

<b>Titre:</b>	Étude comparative in vivo de la compression statique et dynamique sur des vertèbres caudales de rat : effets sur le taux de croissance et sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance
<b>Auteur:</b>	Barthélémy Pierre Valteau
<b>Date:</b>	2011
<b>Type:</b>	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
<b>Référence:</b>	Valteau, B. P. (2011). Étude comparative in vivo de la compression statique et dynamique sur des vertèbres caudales de rat : effets sur le taux de croissance et sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <a href="https://publications.polymtl.ca/581/">https://publications.polymtl.ca/581/</a>
<b>Citation:</b>	

## Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/581/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de recherche:** Isabelle Villemure  
Advisors:

**Programme:** Génie biomédical  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE COMPARATIVE *IN VIVO* DE LA COMPRESSION STATIQUE ET  
DYNAMIQUE SUR DES VERTÈBRES CAUDALES DE RAT: EFFETS SUR LE  
TAUX DE CROISSANCE ET SUR L'HISTOMORPHOMÉTRIE DE LA  
PLAQUE DE CROISSANCE

BARTHÉLÉMY PIERRE VALTEAU

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

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

MAI 2011

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

ÉTUDE COMPARATIVE *IN VIVO* DE LA COMPRESSION STATIQUE ET DYNAMIQUE  
SUR DES VERTÈBRES CAUDALES DE RAT: EFFETS SUR LE TAUX DE CROISSANCE  
ET SUR L'HISTOMORPHOMÉTRIE DE LA PLAQUE DE CROISSANCE

présenté par: VALTEAU Barthélémy Pierre

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

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

M. AUBIN Carl-Éric, Ph. D, président

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

M. STOKES Ian A. F., Ph. D, membre

## REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je remercie ma directrice de recherche, Dre Isabelle Villemure, pour m'avoir offert la possibilité de travailler sur ce projet. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour sa rigueur scientifique, sa disponibilité et sa réactivité. Son investissement et ses conseils furent indispensables à l'organisation, l'analyse et la présentation de mes travaux.

Je souhaite aussi exprimer ma gratitude aux Dr Guy Grimard, Dre Florina Moldovan et à Irène Londono pour leur collaboration qui a contribué à la réussite de ce projet.

Je souhaite remercier Souad Rhalmi, Mickael Cademartori, Denise Carrier ainsi que tout le personnel de l'animalerie pour leur aide concernant l'expérimentation avec les animaux. Je remercie aussi Thierry LaFrance, Martin Cousineau et Marc-Olivier Lacoursière pour leur implication dans la conception du protocole expérimental. Également un immense merci à Vinciane Bocquenet pour la programmation du logiciel de prise de mesures.

Enfin, je souhaite remercier tous mes collègues des laboratoires du Dre Villemure (LMP) et du Dre Florina Moldovan (LBMO) pour leur accueil, leur soutien, leur disponibilité, leur gentillesse et leur bonne humeur. Je pense à Samira Amini, Pierre-François Beauchemin, Caroline Bélanger, Annie Bélisle-L'Anglais, Khaled Fendri, Michelle Dion, Gabriel Kaufman, Maria Laitenberger, Anne-Laure Ménard, Fahrad Mortazavi, Kessen Patten, Kim Sergerie, Roxanne Wosu, Yaroslav Wakula et Charlotte Zaouter. J'ai aussi une grande pensée pour tous ceux que j'ai eu la chance de côtoyer à l'Institut de Génie Biomédical, au Département de génie mécanique - section mécanique appliquée de l'École Polytechnique, au sein de l'axe musculosquelettique du CHU Sainte-Justine mais aussi, au cours de mon passage dans cette belle ville de Montréal.

Je n'oublierai pas de remercier mes proches pour leur soutien indéfectible depuis la France. Une pensée particulière à Laure qui m'a accompagné dans cette aventure.

Sans toutes ces personnes, mon intégration au Canada et ces années en études supérieures n'auraient pu être aussi belles, merci infiniment !

## RÉSUMÉ

La croissance longitudinale des os a lieu au droit des plaques de croissance, tissus conjonctifs situés à l'extrémité des os et histologiquement divisés en trois zones (réserve, proliférative et hypertrophique). Alors que les chargements mécaniques sont essentiels pour la croissance normale des os, un chargement excessif peut mener à une croissance anormale. Ce phénomène réfère à la modulation mécanique de la croissance osseuse, impliquée dans la progression de nombreuses déformations musculosquelettiques et dans le développement de nouvelles approches minimalement invasives pour leur traitement. Ces nouvelles techniques sont basées sur la modulation de croissance locale et visent à préserver la croissance et la mobilité segmentaire. De nombreuses études *in vivo* ont investigué la réponse mécanobiologique de la plaque de croissance. Alors que les effets du chargement statique sur la croissance sont bien caractérisés, les études comparant les effets du chargement statique *versus* dynamique sont peu nombreuses et utilisent des chargements non contrôlés, non normalisés ou non équivalents. Ces limites méthodologiques pourraient être la cause des résultats contradictoires reportés dans la littérature. Basé sur nos connaissances, il n'est donc pas possible de déterminer quel type de régime, statique ou dynamique, offre le meilleur potentiel de modulation mécanique de croissance et présente le moins de dommages pour la plaque de croissance. L'objectif de cette étude est de caractériser et comparer les effets d'un chargement *in vivo* en compression statique et dynamique sur le taux de croissance osseuse et sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance dans un modèle animal de rat.

Vingt-quatre rats ont été aléatoirement répartis en quatre groupes: contrôle, sham, statique et dynamique. Aucune manipulation n'a été effectuée sur les rats du groupe contrôle tandis que les rats des autres groupes ont été opérés à l'âge de 28 jours, suite à une période d'acclimatation d'une semaine. Une compression normalisée a été appliquée sur la 7<sup>ème</sup> vertèbre caudale (Cd7), de manière soutenue pour le groupe statique (0,2 MPa - 0,0 Hz) et sinusoïdale (0,2 MPa  $\pm$  30% - 0,1 Hz) pour le groupe dynamique. Afin d'évaluer l'effet de la procédure chirurgicale, le groupe sham a également été opéré mais sans aucune application de charge. Deux injections de calcéine (marqueur de minéralisation active) ont été effectuées, cinq jours et deux jours avant le sacrifice. Les rats ont été euthanasiés à l'âge de 43 jours, après 15 jours d'expérience. Les vertèbres ont été

immédiatement collectées, traitées puis enrobées dans le méthylmétacrylate. Le taux de croissance (mesuré entre les deux fronts de calcéine) et l'histomorphométrie de la plaque de croissance (coloration à la toluidine bleue) ont été mesurés puis comparés dans une étude statistique.

Les résultats démontrent que le chargement dynamique est aussi efficace que le chargement statique en termes de modulation mécanique de croissance. En effet, le taux de croissance de Cd7 a été significativement réduit de 19% pour ces deux régimes de chargement, lorsque comparés au groupe sham. En revanche, le chargement statique altère plus sévèrement l'histomorphométrie de la plaque de croissance comparé au chargement dynamique. En effet, des réductions statistiquement significatives ont été observées dans le groupe statique lorsque comparé au groupe sham pour l'épaisseur de la plaque de croissance (réduction de 14% *versus* 4% dans le groupe dynamique), le nombre de chondrocytes par colonne dans la zone proliférative (réduction de 23% *versus* 8% dans le groupe dynamique) et la hauteur des cellules hypertrophiques (réduction de 19% *versus* 9% dans le groupe dynamique). Des différences statistiquement significatives ont également été observées entre les groupes statique et dynamique pour l'épaisseur de la plaque de croissance et le nombre de chondrocytes par colonne. La différence observée pour la taille des chondrocytes hypertrophique a presque atteint le niveau de significativité.

Les chargements statique et dynamique, équivalents en termes de contrainte moyenne résultante, sont aussi efficaces en termes de modulation mécanique de croissance osseuse. Cette observation suggère que le chargement moyen résultant serait le facteur biomécanique prépondérant dans la modulation mécanique de croissance comparativement aux variations minimale et maximale de compression. Pour la même modulation mécanique de croissance, les chargements statiques causent plus de dommages à l'histomorphométrie de la plaque de croissance que les chargements dynamiques. L'importante réduction observée pour l'épaisseur de la plaque de croissance dans le groupe statique est liée à une diminution substantielle des paramètres histomorphométriques cellulaires associés à la prolifération (nombre de chondrocytes par colonne dans la zone proliférative) et à l'hypertrophie (hauteur des chondrocytes dans la zone hypertrophique), deux processus essentiels à la croissance longitudinale des os. L'impact moins important de la compression dynamique sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance pourrait être attribué à des effets différents du chargement dynamique sur la matrice extracellulaire, dont la

composition, la synthèse et la dégradation jouent un rôle clé dans la prolifération et l'hypertrophie des chondrocytes.

Les limitations de cette étude résident principalement dans l'investigation d'un unique niveau de chargement et d'une unique fréquence. Ces deux paramètres de même que la reprise de croissance après retrait du chargement, l'effet du chargement de jour ou de nuit ou encore les effets sur la biologie de la plaque de croissance pourraient être investigués dans une future étude.

Basé sur nos connaissances, cette étude *in vivo* comparant la compression statique et dynamique est la première utilisant des chargements continus, normalisés, bien contrôlés et équivalents en termes de contrainte moyenne résultante. L'hypothèse de recherche selon laquelle la réponse mécanobiologique de la plaque de croissance dépend du régime de chargement est donc confirmée. En effet, la modulation de croissance dynamique serait aussi efficace mais plus conservatrice que la modulation de croissance statique. Ces résultats s'avèrent prometteurs en termes de modulation de croissance non dommageable utilisant des chargements plus représentatifs des conditions physiologiques (dynamiques) pour le développement de traitements minimalement invasifs des déformations musculosquelettiques pédiatriques.

**Mots clés:** plaque de croissance, compression statique/dynamique *in vivo*, modèle animal de rat, histomorphométrie, taux de croissance, mécanobiologie.

## ABSTRACT

Longitudinal bone growth occurs at the end of bones, in growth plates, a connective tissue histologically divided into three zones (reserve, proliferative and hypertrophic). Loads are essential to normal bone growth, yet, if too elevated, these loads can result in abnormal growth. This phenomenon refers to the mechanical modulation of bone growth and is involved in the progression of several musculoskeletal deformities. This process also plays a key role in the development of new minimally invasive approaches for their treatment. These new techniques locally target the modulation of growth while preserving growth and segment motion. Several *in vivo* studies have examined the mechanobiological response of growth plates. While the effects of static loading are well characterized, the few reported static/dynamic comparative studies are using load parameters which are not well controlled, normalized or matched. These methodological limitations could explain inconsistent results currently reported in the literature. Based on our knowledge, it is not possible to determine which regimen, static or dynamic, provides the best growth modulation potential and the less detrimental effect on the growth plate histomorphometry. The aim of this *in vivo* study is to characterize and compare the effects of static *versus* dynamic compression on the growth rate and on the growth plate histomorphometry using a rat animal model.

Twenty-four rats were randomly divided into four groups: control, sham, static and dynamic. Control rats underwent no manipulation while other rats were operated at 28 days old, following one week of acclimatization. A normalized compression was applied on the seventh caudal vertebra (Cd7). The load was sustained (0.2 MPa, 0.0 Hz) in the static group and sinusoidally oscillating (0.2 MPa  $\pm$  30%, 0.1 Hz) in the dynamic group. To determine the effects of the surgical procedure, sham rats were also operated but no load was applied. All rats were injected with calcein (a mineralizing bone label) five days and two days prior to euthanasia. The rats were euthanized at 43 days old, after a 15-day period. Vertebrae were immediately collected, processed and embedded in methylmetacrylate. The growth rate (measured between the two calcein labels) and the histomorphometry of the growth plate (toluidine blue staining) were evaluated and compared in a statistical study.

Results showed that dynamic loading is as effective as static loading in terms of mechanical modulation of bone growth. Cd7 growth rate was indeed significantly reduced by 19% for both loading regimens when compared to the sham group. However, static loading altered more severely the histomorphometry of the growth plate than dynamic loading. Statistically significant reductions were indeed observed in the static group when compared to the shams for the growth plate thickness (reduction of 14% *versus* 4% in the dynamic group), for the number of proliferative chondrocytes per column (reduction of 23% *versus* 8% in the dynamic group) and for the height of hypertrophic chondrocytes (reduction of 19% *versus* 9% in the dynamic group). Statistically significant differences were also observed between static and dynamic groups for the growth plate thickness and the number of proliferative chondrocyte per column. The difference observed between static and dynamic group for the height of hypertrophic chondrocytes almost reached significance.

Static and dynamic loadings, which are equivalent in terms of average stress, are equally effective in terms of mechanical modulation of bone growth. This finding suggests that average compressive stresses rather than peak compressive stresses would be the active biomechanical factors modulating bone growth. For the same mechanical modulation of bone growth, static loadings are more detrimental in terms of growth plate histomorphometry than dynamic loading. The important reduction observed in the growth plate thickness following static loading is due to reductions in cellular characteristics associated with proliferation (number of chondrocytes per column in the proliferative zone) and hypertrophy (height of hypertrophic chondrocytes), two cellular process strongly involved in the longitudinal bone growth. The less significant impact of dynamic compression on growth plate histomorphometry could be attributed to different dynamic loading effects on the growth plate extracellular matrix whose composition, synthesis and degradation play a key role in chondrocyte proliferation and hypertrophy.

Limitations of this study mainly include the use of one load level and one frequency. These two parameters associated with the potential resumption of normal growth after removal compressive loading, the effects of full-time, day-time or night-time loading as well as the effects of static *versus* dynamic loading on the growth plate biology could be investigated in a future study.

Based on our knowledge, this *in vivo* study comparing static/dynamic loading is the first using continuous, finely controlled, normalized and matched in terms of average stress loading. The

research hypothesis stating that the mechanobiological response of growth plate depends of the loading regimen, static or dynamic, is confirmed. Indeed, dynamic modulation of bone growth would be as effective but less detrimental than static modulation. These results are promising in terms of non detrimental growth modulation with loadings reproducing more physiological conditions (dynamic) for the development of minimally invasive treatment of pediatric musculoskeletal deformities.

**Keywords:** growth plate, *in vivo* static/dynamic compression, rat animal model, histomorphometry, growth rate, mechanobiology

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT .....	VII
TABLE DES MATIÈRES .....	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES FIGURES.....	XIV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	XVIII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE .....	3
1.1    Système musculosquelettique .....	3
1.1.1    Composition et rôle du système musculosquelettique .....	3
1.1.2    Tissus cartilagineux et osseux.....	4
1.2    Du stade embryonnaire au stade adulte: ostéogénèse .....	6
1.2.1    De l'embryon au nourrisson: mécanismes d'ossification .....	6
1.2.2    Plaque de croissance .....	9
1.2.3    De l'enfance à l'adolescence: processus de croissance .....	15
1.2.4    Au stade adulte: phénomène de remodelage.....	19
1.3    Influence de l'environnement mécanique sur la croissance.....	19
1.3.1    Modulation de croissance.....	20
1.3.2    Déformations musculosquelettiques évolutives.....	21
1.4    Études mécanobiologiques de la plaque de croissance .....	24
1.4.1    Effets sur le taux de croissance .....	25

1.4.2	Effets sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance.....	30
1.4.3	Conclusion .....	34
CHAPITRE 2 RATIONNELLE DU PROJET .....		36
2.1	Hypothèse.....	37
2.2	Objectifs principal et spécifiques .....	38
2.3	Organisation du mémoire .....	38
CHAPITRE 3 ARTICLE: IN VIVO DYNAMIC BONE GROWTH MODULATION IS LESS DETRIMENTAL BUT AS EFFECTIVE AS STATIC GROWTH MODULATION.....		40
3.1	Abstract .....	41
3.2	Introduction .....	41
3.3	Materials and methods .....	43
3.3.1	Animal model and mechanical loading.....	43
3.3.2	Pneumatic device, calibration and experimental setup .....	44
3.3.3	Surgical procedure and tissue preparation .....	46
3.3.4	Growth rate and histomorphometry measurement.....	48
3.4	Results .....	51
3.4.1	Similar reduction in Cd7 growth rate following both static and dynamic loadings .....	51
3.4.2	More significant reduction in Cd7 growth plate thickness following static loading compared to dynamic loading .....	53
3.4.3	Similar proportions for the three growth plate zones thicknesses following both static and dynamic loadings .....	53
3.4.4	More significant changes in Cd7 cellular characteristics following static loading compared to dynamic loading .....	55
3.4.5	Correlations between cell characteristics and zone thicknesses .....	55

3.5	Discussion .....	57
3.6	Acknowledgements .....	61
3.7	Références .....	61
<b>CHAPITRE 4 ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES COMPLÉMENTAIRES .....</b>		<b>65</b>
4.1	Composantes de l'étude .....	65
4.1.1	Modèle animal (identification des vertèbres).....	65
4.1.2	Chargement .....	67
4.2	Appareil de microchargement .....	68
4.2.1	Conception .....	68
4.2.2	Calibration.....	70
4.3	Procédure chirurgicale et collecte des résultats.....	71
4.3.1	Guide chirurgical.....	71
4.3.2	Logiciel de mesure .....	72
<b>CHAPITRE 5 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES .....</b>		<b>74</b>
5.1	Études morphologiques .....	74
5.1.1	Poids des animaux.....	74
5.1.2	Caractérisations morphologiques des vertèbres .....	75
5.2	Corrélations supplémentaires .....	76
5.2.1	Paramètres histomorphométriques .....	76
5.2.2	Relation avec le taux de croissance.....	79
<b>CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>		<b>81</b>
<b>CONCLUSION .....</b>		<b>86</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>88</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Rôles des différents composants de la plaque de croissance .....	11
Tableau 1.2: Rôles des différents agents de régulation dans la composition de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance .....	12
Tableau 1.3: Résumé des principales études <i>in vivo</i> sur la modulation mécanique du taux de croissance, classées selon le type de chargement (statique, dynamique, statique/dynamique) et par ordre anti chronologique.....	26
Tableau 1.4: Résumé des principales publications étudiant l'histomorphométrie de la plaque de croissance, classées selon le type de chargement (statique, dynamique, statique/dynamique) et par ordre anti chronologique.....	31
Table 3.1: Growth rate and histomorphological measurements of Cd7 rat growth plates for control, sham, static and dynamic groups (mean value $\pm$ SD).....	51
Table 3.2: Growth rate and histomorphological measurement of Cd5 rat growth plates for control, sham, static and dynamic groups (mean value $\pm$ SD) .....	52
Table 3.3: Growth rate and histomorphological measurement of Cd9 rat growth plates for control, sham, static and dynamic groups (mean value $\pm$ SD) .....	52

