lorsque des plaques de croissance de la base du crâne de lapins ont été soumises *ex vivo* à un chargement dynamique en compression. En comparant au groupe contrôle, une hausse de l'arrangement columnaire des chondrocytes a été observée suite à un chargement cyclique. Une contrainte mécanique de petite amplitude pourrait donc inhiber l'hypertrophie des chondrocytes [110].

1.3.5 Effets d'un chargement mécanique sur la biologie de la plaque de croissance

1.3.5.1 Effets d'un chargement mécanique sur la prolifération cellulaire

L'effet des charges mécaniques sur la prolifération cellulaire a également été étudié [1; 2; 4; 6; 84; 86; 108-111]. Les chondrocytes ont réduit, mais n'ont pas cessé leur prolifération cellulaire lorsque soumises à des forces statiques en compression [6; 84; 108]. La prolifération des chondrocytes demeure habituellement inchangée par la distraction [2; 4; 84] bien qu'une augmentation de la prolifération des chondrocytes ait été observée suite à des chargements statique et cyclique en tension [1].

Des queues de rat ont été soumises *in vivo* à un chargement répétitif d'ordre physiologique. Dans le groupe chargé, il a été observé que les chondrocytes étaient plus gros et plus nombreux [109]. Une augmentation du nombre de chondrocytes hypertrophiés a aussi été rapportée suite à une compression intermittente *in vivo* d'ulnas de rat [86]. Une augmentation du nombre de chondrocytes en prolifération et en hypertrophie a été observée suite à un chargement cyclique intermittent en tension de cartilage de la base du crâne [1]. Finalement, des plaques de croissance de la base du crâne soumises à un chargement cyclique *ex vivo* en compression ont aussi montré une augmentation du nombre de chondrocytes [110].

Basso a réalisé à une étude inverse dans laquelle les charges sur les membres postérieurs de rats étaient retirées. En suspendant les rats par la queue, les effets d'une absence de

chargement physiologique ont été observés dans la plaque de croissance tibiale. L'apoptose (mort cellulaire programmée) des chondrocytes s'est vu augmentée et le nombre de chondrocytes a diminué suite à cette absence de chargement [111].

1.3.5.2 Effets d'un chargement mécanique sur l'expression génique de la matrice extracellulaire

Méthodes de détection de l'expression génique

Les méthodes de détection de l'expression génique fournissent une mesure quantitative ou semi-quantitative de l'abondance des ARN messagers (ARNm) d'une ou plusieurs protéines dans un tissu spécifique ou dans une cellule. Puisque l'ARNm d'une protéine n'est présent que lorsque la cellule est en voie de produire cette protéine, cette information permet de vérifier si certaines protéines sont en production ou non à un moment spécifique. Trois de ces techniques sont expliquées ci-dessous.

La technique de *Northern Blot* est utilisée pour détecter l'expression des gènes via la détection des ARNm dans un échantillon. Suite à l'extraction de l'ARN à partir d'homogénats de tissus, une électrophorèse permet de séparer les ARN selon leur taille. Cette étape s'appelle la dénaturation. Les ARN sont transférés sur une membrane puis détectés par une sonde suite à l'hybridation. La visualisation se fait par autoradiographie ou par des méthodes chimiques. Il est possible d'analyser la présence d'un ou quelques gènes seulement. La dégradation de l'ARN par les RNases est fréquente, mais la spécificité de cette technique est toutefois excellente [112].

La RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) se base sur une technique d'amplification exponentielle des gènes. Suite à l'extraction, l'ARN est convertie en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide d'enzymes *reverse transcriptase*. L'ADNc est ensuite amplifiée par une séquence d'incubations et de variations thermiques (PCR). Cette étape inclut la dénaturation de l'ARN et l'extension de l'ADN à partir des amorces spécifiques aux gènes d'intérêt. Le produit de la PCR est finalement détecté par électrophorèse sur gel d'agarose ou sur gel de bromure d'éthidium (). Le développement des amorces requiert que la séquence à amplifier soit connue, mais cette technique nécessite de faibles quantités d'ARN [113].

La RT-qPCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*) est une variante de la technique décrite précédemment qui est largement utilisée en recherche et qui permet la détection

et la quantification de l'ARN. Cette méthode permet de détecter à quel cycle d'amplification la quantité de copies du gène dépasse une valeur seuil par rapport à un échantillon contrôle. Il est donc possible d'évaluer la différence de quantité d'ARN entre deux gènes ou alors pour le même gène mais entre deux groupes d'étude distincts. Bien qu'elle nécessite peu d'ARN, cette méthode est très sensible et plus coûteuse que la RT-PCR conventionnelle [113-117].

Effet du chargement sur l'expression génique de la matrice extracellulaire

Les études portant sur les effets d'un chargement mécanique, statique ou dynamique, sur l'expression génique des protéines de la plaque de croissance sont peu nombreuses. Une compression statique *in vitro* de courte durée a engendré une réduction de l'expression de l'ARNm du collagène de type II et X à travers la plaque de croissance (hybridation *in situ*) [118]. Des sacs de sable attachés au dos de poulets ont permis d'exercer une compression *in vivo* sur les plaques de croissance de leurs membres inférieurs. Cette étude ne rapporte toutefois aucune différence significative dans l'expression des gènes du collagène de type II et de type X. Une augmentation de 50% de l'expression des ARNm pour le MMP13 a cependant été observée pour le groupe chargé lorsque comparé au groupe contrôle (*Northern Blot* et hybridation *in situ*). Bien que les charges appliquées s'apparentaient à un chargement physiologique, il est important de préciser que les charges étaient non normalisées et leur contrôle limité [105]. Dans une récente étude *in vivo* menée sur des vertèbres caudales de rats, il a été montré qu'un chargement statique n'engendrait aucune variation significative dans l'expression des ARNm pour le collagène de type II, le collagène de type X, l'aggrécane et le MMP13. Le taux de croissance s'est aussi vu diminué par les charges compressives statiques [90]. Une autre étude *in vivo* menée sur des plaques de croissance de la base du crâne de rats a démontré par RT-PCR qu'un chargement dynamique et intermittent ne produisait aucune différence significative dans l'expression du collagène de type II et du collagène de type X [119].

1.3.5.3 Effets d'un chargement mécanique sur l'expression des protéines de la matrice extracellulaire

Méthodes de détection des protéines

Les méthodes de détection des protéines fournissent une mesure de l'abondance d'une ou plusieurs protéines dans un tissu spécifique ou dans une cellule et permettent de caractériser qualitativement l'expression de ces protéines. Trois de ces techniques sont expliquées ci-dessous.

La technique de *Western Blot* est une technique analytique utilisée pour détecter des protéines spécifiques dans un échantillon ou un homogénat de tissu. L'électrophorèse sur gel permet de séparer les protéines selon la longueur des polypeptides ou selon la structure tridimensionnelle de la protéine. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane où elles sont détectées à l'aide d'anticorps spécifiques. La détection et la lecture des résultats peuvent se faire par autoradiographie, fluorescence ou par détection radioactive [120].

Le *marquage par isotopes radioactifs* sert à suivre le passage d'une molécule dans un système. Des isotopes radioactifs sont inclus dans la composition chimique de la molécule et sont ensuite détectés par spectrométrie de masse ou par spectroscopie infrarouge [5; 121; 122].

Le *marquage par anticorps* ou *immunohistochimie* (IHC) permet de détecter qualitativement des protéines spécifiques dans les cellules ou sur une section de tissu. Par une chaîne de réactions et de liaisons, des anticorps spécifiques se lient aux protéines. Certains marqueurs moléculaires sont spécifiques à une phase cellulaire telle que la prolifération ou l'apoptose. L'immunohistochimie est largement utilisée en recherche pour comprendre la distribution, la localisation et les différences d'expression des protéines dans différents tissus biologiques. La détection et la visualisation peuvent se faire par contre-coloration ou par immunofluorescence [123]. La section 3.1.3.5 du Chapitre 3 présente un exemple de protocole d'immunohistochimie.

Effet du chargement sur l'expression des protéines de la matrice extracellulaire

Un nombre limité d'études a investigué l'effet d'un chargement statique ou cyclique sur l'expression de certaines protéines clés de la matrice extracellulaire. Cancel a démontré une diminution de l'expression du collagène de type II et X de même qu'une diminution du taux de croissance après une compression statique *in vivo* appliquée à des plaques de croissance de rat [90]. Des sacs de sable attachés au dos des poulets ont permis d'exercer une compression *in vivo* sur les plaques de croissance de leurs membres inférieurs. Cette étude rapporte également une distribution ciblée de l'expression du collagène de type II et X dans les zones inférieures de la plaque de croissance [105]. Ces changements peuvent laisser croire que la zone hypertrophique joue un rôle clé dans la réponse de la plaque de croissance aux chargements mécaniques.

Des études *in vivo* menées sur des rats chargés dynamiquement ont montré par immunohistochimie que l'expression du collagène de type II, du collagène de type X [23; 86;

119] ou de l'aggrécane [119] n'étaient pas modifiées par le chargement, que celui-ci soit cyclique [86; 119] ou basé sur l'exercice volontaire [23]. Le taux de croissance était plus rapide et la maturité squelettique était atteinte plus rapidement pour les rats sous exercices [23]. Les forces en compression, même de faibles amplitudes, ont complètement supprimé le taux de croissance [86]. Toutefois, des différences d'expression pour le collagène de type II et le collagène de type X ont été observées dans le cadre d'une étude *ex vivo*. Les explants de condyle fémoral distal chargés en compression cyclique ont indiqué une diminution de collagène de type II comparativement aux échantillons non chargés. Une réduction du collagène de type X a également été observée dans les explants non chargés [36].

1.3.6 Comparaison des effets de charges statique ou dynamique sur la mécanobiologie de la plaque de croissance

Des études comparatives plus récentes ont investigué les effets d'un chargement statique versus un chargement dynamique appliqué sur les plaques de croissance [1; 3; 7; 11]. Dans une étude *in vivo*, des ulnas de rats chargés en compression statique (forces de 8.5N ou 17N) et en compression dynamique (force maximale de 17 N, 2 Hz) ont indiqué une perte de croissance similaire de 4% pour les deux types de chargement [7]. Cette perte de croissance a par la suite été associée à une augmentation de l'épaisseur totale de la plaque de croissance et de la zone hypertrophique après les chargements, tant statiques que dynamiques. Ces conclusions contredisent toutefois la plupart des études portant sur les chargements statiques citées précédemment [2; 6; 9], où une diminution de l'épaisseur totale de la plaque de croissance a été observée. Lors d'une autre étude *in vivo*, des vertèbres caudales de rats ont été soumises à une compression asymétrique statique (force de 55% du poids de l'animal) ou dynamique (niveau de force non précisé, 1 Hz) [3]. Les résultats indiquent que le chargement dynamique a réduit la croissance des os de manière plus importante que le chargement statique; ces résultats n'étaient toutefois pas statistiquement significatifs. D'autres études comparatives ont analysé les effets sur les plaques de croissance d'un chargement statique/dynamique en tension [1; 11]. Lors d'études *in vivo* sur le chargement en tension, du cartilage provenant de la base du crâne [1; 11] a été chargé statiquement (force de 2N) ou dynamiquement (force maximale de 2N, 1Hz). La prolifération des chondrocytes s'est vue augmentée et l'épaisseur totale de la plaque, de même que l'épaisseur de la zone hypertrophique, ont été favorisées par le chargement cyclique.

Les études comparatives statique/dynamique *in vivo* détaillées précédemment utilisent souvent des paramètres de chargement qui ne sont pas rigoureusement définis en terme d'amplitude [3], qui ne sont pas équivalents en terme de chargement moyen résultant [1; 3; 11] ou qui sont simplement non normalisés [1; 3; 7; 11] par rapport aux dimensions des tissus osseux chargés. Alors que les forces appliquées [1; 3; 7; 11] et les déplacements correspondent à des paramètres de chargement absolus, les contraintes (force divisée par la section transversale de l'échantillon) et les déformations (déplacement divisé par l'épaisseur ou la hauteur de l'échantillon) ont la propriété d'être des paramètres de chargement normalisés. Ainsi, en s'appuyant sur les études disponibles, il n'est pas possible de définir quel type et paramètres de chargement offrent le meilleur potentiel de modulation de la croissance. Ces connaissances pourront ultérieurement servir aux études mécanobiologiques permettant de comprendre comment les chargements mécaniques peuvent altérer pathologiquement la croissance et le développement des tissus osseux.

CHAPITRE 2 RATIONNELLE DU PROJET ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

La revue des connaissances permet de dégager les éléments suivants :

- La croissance osseuse endochondrale a lieu dans la plaque de croissance cartilagineuse;
- Le matrice extracellulaire est composée des éléments clés suivants : collagène de type II et aggrécane (principaux composants matriciels extracellulaires), le collagène de type X (composant hypertrophique de la matrice extracellulaire) et MMP13 (métalloprotéinase dégradeur de collagène de type II);
- Les cellules de la plaque de croissance régulent, via des modifications dans la synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire, plusieurs caractéristiques de différenciation des chondrocytes, tels que les changements préférentiels dans la forme et le volume des cellules. Ceci suggère que la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire constituent un maillon essentiel dans la chaîne des événements qui se produit dans la croissance osseuse;
- L'hypertrophie des chondrocytes, la synthèse de la matrice extracellulaire et la prolifération cellulaire sont les trois facteurs les plus importants impliqués dans la régulation de la croissance;
- En plus des facteurs de croissance, des hormones, des nutriments, et de la génétique, il est reconnu que les forces mécaniques peuvent moduler le taux de croissance d'un os;
- Les études comparatives statique/dynamique *in vivo* détaillées précédemment utilisent souvent des paramètres de chargement qui ne sont pas rigoureusement définis en terme d'amplitude, qui sont non équivalents en terme de chargement moyen résultant ou qui sont simplement non normalisés;
- En s'appuyant sur les études disponibles, il n'est pas possible de définir quel type de chargement offre le meilleur potentiel de modulation de la croissance;
- Les traitements orthopédiques actuellement utilisés sont empiriques et basés sur des observations cliniques ou expérimentales et la réponse physiologique exacte à des stimuli externes n'est pas clairement définie;

- Les chargements dynamiques, en opposition aux chargements statiques, sont une représentation plus fidèle des contraintes quotidiennes auxquelles est soumis le corps humain.

L'analyse de ces considérations mène à l'hypothèse de recherche suivante :

« Des chargements statiques et cycliques équivalents (comparables en terme de déformation moyenne) entraînent des changements distincts dans l'histomorphométrie de la plaque de croissance et dans les modes d'expression de protéines de sa matrice extracellulaire. »

Le développement et l'élaboration des différents protocoles de préparation tissulaire et de chargements mécaniques serviront à implémenter 4 groupes d'étude *in vitro* d'explants de plaques de croissance : (a) baseline, (b) contrôle, (c) chargement statique, (d) chargement cyclique équivalent.

Deux objectifs spécifiques aideront à vérifier l'hypothèse de recherche:

- O1) Caractériser, pour chacun des groupes, l'histomorphométrie des plaques de croissance ainsi que les modes d'expression des protéines de certaines molécules clés de la matrice extracellulaire;
- O3) Mener une étude comparative afin d'analyser les effets: (a) du système de culture, (b) d'un chargement statique versus un chargement dynamique.

Le diagramme présenté à la Figure 2.1 illustre la méthodologie et les objectifs du projet.