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Squelettes axial et appendiculaire, et cartilages du corps humain (adapté de [15]).....	3
Figure 1.2: Structure typique des os longs (adapté de [15]).....	6
Figure 1.3: Mécanisme d'ossification intramembraneuse (adapté de [15]) .....	7
Figure 1.4: Mécanisme d'ossification endochondrale (adapté de [15]) .....	9
Figure 1.5: Section histologique d'une plaque de croissance murine (coloration à la toluidine bleue, grossissement 10X) .....	10
Figure 1.6: Immunohistochimies effectuées sur des coupes histologiques de plaque de croissance murine (adapté de Cancel et al. [3]) .....	15
Figure 1.7: Contribution des zones proliférative et hypertrophique dans la croissance longitudinale des os (adapté de [92]) .....	17
Figure 1.8: Mécanisme de croissance par apposition (adapté de [15]) .....	18
Figure 1.9: Remodelage osseux. A: Loi de Wolff (adapté de [99]). B: Différence entre le bras dominant et non dominant d'un tennisman (adapté de [100]).....	20
Figure 1.10: Déformation 3D de la scoliose idiopathique adolescente .....	21
Figure 1.11: <i>Genu varum/valgum</i> (adapté de www-sante.ujf-grenoble.fr) .....	22
Figure 1.12: Implants de type agrafes. A: Betz et al. [109]. B: Wall et al. [110]. C: Gorman et al. [111]. .....	23
Figure 1.13: Implants de type « ancre-ligament ». A: Newton et al. [113]. B: Braun et al. [112]. .....	24
Figure 1.14: Mesure de croissance par injection de fluorochrome (oxytetracycline, adapté de Breur et al. [72]).....	25

Figure 1.15: Relation entre contrainte appliquée et modulation de croissance pour deux localisations distinctes, différents âges et différentes espèces (Stokes et al. [6]).....	28
Figure 1.16: Exemples de mesure des paramètres histomorphométriques (hauteur des cellules hypertrophiques et épaisseur de la zone hypertrophique, Stokes et al. [9]).....	30
Figure 2.1: Résumé graphique du projet .....	39
Figure 3.1: Experimental setup. (A) Air driven micro-loading device installed on the rat tail. (B) Air pressure control system for two operated rats.....	45
Figure 3.2: Force-voltage relationship resulting from the calibration of two identical devices (mean value $\pm$ SD). Dotted lines show an example of static and dynamic 0.2 MPa loading for a 35-day old rat, for which Cd7 transverse area was evaluated at 4.74 mm <sup>2</sup> .....	46
Figure 3.3: Surgical procedure. (A) Fluoroscopic identification of caudal vertebrae. (B) Surgical guide ensuring centering and perpendicularity of the device with the tail. (C) Post-operative fluoroscopic image showing the pneumatic device ready for loading of Cd7 vertebra.....	47
Figure 3.4 : Growth rate measurements. (A) Labeling of bone growth with calcein. Growth labels, which are marked by yellow lines, correspond to the two calcein injections. Scale bar represents 200 $\mu$ m. (B) Growth rates ( $\mu$ m/day) along the rat tail (for Cd5, Cd7 and Cd9) for the control, sham, static and dynamic groups (mean value $\pm$ SD). a: p < 0.001 compared to control Cd7, b: p < 0.001 compared to sham Cd7. ....	48
Figure 3.5: Growth plate section embedded in MMA and stained with toluidine blue. (A) Evaluation of the total growth plate and zonal thicknesses. Scale bar represents 100 $\mu$ m. (B) Evaluation of the number of chondrocytes per column and the columnar density of chondrocytes in the proliferative zone as well as the height of hypertrophic cells. Scale bar represents 50 $\mu$ m.....	50

Figure 3.6: Histomorphological measurements. (A) Growth plate thickness ( $\mu\text{m}$ ) along the rat tail (for Cd5, Cd7 and Cd9) for the control, sham, static and dynamic groups (mean value $\pm$ SD). a: $p < 0.001$ compared to control Cd7, b: $p < 0.001$ compared to sham Cd7, c: $p < 0.01$ compared to control Cd7, d: $p < 0.01$ compared to static Cd7. (B) Thickness proportion (%) of the reserve (RZ), proliferative (PZ) and hypertrophic (HZ) zones with respect to the complete growth plate.....	54
Figure 3.7: Cellular characterization. (A) Number of proliferative chondrocytes along the rat tail (for Cd5, Cd7 and Cd9) for the control, sham, static and dynamic groups. (B) Height ( $\mu\text{m}$ ) of hypertrophic chondrocytes (mean value $\pm$ SD). a: $p < 0.001$ compared to control Cd7, b: $p < 0.001$ compared to sham Cd7, d: $p < 0.01$ compared to static Cd7, f: $p < 0.01$ compared to control Cd9, g: $p < 0.01$ compared to sham Cd9. (C) Correlation between the number of proliferative cells per column and the proliferative zone thickness. Pearson correlation coefficient = 0.7 ( $p < 0.001$ , $n = 72$ ). (D) Correlation between the hypertrophic cell height and the hypertrophic zone thickness. Pearson correlation coefficient = 0.8 ( $p < 0.001$ , $n = 72$ ). .....	56
Figure 4.1: Vue ventrale d'un pelvis de rat disséqué. ....	65
Figure 4.2: Identification des vertèbres caudales chez le rat. ....	66
Figure 4.3: Évolution du diamètre de Cd7 en fonction de l'âge, chez le rat (adapté de [3])......	67
Figure 4.4: Conception de l'appareil de microchargement. ....	68
Figure 4.5: Dispositif anti-torsion .....	69
Figure 4.6: Dispositif expérimental pour la calibration des appareils de microchargement.....	70
Figure 4.7: Courbe de calibration et vérification post-expérimentale .....	71
Figure 4.8: Conception du guide chirurgical .....	72
Figure 4.9: Modules du logiciel de mesures.....	73

Figure 5.1: Poids des animaux en fonction de l'âge .....	74
Figure 5.2: Vertèbre collectée et nettoyée .....	75
Figure 5.3: Longueur et masse des vertèbres Cd4 à Cd9. ....	75
Figure 5.4: Relations entre l'épaisseur des zones et les caractéristiques cellulaires de la plaque de croissance.....	77
Figure 5.5: Sections histomorphométriques de la plaque de croissance. ....	78
Figure 5.6: Relation entre l'épaisseur totale et les caractéristiques cellulaires de la plaque de croissance.....	79
Figure 5.7: Corrélation entre le taux de croissance et l'épaisseur de la plaque de croissance.....	80

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Les sigles et abréviations utilisés dans ce mémoire ainsi que leur signification sont présentés ci-dessous dans l'ordre alphabétique:

ADAMTS	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin
AIS	Adolescent idiopathic scoliosis
ANOVA	Analysis of variance
bFGF	Basic FGF
BrdU	Bromodioxyuridine
Cdn	N <sup>th</sup> caudal vertebra
CO <sub>2</sub>	Carbon dioxide
FGF	Fibroblast growth factor
GH	Growth hormone
IGF	Insulin like growth factor
IHH	Indian hedgehog
MMP	Metalloproteinase
PTH	Parathyroid hormone
PTHrP	Parathyroid hormone related protein
RA	Retinoic acid
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of MMP

## INTRODUCTION

La croissance longitudinale des os est un processus important en orthopédie pédiatrique. En plus des facteurs hormonaux, nutritionnels ou génétiques, il est cliniquement reconnu que l'environnement mécanique joue un rôle primordial sur la croissance osseuse. Dans les années 1800, la loi d'Hueter-Volkmann est la première à décrire ce phénomène et énonce que des pressions inférieures aux plages physiologiques exacerberaient le taux de croissance tandis que des pressions supérieures le ralentiraient. Cette loi a depuis été confirmée par de nombreuses études expérimentales investiguant l'effet des charges statiques en compression [1-9]. La modulation mécanique de la croissance osseuse est impliquée dans la progression de nombreuses déformations musculosquelettiques chez l'enfant ou l'adolescent. Ces déformations sont souvent évolutives, une déformation angulaire entraînant dans un « cercle vicieux » une asymétrie de contraintes, une asymétrie de croissance et donc une aggravation de la déformation angulaire initiale [2]. La scoliose idiopathique chez l'adolescent ou encore le *genu varum/valgum* en sont des exemples [2, 10]. La modulation mécanique de croissance est aussi exploitée dans de nouvelles approches minimalement invasives pour le traitement de ces déformations. Ces approches sont basées sur la modulation de croissance locale qui préserve la croissance et la mobilité segmentaire. Le régime de chargement optimal, statique ou dynamique, reste cependant à déterminer. Alors que l'effet des charges statiques est clairement reporté dans la littérature, les études portant sur l'effet des charges dynamiques sont peu nombreuses, rapportent des résultats contradictoires et présentent certaines limites méthodologiques, les chargements n'étant pas normalisés, bien contrôlés ou équivalents en termes de chargement moyen résultant [1, 5, 11, 12].

La croissance longitudinale des os, qualifiée de « croissance en bout », s'opère au droit des plaques de croissance. La plaque de croissance est un tissu conjonctif (cartilagineux) composé de cellules (chondrocytes) enrobées dans une matrice extracellulaire hautement hydratée. Elle est histologiquement divisée en trois zones: la zone de réserve, la zone proliférative et la zone hypertrophique. La croissance longitudinale des os résulte d'un processus spatio-temporel synchronisé dans lequel la différentiation des chondrocytes joue un rôle central. Cette différentiation s'effectue dans chacune des trois zones possédant une structure cellulaire et une composition extracellulaire spécifiques. Plus précisément, la croissance longitudinale résulte

d'une interrelation complexe entre division cellulaire dans la zone proliférative (où les cellules sont plates et organisées en colonnes), expansion cellulaire dans la zone hypertrophique (où les cellules effectuent leur différentiation terminale) et synthèse de matrice extracellulaire [13, 14].

L'objectif de ce projet est de caractériser *in vivo* les effets des chargements en compression statique et dynamique sur le taux de croissance et sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance dans un modèle animal de rat. Afin de comparer leur potentiel respectif de modulation mécanique de croissance, les chargements statique et dynamique utilisés sont finement contrôlés, normalisés et équivalents en termes de contrainte moyenne. Cet objectif peut être séparé en plusieurs objectifs spécifiques incluant le développement et la conception de tous les éléments du protocole expérimental, la réalisation de l'étude sur quatre groupes de rats (contrôle, sham, statique et dynamique), la mesure du taux de croissance et des paramètres histomorphométriques de la plaque de croissance puis la réalisation d'une analyse statistique comparative.

Ce mémoire par article est divisé en six chapitres. Le Chapitre 1 effectue une revue critique de la littérature; des généralités sur le système musculosquelettique et sur les processus d'ossification y sont apportées. Cette revue des connaissances détaille aussi la composition de la plaque de croissance et son rôle dans le processus de croissance longitudinale des os. Enfin, les différentes études portant sur la mécanobiologie de la plaque de croissance y sont synthétisées. Le Chapitre 2 énonce les questions de recherche qui ont mené à la réalisation de cette étude. En présentant l'hypothèse de recherche et les objectifs du projet, ce chapitre se veut une introduction à l'article scientifique. Cet article est le corps du mémoire, il est présenté dans le Chapitre 3. Le Chapitre 4 et le Chapitre 5 apportent respectivement des éléments de méthodes et des résultats complémentaires, non présentés dans l'article. Une discussion générale (Chapitre 6) et une conclusion, incluant des recommandations pour des travaux futurs, viennent compléter ce mémoire.

## CHAPITRE 1 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

### 1.1 Système musculosquelettique

#### 1.1.1 Composition et rôle du système musculosquelettique

Les principales composantes du système musculosquelettique sont les os, les cartilages, les ligaments, les muscles et les tendons. Au nombre de 206, les os sont répartis sur le squelette axial, composé de la tête et du tronc et sur le squelette appendiculaire, composé des épaules, des hanches et des membres (Figure 1.1). Les ligaments permettent la liaison des os au droit des articulations dont la bonne mobilité est assurée par le cartilage hyalin. D'autres types de cartilage existent (Figure 1.1); ils sont détaillés dans la partie 1.1.2.1. Le système musculosquelettique est le support indispensable du corps humain, mais il est aussi responsable des mouvements générés par la contraction des muscles. Cette mobilité est possible grâce à la transmission des efforts musculaires aux os par les tendons [15]. La partie 1.1.2 détaille la composition et le rôle des os et du cartilage, deux composants importants du système musculosquelettique et étroitement reliés à ce projet.

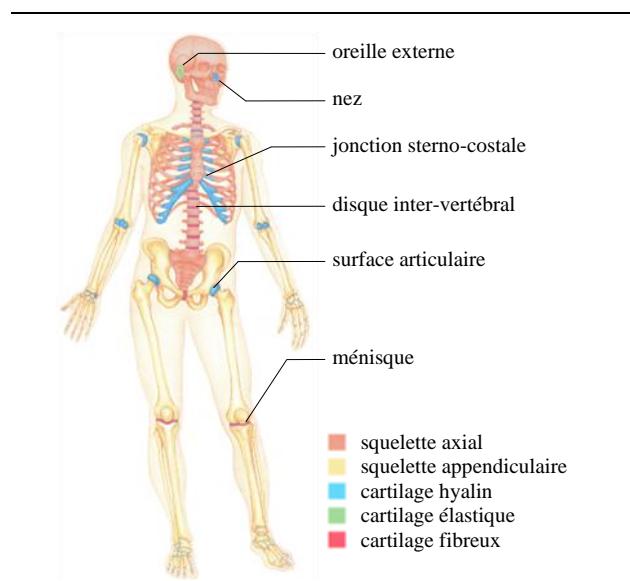


Figure 1.1: Squelettes axial et appendiculaire, et cartilages du corps humain (adapté de [15])

## 1.1.2 Tissus cartilagineux et osseux

Au cours de la gestation, le fœtus est initialement composé de cartilage et de tissus fibreux. Tel qu'expliqué dans la partie 1.2, c'est à partir de ces tissus que les os sont formés et de cette ossification ne subsisteront que quelques vestiges de cartilage, dans les endroits du corps où la souplesse est de mise [15]. Les différents cartilages et les os qui composent le système musculosquelettique sont décrits dans les deux parties suivantes.

### 1.1.2.1 Cartilage

Non innervé et non vascularisé, le cartilage est un tissu conjonctif composé de chondrocytes dans une matrice extracellulaire fortement hydratée [15]. Le passage des nutriments s'effectue par un mécanisme de diffusion à partir du périchondre, membrane vascularisée qui entoure le cartilage [15]. Les tissus cartilagineux peuvent être de trois types: le cartilage hyalin, le cartilage élastique et le cartilage fibreux.

#### *Cartilage hyalin*

Le cartilage hyalin est le type de cartilage le plus répandu du corps humain. Il est formé de chondrocytes sphériques entourés de nombreuses et fines fibres de collagène qui lui confèrent une bonne fermeté associée à une certaine flexibilité. Idéal pour dissiper les sollicitations au droit des articulations, ce type de cartilage recouvre les surfaces en contact à l'extrémité des os [15]. Il compose aussi la structure du nez, des voies respiratoires (larynx, trachée) et assure les jonctions sterno-costales (Figure 1.1). Enfin, tel que discuté dans la partie 1.2.1.1, le cartilage hyalin persiste chez l'enfant à l'extrémité des os et forme une zone de croissance active nécessaire à l'expansion longitudinale. Il est alors appelé cartilage épiphysaire, cartilage de conjugaison ou encore plaque de croissance. Ce tissu constitue le point central de ce projet et sera étudié en détails dans la suite de ce chapitre.

#### *Cartilage élastique*

Histologiquement similaire au cartilage hyalin, le cartilage élastique est composé toutefois d'un plus grand nombre de fibres d'élastine. Cette composition lui confère une très grande capacité de déformation [15]. Il compose la structure de l'oreille externe (Figure 1.1) et de l'épiglotte.

### *Cartilage fibreux (ou fibrocartilage)*

Composé d'une alternance de rangées de chondrocytes et d'épaisses fibres de collagène orientées selon les directions de sollicitations, le cartilage fibreux constitue la parfaite transition entre le cartilage hyalin et les tissus conjonctifs plus réguliers et plus denses comme les ligaments ou les tendons [15]. Il se trouve donc au niveau des transitions os-ligament et os-tendon. Très résistant à la compression et à la tension, il compose aussi la structure des disques intervertébraux et des ménisques (Figure 1.1). Les disques intervertébraux permettent l'articulation des vertèbres entre elles tandis que les ménisques jouent un rôle d'amortisseur au niveau du genou, en dissipant les chocs subis par le corps humain lors d'activités comme la course à pied.

#### **1.1.2.2 Os**

Ils peuvent être de quatre différentes formes: plats comme les omoplates, longs comme les fémurs, courts comme les os du poignet ou encore irréguliers comme les vertèbres [15]. En plus de jouer un rôle clef dans le soutien et la mise en mouvement du système musculosquelettique, ils ont pour fonction de protéger les organes vitaux (boîte crânienne pour le cerveau, cage thoracique pour le cœur et les poumons, colonne vertébrale pour la moelle épinière), d'emmagasinier les lipides et les minéraux et sont responsables de la formation des cellules sanguines [15]. Malgré leur apparence inerte, les os sont des tissus très vivants possédant une structure typique. Cette structure est décrite en détails pour les os longs dans la Figure 1.2.

Les os possèdent au droit des épiphyses et métaphyses une structure peu dense, en « nid d'abeille », appelée os spongieux ou os trabéculaire. L'os spongieux est dans les os plats ainsi que dans les épiphyses (têtes des os longs) le siège de la moelle rouge, responsable de la formation des cellules sanguines (hématopoïèse). La moelle jaune est quant à elle une importante réserve de lipides siégeant dans le canal médullaire au centre de la diaphyse (corps des os longs). Cette cavité médullaire est recouverte d'une membrane fibreuse: l'endoste. Sur sa partie externe, l'os est entouré d'os cortical, une structure très compacte composé d'ostéons et recouverte elle aussi d'une membrane fibreuse appelée périoste. Tel que détaillé dans la partie 1.2.4, la matrice osseuse est sans cesse remodelée par le travail antagoniste des ostéoclastes, qui résorbent la matrice, et des ostéoblastes, qui la synthétisent [15]. Une fois entourés de matrice osseuse, les ostéoblastes se transforment en cellules quiescentes appelées ostéocytes (Figure 1.2).