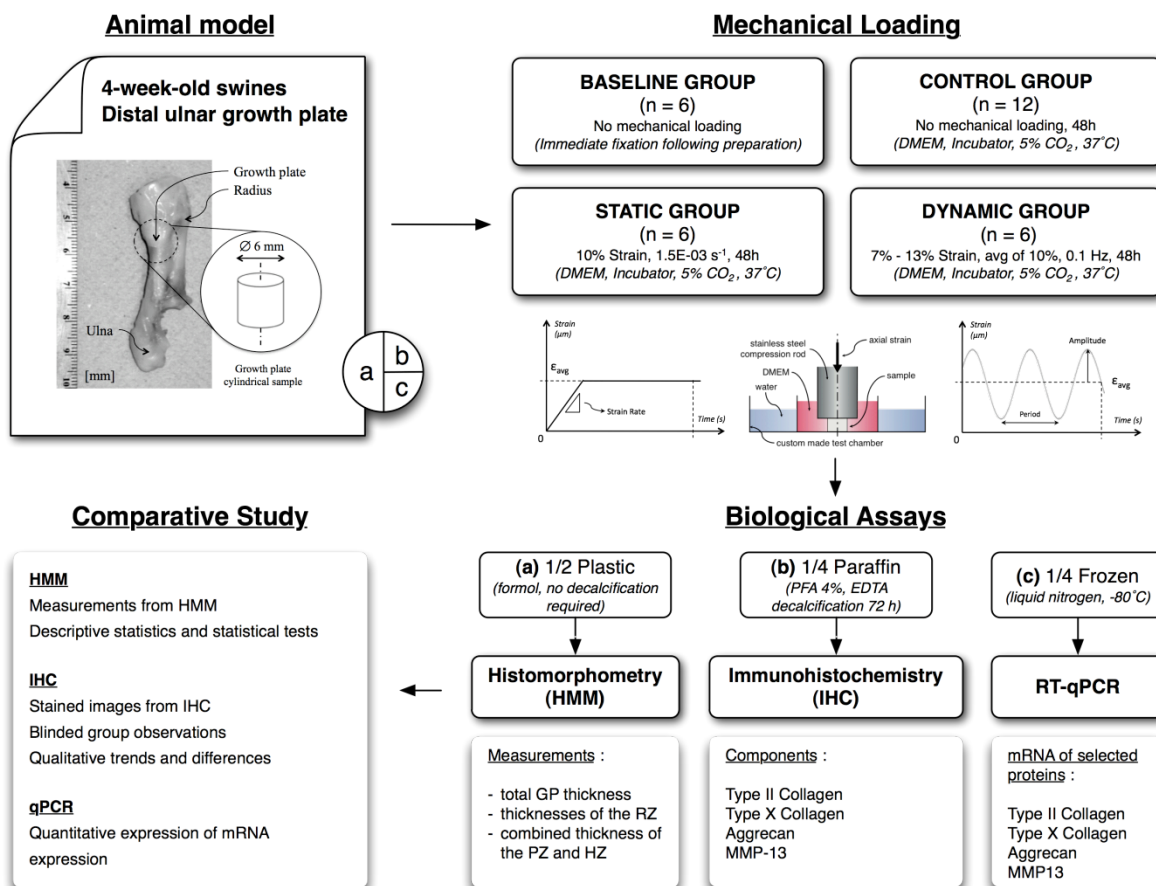


Figure 2.1 : Représentation schématique de la méthodologie de l'étude

La réalisation des objectifs du projet est présentée au chapitre suivant (Chapitre 3) par l'entremise d'un article scientifique. Cet article regroupe les étapes méthodologiques ainsi que les résultats des effets comparatifs d'un chargement statique ou dynamique sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance et sur les modes d'expression des protéines clés dans la matrice extracellulaire. Le Chapitre 4 présente des aspects méthodologiques additionnels ainsi que des résultats complémentaires. Une discussion générale, une conclusion et des recommandations complètent ce rapport.

CHAPITRE 3 ARTICLE SCIENTIFIQUE

La contribution du premier auteur à la rédaction de l'article est d'environ 85%. L'article a été soumis le 23 avril 2010 pour publication dans la revue scientifique *Journal of Orthopaedic Research* publiée au nom de *Orthopaedic Research Society (ORS)* chez John, Wiley & Sons, Inc.

3.1 Growth plate explants respond differently to *in vitro* static and dynamic loadings



GROWTH PLATE EXPLANTS RESPOND DIFFERENTLY TO *IN VITRO* STATIC AND DYNAMIC LOADINGS

(STATIC/DYNAMIC GROWTH PLATE COMPRESSIVE RESPONSE)

^{1,2}Sergerie, K; ^{2,3}Parent, S; ^{1,2}Beauchemin, P-F; ²Londoño, I;
^{2,3}Moldovan, F; ^{+1,2}Villemure, I

1- Dept. of Mechanical Engineering, École Polytechnique of Montreal

2- Sainte-Justine University Hospital Center

3- Université de Montréal

Authors' e-mail addresses:

Kim Sergerie	kim.sergerie@polymtl.ca
Stefan Parent	stefan.parent@umontreal.ca
Pierre-François Beauchemin	pierre-francois.beauchemin@polymtl.ca
Irène Londoño	irene.londono@umontreal.ca
Florina Moldovan	florina.moldovan@umontreal.ca
Isabelle Villemure	isabelle.villemure@polymtl.ca

3.1.1 Abstract (219 words)

This study aimed at investigating the effects of static and dynamic compression applied on growth plate explants using matched compressive strains. Growth plate explants from 4-week-old swine ulnae were submitted to *in vitro* static (10% strain) or dynamic (oscillating between 7% and 13% at 0.1 Hz) unconfined compression for 48 hrs. The total growth plate height, the combined proliferative and hypertrophic thickness and the resulting ratio between these two thicknesses were evaluated. Standard immunohistochemistry was used to analyze the protein expression of key components of the extracellular matrix: aggrecan, type II collagen, type X collagen and MMP13. In the statically loaded samples, the columnar organization of the cells was preserved but with slight columns deviation from the growth axis. Decreases in all histomorphological parameters were important and a notable loss of aggrecan, type II and type X collagens expressions was denoted. In the dynamically loaded samples, a severe loss of columnar arrangement was observed in the proliferative and hypertrophic zones. However, dynamic compressive loads preserved the proliferative and hypertrophic zones ratio and contributed to the synthesis of aggrecan and type II collagen in the extracellular matrix. The exact response of the growth plate to mechanical stresses along with optimal loading parameters could help improve the current treatment approaches or develop new treatment approaches for the underlying progressive musculoskeletal deformities.

Keywords: growth plate, dynamic/static compression, mechanobiology, histomorphometry, immunohistochemistry

3.1.2 Introduction

From a physiological and experimental point of view, mechanical loads are essential to normal bone growth. However, if too elevated, these loads may result in abnormalities in growing bones. This phenomenon has key implications in infant and juvenile musculoskeletal deformities [1; 2]. There is strong evidence that static (sustained) loading alters longitudinal growth. According to Hueter-Volkmann principle, increased pressure on the growth plates slows growth and vice-versa [3; 4].

Longitudinal bone growth is the result of a complex temporo-spatial progression of chondrocytes differentiation within the three growth plate zones [5-7]. The reserve, proliferative and hypertrophic zones play specific roles in the growth process and present differences in cell arrangement/size and in extracellular matrix composition (Figure 3.1) [6; 7]. Growth plate cells seem to regulate several differentiation steps, such as changes in cell shape and volume, via alterations in the matrix synthesis and/or degradation [8]. Aggrecan is the principal proteoglycan molecule in the extracellular matrix and provides osmotic properties necessary for resistance to compression [9]. Type II collagen is also a structural component forming a fibrillar network for resistance to tensile loads [10; 11]. Type X collagen, localized in hypertrophic zone, would play a role in bone mineralization [12; 13]. MMP13 (or collagenase 3) is a proteinase involved in the degradation of type II and X collagens as well as aggrecan and other proteoglycans [14; 15]. Increased or decreased expression as well as an altered distribution of these proteins might alter mechanical properties of the growth plate [11] and/or bone growth rate [8].

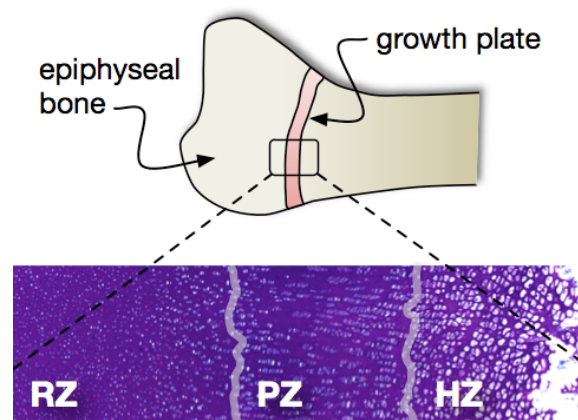


Figure 3.1 : Histological section showing the growth plate structure as well as the reserve, proliferative and hypertrophic zones.

Using animal models, several *in vivo* studies investigated growth plate mechanobiology [3; 4; 16-19]. These studies reported disorganization of chondrocytes columns in the proliferative and hypertrophic zones [4; 17] as well as diminution of the proliferative [17] and hypertrophic [4; 16-18] zones thicknesses under static compression. Chondrocytes proliferation was also reported to reduce [4; 17; 18] as well as the level of chondrocytes hypertrophy [4; 16; 18]. Other studies have assessed the differential effect of static versus dynamic compression on growth plates [20-23]. Robling et al. [21] showed that growth suppression was proportional to the applied load magnitude, whether the load was static or dynamic, and that dynamic compression significantly increased osteogenesis. In a study on asymmetrical compression of rat caudal growth plates, longitudinal growth suppression was greater for dynamic loading than for sustained loading, although these differences were not statistically significant [20]. Tensile loads applied on rat cranial base cartilage led to an increase of chondrocyte proliferation and of the total growth plate and hypertrophic zone heights. These changes were further enhanced by cyclic loading compared to static tension [22; 23], suggesting that cyclic forces are more effective stimuli for chondrogenesis [10]. However, these comparative static/dynamic *in vivo* studies used loading parameters that were either not well controlled in terms of magnitude [20], not matching between static and dynamic [20; 22; 23] or not normalized [20-23]. Therefore, based on current knowledge, it is not possible to conclude which type of loading, static or dynamic, is most effective in terms of growth modulation potential.

This study aims at investigating the effects of static and dynamic compression applied on growth plate explants using matched average normalized compressive strains and further comparing growth plate histomorphometry as well as protein expression patterns of key molecules of the extracellular matrix. It is hypothesized that growth plate explants respond differently to *in vitro* static and dynamic compression. This knowledge will increase the understanding of the growth plate mechanobiology, which is significant for growth modulation techniques used in conservative and surgical orthopaedic treatments of progressive musculoskeletal deformities.

3.1.3 Methods

3.1.3.1 Specimen Preparation

Distal ulnae of 4-week-old swine were obtained from a local abattoir within three hours of slaughter and dissected to extract growth plate samples using 6 mm diameter biopsy punches (Figure 3.2). Following dissection, growth plate samples were kept hydrated with HBSS and held on ice. Four groups were implemented: (a) baseline (n=6), (b) culture control (n=12), (c) static loading (n=6) and (d) dynamic loading matched in terms of average compressive strain (n=6). For the mechanically loaded groups (static and dynamic), sample disks were trimmed on their upper and lower surfaces using a Vibratome (Vibratome 1500 Sectioning System) to obtain two parallel surfaces. The thickness of the complete growth plate was measured at two different locations on the explants using an electronic micrometer (Mitutoyo Digimatic Caliper, precision of 10 μm).

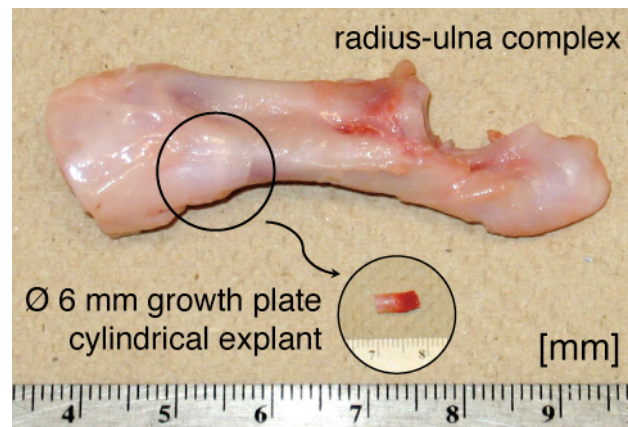


Figure 3.2 : Growth plate cylindrical sample extraction using a 6 mm diameter biopsy punch. The growth plate is located between the metaphysis and epiphysis.

3.1.3.2 Mechanical Loading

The micromechanical testing system (MACH-1, BioSyntech Inc.) used for static and dynamic groups was placed inside a standard incubator (Hera Cell 240, Mandel Scientific Inc.) under controlled conditions at 37°C under an atmosphere of 95% O₂ and 5% CO₂. Samples were incubated in Dulbecco's Modified Eagle culture medium (DMEM) enriched with 10% FBS and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin). Mechanically loaded disk samples were placed in a custom designed test chamber between two impermeable smooth platens allowing for their lateral

expansion and subjected to a 2% strain preload and then compressed for 48 hrs (Figure 3.3). The static loading samples underwent an additional 10% strain at a strain rate of $1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. The dynamic loading samples were submitted to an additional cyclic strain oscillating between 7% and 13% (average strain level of 10%) at 0.1 Hz. Axial displacements were controlled via an encoder of 100 mm range and $0.5 \mu\text{m}$ resolution. Matched culture control samples were kept in identical conditions besides the compressed samples.

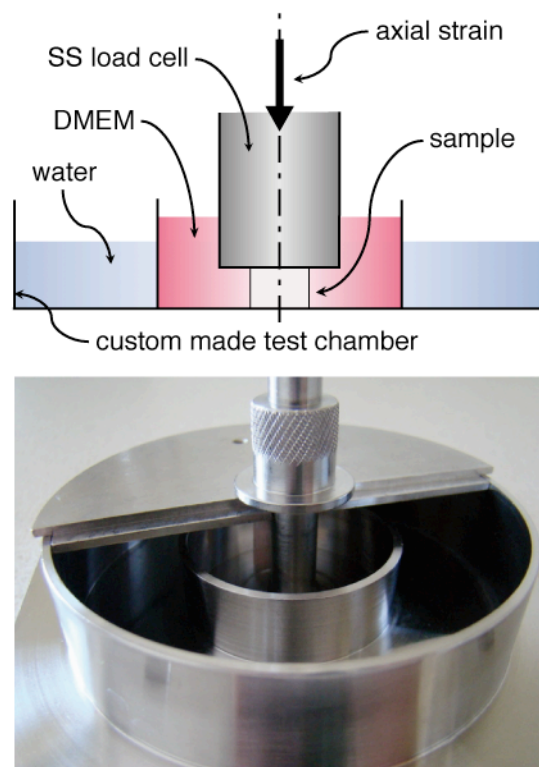


Figure 3.3 : Schematic of the unconfined compression test. Samples were submitted to static or dynamic compression for 48h. All samples were bathed in DMEM (supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics) throughout the test.

3.1.3.3 Tissue Processing and Biological Assays

Following the incubation period (or immediately following growth plate extraction for the baseline group), samples were sliced along the longitudinal growth axis using a custom-made tissue slicer (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA, USA) to obtain growth plate tissue for both histomorphometry analyses and immunohistochemical bioassays.

3.1.3.4 Histomorphometry

Growth plate tissues for histomorphometry were fixed in 10% formalin and embedded in methylmetacrylate. For all samples, four sections (6 μm thick) were made at different depths within the samples (Sliding Microtome Leica SM 2500) and stained with 0.2% Toluidine Blue. Images were acquired using a microscope (Leica DMR with a Retiga Qimaging Camera). The overall aspect of the growth plate was first qualitatively evaluated for each of the study groups in terms of chondrocytes shape and arrangement within the three zones. Two histomorphometric parameters were measured using a custom designed MATLAB application. A total of 30 measurements per section were made for the total growth plate height. The combined thickness of the hypertrophic and proliferative zones was measured on three close up images, and 30 measurements per image were done. The ratio of the combined hypertrophic and proliferative thickness with respect to the total thickness was also evaluated. Basic statistical analyses were completed using MATLAB (R2007, The MathWorks Inc). A one-way ANOVA for repeated measures was carried out to determine whether any difference existed between the means obtained for each group. The post-hoc comparisons between groups were done using the Tukey's method. For all tests, the level of significance was fixed at $p < 0.05$.

3.1.3.5 Immunohistochemistry for Aggrecan, Type II Collagen, Type X Collagen and MMP13

Growth plate tissues for immunohistochemistry were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for two days, rinsed in PBS and decalcified in 10% EDTA at pH 7.0 for another three days prior to paraffin embedding. Using a rotary microtome (Leica RM 2145), four sections of 5 μm were made at different depths within the samples.

The sections were deparaffinized with toluene, rehydrated and preincubated in chondroitinase ABC (5.1 U/mL) for 90 minutes at 37°C. Antigen retrieval was performed by heating the sections in 10 mM pH 10.0 TRIS buffer (for aggrecan, MMP13, type X collagen) or 10 mM pH 6.0 citrate buffer (for type II collagen). The sections were then digested with hyaluronidase (2 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 30 minutes at 37°C. To make tissue permeable and to prevent certain nonspecific interactions, 0.5% Triton X-100 was used for 15 minutes at room temperature. Sections were incubated in freshly prepared 2% H₂O₂ in PBS (or in methanol for type II collagen) for 30 minutes to inhibit endogenous peroxidase activity. In

order to block the reactive sites in the tissues, sections were incubated for 60 minutes at room temperature with goat normal serum (for aggrecan and type X collagen) or horse normal serum (for type II collagen and MMP13) (1.5% in PBS). The sections were then incubated overnight at 4°C with polyclonal rabbit anti-mouse anti-aggrecan (1/50; Chemicon, Temecula, CA, USA), monoclonal mouse anti-chicken anti-type II collagen (1/1; Spring Biosciences, Fremont, CA, USA), monoclonal mouse anti-porcine anti-type X collagen (1/75; Sigma-Aldrich) or monoclonal mouse anti-human anti-MMP13 (1/20; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) antibodies. After being washed, the sections were incubated with biotinylated anti-rabbit or anti-mouse IgG secondary antibodies (1/200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 60 minutes at room temperature and stained using the avidin-biotin complex method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories). The color was developed using diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories). The sections were finally counterstained with Harris modified hematoxylin (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) and mounted with Permount (Fisher Scientific).

Staining specificity was evaluated by substituting the primary antibodies with 1.5% goat or horse normal sera following the same experimental protocol. The experiment was run in quadruplicate. Representative pictures were taken (X100; Leica DMR with a Retiga Qimaging Camera) for each section. A qualitative image analysis was then performed by five independent observers who were blinded as to the belongingness of the images to each group. Each observer first performed an individual analysis, and major differences and trends between the four study groups were subsequently pooled together and analyzed.

3.1.4 Results

3.1.4.1 Histomorphometry

Representative growth plate histological sections from each study group are shown in Figure 3.4. For the baseline and control samples, chondrocytes were organized in columns and the limits between the three zones could clearly be distinguished. Although the columnar organization of the cells was preserved in the statically loaded samples, slight columns deviation from the growth axis was observed in these samples. In the growth plates from dynamic group, a severe loss of columnar arrangement was observed in the proliferative and hypertrophic zones when compared to the control and baseline groups. In addition, the junction between the

proliferative and hypertrophic zones was indistinguishable, and hence proliferative and hypertrophic zone thicknesses could not be measured separately.

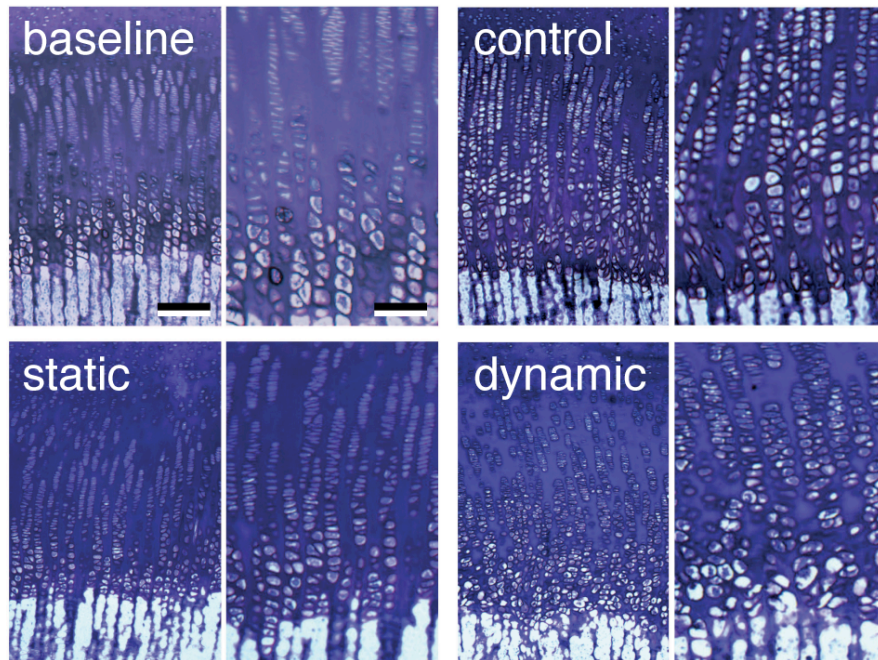


Figure 3.4 : Representative growth plate sections (methyl methacrylate embedding, toluidine blue staining) showing the columnar arrangements of the chondrocytes under static or dynamic compression. Scale bar represents 200 μm in lower magnifications and 100 μm in higher magnifications.

Measured histomorphometric parameters are summarized in Tableau 3.1 and Figure 3.5. When comparing control and baseline groups, an increase, although not significant, was observed for all three parameters. A non-statistically significant decrease ($0.05 < p\text{-value} < 0.10$) was observed in the growth plate thicknesses for both static and dynamic groups compared to the control group. For the combined thickness of the two lower zones, a statistically significant reduction was found between the control and the static groups only. The ratio of the two lower zones relative to the total growth plate height was reduced for the static group, although non significantly ($0.05 < p\text{-value} < 0.10$), but remained similar for the dynamic group when compared to the control group.

Tableau 3.1 : Histomorphological measurements of porcine distal ulna growth plates under static or dynamic compression (mean values \pm standard deviations).

<i>(avg \pm std. dev.)</i>	Baseline (n=6)	Control (n=12)	Static (n=6)	Dynamic (n=6)
Complete growth plate (GP) thickness [μm]	3077 \pm 374	3327 \pm 543	2681 \pm 614 *	2677 \pm 541 *
Combined thickness of hyp. and prolif. zones [μm]	777 \pm 113	1025 \pm 309	627 \pm 142 † *	841 \pm 230
Combined thickness of hyp. and prolif. zones relative to total GP thickness [%]	25.3 \pm 2.4	30.3 \pm 6.6	23.8 \pm 5.0 *	31.2 \pm 4.8

† Statistically significant compared to control (p -value < 0.05)

* Statistically significant compared to control (p -value < 0.10)

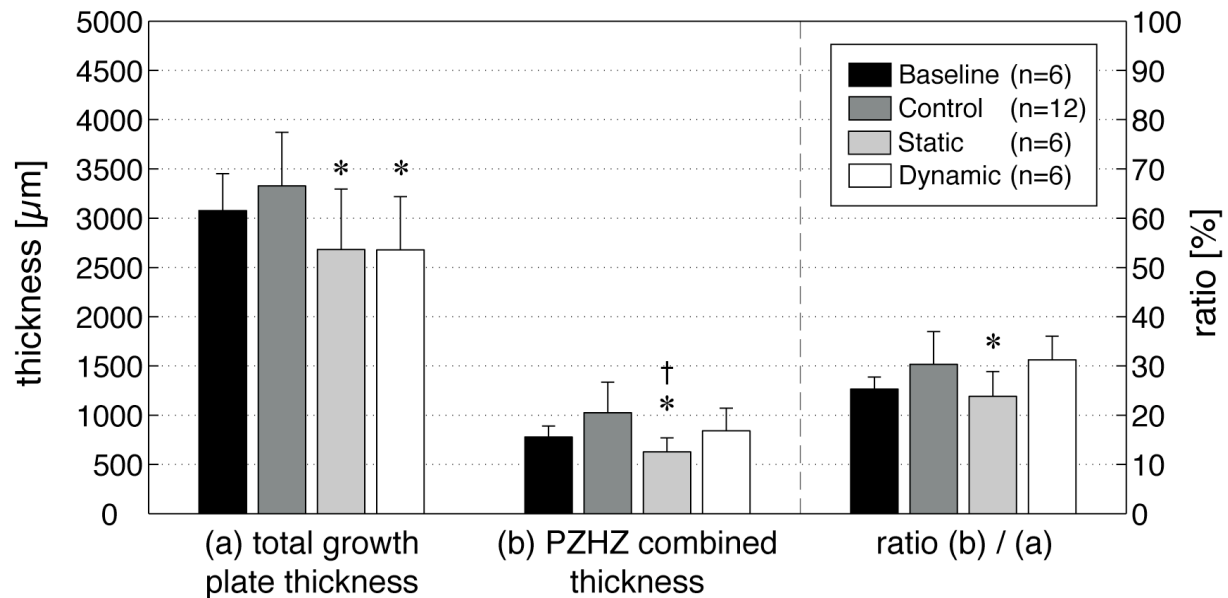


Figure 3.5 : Histomorphological measurements of porcine distal ulna growth plates under static or dynamic compression (mean values + standard deviations). Asterisks represent significant differences compared to control († p -value < 0.05 , * p -value < 0.10).

3.1.4.2 Immunohistochemistry

Representative images from immunohistochemical analysis for each protein (aggrecan, type II collagen, type X collagen, MMP13) and for each study group (baseline, control, static, dynamic) are shown in Figure 3.6. Aggrecan staining was detected in the four groups. In baseline samples, the expression of aggrecan was uniformly found throughout the growth plate. For the control group, the distribution and the intensity of the signal were greatly reduced in both the proliferative and reserve zones, but aggrecan expression was observed in the lower hypertrophic zone. In the static group, high positive aggrecan immunostaining was found throughout the growth plate; the signal was higher in the hypertrophic, reserve and mid-proliferative zones and reduced in the lower and upper proliferative zones compared to the control group. In the dynamic samples, aggrecan staining was similar in all zones, however more intense than in the baseline and control samples.

Compared to baseline samples, there seems to be a notable loss of type II collagen signal in the reserve zone of the control samples. When comparing to the control group, type II collagen expression was intense in the reserve zone of the dynamic samples. For all the groups, little expression was present at the interface of the proliferative and reserve zones. More intense and similar immunostaining was observed in the hypertrophic zones of the control and dynamic samples, compared to baseline samples.

Type X collagen, a typical chondrocyte hypertrophy marker, was expressed in the hypertrophic zone of growth plates from the baseline group. The expression was altered in the control and both mechanically loaded groups. In these three groups, type X collagen expression was primarily found at the interface of the proliferative and hypertrophic zones. In addition, staining was still observed in the lower hypertrophic zone of the dynamic and control samples, but greatly reduced in the mid-hypertrophic region.

Immunostaining of MMP13 protein was low, but positive signal was observed in all four experimental groups. In the static group, positive signal was observed only in the hypertrophic zone. For the dynamic, control and baseline group, no preferential localization of MMP13 staining was observed. Negative controls showed no positive signal for the four assays.

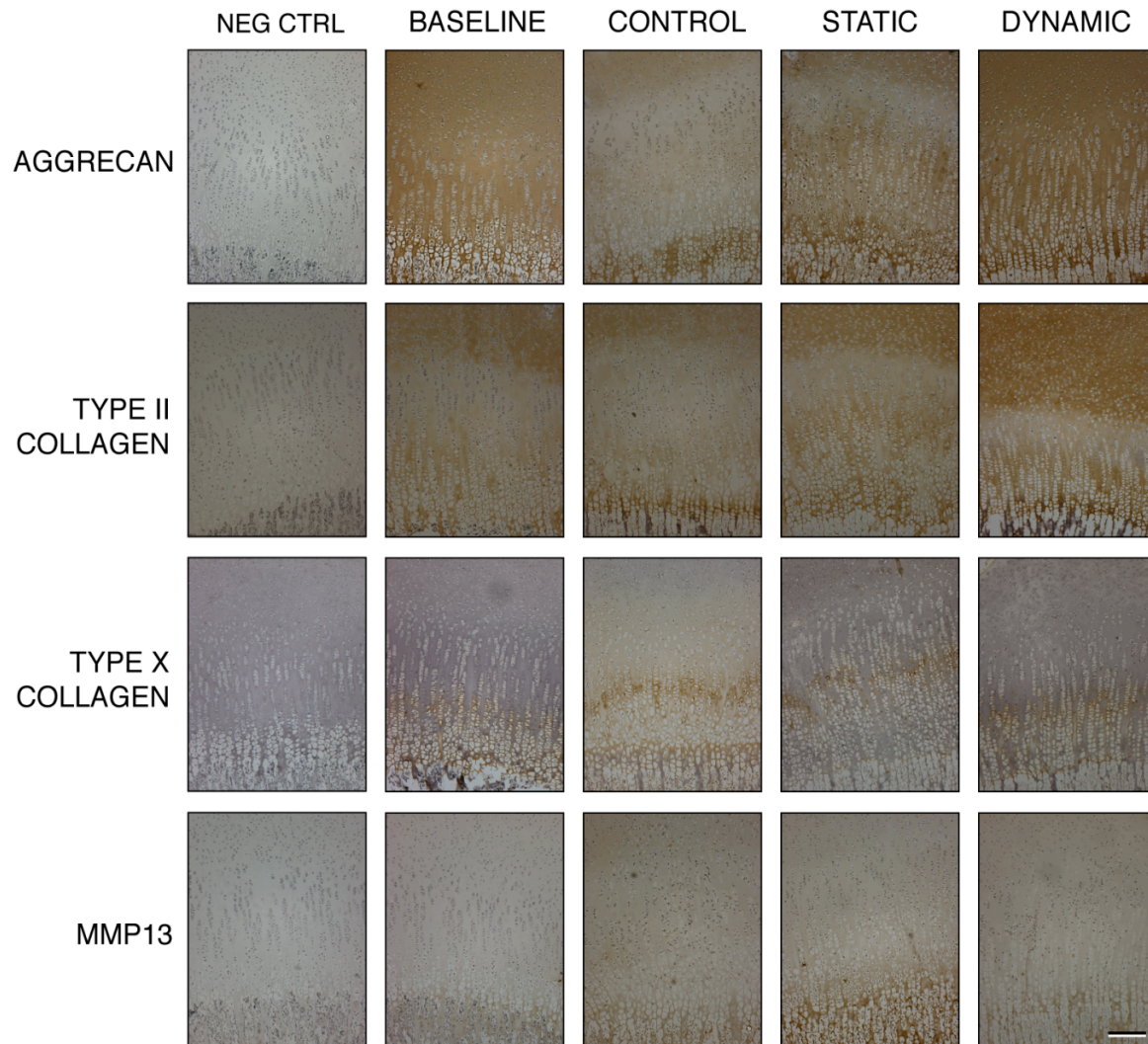


Figure 3.6 : Immunohistochemistries showing aggrecan, type II collagen, type X collagen and MMP13 staining for the baseline, control, static and dynamic groups (paraffin embedding, hematoxylin staining). Scale bar represents 200 μm .

3.1.5 Discussion

In the present study, the differential effects of *in vitro* static and dynamic loadings of growth plate explants were investigated by characterizing growth plate histomorphometry as well as protein expression pattern of key components of the extracellular matrix. By combining semi-quantitative histomorphometry with standard protein detection by immunohistochemistry, it was shown that growth plate explants respond differently to *in vitro* static and dynamic compression.

Following static loading, decreases in all histomorphological parameters were important and a notable loss of aggrecan, type II and type X collagens expressions was observed. Diminution of absolute heights of the total growth plate as well as the proliferative and hypertrophic zones were expected since growth plate explants were subjected to sustained compressive strain and since proliferative and hypertrophic zones were previously found half as stiff as the reserve zone along the compression axis [24]. These findings correlate with previous studies where a reduction of the proliferative and hypertrophic zones was also observed following *in vivo* static growth plate compression [4; 16-18; 25]. Several studies have also demonstrated a significant correlation between decreased bone growth rate and reduced growth plate thickness [7; 16]. Short-term *in vitro* static compressive loads reduced the mRNA expression of type II and type X collagens throughout the growth plate [26]. In an *in vivo* study on static loading of rat caudal growth plates, a diminished expression of type II and type X collagens was noted, though no variation was observed for proteoglycans [19]. Changes in the expression of type II collagen, type X collagen and MMP13 by growth plate chondrocytes are closely related to the proliferation and hypertrophy processes [9]. The expression pattern of these proteins indeed varies between growth plates growing at different rates [8]. In human articular cartilage, proteoglycan content is directly related to the equilibrium aggregate modulus [27]. Relative alterations of aggrecan, type II and type X collagens expressions following static loading could be associated with a decreased growth plate compressive strength and therefore with an important alteration of cell organization of the proliferative and hypertrophic zones. Since longitudinal growth strongly depends on both growth plate proliferation and hypertrophy [9] and because chondrocytes hypertrophy is the most important factor influencing longitudinal bone growth [5; 7], alterations in the extracellular matrix histomorphometry and biology of the two lower zones due to sustained static loads are susceptible to have severe impacts on the growth process.