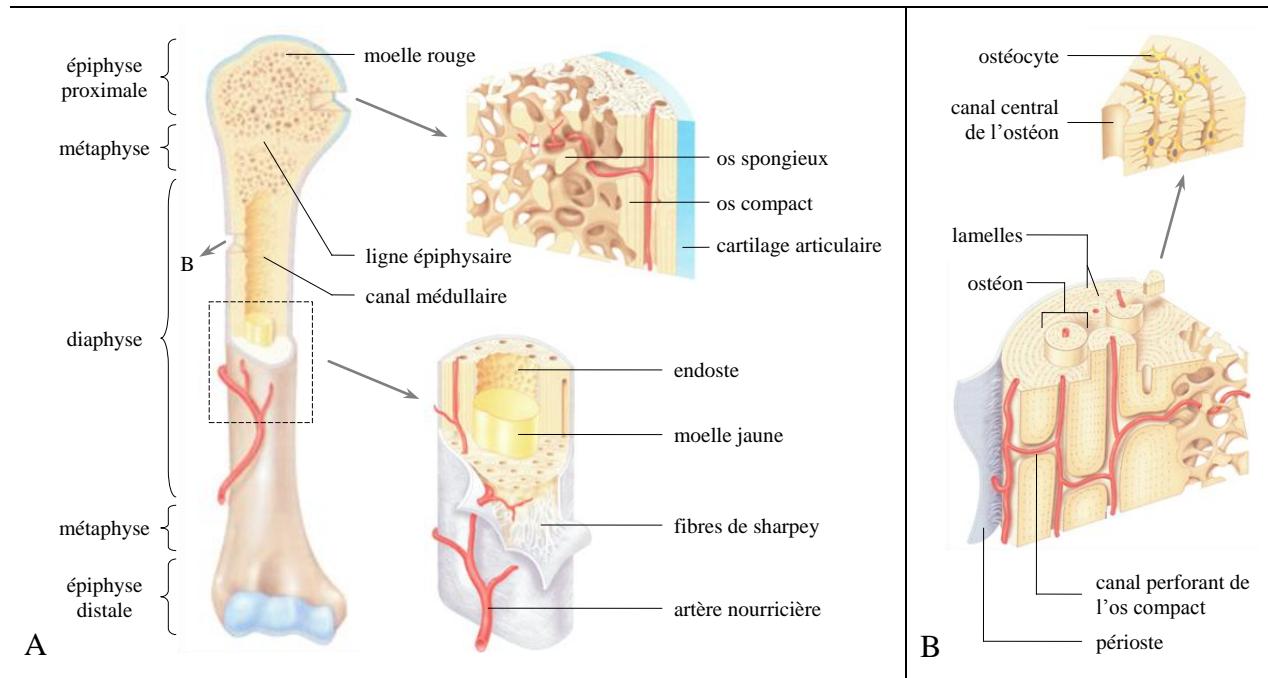


Figure 1.2: Structure typique des os longs (adapté de [15])

## 1.2 Du stade embryonnaire au stade adulte: ostéogénèse

L'ostéogénèse désigne la formation du tissu osseux. Elle est détaillée dans cette partie en considérant les mécanismes de formation prénataux, les mécanismes de croissance postnataux ainsi que les mécanismes de renouvellement au stade adulte.

### 1.2.1 De l'embryon au nourrisson: mécanismes d'ossification

Comme mentionné précédemment, jusqu'à la huitième semaine de gestation, le squelette fœtal est uniquement composé de cartilage hyalin et de tissus fibreux. Une grande partie de ces tissus est progressivement remplacée par les tissus osseux en suivant deux mécanismes d'ossification décrits dans la suite de cette section: l'ossification intramembraneuse et l'ossification endochondrale [15].

#### 1.2.1.1 Ossification intramembraneuse

Initiée aux environs de la huitième semaine à partir de tissus fibreux, l'ossification intramembraneuse s'opère dans les os du crâne, les maxillaires supérieurs ainsi que les clavicules.

Ces os sont donc appelés « os intramembraneux ». Le processus suit un déroulement en quatre étapes (Figure 1.3) [15]:

- 1) Des points d'ossification, résultant de la différentiation de cellules mésenchymateuses en ostéoblastes, apparaissent à l'intérieur de la membrane de tissus fibreux..
- 2) La matrice osseuse est sécrétée autour de ces points d'ossification fusionnés. Tel que mentionné précédemment, les ostéoblastes enfermés deviennent des ostéocytes.
- 3) Des travées d'os fibreux (futur os spongieux) sont formées autour des vaisseaux sanguins irrégulièrement ramifiés. Des cellules mésenchymateuses s'associent à la surface pour former le périoste.
- 4) Une gaine osseuse est formée et sera plus tard remplacée par de l'os compact; elle résulte de l'épaississement des travées situées sous le périoste. La moelle rouge apparaît au sein des travées de l'os spongieux.

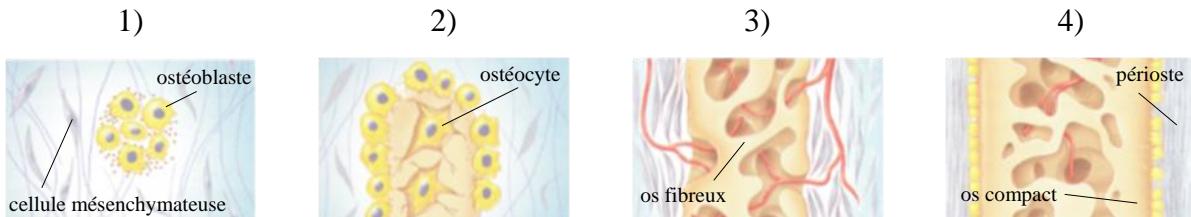


Figure 1.3: Mécanisme d'ossification intramembraneuse (adapté de [15])

---

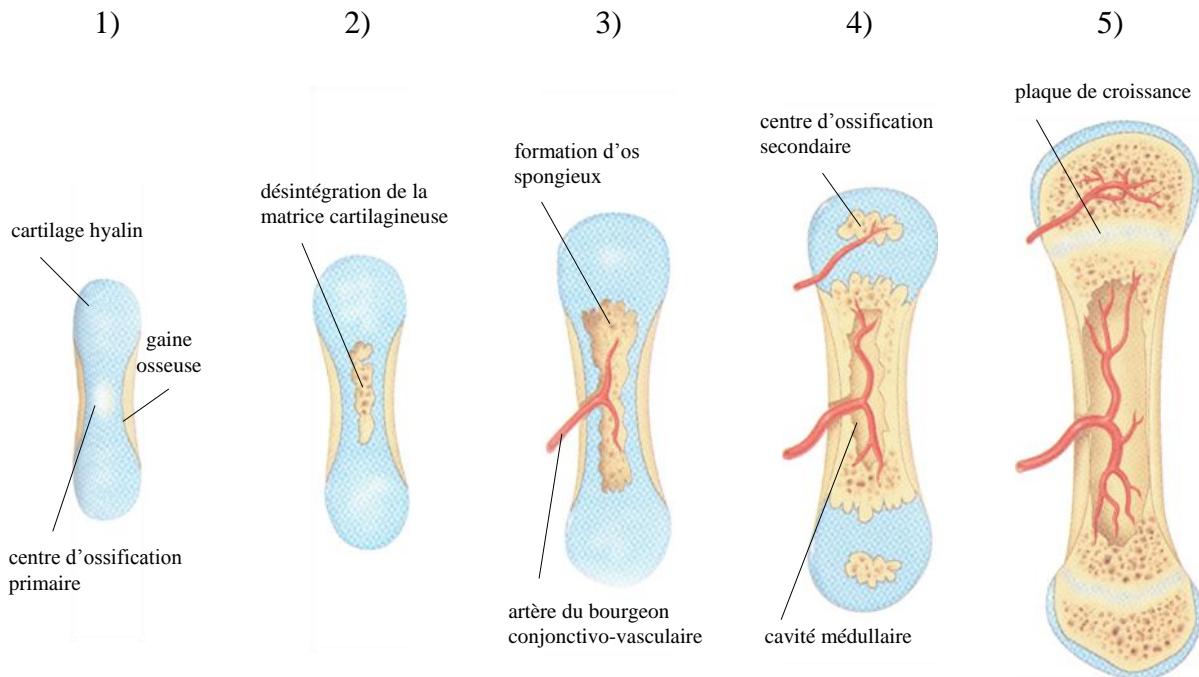
### 1.2.1.2 Ossification endochondrale

L'ossification endochondrale concerne quant à elle tous les os du squelette situés sous le crâne à l'exception des clavicules. Elle s'initie à compter du deuxième mois de gestation à partir de

cartilage hyalin; les os ainsi formés sont donc appelés « os endochondral (ou cartilagineux) ». L'ossification endochondrale est un processus plus complexe qui nécessite la dégradation progressive du cartilage hyalin au fur et à mesure de l'ossification [15]. Elle commence généralement au centre des os par la différentiation de fibroblastes du périchondre (membrane entourant le cartilage) en ostéoblastes, puis suit un développement en cinq étapes (Figure 1.4):

- 1) Les ostéoblastes nouvellement formés sécrètent une gaine osseuse autour de la diaphyse. Un centre d'ossification apparaît au centre du cartilage qui a déjà la forme définitive de l'os et qui ne va cesser de grandir tout au long du processus d'ossification.
- 2) Les chondrocytes du centre d'ossification primaire s'hypertrophient et provoquent la calcification de la matrice qui les entourent. Cette calcification empêche la diffusion de nutriments, provoquant la mort des chondrocytes. La matrice cartilagineuse est ainsi dégradée.
- 3) Les cavités formées par la désintégration de la matrice cartilagineuse sont envahies par un « bourgeon conjonctivo-vasculaire » composé d'une artère, de plusieurs veines nourricières, de neurofibres, d'ostéoclastes, d'ostéoblastes et d'éléments de moelle rouge. Les ostéoclastes vont poursuivre la dégradation des cavités et les ostéoblastes vont sécréter une nouvelle matrice osseuse autour des derniers fragments cartilagineux, formant ainsi l'os spongieux.
- 4) Les ostéoclastes dégradent l'os spongieux nouvellement formé afin de former dans la diaphyse de l'os, la cavité médullaire. Cette dégradation s'accompagne d'une croissance constante en longueur du cartilage intact de part et d'autre du centre d'ossification primaire. Cette quatrième étape se situe avant ou peu après la naissance alors que des centres d'ossifications secondaires commencent à apparaître au centre des épiphyses.
- 5) L'ossification des épiphyses est similaire à l'ossification diaphysaire, à l'exception que l'os spongieux demeure en place.

Tel que mentionné précédemment, les seuls vestiges de cartilage hyalin restant à la fin de l'ossification endochondrale sont le cartilage articulaire, qui recouvre la surface externe de l'épiphyse, et le cartilage épiphysaire, aussi appelé cartilage de conjugaison ou encore plaque de croissance. Cette plaque de croissance située entre l'épiphyse et la métaphyse de l'os est le centre d'intérêt de cette étude et est décrite en détails dans la partie suivante.



## 1.2.2 Plaque de croissance

La plaque de croissance est un cartilage hyalin composé de chondrocytes dans une matrice extracellulaire hautement hydratée. Tel que détaillé sur Figure 1.5, la plaque de croissance est divisée en trois zones bien distinctes: la zone de réserve, la zone proliférative et la zone hypertrophique. La composition de la plaque de croissance varie en fonction de la zone considérée [16-18].

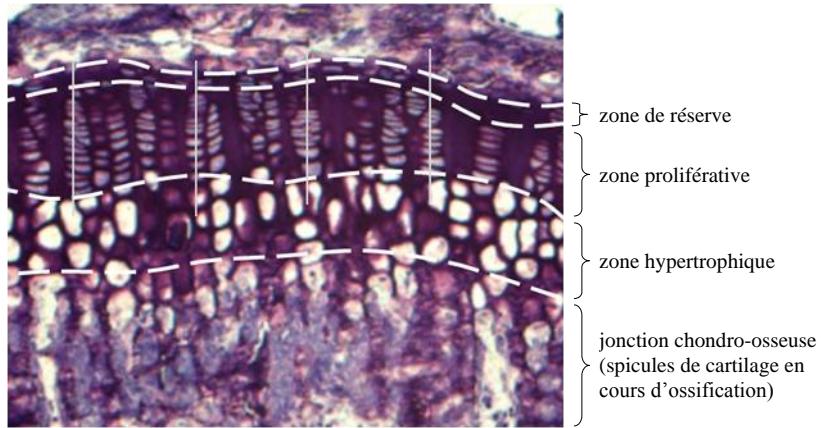


Figure 1.5: Section histologique d'une plaque de croissance murine (coloration à la toluidine bleue, grossissement 10X)

### 1.2.2.1 Composition de la plaque de croissance

Les chondrocytes sont entourés d'une matrice extracellulaire principalement composée de fibres de collagène et de protéoglycans. Des facteurs de croissance stimulent la synthèse des composants de la matrice et des enzymes protéolytiques les dégradent [16-18]. Tous ces éléments sont détaillés dans la suite de cette section.

#### *Collagène*

Le collagène réfère à une famille de protéines composées de fibres extrêmement résistantes. Ces protéines sont les plus abondantes du corps humain et confèrent aux tissus leur résistance en traction. Il en existe de nombreux types; les collagènes de type II, IX, X et XI sont les principaux retrouvés dans la plaque de croissance. Le collagène de type II est le plus abondant de la matrice extracellulaire [16, 18-20]. Composé de trois chaînes  $\alpha$  repliées en hélice, il joue un rôle structurant [11, 21-24] et inhibe la calcification [25]. Avec la même structure fibrillaire que le collagène de type II, le collagène de type IX est exprimé dans la plaque de croissance mais en quantité moins importante [20, 26]. En se liant au collagène de type II [27-30], il permettrait l'interaction de ce dernier avec les autres composants de la matrice extracellulaire [20, 26]. Le collagène de type X est un collagène non fibrillaire. Il est impliqué dans la calcification de la plaque de croissance [17, 19, 31, 32] et dans l'hypertrophie des chondrocytes [24]. Similairement

au collagène de type IX, le collagène de type XI est un collagène fibrillaire [19, 33] exprimé dans la plaque de croissance [26] mais de manière moins importante que le collagène de type II [18, 20]. Le collagène de type IX et le collagène de type XI sont tous deux impliqués dans le contrôle de la croissance et du diamètre des fibres de collagène de type II [20].

### *Protéoglycane*

Chargés négativement, les protéoglycane sont responsables de la rétention d'eau dans les tissus. Cette eau emmagasinée confère aux tissus leur résistance en compression [26]. Comme le collagène, il en existe différents types; la versicane, décorine, biglycane, fibromoduline, lumicane, glypicane, chondroïtine et agrine en sont des exemples [17, 23, 26, 34-38]. C'est cependant l'aggrécane qui se retrouve en plus grande proportion dans toute la plaque de croissance [16, 18, 26, 36, 39, 40].

Tableau 1.1: Rôles des différents composants de la plaque de croissance

Composants	Rôles
collagène de type II	rôle structurant (primordial dans la résistance en tension); inhibition de la calcification; le plus abondant
collagène de type IX	contrôle de la croissance et du diamètre des fibres de collagène de type II; interaction du collagène de type II avec les autres composants de la matrice;
collagène de type X	calcification et hypertrophie des chondrocytes
collagène de type XI	contrôle de la croissance et du diamètre des fibres de collagène de type II
aggrécane	responsable des propriétés osmotiques nécessaires à la résistance à la compression

### *Facteur de croissance*

Les facteurs de croissance influent sur la matrice extracellulaire en régulant la production de ses composants. Les GH (growth hormone) [41, 42], IGFs (insulin like growth factors) [41] , les TGF $\beta$ s (transforming growth factors) [43] et les FGFs (fibroblast growth factors) [41] sont des

exemples de ces facteurs de croissance. Les RAs (retinoic acid) sont aussi impliquées, notamment dans la maturation des chondrocytes lors de l'ossification [44, 45]. Comme beaucoup de mécanismes hormonaux systémiques, ces facteurs de croissance agissent de manière complexe, avec des processus d'action synergiques et/ou antagonistes. GH [42], IGF-1 [46, 47] et TGF- $\beta$ 1 [48, 49] stimulent l'expression du collagène de type II. En revanche, le collagène de type II est inhibé par bFGF (basic FGF) [46, 47] et par RA [50, 51]. IGF-1 et IGF-2 stimulent l'expression du collagène de type X et des protéoglycans [52]. RA stimule aussi l'expression du collagène de type X [50]. En revanche l'expression du collagène de type X est inhibée par TGF- $\beta$ 1 [48] et PTHrP (parathyroid hormone related protein) [53]. Enfin, l'expression des protéoglycans est inhibée par bFGB [54] et RA [50]. Ces différents mécanismes de régulation sont résumés dans le Tableau 1.2.

Tableau 1.2: Rôles des différents agents de régulation dans la composition de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance

Constituants de la matrice:	Expression stimulée par:	Expression inhibée par:
collagène de type II	GH, IGF-1 et TGF- $\beta$ 1	bFGF et RA
collagène de type X	IGF-1, IGF-2 et RA	TGF- $\beta$ 1 et PTHrP
protéoglycane	IGF-1, IGF-2	bFGB et RA

### *Enzymes de dégradation*

Les enzymes de dégradation sont des enzymes protéolytiques qui contribuent au remodelage de la matrice en dégradant ses composants. Parmi ces enzymes, il existe les métalloprotéinases et les aggrécanases. Il existe 4 groupes de métalloprotéinases (MMPs): les collagénases, les gélatinases, les stromélysines et les métalloprotéinases de type membranaire [55, 56]. Les collagénases sont capables de dégrader le collagène de manière très efficace en détruisant ces liaisons peptidiques. La MMP-13 (ou collagénase 3) est la protéase la plus efficace pour la dégradation du collagène de type II mais elle dégrade aussi le collagène de type X et l'aggrécane [57-60]. De même que la MMP-13, la MMP-3 (ou stromélysine 1) est impliquée dans la dégradation du collagène de type

II et X, mais aussi du collagène de type IX et XI [61]. Cette stromélysine est aussi connue pour activer les collagéanases [62, 63] et dégrader les protéoglycans [64]. De plus, PTH (parathyroid hormone) et PTHrP (son peptide lié) jouent un rôle important en stimulant l'expression de ces métalloprotéinases [65]. Il est à noter que la dégradation du collagène est contre-régulée par des inhibiteurs de MMPs appelés TIMPs (tissue inhibitor of MMPs). Il en existe de quatre types: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4 [66, 67]. TIMP-1 est un inhibiteur de MMPs présent dans toute la plaque de croissance [55, 68]. Les aggrécanases sont des enzymes de la famille des ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin). L'ADAMTS-4 (ou aggrécanase 1) et l'ADAMTS-5 (ou aggrécanase 2) dégradent les aggrécanes de la plaque de croissance [39, 69-71].