Our results suggest that dynamic compressive loads preserved the proliferative and hypertrophic zones ratio and contributed to the synthesis of aggrecan and type II collagen in the extracellular matrix. Previous studies have shown inconsistent results, with both significant decreases [11] and increases [22; 28; 29] of the proliferative and hypertrophic zones heights reported following dynamic loads. In this study, the loss of columnar arrangement found in the dynamically loaded explants disagrees with an anterior study, which reported an enhanced

columnar arrangement of the hypertrophic cells in rabbit cranial base growth plates submitted to dynamic compression [29]. In articular cartilage, it was previously shown that, under *in vitro* compression, aggrecan expression was significantly higher in dynamically simulated explants than in statically simulated explants [30]. This finding is consistent with our observations from porcine growth plates under *in vitro* dynamic compression in our study. However, *in vivo* studies involving compressive dynamic loading of growth plates showed that aggrecan [31] and type X collagen [28; 31] expressions remained unchanged after dynamic compression. *Ex vivo* short-term compressive dynamic loads of cranial base growth plate explants significantly increased the number of proliferating chondrocytes when compared to unloaded specimens [29]. In our case, the columnar disorganization observed in the lower zones of dynamic explants could be explained by such an increase in chondrocytes proliferation, which would yield in an addition of material in the proliferative zone. The fluid flow through the biphasic tissue due to oscillating movement from the cyclic loading could also be associated with the chondrocytes columnar disorganization. Furthermore, it is conceivable that increased content of aggrecan and collagens in the reserve zone brings rigidity to the tissue and may contribute to preservation of the proliferative and hypertrophic zones ratio.

This study is limited by its *in vitro* approach, which includes a culture effect observed when comparing baseline and control groups, but also excludes regulatory mechanisms. Although subtle for type II collagen and MMP13, these changes were more pronounced for aggrecan expression. Hence, the comparative analyses were mainly done between control and loaded groups. Other limits of the experimental model involve the load level and cyclic frequency, which were tested for one magnitude only. The lack of statistically significant differences could be related to the sample size and consequent reduced power to detect a relevant difference. As marked on Figure 5, further analysis with a more permissive significance level ($p\text{-value} < 0.1$) showed that the diminution of the growth plate height, the decrease of the combined thickness of the two lower zones as well as the difference between the combined thicknesses of the two lower zones relative to the total growth plate thickness were statistically significant between the control and the static groups.

This study provides relevant insights on the differential effects of static versus dynamic loadings, which were matched in terms of average compressive strain. It was demonstrated that the growth plate samples respond differently to static and dynamic compression. Future work will

aim at investigating the effects of the dynamic load frequency and load magnitude. Dynamic loading, as opposed to static loading, is a better representation of the everyday stresses experienced by the growth plate. Walking, running, repetitive movements of the upper extremity, standing and sitting are all examples where stresses across the growth plate are not static. Dynamic loads tend to preserve the content of the extracellular matrix of the growth plate, which is indirectly linked to the growth process. Thus, growth process is more likely to resume normally after growth modulation orthopaedic treatments involving dynamic loads. The exact response of the growth plate to these stresses along with optimal loading parameters could help improve or develop new treatment approaches based on dynamic loading for the underlying progressive musculoskeletal deformities.

3.1.6 Acknowledgments

Thank you to Michelle Dion, David Hamel, Thierry Lafrance, Gabriel Kaufman, Raphaëlle Lambert, Barthélémy Valteau and Charlotte Zaouter for their technical assistance. This research project was funded by the Pediatric Orthopaedic Society of North America (POSNA), the FQRNT (Quebec, Canada), the NSERC (Canada), the Canada Research Chair in Mechanobiology of the Pediatric Musculoskeletal System (I.V.) and by Sainte-Justine UHC Foundation and The Foundation of Stars.

3.1.7 References

1. Frost, H. 1990. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 3. The hyaline cartilage modeling problem. *Anat Rec* 226: 423-432.
2. Stokes, I, Aronsson, D, Urban, J. 1994. Biomechanical factors influencing progression of angular skeletal deformities during growth. *European Journal Exp Musculoskel Res* 3: 51-60.
3. Stokes, IAF, Aronsson, DD, Dimock, AN, et al. 2006. Endochondral growth in growth plates of three species at two anatomical locations modulated by mechanical compression and tension. *J Orthop Res* 24: 1327-1334.
4. Farnum, CE, Nixon, A, Lee, AO, et al. 2000. Quantitative three-dimensional analysis of chondrocytic kinetic responses to short-term stapling of the rat proximal tibial growth plate. *Cells Tissues Organs (Print)* 167: 247-258.
5. Breur, GJ, VanEnkevort, BA, Farnum, CE, Wilsman, NJ. 1991. Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. *J Orthop Res* 9: 348-359.
6. Farnum, C, Wilsman, NJ, Buckwalter, J, et al. 1998. Growth Plate Cellular Function. In, *Skeletal Growth and Development*, pp. 203-243.
7. Hunziker, E, Schenk, R. 1989. Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *J Physiol* 414: 55-71.
8. Alvarez, J, Balbín, M, Santos, F, et al. 2000. Different bone growth rates are associated with changes in the expression pattern of types II and X collagens and collagenase 3 in proximal growth plates of the rat tibia. *J Bone Miner Res* 15: 82-94.
9. Ballock, RT, O'Keefe, RJ. 2003. The biology of the growth plate. *J Bone Joint Surg Am* 85-A: 715-726.
10. Mao, JJ, Nah, H-D. 2004. Growth and development: hereditary and mechanical modulations. *Am J Orthod Dentofac* 125: 676-689.

11. Niehoff, A, Kersting, U, Zaucke, F, et al. 2004. Adaptation of mechanical, morphological, and biochemical properties of the rat growth plate to dose-dependent voluntary exercise. *Bone* 35: 899-908.
12. Kirsch, T, Harrison, G, Golub, EE, Nah, HD. 2000. The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *J Biol Chem* 275: 35577-35583.
13. Gibson, GJ, Flint, MH. 1985. Type X collagen synthesis by chick sternal cartilage and its relationship to endochondral development. *J Cell Biol* 101: 277-284.
14. Knauper, V, Will, H, Lopez-Otin, C, et al. 1996. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 271: 17124-17131.
15. Mitchell, P, Magna, H, Reeves, L, et al. 1996. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 97: 761-768.
16. Stokes, IA, Mente, PL, Iatridis, JC, et al. 2002. Enlargement of growth plate chondrocytes modulated by sustained mechanical loading. *J Bone Joint Surg Am* 84-A: 1842-1848.
17. Alberty, A, Peltonen, J, Ritsilä, V. 1993. Effects of distraction and compression on proliferation of growth plate chondrocytes. A study in rabbits. *Acta Orthop Scand* 64: 449-455.
18. Farnum, C, Wilsman, NJ, Buckwalter, J, et al. 1998. Effects of Distraction and Compression on Growth Plate Function. In, *Skeletal Growth and Development*, pp. 517-530.
19. Cancel, M, Grimard, G, Thuillard-Crisinel, D, et al. 2009. Effects of in vivo static compressive loading on aggrecan and type II and X collagens in the rat growth plate extracellular matrix. *Bone* 44: 306-315.
20. Akyuz, E, Braun, JT, Brown, NAT, Bachus, KN. 2006. Static versus dynamic loading in the mechanical modulation of vertebral growth. *SPINE* 31: E952-958.

21. Robling, A, Duijvelaar, K, Geevers, J, et al. 2001. Modulation of appositional and longitudinal bone growth in the rat ulna by applied static and dynamic force. *Bone* 29: 105-113.
22. Wang, X, Mao, JJ. 2002. Accelerated chondrogenesis of the rabbit cranial base growth plate by oscillatory mechanical stimuli. *J Bone Miner Res* 17: 1843-1850.
23. Wang, X, Mao, JJ. 2002. Chondrocyte proliferation of the cranial base cartilage upon in vivo mechanical stresses. *J Dent Res* 81: 701-705.
24. Sergerie, K, Lacoursière, M-O, Lévesque, M, Villemure, I. 2009. Mechanical properties of the porcine growth plate and its three zones from unconfined compression tests. *J Biomech* 42: 510-516.
25. Stokes, I, Clark, K, Farnum, C, Aronsson, D. 2007. Alterations in the growth plate associated with growth modulation by sustained compression or distraction. *Bone* 41: 197-205.
26. Villemure, I, Chung, M, Seck, C, et al. 2005. Static compressive loading reduces the mRNA expression of type II and X collagen in rat growth-plate chondrocytes during postnatal growth. *Connect Tissue Res* 46: 211-219.
27. Mow, VC, Huiskes, R. 2004. Structure and Function of Articular Cartilage and Meniscus. In, *Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechano-Biology*, 3 ed: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 181-258.
28. Ohashi, N, Robling, A, Burr, D, Turner, C. 2002. The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate. *J Bone Miner Res* 17: 284-292.
29. Othman, H, Thonar, EJ, Mao, JJ. 2007. Modulation of neonatal growth plate development by ex vivo intermittent mechanical stress. *J Biomech* 40: 2686-2693.
30. Aufderheide, AC, Athanasiou, KA. 2006. A direct compression stimulator for articular cartilage and meniscal explants. *Annals of biomedical engineering* 34: 1463-1474.
31. Tang, M, Mao, JJ. 2006. Matrix and gene expression in the rat cranial base growth plate. *Cell Tissue Res* 324: 467-474.

CHAPITRE 4 ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES ET RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

4.1 Analyses RT-qPCR

En plus des analyses histomorphométriques et immunohistochimiques, une démarche a été entreprise pour effectuer des analyses RT-qPCR. Ces analyses visaient à quantifier l'expression des ARNm de certaines molécules clés de la matrice extracellulaire et se voulaient des résultats complémentaires aux analyses immunohistochimiques. Les sections qui suivent décrivent la méthodologie pour la réalisation de tels essais sur des explants de plaques de croissance porcines ainsi que les principaux résultats obtenus.

4.1.1 Méthodologie

La Figure 4.1 illustre les principales étapes de l'extraction d'ARN. Les pages qui suivent détaillent le travail effectué pour optimiser chacune de ces étapes.

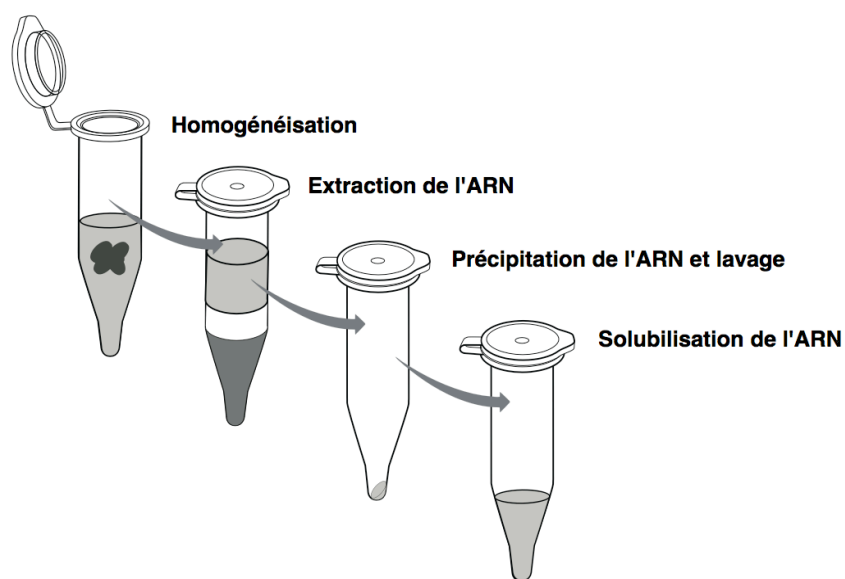


Figure 4.1 : Principales étapes de l'extraction d'ARN (image adaptée de [124])

Préparation des échantillons

À la fin de chaque expérimentation, les échantillons étaient coupés en trois morceaux; une moitié était utilisée pour les analyses histomorphométriques, un quart était dédié aux analyses

immunohistochimiques et l'autre quart de l'échantillon était réservé pour les analyses RT-qPCR, et ce, pour chacun des explants de plaque de croissance (baseline, contrôle, statique et dynamique). Pour les fractions d'échantillon dédiées aux analyses RT-qPCR, les fragments étaient d'abord enveloppés dans du papier d'aluminium, puis immédiatement figés dans l'azote liquide. Les échantillons étaient ensuite conservés au congélateur à -80°C jusqu'à l'homogénéisation.

Homogénéisation des plaques de croissance

La plaque de croissance est un tissu cartilagineux difficile à homogénéiser. Plusieurs méthodes d'homogénéisation ont été envisagées, toutes utilisant du TRIzol (Invitrogen). Le TRIzol est un réactif à base de phénol qui facilite l'inhibition immédiate de l'activité des RNases. Les échantillons biologiques sont lysés et homogénéisés dans du TRIzol.

Plusieurs appareils ont été testés pour optimiser l'homogénéisation des échantillons. Le Precellys 24 (Bertin Technologies) (Figure 4.2) est un appareil qui permet d'homogénéiser jusqu'à 24 échantillons à la fois. Les échantillons sont placés individuellement dans des fioles avec du TRIzol et des microbilles. L'action rapide du brassage permet la lyse et l'homogénéisation des tissus biologiques. Cette méthode semblait fonctionner pour les échantillons de petites tailles, mais des fragments demeuraient souvent entiers. Beaucoup de chaleur était également générée, ce qui est loin d'être favorable à la préservation de l'ARN.



Figure 4.2 : Homogénéiseur de tissu biologique (www.precellys.com)

L'Omni 2000 est un homogénéiseur à main muni d'un stator et d'un rotor. Les échantillons sont placés individuellement dans des fioles avec du TRIzol. À l'aide de l'appareil,

chaque échantillon est homogénéisé un à un. C'est l'effet du stator et du rotor qui permet la lyse et l'homogénéisation des tissus. Les manipulations sont effectuées sur glace pour préserver l'intégrité de l'ARN. Bien que la méthode soit plus longue, cet outil fonctionnait bien pour les échantillons de petites tailles. De meilleurs résultats ont été obtenus lorsque l'échantillon était d'abord retransché en plus petits morceaux.



Figure 4.3 : Homogénéiseur manuel de tissus biologiques (Omni International 2000). Gros plan sur le rotor et le stator.

Le pilon et le mortier sont utilisés en laboratoire pour des homogénéisations de toutes sortes. Alors qu'ils étaient encore congelés et emballés dans le papier d'aluminium, les échantillons étaient écrasés à froid dans l'azote liquide à l'aide du pilon et du mortier. Les échantillons en petits morceaux étaient récupérés dans une fiole de TRIzol puis homogénéisés à

l'aide de l'homogénéiseur manuel. Bien que cette méthode oblige des étapes supplémentaires, elle s'est avérée la plus efficace pour l'homogénéisation des explants de plaques de croissance porcines.



Figure 4.4 : Pilon et mortier de laboratoire

Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN se fait à partir des homogénats obtenus suite à l'homogénéisation. L'ajout de bromochloropropane ou de chloroforme à la solution de TRIzol résulte en la séparation de l'homogénat en des phases aqueuses et organiques. L'ARN se retrouve alors dans la phase aqueuse, l'ADN dans l'interphase, et les protéines dans la phase organique. L'étape de récupération du surnageant est critique et il est primordial de ne pas toucher l'interphase, sans quoi l'ARN sera forcément contaminée. L'ajout d'isopropanol au supernageant permet la précipitation de l'ARN. Cette étape d'extraction d'ARN a été effectuée selon le protocole publié par Invitrogen [125].

Quantification de l'ARN

La spectrophotométrie permet d'analyser la quantité, la qualité et la concentration de l'ARN. L'ADN et l'ARN absorbent la lumière ultra-violette avec un maximum d'absorption à une longueur d'onde de 260 nm. Dans le spectrophotomètre, un échantillon est exposé à une lumière ultra-violette à une longueur d'onde de 260 nm et une cellule photographique mesure la

quantité de lumière qui traverse l'échantillon. Plus la lumière est absorbée par l'échantillon, plus la concentration d'acides nucléiques y est élevée. Parce que les protéines absorbent la lumière ultra-violette avec un maximum à 280 nm, le ratio des absorbances A_{260}/A_{280} est utilisé pour déterminer si l'échantillon est contaminé avec des protéines. Le ratio des absorbances A_{260}/A_{280} doit être compris entre 1.9 et 2.1 pour que l'ARN puisse être qualifiée de « pure » [126].

Le dosage des échantillons a été effectué à l'aide du *NanoDrop Spectrophotometer* (Thermo Scientific). Avec seulement 1 μ L d'ARN solubilisée, il était possible d'obtenir une lecture des absorbances et des ratios. Fréquemment, les ratios indiquaient que l'ARN était contaminée, mais certains échantillons moins purs ont toutefois été envoyés à l'IRIC (Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie) pour la suite des essais.

Évaluation du rendement total d'ARN (RNA yield)

L'électrophorèse physicochimique permet la séparation de diverses substances contenues dans un mélange, grâce à leur différence de mobilité sous l'influence d'un champ électrique (courant continu). Le rendement total de l'ARN peut être évalué par migration sur gel MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) d'agarose. La migration de l'ARN dans le gel est observée sous un transilluminateur ultra-violet. En comparant les résultats avec un marqueur de poids moléculaires, il est possible d'évaluer la qualité de l'ARN. L'ARN intacte montre des bandes claires à 28S et 18S alors que l'ARN dégradée montre un signal flou sans bande distincte (Figure 4.5). Dans le cadre de la présente étude, les électrophorèses ont donné des résultats discutables et il semble que la majorité des échantillons d'ARN était contaminée (Figure 4.6).

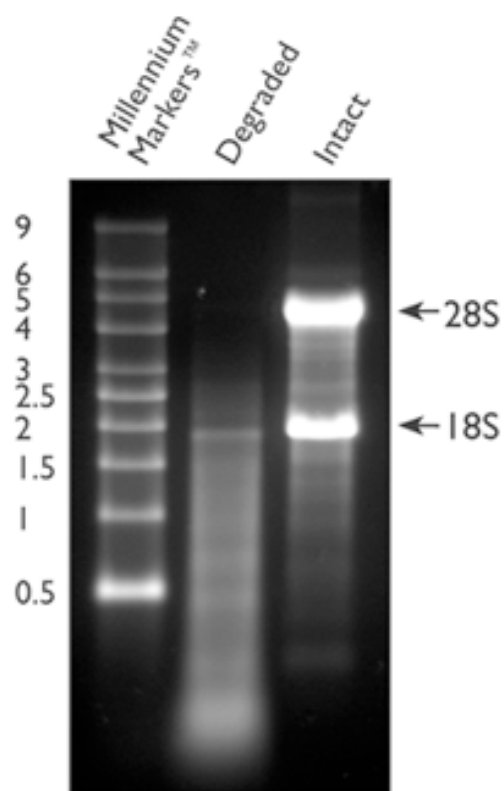


Figure 4.5 : ARN dégradée vs ARN intacte (image tirée de [127])

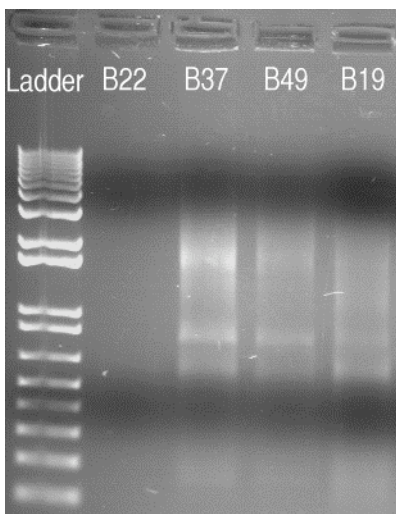


Figure 4.6 : Résultats d'une électrophorèse d'ARN sur gel d'agarose. ARN présente, mais dégradée.

L'électrophorèse demeure une méthode courante, mais l'analyse des résultats repose sur de simples observations. Même si les manipulations sont répétées plusieurs fois, les conclusions ne sont pas toujours évidentes et leur exactitude peut être biaisée. Une seconde alternative a été

envisagée pour évaluer la qualité de l'ARN. Le Bioanalyzer (Agilent Technologies) est une plateforme semi-automatisée qui permet le contrôle de la qualité et la quantification de l'ARN. Son fonctionnement est basé sur la micro-fluidique. Suite au dosage par spectrophotométrie, les échantillons étaient envoyés à l'IRIC où leur qualité était testée à l'aide du Bioanalyzer.

4.1.2 Résultats

La Figure 4.7 montre un exemple de rapport des résultats obtenus pour des échantillons baseline ou contrôle. Les ratios d'absorbances suite au dosage de chacun de ces échantillons étaient acceptables. Il y a présence d'ARN dans la majorité des échantillons, mais l'ARN est dégradée et n'est souvent pas assez pure pour procéder à des essais RT-qPCR. Il n'y avait pas de différence notable entre les échantillons baseline et les échantillons contrôle, ou pour des échantillons conservés à -80°C depuis plusieurs mois.

Il a par la suite été convenu de procéder à l'extraction de l'ensemble des échantillons accumulés depuis le début des expérimentations. Le dosage a ensuite été effectué pour tous les échantillons avant que ces derniers ne soient livrés à l'IRIC pour la suite des essais. Les Figure 4.8, Figure 4.9 et Figure 4.10 montrent le sommaire final des extractions d'ARN pour un total de 35 échantillons.

Les échantillons dont le RIN (RNA Integrity Number) était supérieur à 6 peuvent être utilisés pour les analyses RT-qPCR et les échantillons dont le RIN était entre 4 et 5 pouvaient être purifiés à nouveau avant de procéder aux essais RT-qPCR. En somme, seulement quatre échantillons avaient un RIN supérieur à 6 et cinq échantillons avaient un RIN compris entre 4 et 6. Sur un total de 9 échantillons potentiels, 6 étaient des échantillons baseline (B0040.2, B0052, B0112, B0118, B0127 et B0154), 1 était un échantillon statique (B0255) et 2 étaient des échantillons dynamique (B0133 et B0151). Puisque ces données n'auraient pas permis d'effectuer une analyse comparative satisfaisante et puisque les réserves d'échantillons étaient épuisées, il a été convenu de suspendre les manipulations visant la quantification de l'ARNm des protéines. Les essais effectués auront toutefois permis de dresser une liste de précautions à prendre (4.1.3 Précautions lors des manipulations) et d'élaborer un protocole optimal qui permettra certainement d'effectuer avec plus de succès des extractions d'ARN et des essais RT-qPCR pour des tissus semblables dans le futur.x

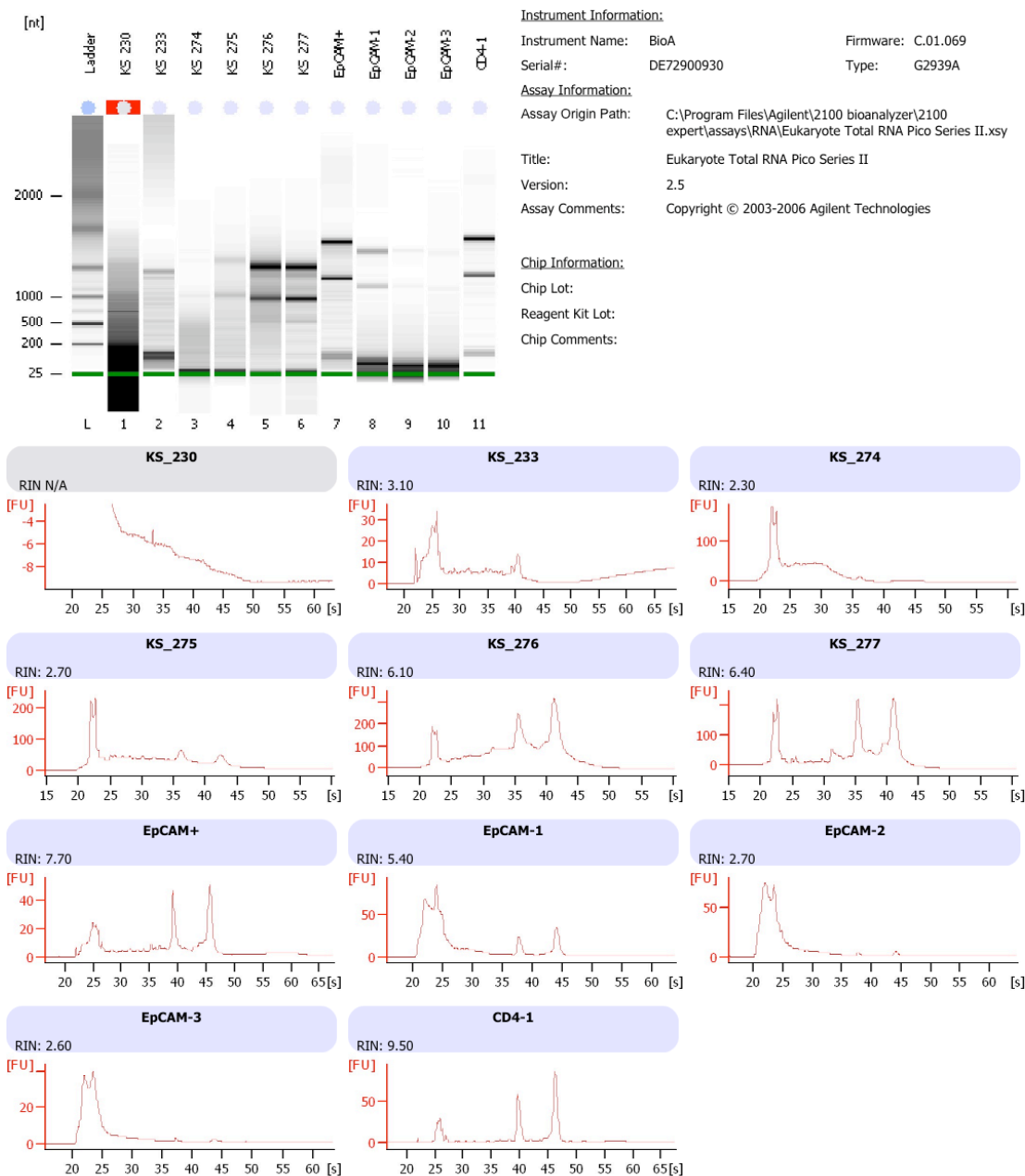
EukaryoteTotal RNA Pico_2009-10-19_001.xad

Page 1 of 5

Assay Class: EukaryoteTotal RNA Pico
 Data Path: \\S...9-10-19_Juan_Kim\EukaryoteTotal RNA Pico_2009-10-19_001.xad

Created: 2009-10-19 12:56:32
 Modified: 2009-10-19 14:35:23

Electrophoresis File Run Summary



2100 expert (B.02.06.S1418)

© Copyright 2003-2008 Agilent Technologies, Inc.

Printed: 2009-10-19 14:35:52

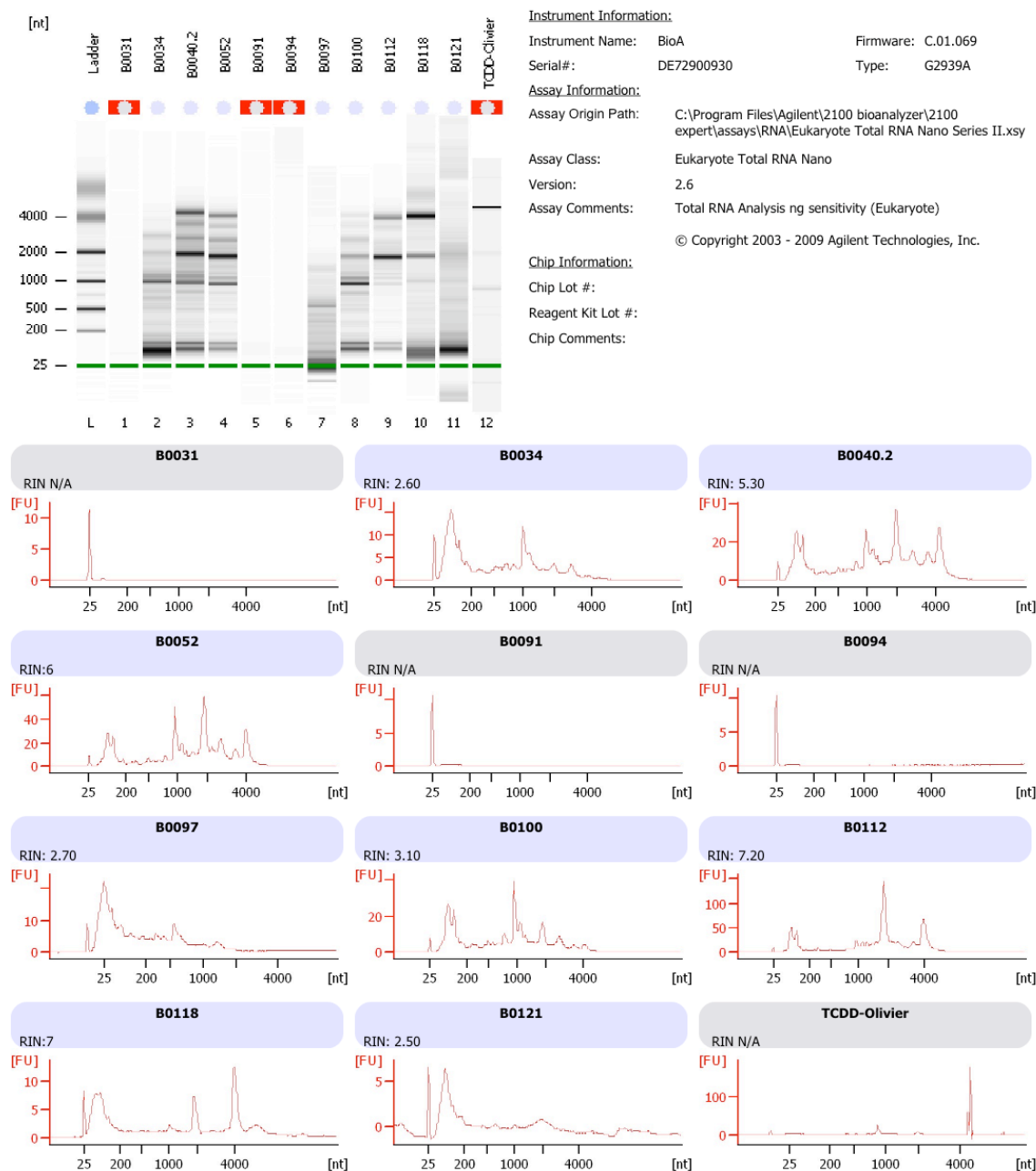
Figure 4.7 : Sommaire de l'électrophorèse au Bioanalyzer

2100 expert_2010-01-27_002.xad

Page 1 of 8

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: \\S...\BioAnalyseur\2010-01-27-Kim\2100 expert_2010-01-27_002.xad

Created: 2010-01-27 13:33:09
 Modified: 2010-01-28 15:08:30

Electrophoresis File Run Summary

2100 Expert (B.02.07.SI532)

© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Printed: 2010-01-28 15:09:10