### 1.2.2.2 Structure de la plaque de croissance

La plaque de croissance se présente sous la forme d'un disque ondulé. Tel que mentionné précédemment, elle est histologiquement divisée en trois zones distinctes: la zone de réserve, la zone proliférative et la zone hypertrophique (Figure 1.5) [14, 72-77]. La taille de ces trois zones ainsi que leur proportion par rapport à l'épaisseur totale de la plaque de croissance varient en fonction de l'âge, de la localisation et de l'espèce [14, 76]. La structure de la plaque de croissance y est différente; c'est ce qui est détaillé dans la suite de cette section.

#### *Structure de la zone de réserve*

Adjacente à la frontière chondro-osseuse épiphysaire, la zone de réserve est constituée de chondrocytes quasiment sphériques [74] dispersés aléatoirement ou regroupés en petit amas [74-76]. La matrice extracellulaire est composée de collagène de type II dont les fibres sont orientées aléatoirement, de protéoglycans et d'eau [16, 78-80]. Le ratio « matrice/cellule » y est le plus important [25, 26, 81].

#### *Structure de la zone proliférative*

Située entre la zone de réserve et la zone hypertrophique, la zone proliférative est composées de chondrocytes aplatis [25, 26, 38, 74, 75] organisés sous forme colonnaire [25, 33, 38, 75]. Ces colonnes sont orientées parallèlement à l'axe de croissance [25, 26, 38, 74, 75]. La matrice extracellulaire est la plus riche en collagène de type II [18, 20], dont les fibres sont orientées longitudinalement [25, 79]. Les cellules prolifératives, dont le cycle cellulaire est très rapide [14,

25, 74, 77], produisent aussi la métalloprotéinases MMP-13 [16] ainsi que leurs inhibiteurs [55, 68]. Le ratio « matrice/cellule » y est plus faible que dans la zone de réserve [75, 81].

### *Structure de la zone hypertrophique*

Adjacente à la jonction chondro-osseuse métaphysaire, la zone hypertrophique est souvent divisée en deux zones: la zone pré-hypertrophique (transition avec la zone proliférative) et la zone hypertrophique [18, 20, 25, 38, 76, 82, 83]. La division cellulaire s'achève dans la zone pré-hypertrophique [38, 76] après un nombre fini de divisions [38, 82] ou par l'action d'un facteur de croissance local [26, 38, 76, 83]. La matrice extracellulaire y est riche en protéoglycans [16, 26, 84], en collagène de type II [16, 18, 20, 36, 40, 78, 85] et s'avère la plus riche en collagène de type IX [38]. Le collagène de type X, impliqué dans l'hypertrophie des chondrocytes et dans la calcification de la matrice [17, 24, 31, 32], commence à y être synthétisé [18, 25, 36, 86], de même que la métalloprotéinase MMP-13, qui facilite le remodelage de la matrice extracellulaire [16, 87]. Les chondrocytes commencent à s'hypertrophier dans cette zone et tendent à perdre leur organisation colonnaire [18]. La différenciation cellulaire prend définitivement fin dans la zone hypertrophique [26, 38], alors que les chondrocytes y poursuivent leur importante expansion [26, 38, 72, 75, 77]. Cette expansion serait due à une augmentation de volume des fluides intracellulaires, associée à un réarrangement de la matrice extracellulaire [75]. Dans cette zone hypertrophique, la matrice extracellulaire est synthétisée de manière importante [38, 75, 77], produisant du collagène de type II, du collagène de type X [16, 18-20, 36, 40, 75, 78, 79, 86], des agrécanes [39] et la métalloprotéinase MMP-13 [16, 26, 29, 40] qui participe à l'ossification endochondrale [88]. Le ratio « matrice/cellule » y est le plus faible de toute la plaque de croissance [75, 81].

Il est possible de mesurer l'expression des protéines dans la matrice extracellulaire en utilisant par exemple, un marquage par anticorps appelé immunohistochimie [3]. Les images de la Figure 1.6 ont été obtenues avec cette technique et confirment bien la composition de la plaque de croissance décrite précédemment avec la présence de collagène de type II dans toute la plaque de croissance et de collagène de type X dans la zone hypertrophique.

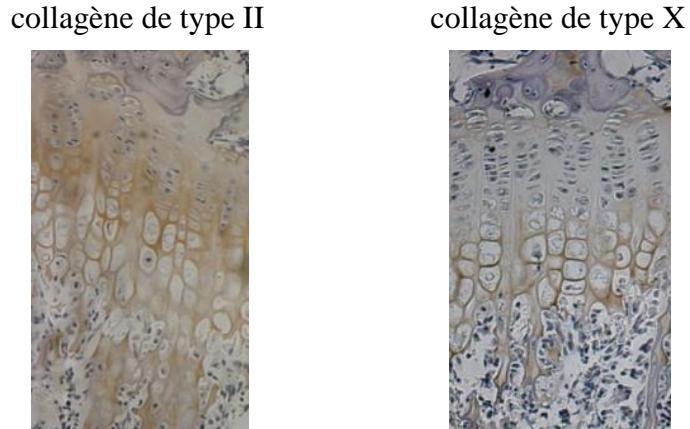


Figure 1.6: Immunohistochimies effectuées sur des coupes histologiques de plaque de croissance murine (adapté de Cancel et al. [3])

---

### 1.2.3 De l'enfance à l'adolescence: processus de croissance

De l'enfance à l'adolescence, le squelette humain ne cesse de croître autant en longueur qu'en largeur. Ces deux types de croissance sont dictés en grande partie par la régulation hormonale. Les hormones sexuelles (œstrogènes et testostérones) jouent entre autres un rôle clé dans le processus de croissance, notamment au moment de l'adolescence où la croissance connaît une accélération importante [15, 38]. Tel que présenté dans la partie 1.3, la régulation hormonale n'est pas le seul facteur qui influe sur la croissance. L'environnement mécanique est un facteur important qui peut influer sur le processus de croissance. Les croissances en longueur et en largeur sont décrites dans la section suivante.

#### 1.2.3.1 Croissance en longueur et rôle des différentes zones de la plaque de croissance

La croissance en longueur des os s'effectue au droit des plaques de croissance. Elle résulte en un processus spatio-temporel complexe basé sur un mécanisme de prolifération et d'hypertrophie cellulaires, contrôlé notamment par la boucle de rétroaction IHH-PTHrP (indian hedgehog-PTHrP) [83] et dans lequel chacune des trois différentes zones de la plaque de croissance joue un rôle précis.

### *Rôle de la zone de réserve*

Située du côté de l'épiphysé, cette zone relativement quiescente (long cycle cellulaire et rares divisions) [76, 82, 89] sert à absorber et emmagasiner les nutriments nécessaires aux zones proliférative et hypertrophique [25]. Les chondrocytes y jouent dans un premier temps le rôle de cellules souches [74, 76, 82, 90, 91] puis déclenchent l'expansion clonale décrite ci-dessous dans la zone proliférative [38, 76, 91].

### *Rôle de la zone proliférative*

Située entre la zone de réserve et la zone hypertrophique, la zone proliférative est une zone particulièrement active dans laquelle les cellules se divisent énormément [14, 25, 74, 92], équilibrant ainsi la perte de chondrocytes dans la zone hypertrophique.

### *Rôle de la zone hypertrophique*

Dans la zone hypertrophique, adjacente à la jonction chondro-osseuse du côté diaphysaire, les chondrocytes subissent un important grossissement ainsi qu'un allongement dans la direction de croissance [14, 92]. Cette expansion cellulaire diffère suivant l'âge, l'espèce ainsi que la plaque de croissance considérée [93].

Le mécanisme de croissance interstitielle au sein du cartilage de croissance se base sur l'association de la division cellulaire dans la zone proliférative [14, 25, 74, 92] et de l'expansion cellulaire dans la zone hypertrophique [72]. Ce mécanisme est associé à un mécanisme d'ossification endochondral du côté de la diaphysé [25, 38, 90]. Tel que détaillé dans la partie 1.2.1.2, la matrice cartilagineuse qui entoure les chondrocytes hypertrophiés au niveau de la jonction chondro-osseuse se calcifie, provoquant la mort des chondrocytes et laissant place à de longs spicules de cartilage calcifié (Figure 1.5). Ces longs spicules sont par la suite érodés par les ostéoclastes et recouverts de matrice osseuse par les ostéoblastes, ce qui résulte en la formation d'os spongieux [15]. Les chondrocytes produisent aussi une importante quantité de matrice extracellulaire. Selon Wilsman et al. [92], cette production de matrice extracellulaire est le deuxième facteur le plus important en termes de contribution à la croissance longitudinale des os, derrière l'hypertrophie dans la zone hypertrophique et devant la prolifération dans la zone proliférative (Figure 1.7).

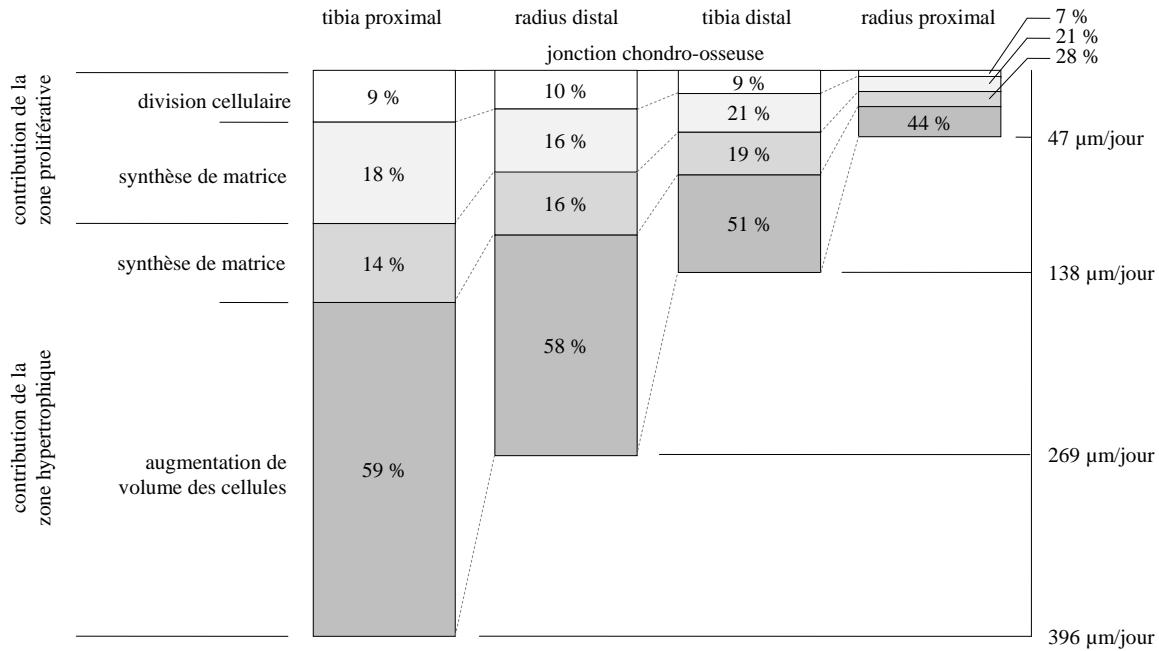


Figure 1.7: Contribution des zones proliférative et hypertrophique dans la croissance longitudinale des os (adapté de [92])

Cette production de matrice extracellulaire et son remodelage (pour permettre le changement de forme et de volume des cellules) sont directement reliés aux mécanismes de synthèse/dégradation et aux différents agents de régulation (GH, IGF-1, IGF-2, TGF- $\beta$ 1, bFGF, RAs, MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4, ADAMTS-5, TIMP-1) détaillés dans la partie 1.2.2.1. Tous ces processus biologiques impliqués dans la croissance en longueur des os sont influencés par différents facteurs: les facteurs génétiques [14, 82], les facteurs nutritionnels [82], les facteurs chimiques (comme la prise de médicament) [94] ou encore l'environnement mécanique [10, 95-97]. L'expression de la protéine (PTHRP) est par exemple influencée par les charges mécaniques [98]. L'influence de l'environnement mécanique sur la croissance longitudinale des os est le point central de cette étude, tel qu'expliqué dans la suite, il peut être la cause de nombreuses déformations musculosquelettiques évolutives.

### 1.2.3.2 Croissance en largeur (ou croissance par apposition)

Au fur et à mesure qu'ils s'allongent, les os doivent également s'épaissir afin de conserver leur proportions, mais surtout d'accroître leur solidité alors que les sollicitations mécaniques ne cessent d'augmenter (augmentation du poids du corps humain, augmentation de la force musculaire). Cet épaississement suit un processus appelé « croissance par apposition » dans lequel les ostéoclastes résorbent l'os du côté de l'endoste augmentant ainsi le diamètre de la cavité médullaire tandis que les ostéoblastes sous le périoste sécrètent une nouvelle matrice osseuse sur la surface externe augmentant ainsi le diamètre de l'os [15]. Il est à noter que la résorption du côté de l'endoste est moins importante que la synthèse du côté du périoste, l'os ainsi formé sera donc plus épais, plus solide sans être trop alourdi [15]. Du côté du périoste, le mécanisme de croissance par apposition suit un mécanisme en quatre étapes (Figure 1.8):

- 1) Les ostéoblastes produisent une matrice osseuse autour d'un vaisseau sanguin du périoste.
- 2) La matrice osseuse finit par entourer complètement le vaisseau sanguin dans un tunnel.
- 3) Les ostéoblastes forment des lamelles autour de ce tunnel réduisant ainsi son diamètre.
- 4) Le tunnel devient alors un canal central qui, avec les lamelles récemment synthétisées, forment un nouvel ostéon. Le processus se répète pour d'autres vaisseaux sanguins augmentant ainsi le diamètre de l'os.

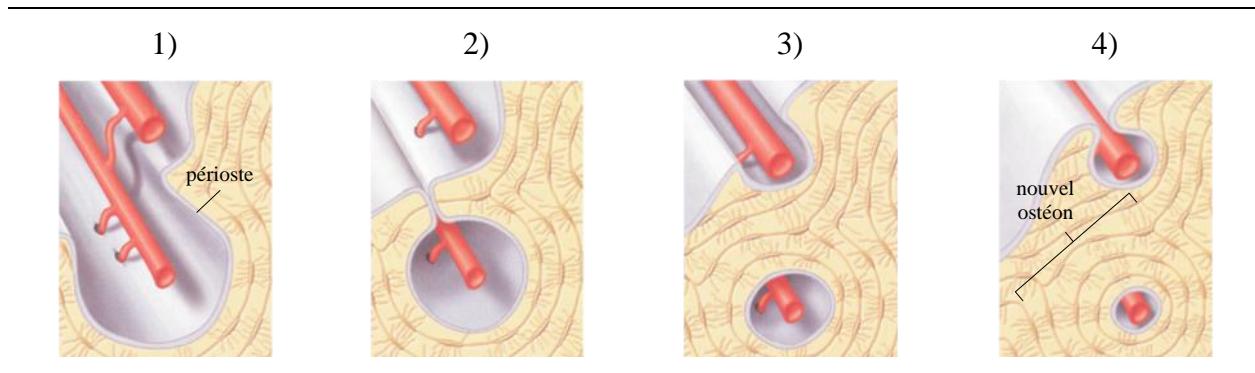


Figure 1.8: Mécanisme de croissance par apposition (adapté de [15])

---

### 1.2.4 Au stade adulte: phénomène de remodelage

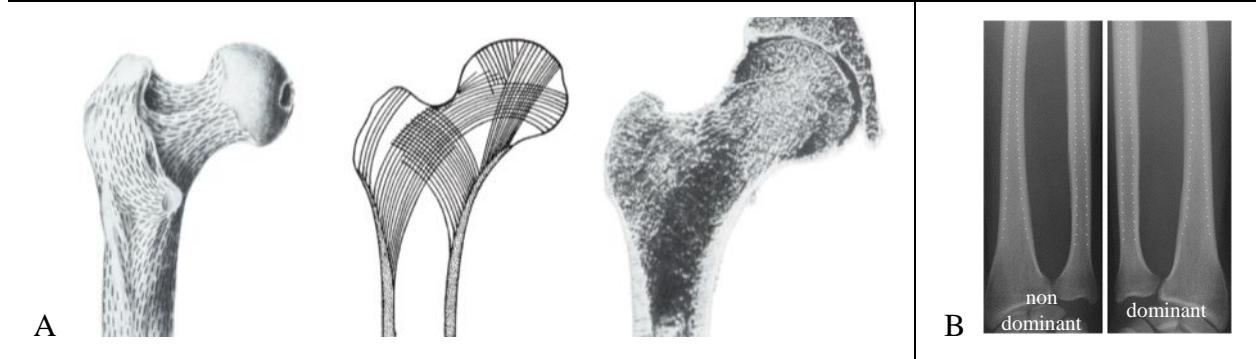
À la fin de l'adolescence, les chondrocytes de la plaque de croissance se divisent de moins en moins souvent, la plaque de croissance s'amincit et finit par être complètement remplacée par de la matrice osseuse. Ce phénomène, appelé fermeture des plaques de croissance, apparaît à l'âge d'environ 18 ans chez la femme et 21 ans chez l'homme [15]. C'est l'analyse de cette fermeture qui permet de déterminer l'âge squelettique. Au stade adulte, la plaque de croissance a donc totalement disparu et la croissance en longueur des os est terminée. En revanche, la croissance ou plutôt la variation de largeur se poursuit tout au long de la vie; ce phénomène est appelé remodelage osseux. Le remodelage osseux est perpétuel, en moyenne 5 à 7% de notre squelette est renouvelé en une semaine [15]. Le remodelage est le résultat d'un couplage parfaitement synchronisé entre la résorption par les ostéoclastes et la synthèse par les ostéoblastes. Il est contrôlé d'une part par la régulation hormonale, qui maintient l'équilibre des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le sang, et d'autre part par les sollicitations mécaniques [15]. Ce second point sera présenté en détails dans la partie suivante. Tel que mentionné dans la partie 1.1.2.2, le remodelage osseux est la preuve que les os sont des tissus très vivants, le phénomène de guérison de fracture est un des meilleurs exemples.

## 1.3 Influence de l'environnement mécanique sur la croissance

L'environnement mécanique est bien connu pour influencer la croissance et le remodelage osseux. Wolff fut le premier à décrire ce phénomène dans les années 1800 en décrivant que la structure trabéculaire des os était orientée afin de résister au mieux aux sollicitations mécaniques (Figure 1.9A) [99]. En d'autres mots, les os possèdent une résistance maximale pour un poids minimal.

Cette loi concernant le remodelage osseux a été confirmée depuis par de nombreuses études. Deux exemples frappants sont: la différence entre le bras dominant et non dominant d'un tennisman (Figure 1.9.B) [95, 100], ou encore la perte de masse osseuse pouvant atteindre 1 à 2% par mois selon le site de la NASA lorsque les astronautes se trouvent dans l'espace, en situation de microgravité. Toujours dans les années 1800, la loi d'Hueter-Volkmann a quant à elle décrit l'influence de l'environnement mécanique sur la croissance longitudinale des os: une augmentation de pression diminuerait la croissance, tandis qu'une diminution de pression

l'exacerberait. Ce phénomène de modulation mécanique de la croissance longitudinale est décrit dans la suite de cette section.



### 1.3.1 Modulation de croissance

La loi d'Hueter-Volkman a été confirmée par de nombreuses études (partie 1.4.1). Ces chargements sont caractérisés par leur amplitude, leur durée et leur type (statique/dynamique, en tension/compression, en torsion ou en cisaillement). Alors qu'un chargement physiologique semble requis pour la croissance et l'ossification normale des os [101, 102], il semble qu'un chargement trop élevé peut causer une diminution et même un arrêt de la croissance [102-104]. Cette inhibition peut s'accompagner de dommages dans la plaque de croissance [105]. Plus le chargement est maintenu longtemps, plus la modulation est importante. Ce phénomène entraîne un « cercle vicieux » impliqué dans la progression de nombreuses déformations musculosquelettiques. En effet, une déformation angulaire initiale entraîne une asymétrie des contraintes qui, d'après la loi d'Hueter-Volkmann, entraîne une asymétrie de croissance. Cette asymétrie de croissance contribue alors à l'aggravation de la déformation angulaire initiale, et ainsi de suite [2, 10]. Des exemples de déformations musculosquelettiques évolutives reliées à la modulation de croissance sont détaillés dans la section suivante (1.3.2) alors que les effets du chargement mécanique sur le taux de croissance et sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance seront décrits en détails dans la partie 1.4.

### 1.3.2 Déformations musculosquelettiques évolutives

La scoliose idiopathique adolescente et le *genu varum/valgum* sont deux exemples de pathologies influencées par l'environnement mécanique. Ces déformations sont détaillées dans le paragraphe suivant tandis que la partie 1.3.2.2 explique comment la modulation mécanique de croissance est aussi impliquée dans de nouvelles approches pour leur traitement.

#### 1.3.2.1 Exemples de pathologies

##### *La scoliose idiopathique adolescente*

La scoliose idiopathique adolescente est une déformation du rachis qui s'opère dans les trois dimensions. La déformation principale s'opère dans le plan frontal où la colonne vertébrale prend la forme caractéristique d'un S (Figure 1.10) déformant aussi la cage thoracique, ce qui peut entraîner des difficultés respiratoires. La sévérité de la déformation est principalement caractérisée par la mesure de l'angle de Cobb. La scoliose nécessite un traitement conservateur par corset lorsque l'angle de Cobb se situe entre 20 et 45°, et une chirurgie par instrumentation et fusion osseuse extrêmement invasive pour des déformations plus importantes [106].

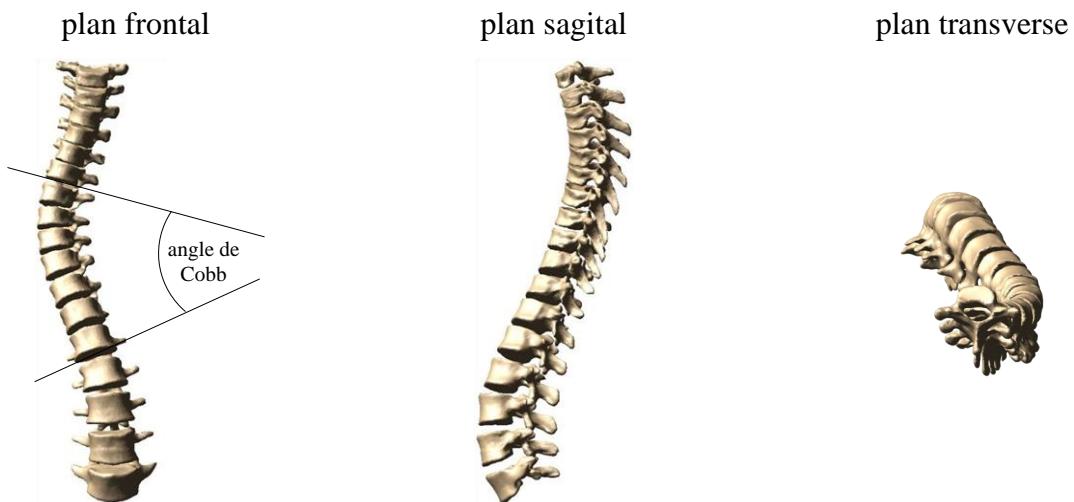


Figure 1.10: Déformation 3D de la scoliose idiopathique adolescente

### *Le genu varum/valgum*

Le *genu varum* est une déformation au niveau du genou plus connue sous le nom de « jambes arquées ». Le *genu valgum* est une déformation qui donne aux membres inférieurs une forme de X (genoux en dedans). L'évolution naturelle de la physiologie du genou dans le plan frontal commence à la naissance par un *varus* dû à la position des membres *in utero*. Cette courbure arquée va totalement s'inverser pour atteindre un *valgus* maximum à l'âge d'environ 3-4 ans. À l'âge d'environ 7-8 ans, la courbure va se stabiliser définitivement et atteindre une courbure physiologique en léger valgus [107]. Tout le défi pour le diagnosticien consiste à différencier une courbure pathologique, qui risque de s'aggraver, d'une courbure physiologique qui va s'autocorriger avec la croissance. Les différents traitements existants sont le port de fixateurs externes pour les faibles déformations, une chirurgie minimalement invasive d'épiphysiodèse, détaillée dans la prochaine partie, pour les déformations plus importantes et une ostéotomie très invasive consistant à couper l'os pour le réaligner dans les cas de déformations extrêmes [108].



Figure 1.11: *Genu varum/valgum* (adapté de [www-sante.ujf-grenoble.fr](http://www-sante.ujf-grenoble.fr))

---

#### **1.3.2.2 Nouvelles approches de traitement**

La modulation mécanique de croissance, impliquée dans la progression de déformations, est aussi exploitée dans leur traitement. En effet, la modulation de croissance est utilisée de manière locale dans de nouvelles approches de traitements dites minimalement invasives. Plusieurs types

d'implants existent pour moduler la croissance de manière locale. Parmi ceux-ci, on retrouve les agrafes installées de part et d'autre de la plaque de croissance pour en diminuer l'activité. Ces agrafes, utilisées pour la correction de la scoliose, ralentissent la croissance du côté convexe de la courbe; le côté concave de la courbure grandit donc plus vite, contribuant à réaligner la colonne vertébrale (Figure 1.12.A et Figure 1.12.B) [109, 110]. Ces agrafes sont trouvées aussi avec l'épiphysiodèse, discutée précédemment pour la correction des déformations au niveau du genou. Elles peuvent aussi être installées de chaque côté de la plaque de croissance afin de moduler la croissance totale et corriger ainsi l'asymétrie de longueur des membres (Figure 1.12.C) [111].

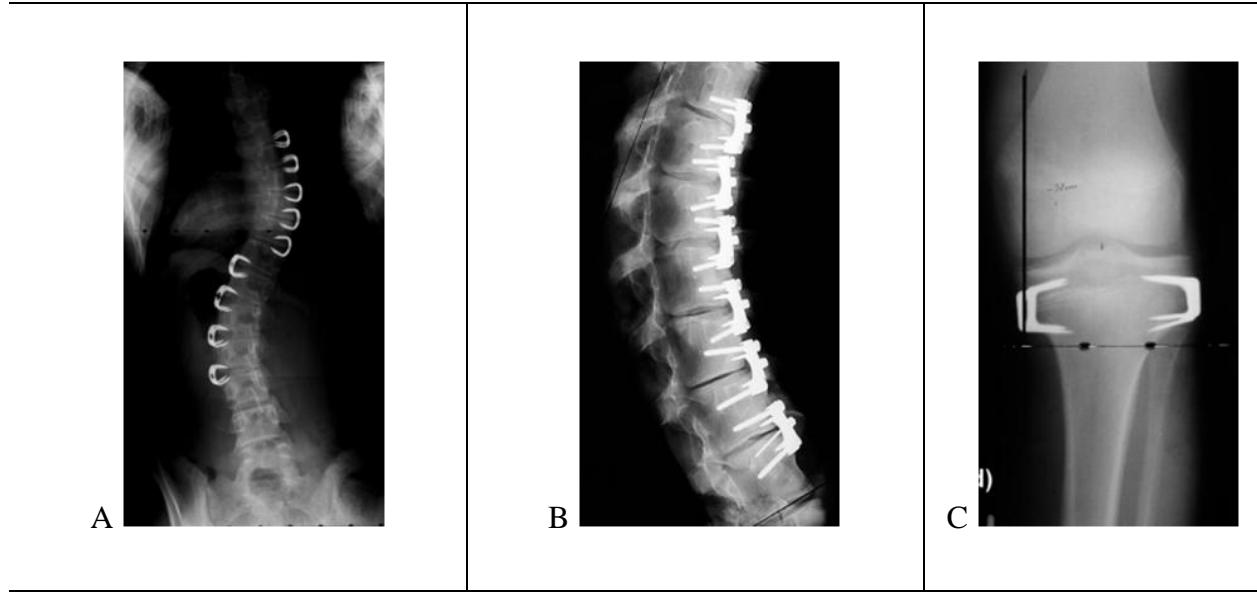


Figure 1.12: Implants de type agrafes. A: Betz et al. [109]. B: Wall et al. [110]. C: Gorman et al. [111].

D'autres types d'implants existent comme les implants du type ancre-ligaments (Figure 1.13) [112, 113]. Par rapport aux agrafes, ces implants ont, de par l'élasticité des ligaments, un potentiel de transmission de charges dynamiques beaucoup plus grand. Basé sur les mouvements du patient, ces chargements dynamiques sont de plus, une représentation bien plus fidèle des sollicitations mécaniques subies par le corps humain au cours de la réalisation des tâches de la vie quotidienne (marche...).

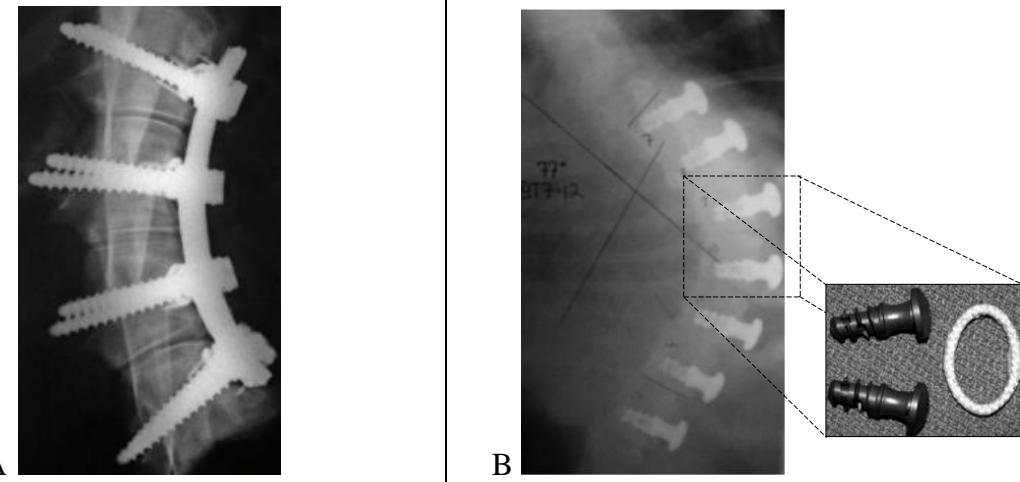


Figure 1.13: Implants de type « ancre-ligament ». A: Newton et al. [113]. B: Braun et al. [112].

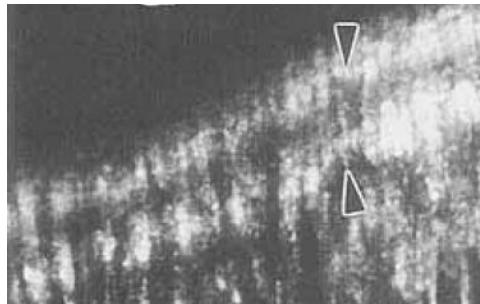
Beaucoup d'études ont tenté d'expliquer la réponse physiologique précise de la plaque de croissance à ces stimulations mécaniques autant statique que dynamique. Cette réponse mécanobiologique de la plaque de croissance est le fondement même de la modulation de croissance et donc du développement de ces nouvelles approches de traitements minimalement invasives. Même si tous les phénomènes qui entrent en jeu ne sont pas encore complètement élucidés (notamment au niveau des charges dynamiques), de nombreuses avancées ont été faites dans ce processus de compréhension.

## 1.4 Études mécanobiologiques de la plaque de croissance

Inscrite dans le domaine de la biomécanique, la mécanobiologie est une science multidisciplinaire unissant la mécanique à la biologie. Elle étudie la réponse des tissus biologiques aux sollicitations mécaniques de leur environnement [114, 115]. Cette section détaille l'influence des chargements mécaniques sur le taux de croissance et sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance, deux éléments d'intérêt dans ce projet. Différentes approches expérimentales sont utilisées pour étudier la mécanobiologie des plaques de croissance. Les chargements peuvent être transmis *in vivo*, de manière continue par un dispositif externe implanté chirurgicalement et porté par l'animal [1, 3, 6-8, 116] ou transmis par une machine de chargement, toujours *in vivo*, mais sous anesthésie pendant de brèves périodes [5, 12, 117, 118]. Enfin, ils peuvent être transmis par une machine de microchargement *in vitro* sur des explants de plaque de croissance [119, 120].

### 1.4.1 Effets sur le taux de croissance

Le taux de croissance peut être quantifié de différentes manières, par mesure *post-mortem* de la longueur des os [5, 11, 12], par mesure de la distance entre deux fronts de fluorochrome divisée par l'intervalle de temps entre les injections de ces fluorochromes (Figure 1.14) [3-8, 12-14, 16, 72, 77, 91, 92, 121-123]. Ces fluorochromes, comme la calcéine, le xylénol orange ou la tétracycline, sont des marqueurs de minéralisation qui se fixent sur les zones d'ossification active [14, 121]. Enfin, le taux de croissance peut être déterminé par mesure directe sur des clichés radiographiques [1, 2, 9]. Le taux de croissance diffère en fonction de la plaque de croissance considérée, de l'espèce et de l'âge [6].




---

Figure 1.14: Mesure de croissance par injection de fluorochrome (oxytetracycline, adapté de Breur et al. [72]).

---

Une synthèse des principales études *in vivo* portant sur la modulation mécanique de croissance sous chargement statique et/ou dynamique est présentée dans le Tableau 1.3. Ce tableau est séparé en deux sections, une section méthodologique détaillant le modèle animal utilisé, le tissu ainsi que le type de chargement étudiés, et une seconde section, présentant les principales conclusions.