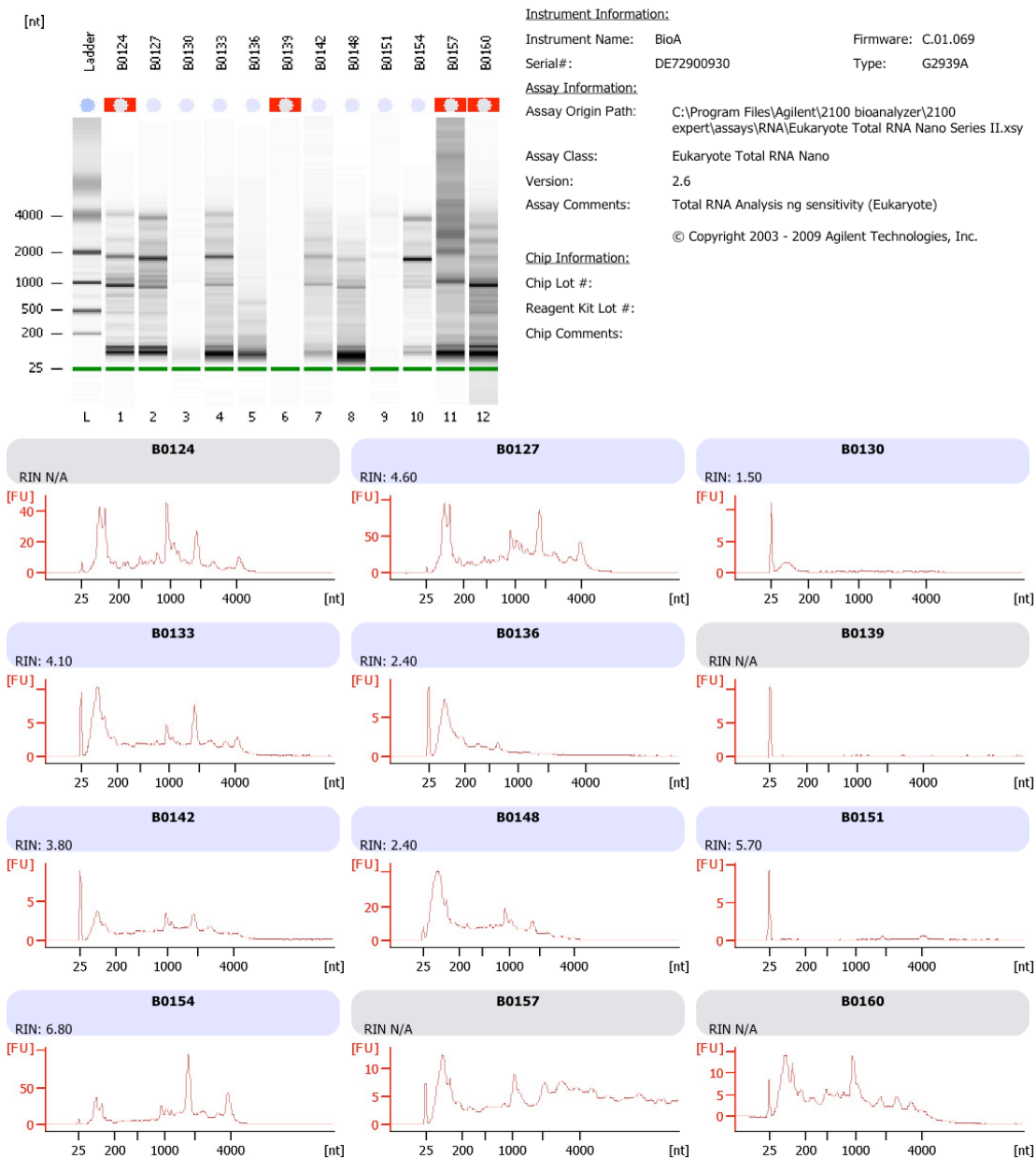
Figure 4.8 : Sommaire final de l'électrophorèse au Bioanalyzer (1 de 3)

2100 expert_2010-01-27_003.xad

Page 1 of 10

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...\2100 expert\Data\2010-01-27\2100 expert_2010-01-27_003.xad

Created: 2010-01-27 14:15:11
 Modified: 2010-01-27 14:38:38

Electrophoresis File Run Summary

2100 Expert (B.02.07.SI532)

© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Printed: 2010-01-27 15:22:26

Figure 4.9 : Sommaire final de l'électrophorèse au Bioanalyzer (2 de 3)

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...\\2100 expert\Data\2010-01-27\2100 expert_2010-01-27_004.xad

Created: 2010-01-27 14:51:44
 Modified: 2010-01-27 15:15:07

Electrophoresis File Run Summary



Figure 4.10 : Sommaire final de l'électrophorèse au Bioanalyzer (3 de 3)

4.1.3 Précautions lors des manipulations

Suite aux nombreux problèmes de dégradation de l'ARN, une liste de précautions a été mise à jour pour chacune des étapes de l'extraction d'ARN, mais aussi pour l'ensemble des manipulations. Ces précautions visent à réduire au minimum les risques de dégradation de l'ARN. Il est primordial de porter des gants désinfectés et de les changer régulièrement tout au long des manipulations. L'utilisation du RNase Away (Invitrogen) pour le nettoyage des outils et des surfaces de travail est également fortement recommandée.

Cueillette des échantillons à la Ferme Ménard

- Sacrifice effectué quelques heures avant la cueillette;
- Échantillons récupérés dans un sac hermétique;
- Transport sur glace.

Préparation tissulaire (dissection)

- Surface de travail désinfectée et utilisation d'un papier protecteur;
- Lames de scalpel et punches de biopsie stériles;
- Manches de scalpel et pinces trempés dans l'alcool et autoclavés;
- Changement fréquent des lames de scalpel;
- Échantillons déposés dans un Pétri inutilisé sur gazes stériles avec HBSS stérile ou PBS DEPC;
- Échantillons toujours conservés sur glace.

Préparation tissulaire avant congélation

- Pinces trempées dans l'alcool et autoclavées;
- Guide de coupe Zivic trempé dans l'alcool et autoclavé;
- Lames de rasoir neuves trempées dans l'alcool et autoclavées;
- Échantillons conservés à -80°C.

Homogénéisation et lyse des plaques de croissance

- Utilisation d'un pilon / mortier avec de l'azote liquide;

- Utilisation de solutions DEPC;
- Utilisation du Polytron désinfecté et nettoyé avec du RNase Away;
- Manipulations effectuées sur glace.

Extraction d'ARN

- Selon le protocole de TRIzol Invitrogen.

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

La présente étude visait à investiguer et comparer les effets d'un chargement statique ou dynamique sur la mécanobiologie de la plaque de croissance. La caractérisation de l'histomorphométrie de la plaque de croissance et des patrons d'expression de molécules clés de la matrice extracellulaire a permis de compléter une analyse comparative et de soulever certaines hypothèses quant à l'effet du type de chargement sur le processus de croissance. À partir d'analyses histomorphométriques semi-quantitatives et immunohistochimiques, il a été démontré que les explants de plaques de croissance répondaient différemment à la compression *in vitro* statique et dynamique. Une discussion tirée de l'article scientifique est présentée à la section 3.1.5. La présente discussion se veut un sommaire et un complément à cette discussion. Les manipulations et les analyses effectuées dans le cadre du projet ont permis de mettre en évidence les hypothèses et les conclusions suivantes :

- La compression statique a engendré une diminution importante de l'épaisseur totale de la plaque de croissance, de l'épaisseur des trois zones ainsi que du ratio combiné des zones proliférative et hypertrophique par rapport à l'épaisseur totale;
- Une réduction de l'expression de l'aggrécane, du collagène de type II et du collagène de type X a été observée suivant un chargement statique;
- Considérant que la croissance longitudinale est hautement dépendante de la prolifération et de l'hypertrophie des chondrocytes [37] et parce que l'hypertrophie des cellules de la plaque de croissance est le plus important facteur influençant la croissance longitudinale [14; 17], des altérations dans l'histomorphométrie et dans la biologie des deux zones inférieures de la plaque de croissance pourraient, suite à des charges statiques soutenues, avoir des impacts sévères sur le processus de croissance;
- Nos résultats suggèrent que la compression dynamique préserve le ratio des zones proliférative et hypertrophique et contribue également à la synthèse de l'aggrécane et du collagène de type II dans la matrice extracellulaire de la plaque de croissance;
- La présence accrue d'aggrécane et de collagène de type II dans la zone de réserve des échantillons chargés dynamiquement pourrait apporter une rigidité supplémentaire au tissu et contribuer par le fait même à préserver le ratio des zones proliférative et hypertrophique;

- Une désorganisation importante des colonnes de chondrocytes a été observée dans les zones proliférative et hypertrophique des échantillons chargés dynamiquement. Une augmentation de la prolifération cellulaire, qui mènerait à une addition de matériel dans la zone proliférative, pourrait expliquer la perturbation de l'arrangement colonnaire. La circulation des fluides à l'intérieur du tissu, amplifiée par le mouvement du chargement cyclique, pourrait aussi être associée à cette désorganisation des colonnes de chondrocytes;
- Les charges dynamiques ont tendance à préserver la composition et le contenu de la matrice extracellulaire. La matrice étant étroitement liée au processus de croissance, il est plus probable que la croissance reprenne normalement après un traitement orthopédique de modulation de croissance impliquant des charges dynamiques.

Des éléments de discussions supplémentaires sont développés ci-après.

Les études comparatives existantes ayant investigué les effets d'un chargement statique versus un chargement dynamique appliqués sur les plaques de croissance présentent des limites d'ordre méthodologique. Dans le cadre d'une étude *in vivo* menée par Akyuz [3], un chargement asymétrique statique ou dynamique correspondant à 55% du poids de l'animal était appliqué sur des plaques de croissance caudales de rat pour une période de 3 semaines. L'amplitude de chargement n'était pas rigoureusement définie et était non normalisée par rapport aux dimensions des tissus osseux chargés. Cela résulte en des chargements moyens non équivalents entre les groupes soumis à un chargement statique ou dynamique [3]. Une autre étude *in vivo* a été réalisée par Robling [7] lors de laquelle des ulnas de rats étaient soumis à un chargement statique (8.5 N ou 17 N) ou dynamique (17 N, 2 Hz) pour 10 minutes par jour sur une période de 10 jours [7]. Une fois de plus, les paramètres de chargement étaient non normalisés et ne permettaient pas une comparaison directe de la réponse mécanobiologique de la plaque de croissance. Deux autres études similaires conduites par Wang [1; 11] ont étudié les effets comparatifs de chargements statique (2 N) et cyclique (2 N, 1 Hz) appliqués en tension sur des plaques de croissances de la base du crâne de lapin (20 minutes par jour, 12 jours) [1; 11]. Bien que les chargements aient une amplitude maximum égale, le chargement résultant moyen était non équivalent entre les groupes et était non normalisé par rapport à la taille des tissus chargés.

La méthodologie et le design des expérimentations de la présente étude ont été pensés dans le but que les chargements appliqués sur les explants de plaques de croissance aient une

amplitude rigoureusement définie et qu'ils soient normalisés par rapport aux dimensions des échantillons. Il en résulte que les chargements statique (10% de l'épaisseur de l'échantillon, 48h) et dynamique (7-13% de l'épaisseur de l'échantillon, 0.1 Hz, 48h) sont équivalents en terme de déformation moyenne et sont normalisés par rapport aux dimensions des tissus chargés. Cette rigueur expérimentale apporte crédit et poids à l'étude et aux comparaisons qui sont faites entre les groupes.

Dans une étude similaire menée par Othman [110], des explants de plaques de croissance de la base du crâne ont été soumis *in vitro* à un chargement cyclique en compression pour une période d'une heure (200 mN, 1 Hz, 3600 cycles). Un tel chargement équivaut dans ce cas à un niveau de déformation d'environ 10%. Contrairement aux observations de la présente étude, les chondrocytes sont demeurées organisées en colonnes bien définies dans les échantillons du groupe chargé dynamiquement alors qu'ils étaient plutôt désorganisés dans les échantillons du groupe contrôle. Une augmentation du nombre de chondrocytes a également été observée. Puisqu'une augmentation de la prolifération des chondrocytes constitue un ajout de matériel dans la zone proliférative, il est également admissible de penser que sous compression, cela peut mener à une désorganisation dans la structure des chondrocytes. La synthèse des molécules de la matrice s'est vue favorisée par le chargement dynamique lorsque comparé au groupe contrôle [110], ce qui concorde avec les résultats obtenus dans la présente étude.

L'histomorphométrie de la plaque de croissance a été caractérisée pour chacun des groupes d'étude. Il était initialement prévu de mesurer l'épaisseur totale de la plaque de croissance, l'épaisseur des zones de réserve, proliférative et hypertrophique, de même que l'orientation des colonnes de chondrocytes par rapport à l'axe longitudinal de croissance. Le développement d'une application Matlab personnalisée a grandement facilité la prise des mesures histomorphométriques ainsi que la compilation des données et les analyses statistiques. Pour des raisons évidentes, certaines de ces mesures n'ont pas pu être complétées. En effet, la désorganisation des colonnes de chondrocytes dans les échantillons chargés dynamiquement rendait impossible la distinction entre la zone proliférative et la zone hypertrophique. C'est pour cette raison que seule l'épaisseur combinée de ces deux zones et leur ratio par rapport à l'épaisseur totale ont été considérés. Le nombre de chondrocytes en prolifération et le nombre de chondrocytes hypertrophiés par unité d'aire pourraient aussi être mesurés. Aucune procédure n'a été élaborée dans le cadre de ce projet pour mesurer la prolifération et l'hypertrophie dans la

plaque de croissance. Afin de comparer les effets des charges statiques et dynamiques, il serait intéressant de combiner de telles analyses avec des mesures du taux de croissance par exemple. Puisque que de telles analyses demeurent irréalisables dans le cadre d'une étude *in vitro*, une étude *in vivo* future permettrait d'investiguer de manière plus complète, le potentiel de modulation de croissance des chargements dynamiques.

Lors de l'observation des sections histologiques, la présence de trous gênait souvent la prise des mesures. Ces anomalies semblaient dues à des erreurs techniques de manipulations, mais la présence de chondrocytes à l'intérieur de ces lacunes laissait croire qu'il en était tout autre. En observant plusieurs images subséquentes issues d'un même échantillon, il apparaît que ces trous seraient en fait des canaux qui traversent la plaque de croissance. Ces canaux pourraient servir à la vascularisation de la plaque de croissance ou encore agir comme canal de communication. Dans une étude menée par Sundaramurthy, des explants de condyles ont été soumis à un chargement *in vitro* en compression dynamique. Le processus de formation du second centre d'ossification a été analysé et des structures semblables ont été observées. Les canaux étaient plus nombreux dans les échantillons chargés dynamiquement lorsque comparé aux échantillons contrôle [36]. De telles mesures n'ont pas été faites dans le cadre de la présente étude, il pourrait être pertinent de procéder à une quantification de ces structures dans chacun des groupes et de voir si cette tendance semble généralisée.

Les analyses immunohistochimiques ont été effectuées pour quatre protéines distinctes de la matrice extracellulaire. Bien que cette technique de localisation des protéines demeure qualitative, la démarche suivie donne aux résultats une valeur scientifique importante. Les essais ont été faits sur quatre sections histologiques provenant de différentes épaisseurs à travers l'échantillon (quadruple). Les images ont été analysées par cinq observateurs indépendants ne sachant pas a priori à quel groupe elles appartenaient. Une analyse individuelle a été faite et les différences évidentes entre les quatre groupes ainsi que les tendances au sein d'un même groupe ont par la suite été analysées. La variabilité intra-animale était moins importante que la variabilité inter-animale, mais les conclusions n'en demeurent pas moins justes. Un effet notable du milieu de culture a également été constaté. Plusieurs échantillons du groupe contrôle présentaient des diminutions locales de l'expression des protéines. Cela est probablement dû à un problème de diffusion du milieu de culture à travers l'échantillon cylindrique. Une attention particulière devrait être portée à cette difficulté lors d'expériences futures. Il serait intéressant d'élaborer une

procédure semi-quantitative pour l'analyse des images issues des essais d'immunohistochimie. De telles techniques basées sur l'intensité du marquage existent déjà et permettent d'ajouter rigueur et signifiante aux résultats [128; 129].