Tableau 1.3: Résumé des principales études *in vivo* sur la modulation mécanique du taux de croissance, classées selon le type de chargement (statique, dynamique, statique/dynamique) et par ordre anti chronologique

Réf.	Méthodes		Résultats	Limites
	Étude	Chargement		
<b>Études avec chargement statique</b>				
<b>Cancel, 2009 [3]</b>	<u>Modèle animal:</u> rat  <u>Tissus:</u> vertèbre caudale	0,2 MPa Compression	Réduction du taux de croissance (injection de calcéine) de: -29% comparé au groupe « contrôle » -15% comparé au groupe « sham »	-
<b>Stokes, 2007 [7]</b>	<u>Modèle animal:</u> rat, veau et lapin  <u>Tissus:</u> vertèbre caudale et tibia	0,1-0,2 MPa Tension et compression	Augmentation du taux de croissance (injection de calcéine et de xylénol orange) comparé aux vertèbres « contrôle » adjacentes pour le rat: - 4% pour le groupe chargé à 0,1 MPa en tension  Réduction du taux de croissance comparé aux vertèbres « contrôle » adjacentes: - 5% pour le groupe sham - 18% pour le groupe chargé à 0,1 MPa en compression - 40% pour le groupe chargé à 0,2 MPa en compression	-
<b>Stokes, 2006 [6]</b>	<u>Modèle animal:</u> rat, veau et lapin  <u>Tissus:</u> vertèbre caudale et tibia	0,1-0,2 MPa Tension et compression	Relation d'apparence linéaire entre le pourcentage de modulation de croissance (injection de calcéine et de xylénol orange) et la contrainte: - 19% par 0,1 MPa pour le tibia - 15% par 0,1 MPa pour la vertèbre  Pas de différence entre les espèces et entre les âges	-
<b>Stokes, 2005 [8]</b>	<u>Modèle animal:</u> rat  <u>Tissus:</u> vertèbre caudale et tibia	0,1 MPa Compression	Réduction du taux de croissance (injection de calcéine) comparé aux vertèbres « contrôle » adjacentes: - 0% pour le groupe sham - 7% pour le groupe chargé le jour - 10% pour le groupe chargé la nuit - 18% pour le groupe chargé toute la journée  Pas de différence entre les groupes chargés de jour et de nuit	-
<b>Reich, 2005 [105]</b>	<u>Modèle animal:</u> poulet  <u>Tissus:</u> tibia	10% de la masse corporelle portée sur le dos	Réduction de la longueur des os (mesures <i>post-mortem</i> ) après 4 jours de chargement: - 15% pour le tibia - 13% pour le fémur.	Chargement non normalisé
<b>Stokes 2002 [9]</b>	<u>Modèle animal:</u> rat  <u>Tissus:</u> vertèbre caudale	60% de la masse corporelle Tension et compression	Variation du taux de croissance (mesures radiographiques) comparé aux vertèbres « contrôle » adjacentes: - 52% pour le chargement en compression - 113% pour le chargement en tension	Chargement non normalisé Pas de sham
<b>Farnum, 2000 [4]</b>	<u>Modèle animal:</u> rat  <u>Tissus:</u> tibia	Agrafe (intensité du chargement inconnue)	Proche de l'agrafe, diminution du taux de croissance (injection d'oxytetracycline): - 45% après 3 jours - 81% après 6 jours	Chargement non contrôlé Pas de sham

<b>Aronsson 1999 [2]</b>	<u>Modèle animal:</u> veau  <u>Tissus:</u> vertèbre caudale	30-50 N Tension et compression	Variation du taux de croissance (mesures radiographiques) comparé aux vertèbres « contrôle » adjacentes: - 68% pour le chargement en compression - 123% pour le chargement en tension	Chargement non normalisé Pas de sham
----------------------------------	---	-----------------------------------	---	---

### Études avec chargement statique versus dynamique

<b>Akyuz, 2006 [1]</b>	<u>Modèle animal:</u> rat <u>Tissus:</u> vertèbre caudale	55% de la masse corporelle Chargement asymétrique 1 Hz	En comparant le coté concave avec le coté convexe (mesures radiographiques), réduction du taux de croissance de: - 45% pour le groupe « statique » - 60% pour le groupe « dynamique »	Chargement non normalisé, Équivalence non démontrée
<b>Robling, 2001 [5]</b>	<u>Modèle animal:</u> rat <u>Tissus:</u> ulna	8,5-17 N Compression 10 min/jr sous anesthésie 0-2 Hz	Réduction de la longueur (mesure post-mortem) comparé aux ulnae « contrôle » controlatéral: - 2% pour le groupe chargé à 8,5 N (statique) - 4% pour le groupe chargé à 17 N (statique) - 4% pour le groupe chargé à 17 N (dynamique)	Chargement non normalisé et non équivalent

### Études avec chargement dynamique

<b>Niehoff, 2004 [11]</b>	<u>Modèle animal:</u> rat <u>Tissus:</u> fémur	Différents niveaux d'activité (accès ± restreint à une roue d'exercice)	Aucune différence au niveau de la longueur moyenne des fémurs (mesure <i>post-mortem</i> )	Chargement non contrôlé Fréquence non contrôlable
<b>Ohashi, 2002 [12]</b>	<u>Modèle animal:</u> rat <u>Tissus:</u> ulna	4-8,5-17 N Compression 2 Hz 10 min/jr sous anesthésie	Réduction de la longueur (mesure <i>post-mortem</i> ) comparé aux ulnae « contrôle » controlatéraux: - 0,8% pour le groupe chargé à 4 N - 1,2% pour le groupe chargé à 8,5 N - 2,3% pour le groupe chargé à 17 N  Réduction du taux de croissance (injection de calcéine) comparé aux ulnae « contrôle » controlatéraux: - 8% pour le groupe chargé à 4 N - 17% pour le groupe chargé à 8,5 N - 100% pour le groupe chargé à 17 N  Une semaine après chargement, reprise de la croissance normale pour les groupes « 8,5 et 4 N » mais pas pour le groupe « 17 N »	Chargement non normalisé

#### 1.4.1.1 Chargement statique

Selon une étude de Stokes et al. [6], la relation entre le chargement statique (en tension et en compression) et la modulation de croissance (c'est-à-dire le pourcentage de variation du taux de croissance) suit une relation d'apparence linéaire. Cette relation est constante quelque soit l'âge et quelque soit l'espèce mais varie suivant la localisation. En effet, pour une variation de 0,1 MPa au niveau de la contrainte, la modulation de croissance atteint des valeurs respectives de 18,6% et 15% pour le tibia et la vertèbre (Tableau 1.3). Pour tous les animaux et toutes les localisations

anatomiques, une modulation moyenne de 17.1% est observée pour une variation de 0.1 MPa au niveau de la contrainte (Figure 1.15 + Tableau 1.3).

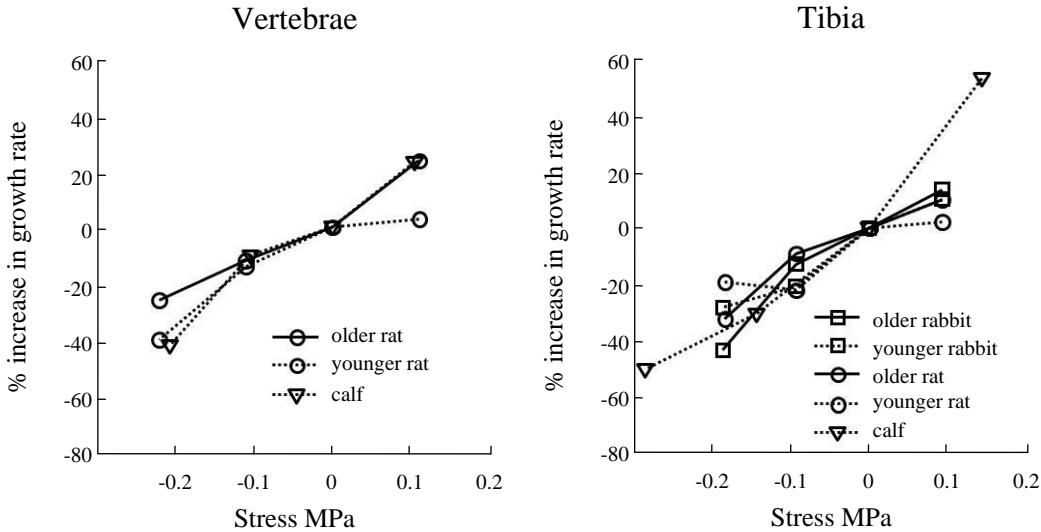


Figure 1.15: Relation entre contrainte appliquée et modulation de croissance pour deux localisations distinctes, différents âges et différentes espèces (Stokes et al. [6])

Cette étude de Stokes et al. [6] n'est pas la seule qui vérifie la loi d'Hueter-Volkmann précédemment énoncée et stipulant qu'une augmentation de pression réduit la croissance osseuse tandis qu'une réduction de pression (ou tension) l'exacerbe [1, 2, 4, 5, 124]. Dans d'autres études, des chargements normalisés de 0,1 à 0,2 MPa sont utilisés et une réduction du taux de croissance est observée [6-8]; cette réduction atteint 29% comparé au groupe contrôle dans la récente étude de Cancel et al. [3]. Ces contraintes correspondent à des chargements physiologiques et déforment la plaque de croissance d'environ 10% [125] selon les modules d'Young avancés par Cohen et al. [126] et Radhakristan et al. [23]. En revanche, des contraintes plus importantes inhiberaient complètement la croissance; Bylski-Austrow et al. [127] avancent des valeurs limites entre 0,5 et 1 MPa, tandis que Bonnel et al. [103] et Safran et al. [104] avancent des valeurs

respectivement supérieures à 0,3 MPa et 0,5 MPa. Enfin, en extrapolant la relation linéaire obtenue par Stokes et al. [6] et citée précédemment (modulation de 17,1% pour une variation de 0,1 MPa au niveau du chargement), une modulation de 100% soit une inhibition totale de la croissance est obtenue pour un chargement de 0,6 MPa [125]. Cette inhibition de croissance peut être produite à l'aide d'agrafes implantées de par et d'autre de la plaque de croissance, tel que discuté dans la partie 1.3.2.2, traitant des nouvelles approches de traitement minimalement invasives, et tel que démontré dans une étude de Farnum et al. [4].

#### 1.4.1.2 Chargement dynamique

Des études ont aussi investigué les effets des chargements dynamiques sur le taux de croissance. En premier lieu, Noonan et al [128] avancent que 90% de la croissance se produirait au cours des phases de repos, phases au cours desquelles les charges dynamiques sont minimales. Mais le fait que la croissance s'effectue au cours de ces phases de repos ne prouve pas que le type de chargement subis au cours de phases d'activité n'ait pas d'influence sur le taux de croissance. La comparaison des charges statiques et dynamiques entraînent des conclusions contradictoires dans la littérature. Une étude d'Ohashi et al. [12] démontre que les charges dynamiques (4-8,5-17 N, 2 Hz) entraînent une modulation de croissance d'autant plus importante que le chargement est important. Cette étude ne compare cependant pas les charges statiques avec les charges dynamiques. En soumettant une cohorte de rats à différents niveaux d'activités (accès plus ou moins restreint à une roue d'entraînement), Niehoff et al. [11] ne trouve aucune différence de longueur au niveau des fémurs, suggérant ainsi que les chargements dynamiques n'ont pas d'influence significative sur la croissance. Ces résultats sont en accord avec une étude de Robling et al. [5] qui conclut à une modulation de croissance identique, quelque soit le type de chargement, statique (17 N, 0 Hz) ou dynamique (8,5-17 N, 2 Hz) (réduction de la longueur de l'ulna de 4% lorsque comparé au « contrôle » contralatéral quelque soit le régime de chargement, statique ou dynamique). En contrepartie, une étude d'Akyuz et al. [1] (55% de la masse corporelle transmise de manière unilatérale à une fréquence de 1 Hz) trouve, pour les vertèbres caudales de rat, un potentiel de modulation de croissance plus grand pour le chargement dynamique (60%) que pour le chargement statique (45%).

### 1.4.2 Effets sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance

L'histomorphométrie de la plaque de croissance peut être définie à l'aide de plusieurs paramètres, pouvant être évalués dans chacune des trois zones de la plaque de croissance (réserve, proliférative et hypertrophique). L'épaisseur totale de la plaque de croissance ainsi que la hauteur de chaque zone sont les principaux. Ils dépendent le plus souvent du nombre de chondrocytes et de leur taux de prolifération dans la zone proliférative ainsi que du nombre de chondrocytes et de leur volume dans la zone hypertrophique. Les mesures de ses paramètres sont généralement obtenues grâce à différentes colorations (toluidine bleue [116, 120], fast green [117, 118] ou encore safranine [117-119]). La prolifération cellulaire est quant à elle généralement déterminée grâce à un marquage au bromodeoxyuridine [4, 7, 8, 21, 91, 92, 116, 117, 129, 130]. Les effets des charges mécaniques sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance sont le résultat de changements et d'interactions complexes entre prolifération, différentiation et hypertrophie des chondrocytes [125].

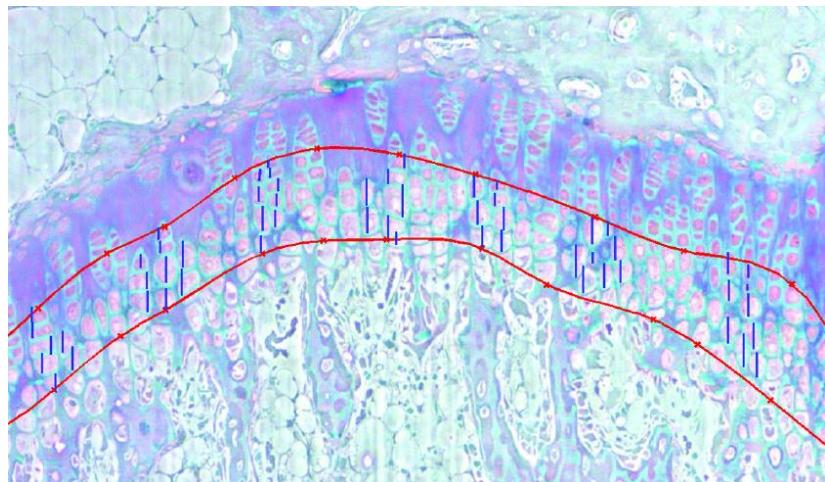


Figure 1.16: Exemples de mesure des paramètres histomorphométriques (hauteur des cellules hypertrophiques et épaisseur de la zone hypertrophique, Stokes et al. [9])

Une synthèse des principales études portant sur l'effet des charges mécaniques sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance est présentée dans le Tableau 1.4. Similairement au Tableau 1.3, ce tableau est séparé en deux sections, une section méthodologique et une section résultats.

Tableau 1.4: Résumé des principales publications étudiant l'histomorphométrie de la plaque de croissance, classées selon le type de chargement (statique, dynamique, statique/dynamique) et par ordre anti chronologique

Réf.	Méthodes		Résultats	Limites
	Étude	Chargement		
<i>Étude avec chargement statique</i>				
<b>Cancel, 2009 [3]</b>	<input type="checkbox"/> <i>in vitro</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>in vivo</i>  <u>Modèle animal:</u> rat  <u>Tissus:</u> vertèbre caudale	0,2 MPa Compression	Réduction de 25% de l'épaisseur de la plaque de croissance comparé au groupe « contrôle »	-
<b>Stokes, 2007 [7]</b>	<input type="checkbox"/> <i>in vitro</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>in vivo</i>  <u>Modèle animal:</u> rat, veau et lapin  <u>Tissus:</u> vertèbre caudale et tibia	0,1-0,2 MPa Tension et compression	Réductions pour la compression de 0,2 MPa sur les vertèbres de rat, par rapport aux vertèbres adjacentes « contrôle »: - 9% pour la hauteur de la zone proliférative - 24% pour la hauteur de la zone hypertrophique - 20% pour la taille des chondrocytes dans la zone hypertrophique - 11% pour le nombre de chondrocytes dans la zone proliférative Augmentation du taux de chondrocytes en prolifération (8%)	-
<b>Stokes, 2005 [8]</b>	<input type="checkbox"/> <i>in vitro</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>in vivo</i>  <u>Modèle animal:</u> rat  <u>Tissus:</u> vertèbre caudale et tibia	0,1 MPa Compression	Réductions pour les vertèbres caudales (chargement toute la journée), par rapport aux vertèbres adjacentes « contrôle »: - 26% pour la hauteur totale de la plaque de croissance - 5% pour la hauteur des chondrocytes dans la zone hypertrophique - 9% pour le nombre de chondrocytes dans la zone proliférative Augmentation du taux de chondrocytes en prolifération (19%)	-
<b>Stokes 2002 [9]</b>	<input type="checkbox"/> <i>in vitro</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>in vivo</i>  <u>Modèle animal:</u> rat  <u>Tissus:</u> vertèbre caudale	60% de la masse corporelle Tension et compression	Réductions par rapport aux vertèbres adjacentes « contrôle » pour le chargement en compression, pour la zone hypertrophique: - 13% au niveau de la hauteur de la zone - 15% au niveau de la hauteur moyenne des chondrocytes - 22% au niveau de l'expansion des chondrocytes	Chargement non normalisé Pas de sham

<b>Farnum, 2000 [4]</b>	<input type="checkbox"/> <i>in vitro</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>in vivo</i>  <u>Modèle animal:</u> rat  <u>Tissus:</u> tibia	Agrafe (intensité du chargement inconnue)	Proche de l'agrafe, réductions de: - 50% pour la hauteur de la zone hypertrophique - 25% pour la hauteur des chondrocytes hypertrophiques - 28% pour le nombre de chondrocytes hypertrophiques - 54% (sans disparition totale) pour la prolifération des chondrocytes Désorganisation colonnaire	Changement non contrôlé, Pas de sham
<b>Apte, 1994 [116]</b>	<input type="checkbox"/> <i>in vitro</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>in vivo</i>  <u>Modèle animal:</u> lapin  <u>Tissus:</u> tibia	20 N Tension	Augmentation de hauteur de la plaque de croissance, sans augmentation de la prolifération cellulaire Dommages dans la plaque de croissance Désorganisation de l'arrangement colonnaire	Changement non normalisé
<b>Alberty, 1993 [130]</b>	<input type="checkbox"/> <i>in vitro</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>in vivo</i>  <u>Modèle animal:</u> lapin  <u>Tissus:</u> fémur	Tension et compression (intensité inconnue)	Augmentation de la taille des zones proliférative et hypertrophique sans changement sur la prolifération des cellules pour le chargement en tension Diminution de la taille des zones proliférative et hypertrophique avec une réduction de la prolifération des cellules pour le chargement en compression	Changement non normalisé

### Étude avec chargement statique versus dynamique

<b>Sergerie, 2010 [120]</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>in vitro</i> <input type="checkbox"/> <i>in vivo</i>  <u>Modèle animal:</u> porc  <u>Tissus:</u> ulna	Déformation de 10% 0,1 Hz	Réduction de l'épaisseur de la plaque de croissance pour le groupe dynamique et statique (19,5%) Réduction de l'épaisseur des zones proliférative et hypertrophique combinée: - 39% pour le groupe statique - 18% pour le groupe dynamique	-
<b>Wang, 2002 [117]</b>	<input type="checkbox"/> <i>in vitro</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>in vivo</i>  <u>Modèle animal:</u> lapin  <u>Tissus:</u> os maxillaire	2 N Tension 0-1 Hz 20 min/jr sous anesthésie	Augmentation de la prolifération cellulaire: - 24% des chondrocytes en division active (contrôle) - 43% (dynamique) - 41% (statique)	Changement non normalisé et non équivalent
<b>Wang, 2002 [118]</b>	<input type="checkbox"/> <i>in vitro</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>in vivo</i>  <u>Modèle animal:</u> lapin  <u>Tissus:</u> os maxillaire	2 N Tension 0-1 Hz 20 min/jr sous anesthésie	Augmentation de la hauteur de la plaque de croissance: - 16% (statique) - 54% (dynamique) Augmentation marquée dans la zone proliférative: - 116% (statique) - 193% (dynamique) Augmentation du nombre de chondrocytes dans la zone proliférative: - 0% (statique) - 65% (dynamique)	Changement non normalisé et non équivalent
<b>Robling, 2001 [5]</b>	<input type="checkbox"/> <i>in vitro</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>in vivo</i>  <u>Modèle animal:</u> rat  <u>Tissus:</u> ulna	8,5-17 N Compression 10 min/jr sous anesthésie 0-2 Hz	Augmentation de la hauteur de la plaque de croissance: - 49% pour les groupes chargés à 17 N de manière statique - 63% pour les groupes chargés à 17 N de manière dynamique Augmentation particulièrement marquée dans la zone hypertrophique - 70% pour les groupes chargés à 17 N de manière statique - 463% pour les groupes chargés à 17 N de manière dynamique	Changement non normalisé et non équivalent Non cohérent avec de nombreuses études pour le chargement statique