La quantification de l'ARNm peut se faire par des analyses RT-qPCR. L'extraction de l'ARN se fait fréquemment à partir d'échantillon fraîchement sacrifiés et disséqués, mais plus rarement suite à une culture *in vitro* prolongée comme dans ce projet pour lequel les échantillons étaient placés en culture avec ou sans chargement pour une période de 48h. Dans l'ensemble des démarches expérimentales, de nombreuses étapes auraient pu entraîner une contamination ou une dégradation de l'ARN. Pour compléter d'éventuelles analyses RT-qPCR, il serait primordial de veiller à minimiser les possibilités de dégradation de l'ARN dans l'ensemble du processus des expérimentations. Aucune analyse RT-qPCR n'a pu être complétée dans le cadre de cette étude, mais les méthodes d'extraction d'ARN pour des explants de plaques de croissance ont grandement été améliorées. Il existe aussi des méthodes pour caractériser de manière semi-quantitative l'expression des ARNm, l'hybridation *in situ* (ISH) permettrait par exemple de localiser les molécules d'ARNm dans les tissus. Il a déjà été démontré par hybridation *in situ* qu'une compression statique *in vitro* de courte durée a engendré une réduction de l'expression de l'ARNm du collagène de type II et X à travers la plaque de croissance caudale de rat [118].

Dans les échantillons de culture, les zones proliférative et hypertrophique étaient souvent gonflées radialement par rapport à la zone de réserve. Cette différence pourrait être expliquée par la perméabilité quatre fois supérieure de ces deux zones par rapport à celle de la zone de réserve [130]. Un phénomène similaire, mais dans la direction axiale, a été observé avec des explants de cartilage articulaire soumis à une compression dynamique [131]. Pour contrer à ce gonflement axial des explants, les auteurs suggèrent qu'une faible force statique soit appliquée sur les échantillons du groupe contrôle afin de contrer l'effet de gonflement dans la direction de croissance [131].

La présente étude inclut certaines limites techniques. L'utilisation d'un modèle expérimental *in vitro* en opposition à une approche *in vivo* constitue une limite de cette étude. Elle fournit toutefois des indications pertinentes sur les effets différentiels des charges statiques et dynamiques, qui ont été finement contrôlées de manière à obtenir des charges équivalentes en termes de déformation moyenne. L'étude étant limitée à un seul modèle animal, il est aussi

important d'être précautionneux lors de l'interprétation des résultats et de la généralisation des conclusions. Malgré cela, les résultats fournissent certainement une justification scientifique pour le développement de nouvelles stratégies pour le traitement des déformations musculosquelettiques progressives basées sur l'utilisation de charges dynamiques.

Les essais mécaniques ont été réalisés avec des paramètres de chargement limités à une seule amplitude et une seule fréquence de chargement. Avec des essais mécaniques supplémentaires, il pourrait être intéressant d'investiguer l'effet de l'amplitude et de la fréquence de chargement sur la mécanobiologie de la plaque de croissance. Le temps de chargement pourrait également être varié et cela permettrait d'évaluer la prolifération cellulaire. La viabilité cellulaire *in vitro* étant toutefois limitée, une étude *in vivo* serait plus appropriée pour effectuer de telles mesures. L'appareil de micro-charge et le montage expérimental utilisés ne permettaient que d'effectuer un seul essai mécanique à la fois. Il pourrait être plus efficace de concevoir une chambre de test qui permettrait le chargement de plusieurs échantillons simultanément. Puisque les échantillons n'ont pas toute la même épaisseur et que les chargements sont contrôlés en déplacement, un tel dispositif apparaît toutefois difficile à développer.

Bien que des tendances générales aient été observées, la difficulté de démontrer des différences statistiques est peut-être attribuable à la taille limitée de l'échantillonnage. Les tests paramétriques statistiques assument généralement une distribution normale de la population et les tests non-paramétriques sont habituellement moins rigoureux que les tests paramétriques. Les données aberrantes peuvent aussi fausser les données. Dans le cadre de la présente étude, les deux types de tests statistiques (paramétriques et non-paramétriques) ont mené à des résultats similaires. Un échantillonnage plus étendu permettrait possiblement de contrer ces lacunes et ajouterait de la rigueur aux résultats.

Les résultats de l'étude guideront aussi l'élaboration d'une étude *in vivo* plus extensive visant à comparer les effets de chargements statique et dynamique sur les plaques de croissance caudales de rats. Cette étude considérera intrinsèquement les mécanismes qui régulent et gouvernent la croissance longitudinale des os, tels que les facteurs de croissance, les hormones, les nutriments et la génétique. Dans ce projet, des analyses histomorphométriques et immunohistochimiques seront combinées à des essais d'hybridation *in situ* et des mesures du

taux de croissance, ce qui permettra de démontrer plus concrètement le potentiel de modulation de croissance des charges dynamiques versus les charges statiques.

CONCLUSION

Le développement de protocoles, d'un montage expérimental et d'une méthodologie de recherche a permis de répondre à l'hypothèse de recherche et de rencontrer les objectifs du projet. Des essais mécaniques ont été réalisés sur des explants de plaque de croissance porcines appartenant à quatre groupes d'étude distincts, soit les groupes baseline, contrôle, chargement statique et chargement dynamique équivalent. Pour chacun de ses groupes, l'histomorphométrie de la plaque de croissance a été caractérisée à l'aide de procédures rigoureuses de prise de mesures et les modes d'expression de l'aggrécane, du collagène de type II, collagène de type X et du MMP13 ont été investigués par des techniques d'immunohistochimie. Enfin, une étude comparative a été menée afin d'analyser les effets différentiels du chargement statique versus dynamique sur la mécanobiologie de la plaque de croissance.

Il a été montré que la compression statique engendre une diminution importante du ratio combiné des zones proliférative et hypertrophique par rapport à l'épaisseur totale de la plaque de croissance. Dans le cas des échantillons chargés dynamiquement, ce ratio était conservé lorsque comparé aux échantillons contrôle. Une désorganisation importante des colonnes de chondrocytes a été observée dans les zones proliférative et hypertrophique des échantillons chargés dynamiquement alors que l'organisation structurale des chondrocytes était conservé dans les échantillons chargés statiquement. Cette perturbation de l'arrangement colonnaire dans les échantillons chargés dynamiquement pourrait vraisemblablement être reliée à une augmentation de la prolifération cellulaire, qui aurait forcé l'accommodement de matériel ajouté cellulaire et/ou extracellulaire dans la zone proliférative.

Une réduction de l'expression de l'aggrécane, du collagène de type II et du collagène de type X a été observée suite au chargement statique. En revanche, la compression dynamique a contribué à la synthèse de l'aggrécane et du collagène de type II dans la matrice extracellulaire de la plaque de croissance.

L'hypothèse de recherche, selon laquelle des chargements statiques et cycliques équivalents entraînent des changements distincts dans l'histomorphométrie de la plaque de croissance et dans les modes d'expression de protéines de sa matrice extracellulaire, est donc confirmée. En effet, il est évident que le type de chargement joue un rôle important dans la

réponse mécanobiologique des plaques de croissance et que le processus de croissance longitudinale est affecté différemment par une compression statique ou dynamique.

Les principales limites du projet résident dans l'utilisation d'un modèle expérimental *in vitro* et dans la taille limitée de l'échantillonnage. En contrepartie, cette étude est la première à compléter une analyse comparative normalisée qui fournit des indications pertinentes sur les effets différentiels des charges statiques et dynamiques équivalentes en terme de déformation moyenne.

Les connaissances découlant de cette étude, jumelées aux résultats d'autres études mécanobiologiques de la plaque de croissance, permettront de mieux comprendre le processus de modulation mécanique de croissance et de fournir une justification objective aux traitements non invasifs ou chirurgicaux des déformations musculosquelettiques progressives.

Considérant la complexité du projet ainsi que son caractère multidisciplinaire, certaines recommandations et avenues futures pourraient faire l'objet d'éventuels travaux:

- Élaborer une procédure semi-quantitative pour l'analyse des images issues des essais d'immunohistochimie. De telles techniques basées sur l'intensité du marquage existent déjà et permettent d'ajouter rigueur et signifiante aux résultats;
- Augmenter la taille de l'échantillonnage de chacun des groupes d'études;
- Réaliser d'autres essais mécaniques pour investiguer les effets de l'amplitude et de la fréquence de chargement;
- Étudier d'autres stades développemental du même modèle animal pour vérifier si les tendances demeurent inchangées avec l'évolution de la croissance;
- Finalement, la réalisation d'une étude *in vivo* permettrait entre autres de mesurer la prolifération cellulaire, l'hypertrophie des chondrocytes ainsi que le taux de croissance. Le potentiel de modulation de croissance des charges dynamiques versus les charges statiques pourrait être démontré concrètement.

La modulation mécanique de la croissance est d'un intérêt grandissant dans le développement et l'amélioration des approches minimalement invasives qui visent la modulation de la croissance de manière locale tout en préservant la croissance naturelle des os, les fonctions des différents segments osseux et la mobilité. Bien que plusieurs approches préconisées en

orthopédie pédiatrique soient basées sur la modulation de la croissance, les paramètres de chargement optimaux, permettant un meilleur contrôle sur la modulation de la croissance, ne sont pas clairement définis. Les résultats de la présente étude révèlent que les charges dynamiques préserve la composition de la plaque de croissance en plus de maintenir le ratio des zones proliférative et hypertrophique par rapport à l'épaisseur totale de la plaque de croissance. Pour ces raisons, et considérant que la matrice extracellulaire ainsi que la prolifération et l'hypertrophie des chondrocytes sont étroitement liées au processus de croissance longitudinale, il semble plus probable que la croissance reprenne normalement après un traitement orthopédique de modulation de croissance impliquant des charges dynamiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wang, X, Mao, JJ. 2002. Chondrocyte proliferation of the cranial base cartilage upon in vivo mechanical stresses. *J Dent Res* 81: 701-705.
2. Alberty, A, Peltonen, J, Ritsila, V. 1993. Effects of distraction and compression on proliferation of growth plate chondrocytes. A study in rabbits. *Acta Orthop Scand* 64: 449-455.
3. Akyuz, E, Braun, JT, Brown, NAT, Bachus, KN. 2006. Static versus dynamic loading in the mechanical modulation of vertebral growth. *SPINE* 31: E952-958.
4. Apte, S, Kenwright, J. 1994. Physeal distraction and cell proliferation in the growth plate. *J Bone Joint Surg Br* 76: 837-843.
5. Bonnel, F, Dimeglio, A, Baldet, P, Rabischong, P. 1984. Biomechanical activity of the growth plate. Clinical incidences. *Anat Clin* 6: 53-61.
6. Farnum, CE, Nixon, A, Lee, AO, et al. 2000. Quantitative three-dimensional analysis of chondrocytic kinetic responses to short-term stapling of the rat proximal tibial growth plate. *Cells Tissues Organs* 167: 247-258.
7. Robling, AG, Duijvelaar, KM, Geevers, JV, et al. 2001. Modulation of appositional and longitudinal bone growth in the rat ulna by applied static and dynamic force. *Bone* 29: 105-113.
8. Stokes, IAF, Aronsson, DD, Dimock, AN, et al. 2006. Endochondral growth in growth plates of three species at two anatomical locations modulated by mechanical compression and tension. *J Orthop Res* 24: 1327-1334.
9. Stokes, IAF, Mente, PL, Iatridis, JC, et al. 2002. Enlargement of growth plate chondrocytes modulated by sustained mechanical loading. *J Bone Joint Surg Am* 84-A: 1842-1848.
10. Taylor, JF, Warrell, E, Evans, RA. 1987. Response of the growth plates to tibial osteotomy in rats. *J Bone Joint Surg Br* 69: 664-669.
11. Wang, X, Mao, JJ. 2002. Accelerated chondrogenesis of the rabbit cranial base growth plate by oscillatory mechanical stimuli. *J Bone Miner Res* 17: 1843-1850.

12. Frost, HM. 1990. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 3. The hyaline cartilage modeling problem. *Anat Rec* 226: 423-432.
13. LeVeau, BF, Bernhardt, DB. 1984. Developmental biomechanics. Effect of forces on the growth, development, and maintenance of the human body. *Phys Ther* 64: 1874-1882.
14. Breur, GJ, VanEnkevort, BA, Farnum, CE, Wilsman, NJ. 1991. Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. *J Orthop Res* 9: 348-359.
15. Buckwalter, JA, Mower, D, Schafer, J, et al. 1985. Growth-plate-chondrocyte profiles and their orientation. *J Bone Joint Surg Am* 67: 942-955.
16. Alvarez, J, Balbín, M, Santos, F, et al. 2000. Different bone growth rates are associated with changes in the expression pattern of types II and X collagens and collagenase 3 in proximal growth plates of the rat tibia. *J Bone Miner Res* 15: 82-94.
17. Hunziker, E, Schenk, RK. 1989. Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *J Physiol* 414: 55-71.
18. Cowin, SC. 1989. Bone Mechanics. In. Boca Raton, Florida: CRC Press, p. 313.
19. Watkins, J. 2009. Structure and Function of the Musculoskeletal System. Human Kinetics, Champaign, IL.
20. Nigg, BM, Herzog, W. 1999. Biomechanics of the Musculo-skeletal System. John Wiley & Sons Canada, Ltd.
21. Nather, A, Ong, H, Aziz, Z. 2005. Structure of Bone In, Bone Grafts and Bone Substitutes: Basic Science and Clinical Applications, pp. 3-17.
22. Marieb, EN, Hoehn, K. 2006. Human Anatomy & Physiology. Benjamin Cummings.
23. Niehoff, A, Kersting, UG, Zaucke, F, et al. 2004. Adaptation of mechanical, morphological, and biochemical properties of the rat growth plate to dose-dependent voluntary exercise. *Bone* 35: 899-908.
24. Mow, VC, Lai, WM. 1974. Some surface characteristics of articular cartilage. I. A scanning electron microscopy study and a theoretical model for the dynamic interaction of synovial fluid and articular cartilage. *J Biomech* 7: 449-456.

25. Wilson, W, van Donkelaar, CC, van Rietbergen, R, Huiskes, R. 2005. The role of computational models in the search for the mechanical behavior and damage mechanisms of articular cartilage. *Medical engineering & physics* 27: 810-826.
26. Minns, RJ, Steven, FS. 1977. The collagen fibril organization in human articular cartilage. *J Anat* 123: 437-457.
27. Bayliss, MT, Venn, M, Maroudas, A, Ali, SY. 1983. Structure of proteoglycans from different layers of human articular cartilage. *Biochem J* 209: 387-400.
28. Mitrovic, D, Ryckewaert, A. 1978. [Structure and biology of articular cartilage in the adult]. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 45: 535-540.
29. Sandell, LJ, Sugai, JV, Trippel, SB. 1994. Expression of collagens I, II, X, and XI and aggrecan mRNAs by bovine growth plate chondrocytes in situ. *J Orthop Res* 12: 1-14.
30. Poole, AR, Matsui, Y, Hinek, A, Lee, ER. 1989. Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix. *Anat Rec* 224: 167-179.
31. Radhakrishnan, P, Lewis, N, Mao, JJ. 2004. Zone-specific micromechanical properties of the extracellular matrices of growth plate cartilage. *Ann Biomed Eng* 32: 284-291.
32. Villemure, I, Cloutier, L, Matyas, JR, Duncan, N. 2007. Non-uniform strain distribution within rat cartilaginous growth plate under uniaxial compression. *J Biomech* 40: 149-156.
33. Robertson, WW. 1990. Newest knowledge of the growth plate. *Clin Orthop Relat Res*: 270-278.
34. Mwale, F, Tchetina, E, Wu, CW, Poole, AR. 2002. The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. *J Bone Miner Res* 17: 275-283.
35. Mao, JJ, Nah, H-D. 2004. Growth and development: hereditary and mechanical modulations. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 125: 676-689.
36. Sundaramurthy, S, Mao, JJ. 2006. Modulation of endochondral development of the distal femoral condyle by mechanical loading. *J Orthop Res* 24: 229-241.