### Études avec chargement dynamique

<b>Othman, 2007 [119]</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>in vitro</i> <input type="checkbox"/> <i>in vivo</i> <u>Modèle animal:</u> lapin <u>Tissus:</u> base du crâne	200 mN (0,027 MPa) Compression 1Hz	Augmentation du nombre de chondrocytes/mm <sup>2</sup> (36%) Augmentation de l'épaisseur de la plaque de croissance (3%)	-
<b>Niehoff, 2004 [11]</b>	<input type="checkbox"/> <i>in vitro</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>in vivo</i> <u>Modèle animal:</u> rat <u>Tissus:</u> fémur	Différents niveaux d'activité (accès ± restreint à une roue d'exercice)	Diminution de la hauteur de la plaque de croissance pour les rats ayant accès à la roue: - diminution pour les zones hypertrophique et proliférative pour le groupe ayant accès à la roue 100% du temps. - diminution pour la zone proliférative pour le groupe ayant accès à la roue 50% du temps.	Chargement non contrôlé
<b>Ohashi, 2002 [12]</b>	<input type="checkbox"/> <i>in vitro</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>in vivo</i> <u>Modèle animal:</u> rat <u>Tissus:</u> ulna	4-8,5-17 N Compression 2 Hz 10 min/jr sous anesthésie	Augmentation de la taille de la plaque de croissance (en particulier de la zone hypertrophique) Augmentation du nombre de chondrocytes	Chargement non normalisé
<b>Simon, 1978 [131]</b>	<input type="checkbox"/> <i>in vitro</i> <input checked="" type="checkbox"/> <i>in vivo</i> <u>Modèle animal:</u> rat bipède <u>Tissus:</u> 4 <sup>ème</sup> métatarsien	Chargement provoqué par l'amputation du 5 <sup>ième</sup> métatarsien (intensité et fréquence inconnue)	Diminution de 50% de la taille des colonnes de chondrocytes pour les rats amputés	Chargement non contrôlé

#### 1.4.2.1 Chargement statique

La modulation de croissance induite par les **chargements statiques en compression** est accompagnée, au niveau de l'histomorphométrie de la plaque de croissance, d'une diminution de la hauteur totale de la plaque [3] due à une diminution de hauteur des zones proliférative et hypertrophique [4, 9, 101, 130]. La diminution de hauteur dans la zone proliférative est due à une diminution du nombre de chondrocytes [7, 130] ainsi qu'une diminution de leur taux de prolifération [4, 7, 101, 130, 132]. Cette prolifération cellulaire est ralentie mais pas intégralement arrêtée [4, 101, 130, 132]. Au niveau de la zone hypertrophique, la diminution de hauteur est associée à une diminution du nombre de chondrocytes ainsi qu'une diminution de leur volume [4, 7, 9, 101]. Enfin, les charges en compression altèrent l'arrangement colonnaire de la plaque de croissance [101, 130, 132]. Les **chargements statiques en tension** entraînent quant à eux une augmentation de l'épaisseur totale de la plaque de croissance [9, 116, 130]. Cette

augmentation est principalement due à l'augmentation de l'épaisseur de la zone hypertrophique [9, 101, 116, 130, 133] avec une augmentation du nombre de chondrocytes et de leur taille [9, 104]. La zone proliférative subit aussi une expansion [116, 130], qui semble indépendante de la prolifération des chondrocytes [101, 116, 130]. Selon Wang et al. [117], cette expansion est au contraire accompagnée d'une augmentation de la prolifération cellulaire.

#### 1.4.2.2 Chargement dynamique

L'effet des charges dynamiques sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance n'est une nouvelle fois pas clairement définis dans la littérature. Au même titre que les charges statiques en compression [3, 4, 7, 101, 130], les **charges dynamiques en compression** basées sur l'exercice volontaire dans une cohorte de rat entraînent une diminution de l'épaisseur de la plaque de croissance [11]. Cette étude corrobore une étude de Simon [131], où les charges dynamiques sur le 4<sup>ème</sup> métatarsien provoqué par l'amputation du 5<sup>ème</sup> métatarsien provoque une diminution de moitié de l'épaisseur de la plaque de croissance. En revanche, les études d'Ohashi et al. [12] et de Robling et al. [5] rapportent des résultats opposés, avec une augmentation de l'épaisseur de la plaque de croissance soumise à un chargement dynamique en compression. Cette augmentation est particulièrement marquée dans la zone hypertrophique et s'accompagne d'une augmentation du nombre de chondrocytes. Il est à noter que l'étude de Robling et al. [5] conclue aussi à une augmentation de l'épaisseur de la plaque de croissance soumise à un chargement statique, tel que décrit dans la partie précédente, cela va à l'encontre de la majorité des études. Les deux études *in vitro* d'Othman et al. [119] et Sergerie et al. [120] trouvent aussi des résultats contradictoires, respectivement augmentation et diminution de l'épaisseur de la plaque de croissance soumise à un chargement dynamique en compression. Enfin, selon Wang et al. [117], le **chargement dynamique en tension** augmenterait la hauteur de la plaque de croissance et de ses zones proliférative et hypertrophique. Cette augmentation est accompagnée d'une augmentation du nombre de chondrocytes.

#### 1.4.3 Conclusion

Les principales études portant sur la mécanobiologie de la plaque de croissance utilisent des modèles animaux tels que le rat, le veau, le lapin ou le porc. Les approches utilisées peuvent être *in vivo* ou *in vitro*. L'avantage des études *in vivo* est d'inclure toutes les interactions biologiques

impliquées dans la croissance longitudinale des os. De plus, les études *in vivo* sont les seules permettant d'investiguer le taux de croissance.

Dans toutes ces études, le contrôle du chargement est un élément clé. Cela inclut le contrôle du niveau de chargement et de la fréquence (en mode dynamique). La normalisation de ces chargements par rapport à la taille des échantillons est essentielle pour l'analyse comparative des résultats et des études entre elles. En effet, une force identique, mais appliquée sur des échantillons de taille variable, aura des effets indéniablement variables. Il est aussi important de noter l'importance de l'utilisation d'un groupe sham. L'analyse de ce type de groupe permet de s'assurer que les effets observés sont bien liés à transmission des charges et non à la procédure expérimentale ou chirurgicale employée. Selon le protocole expérimental utilisé, l'étude d'un groupe sham peut cependant ne pas être possible [5, 12] ou ne pas être applicable [11], ce qui peut constituer une limite.

Basé sur les études répertoriées, l'effet des chargements statiques apparaît clairement caractérisé alors que des résultats contradictoires sont rapportés pour l'impact des chargements dynamiques sur la croissance. Ces disparités pourraient être attribuées à certaines limites méthodologiques qui, conséquemment, ne permettent pas de comparer les résultats (statique *versus* dynamique) entre eux.

## CHAPITRE 2 RATIONNELLE DU PROJET

Les principaux points de la revue des connaissances présentée au Chapitre 1 et traitant de l'influence de l'environnement mécanique sur la modulation de croissance et sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance sont résumés ci-dessous:

- La croissance longitudinale des os, qualifiée de « croissance en bout », a lieu au droit des plaques de croissance, tissus cartilagineux situés à l'extrémité des os.
- L'environnement mécanique peut modifier le taux de croissance et l'histomorphométrie de la plaque de croissance; ce phénomène réfère à la modulation mécanique de croissance.
- La modulation mécanique de croissance est impliquée dans la progression de déformations musculosquelettiques pédiatriques et est exploitée dans de nouvelles approches de traitements dites minimalement invasives.
- Basé sur la loi de Hueter-Volkmann, une augmentation de compression statique sur les plaques de croissance ralentit la croissance, et inversement, une réduction de compression statique l'accélère.
- La modulation de croissance due à une compression statique s'accompagne d'une diminution de la hauteur de la plaque de croissance et de ses trois différentes zones, d'une diminution de la division cellulaire dans la zone proliférative et d'une diminution de la hauteur des chondrocytes dans la zone hypertrophique.
- L'influence du chargement dynamique sur la croissance n'est pas clairement déterminée, bien que ce type de charge soit plus représentatif des sollicitations subies par le corps humain au quotidien.
- Les études comparant l'influence des charges statique et dynamique utilisent des paramètres de chargement non rigoureusement contrôlés, non normalisés ou non équivalents en termes de chargement moyen résultant. De plus, ces études présentent des résultats contradictoires.

De ces points ressortant de la revue de littérature, les questions de recherche suivantes sont posées:

- Quel type de chargement, statique ou dynamique, offre le meilleur potentiel de modulation de croissance osseuse ?
- Quel type de chargement, statique ou dynamique, est le moins dommageable pour la plaque de croissance ?

## 2.1 Hypothèse

Afin de répondre à ces deux questions de recherche, l'hypothèse de recherche suivante est formulée:

*« In vivo, des compressions normalisées, finement contrôlées et équivalentes en termes de chargement moyen résultant ont, en fonction de leur mode d'application (statique ou dynamique), des effets différents sur le taux de croissance et sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance. »*

Dans ce projet, l'histomorphométrie de la plaque de croissance est caractérisée par: l'épaisseur totale de la plaque de croissance et de ses trois différentes zones, le nombre de chondrocytes par colonne et leur densité linéaire dans la zone proliférative et enfin la hauteur des chondrocytes de la zone hypertrophique. Afin de confirmer ou de réfuter cette hypothèse, une étude *in vivo* basée sur le chargement de la 7<sup>ème</sup> vertèbre caudale de rat est effectuée. Les rats sont séparés en quatre groupes: un groupe « contrôle » (a), un groupe « sham » (b), un groupe chargé de manière « statique » (c) et un groupe chargé de manière « dynamique » (d). Les rats du groupe (b) sont opérés, tout comme les rats des groupes (c) et (d), mais aucune charge ne leur est appliquée, le but étant d'évaluer l'effet de la procédure chirurgicale. L'hypothèse de recherche sera réfutée si les différences obtenues entre les différents groupes ne sont pas statistiquement significatives (i.e. si  $p > 0.01$ ).

## 2.2 Objectifs principal et spécifiques

Afin de réaliser cette étude et tester l'hypothèse de recherche, plusieurs objectifs sont déterminés. L'objectif principal est le suivant:

*« Caractériser puis comparer les effets d'un chargement *in vivo* en compression statique et dynamique sur le taux de croissance osseuse et l'histomorphométrie de la plaque de croissance dans un modèle animal de rat. »*

Cet objectif principal est divisé en quatre sous-objectifs spécifiques :

- O1) Développer le protocole expérimental relatif au chargement de la 7<sup>ème</sup> vertèbre caudale de rat et à la mesure des différents paramètres (taux de croissance et histomorphométrie de la plaque de croissance), incluant la conception des différents composants du protocole et des différents outils nécessaires à sa réalisation.
- O2) Effectuer l'étude expérimentale sur un total de 24 rats, soit 6 rats dans chacun des quatre groupes (contrôle, sham, statique et dynamique).
- O3) Effectuer les mesures de taux de croissance et des différents paramètres histomorphométriques 2D de la plaque de croissance.
- O4) Compléter une analyse statistique comparative entre les quatre groupes de rats pour caractériser l'effet de la procédure chirurgicale et du mode de chargement (statique *versus* dynamique).

## 2.3 Organisation du mémoire

La Figure 2.1 illustre les objectifs et présente une description méthodologique sommaire du projet dont la réalisation est décrite par l'entremise d'un article scientifique. Cet article, présenté dans le Chapitre 3, constitue le corps de ce mémoire. Des aspects méthodologiques et des résultats complémentaires, non présentés dans l'article, sont respectivement détaillés dans le

Chapitre 4 et le Chapitre 5. Une discussion générale (Chapitre 6) et une conclusion complètent ce mémoire.

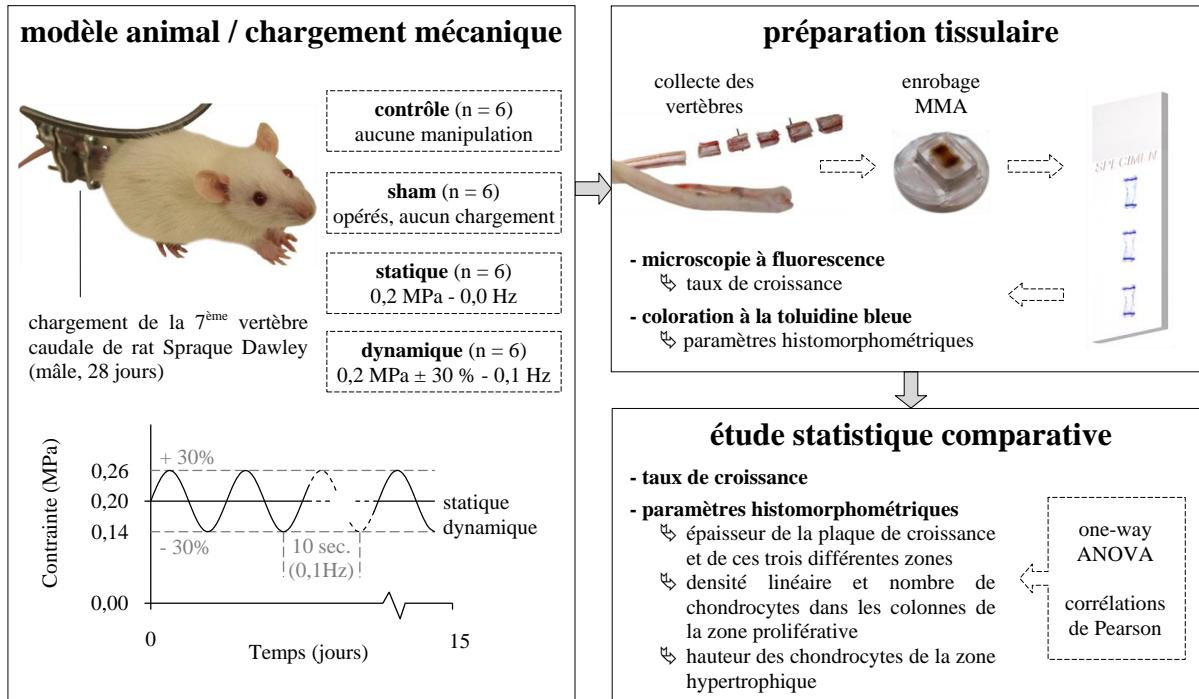


Figure 2.1: Résumé graphique du projet

## CHAPITRE 3 ARTICLE: IN VIVO DYNAMIC BONE GROWTH MODULATION IS LESS DETRIMENTAL BUT AS EFFECTIVE AS STATIC GROWTH MODULATION

Barthélémy Valteau<sup>1,2</sup>, Guy Grimard<sup>2</sup>, Irène Londono<sup>2</sup>, Florina Moldovan<sup>2,3</sup>, Isabelle Villemure<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> École Polytechnique de Montréal, Department of Mechanical Engineering, P.O. Box 6079, Station “centre-ville”, Montréal, Québec, Canada H3C 3A7

<sup>2</sup> Sainte-Justine University Hospital Center, 3175 Côte-Ste-Catherine Rd., Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

<sup>3</sup> Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station “centre-ville”, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

### Authors' email addresses:

Barthélémy Valteau: barthelemy-pierre.valteau@polymtl.ca

Guy Grimard: guy\_grimard@sss.sss.gouv.qc.ca

Irène Londono: irene.londono@umontreal.ca

Florina Moldovan: florina.moldovan@umontreal.ca

Isabelle Villemure: isabelle.villemure@polymtl.ca

### Number of word in the abstract: 288 words.

La contribution du premier auteur à la rédaction de l'article est de 85%. L'article a été soumis le 02 Mai 2011 pour publication dans la revue scientifique *Bone*.

### 3.1 Abstract

Longitudinal bone growth, which occurs in growth plates, has important implications in pediatric orthopaedics. Mechanical loads are essential to normal bone growth, but excessive loads can lead to progressive deformities. In order to compare the effects of *in vivo* static and dynamic loading on bone growth rate and growth plate histomorphometry, a finely controlled, normalized and equivalent compression was applied for a period of two weeks on the seventh caudal vertebra (Cd7) of rats during their pubertal growth spurt. The load was sustained (0.2 MPa, 0.0 Hz) in the static group and sinusoidally oscillating (0.2 MPa  $\pm$  30%, 0.1 Hz) in the dynamic group. Control and sham (operated but no load applied) groups were also studied. Cd7 growth rate was statistically reduced by 19% ( $p < 0.001$ ) for both static and dynamic groups when compared to the sham group. Loading effects on growth plate histomorphometry were greater in the static than dynamic groups with significant reductions ( $p < 0.001$ ) observed for growth plate thickness, proliferative chondrocyte number per column and hypertrophic chondrocyte height in the static group when compared to the sham group. Significant differences ( $p < 0.01$ ) were also found between static and dynamic groups for growth plate thickness and proliferative chondrocyte number per column while the difference nearly reached significance ( $p = 0.014$ ) for hypertrophic chondrocyte height. This *in vivo* study shows that static and dynamic loading are equally effective in modulating bone growth of rat caudal vertebrae. However, dynamic loading causes less detrimental effects on growth plate histomorphometry compared to static loading. This knowledge is greatly relevant for the improvement and/or development of new minimally invasive approaches, which are based on the local modulation of bone growth, to correct several progressive musculoskeletal deformities.

**Keywords:** growth plate, *in vivo* static/dynamic compression, rodent animal model, histomorphometry, growth rate, mechanobiology.

### 3.2 Introduction

The growth plate is a connective tissue composed of cells (chondrocytes) embedded in a highly hydrated extracellular matrix. It is involved in longitudinal bone growth that results from a synchronized spatio-temporal process involving chondrocyte differentiation within the three histological zones of the growth plate: the reserve, proliferative and hypertrophic zones. Each

zone differs in chondrocyte size and arrangement as well as extracellular matrix composition and plays a specific role in the bone growth. Bone growth is a complex interplay between rapid cell division in the proliferative zone (where chondrocytes are flat and arranged into longitudinal columns), substantial cell enlargement in the hypertrophic zone (where chondrocytes begin their terminal differentiation) and extracellular matrix synthesis [1, 2]. Wilsman et al. [3] ranked the contribution of these parameters to bone growth as follows: (1) the expansion of chondrocytes in the hypertrophic zone, (2) the synthesis of extracellular matrix in both proliferative and hypertrophic zones and (3) the cellular division in the proliferative zone.