37. Ballock, RT, O'Keefe, RJ. 2003. The biology of the growth plate. *J Bone Joint Surg Am* 85-A: 715-726.
38. Kirsch, T, Harrison, G, Golub, EE, Nah, H-D. 2000. The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *J Biol Chem* 275: 35577-35583.
39. Gibson, GJ, Flint, MH. 1985. Type X collagen synthesis by chick sternal cartilage and its relationship to endochondral development. *J Cell Biol* 101: 277-284.
40. van der Eerden, BC, Karperien, M, Wit, JM. 2003. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr Rev* 24: 782-801.
41. Takahashi, I, Onodera, K, Bae, J-W, et al. 2005. Age-related changes in the expression of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in mandibular condylar, growth plate, and articular cartilage in rats. *J Mol Histol* 36: 355-366.
42. Knauper, V, Will, H, Lopez-Otin, C, et al. 1996. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 271: 17124-17131.
43. Mitchell, P, Magna, H, Reeves, L, et al. 1996. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 97: 761-768.
44. Stickens, D, Behonick, DJ, Ortega, N, et al. 2004. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* 131: 5883-5895.
45. Keeling, J, Herrera, G. 2008. Human matrix metalloproteinases: characteristics and pathologic role in altering mesangial homeostasis. *Microsc Res Tech* 71: 371-379.
46. Abbaszade, I, Liu, RQ, Yang, F, et al. 1999. Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *J Biol Chem* 274: 23443-23450.

47. Tortorella, MD, Pratta, MA, Liu, RQ, et al. 2000. The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J Biol Chem* 275: 25791-25797.
48. Wilsman, NJ, Farnum, CE, Green, EM, et al. 1996. Cell cycle analysis of proliferative zone chondrocytes in growth plates elongating at different rates. *J Orthop Res* 14: 562-572.
49. Farnum, CE, Wilsman, NJ, Buckwalter, JA, et al. 1998. Growth Plate Cellular Function. In, *Skeletal Growth and Development*, pp. 203-243.
50. Buckwalter, JA, Mower, D, Ungar, R, et al. 1986. Morphometric analysis of chondrocyte hypertrophy. *J Bone Joint Surg Am* 68: 243-255.
51. Hunziker, EB. 1994. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech* 28: 505-519.
52. Abad, V, Meyers, JL, Weise, M, et al. 2002. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* 143: 1851-1857.
53. Fujii, T, Takai, S, Arai, Y, et al. 2000. Microstructural properties of the distal growth plate of the rabbit radius and ulna: biomechanical, biochemical, and morphological studies. *J Orthop Res* 18: 87-93.
54. Horton, WA, Machado, MM. 1988. Extracellular matrix alterations during endochondral ossification in humans. *J Orthop Res* 6: 793-803.
55. Farnum, CE, Lee, R, O'Hara, K, Urban, JPG. 2002. Volume increase in growth plate chondrocytes during hypertrophy: the contribution of organic osmolytes. *Bone* 30: 574-581.
56. Wilsman, NJ, Farnum, CE, Leiferman, EM, et al. 1996. Differential growth by growth plates as a function of multiple parameters of chondrocytic kinetics. *J Orthop Res* 14: 927-936.
57. van der Eerden, BC, Karperien, M, Gevers, EF, et al. 2000. Expression of Indian hedgehog, parathyroid hormone-related protein, and their receptors in the postnatal

- growth plate of the rat: evidence for a locally acting growth restraining feedback loop after birth. *J Bone Miner Res* 15: 1045-1055.
58. Cowell, H, Hunziker, E, Rosenberg, L. 1987. The role of hypertrophic chondrocytes in endochondral ossification and in the development of secondary centers of ossification. *J Bone Joint Surg Am* 69: 159-161.
 59. Wang, Y, Middleton, F, Horton, JA, et al. 2004. Microarray analysis of proliferative and hypertrophic growth plate zones identifies differentiation markers and signal pathways. *Bone* 35: 1273-1293.
 60. Hunziker, E, Schenk, RK, Cruz-Orive, L. 1987. Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. *J Bone Joint Surg Am* 69: 162-173.
 61. Mitani, H, Takahashi, I, Onodera, K, et al. 2006. Comparison of age-dependent expression of aggrecan and ADAMTSs in mandibular condylar cartilage, tibial growth plate, and articular cartilage in rats. *Histochem Cell Biol* 126: 371-380.
 62. Kuhn, J, DeLacey, JH, Leenelle, EE. 1996. Relationship between bone growth rate and hypertrophic chondrocyte volume in New Zealand white rabbits of varying ages. *J Orthop Res* 14: 706-711.
 63. Villemure, I, Stokes, IAF. 2009. Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding. *J Biomech*.
 64. Gil, H, Lozano, JJ, Alvarez-García, O, et al. 2008. Differential gene expression induced by growth hormone treatment in the uremic rat growth plate. *Growth Horm IGF Res* 18: 353-359.
 65. Wit, JM, Kamp, GA, Rikken, B. 1996. Spontaneous growth and response to growth hormone treatment in children with growth hormone deficiency and idiopathic short stature. *Pediatr Res* 39: 295-302.
 66. Monson, E, Halevy, O, Gertler, A, et al. 1995. Growth hormone inhibits differentiation of avian epiphyseal growth-plate chondrocytes. *Mol Cell Endocrinol* 114: 35-42.

67. Isaksson, OG, Jansson, JO, Gause, IA. 1982. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 216: 1237-1239.
68. Noonan, KJ, Hunziker, E, Nessler, J, Buckwalter, JA. 1998. Changes in cell, matrix compartment, and fibrillar collagen volumes between growth-plate zones. *J Orthop Res* 16: 500-508.
69. Tanaka, N, Ohno, S, Honda, K, et al. 2005. Cyclic mechanical strain regulates the PTHrP expression in cultured chondrocytes via activation of the Ca²⁺ channel. *J Dent Res* 84: 64-68.
70. Zerath, E, Holy, X, Mouillon, JM, et al. 1997. TGF-beta2 prevents the impaired chondrocyte proliferation induced by unloading in growth plates of young rats. *Life Sci* 61: 2397-2406.
71. Hutchison, MR, Bassett, MH, White, PC. 2007. Insulin-like growth factor-I and fibroblast growth factor, but not growth hormone, affect growth plate chondrocyte proliferation. *Endocrinology* 148: 3122-3130.
72. Iwamoto, M, Shapiro, IM, Yagami, K, et al. 1993. Retinoic acid induces rapid mineralization and expression of mineralization-related genes in chondrocytes. *Exp Cell Res* 207: 413-420.
73. Wang, W, Kirsch, T. 2002. Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization. *J Cell Biol* 157: 1061-1069.
74. Wroblewski, J, Edwall-Arvidsson, C. 1995. Inhibitory effects of basic fibroblast growth factor on chondrocyte differentiation. *J Bone Miner Res* 10: 735-742.
75. Ballock, RT, Heydemann, A, Wakefield, LM, et al. 1993. TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Dev Biol* 158: 414-429.
76. Thorp, BH, Anderson, I, Jakowlew, SB. 1992. Transforming growth factor-beta 1, -beta 2 and -beta 3 in cartilage and bone cells during endochondral ossification in the chick. *Development* 114: 907-911.

77. Yoshida, E, Noshiro, M, Kawamoto, T, et al. 2001. Direct inhibition of Indian hedgehog expression by parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide and up-regulation by retinoic acid in growth plate chondrocyte cultures. *Exp Cell Res* 265: 64-72.
78. O'Keefe, RJ, Loveys, LS, Hicks, DG, et al. 1997. Differential regulation of type-II and type-X collagen synthesis by parathyroid hormone-related protein in chick growth-plate chondrocytes. *J Orthop Res* 15: 162-174.
79. Leach, RM, Richards, MP, Praul, CA, et al. 2007. Investigation of the insulin-like growth factor system in the avian epiphyseal growth plate. *Domest Anim Endocrinol* 33: 143-153.
80. Makower, AM, Wroblewski, J, Pawlowski, A. 1988. Effects of IGF-I, EGF, and FGF on proteoglycans synthesized by fractionated chondrocytes of rat rib growth plate. *Exp Cell Res* 179: 498-506.
81. van der Meulen, M, Huiskes, R. 2002. Why mechanobiology? A survey article. *J Biomech* 35: 401-414.
82. Stokes, IAF, Aronsson, DD, Urban, JPG. 1994. Biomechanical factors influencing progression of angular skeletal deformities during growth. *Eur J Exp Musculoskel Res* 3: 51-60.
83. Mehlman, CT, Araghi, A, Roy, DR. 1997. Hyphenated history: the Hueter-Volkmann law. *Am J Orthop* 26: 798-800.
84. Farnum, CE, Wilsman, NJ, Buckwalter, JA, et al. 1998. Effects of Distraction and Compression on Growth Plate Function. In, *Skeletal Growth and Development*, pp. 517-530.
85. Stokes, IAF, Gwadera, J, Dimock, AN, et al. 2005. Modulation of vertebral and tibial growth by compression loading: diurnal versus full-time loading. *J Orthop Res* 23: 188-195.
86. Ohashi, N, Robling, AG, Burr, DB, Turner, CH. 2002. The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate. *J Bone Miner Res* 17: 284-292.

87. Bonnel, F, Peruchon, E, Baldet, P, et al. 1983. Effects of compression on growth plates in the rabbit. *Acta Orthop Scand* 54: 730-733.
88. Stokes, IAF. 2002. Mechanical effects on skeletal growth. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2: 277-280.
89. Stokes, IAF, Clark, K, Farnum, CE, Aronsson, DD. 2007. Alterations in the growth plate associated with growth modulation by sustained compression or distraction. *Bone* 41: 197-205.
90. Cancel, M, Grimard, G, Crisinel, D, et al. 2008. Effects of in vivo static compressive loading on aggrecan and type II and X collagens in the rat growth plate extracellular matrix. *Bone*.
91. Burwell, RG, Cole, AA, Cook, TA, et al. 1992. Pathogenesis of idiopathic scoliosis. The Nottingham concept. *Acta Orthop Belg* 58 Suppl 1: 33-58.
92. Body Mechanics. Scoliosis: Posturing for Wellness-Scoliosis Screening in Milwaukee. 2010, from <http://www.bmechanics.com/Content/1938>
93. McMaster, MJ, Singh, H. 1999. Natural history of congenital kyphosis and kyphoscoliosis. A study of one hundred and twelve patients. *J Bone Joint Surg Am* 81: 1367-1383.
94. Newman, PH. 1955. Spondylolisthesis, its cause and effect. *Ann R Coll Surg Engl* 16: 305-323.
95. Fredrickson, BE, Baker, D, McHolick, WJ, et al. 1984. The natural history of spondylolysis and spondylolisthesis. *J Bone Joint Surg Am* 66: 699-707.
96. Standaert, CJ, Herring, SA. 2000. Spondylolysis: a critical review. *Br J Sports Med* 34: 415-422.
97. Filler, AG. 2007. *Do You Really Need Back Surgery?: A Surgeon's Guide to Back and Neck Pain and How to Choose Your Treatment*. Oxford University Press, USA.
98. A.D.A.M. (2010). Medical Encyclopedia. from <http://adam.com/index.aspx>
99. Newton, PO, Faro, FD, Farnsworth, CL, et al. 2005. Multilevel spinal growth modulation with an anterolateral flexible tether in an immature bovine model. *SPINE* 30: 2608-2613.

100. Braun, JT, Akyuz, E, Ogilvie, JW, Bachus, KN. 2005. The efficacy and integrity of shape memory alloy staples and bone anchors with ligament tethers in the fusionless treatment of experimental scoliosis. *J Bone Joint Surg Am* 87: 2038-2051.
101. Betz, RR, D'Andrea, LP, Mulcahey, MJ, Chafetz, RS. 2005. Vertebral body stapling procedure for the treatment of scoliosis in the growing child. *Clin Orthop Relat Res*: 55-60.
102. Wall, EJ, Bylski-Austrow, DI, Kolata, RJ, Crawford, AH. 2005. Endoscopic mechanical spinal hemiepiphysiodesis modifies spine growth. *SPINE* 30: 1148-1153.
103. Guille, JT, D'Andrea, LP, Betz, RR. 2007. Fusionless treatment of scoliosis. *Orthop Clin North Am* 38: 541-545, vii.
104. Breur, GJ, Lapierre, MD, Kazmierczak, K, et al. 1997. The domain of hypertrophic chondrocytes in growth plates growing at different rates. *Calcified Tissue Int* 61: 418-425.
105. Reich, A, Jaffe, N, Tong, A, et al. 2005. Weight loading young chicks inhibits bone elongation and promotes growth plate ossification and vascularization. *J Appl Physiol* 98: 2381-2389.
106. Simon, MR. 1978. The effect of dynamic loading on the growth of epiphyseal cartilage in the rat. *Acta Anat (Basel)* 102: 176-183.
107. Bachrach, NM, Valhmu, W, Stazzone, E, et al. 1995. Changes in proteoglycan synthesis of chondrocytes in articular cartilage are associated with the time-dependent changes in their mechanical environment. *J Biomech* 28: 1561-1569.
108. Ehrlich, MG, Mankin, HJ, Treadwell, BV. 1972. Biochemical and physiological events during closure of the stapled distal femoral epiphyseal plate in rats. *J Bone Joint Surg Am* 54: 309-322.
109. Revel, M, Andre-Deshays, C, Roudier, R, et al. 1992. Effects of repetitive strains on vertebral end plates in young rats. *Clin Orthop Relat Res*: 303-309.
110. Othman, H, Thonar, EJ, Mao, JJ. 2007. Modulation of neonatal growth plate development by ex vivo intermittent mechanical stress. *J Biomech* 40: 2686-2693.

111. Basso, N, Heersche, JNM. 2006. Effects of hind limb unloading and reloading on nitric oxide synthase expression and apoptosis of osteocytes and chondrocytes. *Bone* 39: 807-814.
112. Ambion. (2010). Applied Biosystems. The Basics: Northern Analysis, from <http://www.ambion.com/techlib/basics/northern/index.html>
113. Bustin, SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25: 169-193.
114. VanGuilder, HD, Vrana, KE, Freeman, WM. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 44: 619-626.
115. Udvardi, MK, Czechowski, T, Scheible, W-R. 2008. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* 20: 1736-1737.
116. Kubista, M, Andrade, JM, Bengtsson, M, et al. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27: 95-125.
117. Nolan, T, Hands, RE, Bustin, SA. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1: 1559-1582.
118. Villemure, I, Chung, M, Seck, C, et al. 2005. Static compressive loading reduces the mRNA expression of type II and X collagen in rat growth-plate chondrocytes during postnatal growth. *Connect Tissue Res* 46: 211-219.
119. Tang, M, Mao, JJ. 2006. Matrix and gene expression in the rat cranial base growth plate. *Cell Tissue Res* 324: 467-474.
120. Kurien, BT, Scofield, RH. 2006. Western blotting. *Methods* 38: 283-293.
121. Zioudrou, C, Fujii, S, Fruton, JS. 1958. Labeling of Proteins by Isotopic Amino Acids Derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 44: 439-446.
122. Seinsheimer, F, Sledge, CB. 1981. Parameters of longitudinal growth rate in rabbit epiphyseal growth plates. *J Bone Joint Surg Am* 63: 627-630.
123. Nerlich, AG. 2003. Histochemical and Immunohistochemical Staining of Cartilage Sections. In: An, Y.H., Martin, K.L. editors, *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Totowa, New Jersey: Humana Press, pp. 295-313.

124. Ambion. (2008). Applied Biosystems. TRI Reagent solution RNA / DNA / Protein Isolation Reagent Protocol, from <http://www.appliedbiosystems.com>
125. Invitrogen. (2010). Protocol for Isolation of RNA using Trizol Reagent, from <http://www.invitrogen.com>
126. Roche Applied Sciences. (2010). Lab FAQs 3rd edition. from <http://www.roche-applied-science.com>
127. Ambion. (2010). Applied Biosystems. Denaturing Agarose Gel Electrophoresis of RNA, from http://www.ambion.com/techlib/append/supp/rna_gel.html
128. Cregger, M, Berger, AJ, Rimm, DL. 2006. Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression. Arch Pathol Lab Med 130: 1026-1030.
129. Pham, N-A, Morrison, A, Schwock, J, et al. 2007. Quantitative image analysis of immunohistochemical stains using a CMYK color model. Diagnostic pathology 2: 8.
130. Sergerie, K, Lacoursière, M-O, Lévesque, M, Villemure, I. 2009. Mechanical properties of the porcine growth plate and its three zones from unconfined compression tests. J Biomech 42: 510-516.
131. Aufderheide, AC, Athanasiou, KA. 2006. A direct compression stimulator for articular cartilage and meniscal explants. Annals of biomedical engineering 34: 1463-1474.