There is strong clinical and experimental evidence that growth plates are sensitive to their mechanical environment. According to the Hueter-Volkmann law, increased pressure on the growth plate retards bone growth and, conversely, reduced pressure exacerbates it. This phenomenon refers to mechanical growth modulation which contributes to a vicious cycle that sustains the progression of infantile and juvenile musculoskeletal deformities including adolescent idiopathic scoliosis (AIS) or Blount's disease [4, 5]. In the case of AIS, an initial angular deformation of the vertebral body leads to an asymmetric pressure on the growth plate, which in turn results in asymmetric growth thereby contributing to vertebral wedging. This vertebral wedging aggravates the asymmetric pressure and so on [4]. Mechanical growth modulation also has key implications in the treatment of these deformities, where there is an increasing interest for the development and/or improvement of minimally invasive approaches that locally target the modulation of growth to correct deformities while preserving bone growth, motion and segment function. Some treatment approaches used in pediatric orthopedics rely on some form of growth modulation (epiphysiodesis [6], staple across the growth plate [7]) but the optimal loading regimen remains to be clearly defined.

Several *in vivo* studies have examined the mechanobiology of the growth plate using animal models. Under compressive sustained (static) loading, many studies reported a reduction in bone growth rate, in agreement with the Hueter-Volkmann law [4, 8-15]. In terms of growth plate histomorphometry, sustained compression reduced the thicknesses of the growth plate [8, 16] and the proliferative and hypertrophic zones [10, 15, 17] as well as the organization of chondrocytic columns [10, 17, 18]. These effects were accompanied by reduced chondrocyte number [13] and proliferation [10, 17, 18] in the proliferative zone as well as decreased chondrocyte number [10] and enlargement [10, 13, 15] in the hypertrophic zone. In contrast, despite the fact that cyclic

(dynamic) loading reproduces more physiological conditions, its effects on the growth rate are currently not clearly determined. Indeed, a study by Niehoff et al. [19] showed no difference in the femoral length of rats assigned to different levels of physical activity, while Ohashi et al. [20] reported a dose-dependent growth rate reduction in rat ulnae exposed to different levels of dynamic compression. Furthermore, other studies compared the effects of static *versus* dynamic loading on growth plate mechanobiology. Robling et al. [11] found the same dose-dependent modulation of rat ulnae growth regardless of the type of compressive loading, static or dynamic, whereas Akyuz et al. [9] reported greater effects of asymmetrical load for dynamic than static compression in a study on rat caudal vertebrae. Reports of dynamic loading on growth plate histomorphometry are similarly inconsistent. Niehoff et al. [19] noted a thinning of the growth plate with a reduction of both proliferative and hypertrophic zone thicknesses while Ohashi et al. [20] and Robling et al. [11] found a thickening of the growth plate and hypertrophic zone associated with an increased number of hypertrophic chondrocytes following dynamic compressive loading of ulnae. However, these *in vivo* studies investigating the effects of dynamic compression, used loading parameters which were not well controlled, normalized or matched in terms of averaged stress [9, 11, 19, 20]. Hence, the few comparative static/dynamic *in vivo* studies present inconsistent results as well as methodological limitations, which impede conclusive comparison between these two loading regimens.

The aim of this study is to determine the *in vivo* effects of finely controlled static *versus* dynamic compression on: (1) the growth rate and (2) the histomorphometry of the growth plate undergoing an equivalent averaged stress of 0.2 MPa applied with a calibrated pneumatic micro-loading device. The hypothesis is that the growth plate responds differently to *in vivo* static and dynamic loading. A better understanding of the factors involved in both static and dynamic loading is essential to improve and/or develop innovative minimally invasive techniques exploiting local growth modulation for the treatment of progressive musculoskeletal deformities.

### 3.3 Materials and methods

#### 3.3.1 Animal model and mechanical loading

With the approval of the Institutional Animal Care Committee, a total of 24 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four six-rat groups: control, sham, static and dynamic.

After one week of acclimatization, the sham, static and dynamic groups were operated at 28 days old for a 15-day period. A 0.2 MPa sustained compressive stress (force over transverse area) was applied on the seventh caudal vertebra (Cd7) for the static group while a sinusoidally oscillating compressive stress (0.2 MPa  $\pm$  30%, 0.1 Hz) was applied on rats of the dynamic group. Both types of loading were then matched in terms of averaged stress. Moreover, the compression stress, which was normalized to the vertebral transverse size (perpendicular to the tail axis), was maintained at 0.2 MPa during all the experiment. To do so, the force was increased every day to compensate for the lateral growth of the transverse vertebral area, similarly to the procedure used in Cancel et al. [8]. The Cd7 transverse area was calculated as a circular surface and equation (1) was used to estimate the Cd7 diameter as a linear function of age, based on a morphological study on rat caudal vertebrae [8].

$$\phi_{Cd7}(\text{mm}) = 0.0271 \times \text{Age}(\text{days}) + 1.5076 \quad (1)$$

Caudal vertebrae were chosen because of their accessibility, the possibility of having inter-animal controls using adjacent vertebrae, and because this model was well established [8, 9, 12-15, 21]. To determine the effects of the surgical procedure, the sham group was operated but no loading was applied to Cd7. Rats from the control group were maintained in identical conditions but did not undergo manipulation prior to euthanasia.

### 3.3.2 Pneumatic device, calibration and experimental setup

An air pressure operated device was designed to transmit static or dynamic loading on Cd7 as previously described by Walsh et al [22] (Figure 3.1A). This device is basically composed of two rigid fixations implanted percutaneously through the sixth (Cd6) and eighth (Cd8) caudal vertebrae with two pins per fixation (0.6-mm diameter Kirschner-wires, Medeco-ch, Prangins, VD, Switzerland). The compression is generated by an inflatable circular latex bladder (California Medical Innovations, Pomona, CA, USA). The force generated by the device, i.e. the compression on Cd7, directly results from bladder inflation and, conversely, the force is removed upon bladder deflation. This inflation depends on the pressurization regulated by an electronic valve (Omega, Stamford, CT, USA) and is precisely controlled by a standard oscilloscope (Tectronix, Beaverton, OR, USA) (Figure 3.1B).

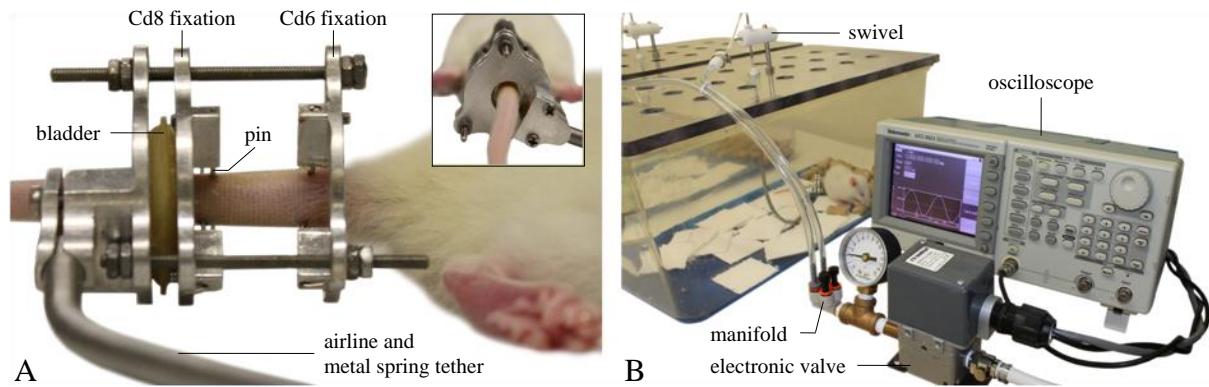


Figure 3.1: Experimental setup. (A) Air driven micro-loading device installed on the rat tail. (B) Air pressure control system for two operated rats.

The pressure remained constant for the static group, whereas the valve provided a waveform pressure proportional to an analog input voltage from the oscilloscope in the dynamic group. The frequency of the waveform pressure, i.e. the frequency of Cd7 loading (0.1 Hz), is the frequency of the sinusoidal input voltage. Prior to running the experiments, two identical devices were accurately calibrated with a micromechanical testing system (Mach-1, Biomomentum, Laval, QC, Canada). To do so, increasing/decreasing input voltage was applied to inflate the bladder and, for each voltage level, the force generated from the device was measured with a load cell, whose range and resolution were 17 N and 0.026 N respectively. The resulting average force/voltage relationship is presented in Figure 3.2. This relationship was verified after experimentation and the perfect reliability of the calibration of the two devices was then confirmed. The resulting work-pressure for bladder inflation ranged between 1.5-4 psi during the experiment.

The experimental setup was composed of a manifold, which divided the airline from the valve to the two pneumatic devices. Swivels (Lomir, N.D. Ile-Perrot, QC, Canada) were fixed above each cage to allow the pneumatic airline to rotate without twisting and hence provided the animals with free motion in their environment (Figure 3.1B). The airline from the bladder to the swivel was protected by a metal spring tether to prevent rodent deterioration. In addition, rats were placed in individual cages to avoid entanglement and with dry litter to avoid disturbance of the

applied load and minimize infection. The non-operated rats of the control group were placed in the same conditions as the sham, static and dynamic groups.

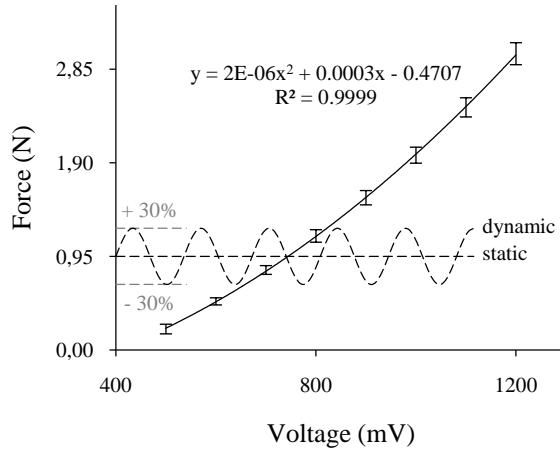


Figure 3.2: Force-voltage relationship resulting from the calibration of two identical devices (mean value  $\pm$  SD). Dotted lines show an example of static and dynamic 0.2 MPa loading for a 35-day old rat, for which Cd7 transverse area was evaluated at 4.74 mm<sup>2</sup>.

### 3.3.3 Surgical procedure and tissue preparation

One hour prior to surgery, an antibiotic (Baytril, 5 mg/Kg) and an analgesic (Buprenorphine, 50 µg/Kg) were injected subcutaneously to prevent infection and pain. At 28 days old, every operated rat (sham, static and dynamic) was anesthetized with Isoflurane for the 30-minute surgery. Rat caudal vertebrae were first properly located using a fluoroscope (Figure 3.3A). Then, a custom designed surgical guide was used to ensure perfect centering of the tail in the device as well as perpendicularity of the pin fixations in Cd6 and Cd8 with the tail axis (Figure 3.3B). A final fluoroscopic image confirmed the correct insertion of the pins and the overall installation of the micro-loading device (Figure 3.3C).

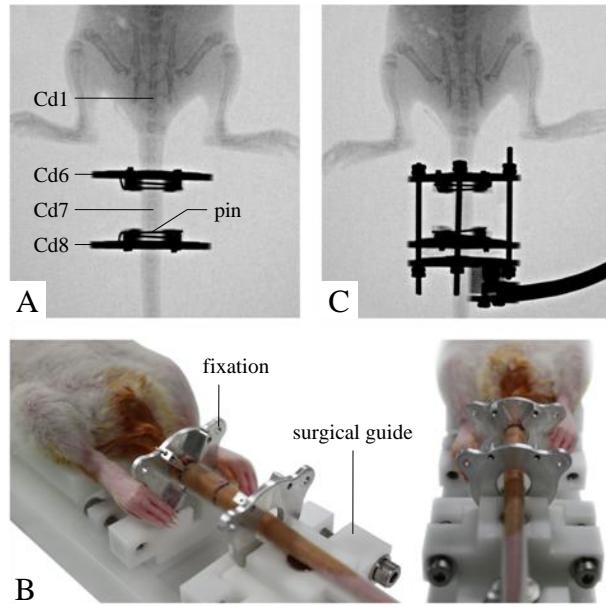


Figure 3.3: Surgical procedure. (A) Fluoroscopic identification of caudal vertebrae. (B) Surgical guide ensuring centering and perpendicularity of the device with the tail. (C) Post-operative fluoroscopic image showing the pneumatic device ready for loading of Cd7 vertebra.

The surgical procedure was well tolerated by rats with resumption of normal behavior within two hours. A second analgesic injection (Buprenorphine, 50 µg/Kg) was done eight hours after surgery to manage pain. Loading began immediately after surgery by applying an initial pressure in the devices, controlled by the force/voltage relationship shown in Figure 3.2 and the devices were adjusted every day to compensate for the longitudinal growth of the vertebra. This procedure was performed under very short Isoflurane anesthesia, after which the rats regained normal behavior within ten minutes. Similarly to the procedure used in Cancel et al. [8], all rats were intraperitoneally injected with calcein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a fluorescent mineralizing bone label (Figure 3.4A), five days and two days prior to sacrifice at a dosage of 15 mg/Kg. The rats were euthanized (by CO<sub>2</sub> asphyxiation) at 43 days old, after the 15-day period. The animals tolerated the device and loading well: there were no signs of increased stress or pain

during the experiment and the device did not restrict their movements. Immediately after euthanasia, the skin was carefully removed and the vertebrae were separated by cutting through intervertebral discs. Cd7 and the most adjacent vertebrae that were external of the pneumatic device, namely Cd5 and Cd9, were collected. Cd5 and Cd9 were used as inter-animal control vertebrae. All vertebral tissues were fixed for 48 hours in 10% formalin (Anachemia, Montreal, QC, Canada), dehydrated in a graded series of ethanol, processed through xylene and finally embedded in methylmethacrylate (MMA) (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

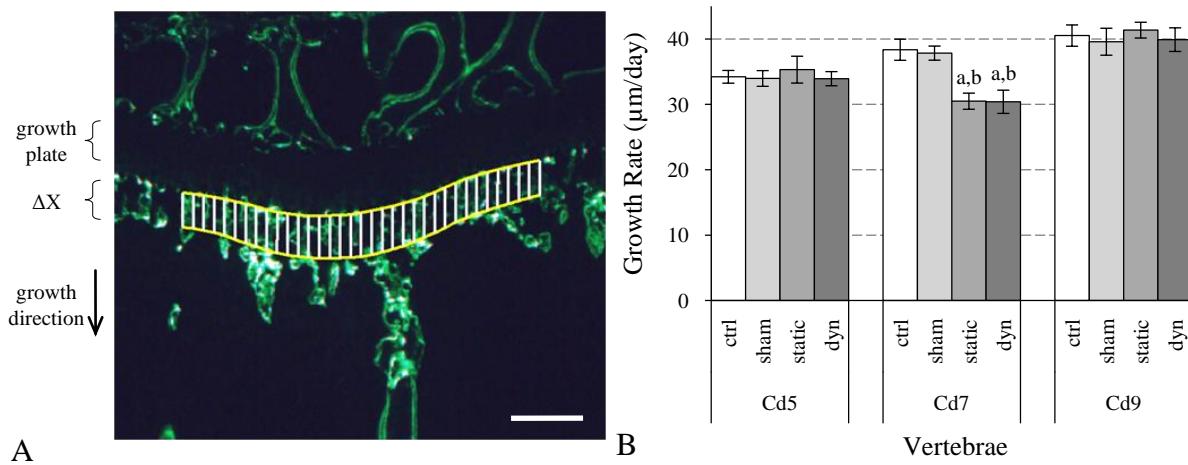


Figure 3.4 : Growth rate measurements. (A) Labeling of bone growth with calcein. Growth labels, which are marked by yellow lines, correspond to the two calcein injections. Scale bar represents 200  $\mu$ m. (B) Growth rates ( $\mu$ m/day) along the rat tail (for Cd5, Cd7 and Cd9) for the control, sham, static and dynamic groups (mean value  $\pm$  SD). a:  $p < 0.001$  compared to control Cd7, b:  $p < 0.001$  compared to sham Cd7.

### 3.3.4 Growth rate and histomorphometry measurement

For all samples, a total of 12 spatially separated sections (6  $\mu$ m thick) were longitudinally cut using an ultramicrotome (heavy-duty sliding microtome, Leica SM250). Six sections were directly used for growth rate measurement and six sections were stained with 0.2% toluidine blue for the histomorphometric measurements. Toluidine blue staining combined with MMA

embedding provides sharp definition of chondrocyte structure on very thin growth plate sections. Two images were acquired on each vertebral section, one of the distal growth plate and one of the proximal, using a microscope (Leica DMR with a Retiga Qimaging Camera). The growth rate and histomorphometric parameters were hence evaluated on a total of 12 images for each caudal vertebra (two images x six sections). All measurements were done using a custom designed MATLAB R2008 (MathWorks, Natick, MA, USA) application, previously used by Sergerie et al. [23].

The growth rate was measured on 5X-magnified images as the distance ( $\Delta X$ ) between the double fluorochrome labels in the growth plate metaphyseal junction divided by three (for the three-day interval between the two calcein injections) (Figure 3.4A). A total of 1200 measurements spatially distributed in each vertebra were completed and averaged, corresponding to 100 measurements taken parallel to the growth direction and evenly separated in each of the 12 images.

Six histomorphometric parameters were further measured: (1) the total growth plate thickness, (2) the proliferative zone thickness, (3) the hypertrophic zone thickness, (4) the number of chondrocytes per column in the proliferative zone, (5) the columnar density of chondrocytes in the proliferative zone and finally and (6) the height of chondrocytes in the hypertrophic zone (Figure 3.5). The reserve zone thickness was calculated by subtracting the proliferative and hypertrophic zone thicknesses from the total growth plate thickness. The respective ratios of the three different zones thicknesses with respect to the total growth plate thickness were also evaluated. Similarly to growth rate evaluation, a total of 1200 measurements were completed on 10X-magnified images for the evaluation of the total growth plate thickness as well as the proliferative and hypertrophic zone thicknesses (Figure 3.5A). A total of 60 columns were evaluated for the number of chondrocytes per column and for the columnar density of chondrocytes in the proliferative zone, i.e. five columns, evenly separated and crossing the proliferative zone thickness, which were evaluated for each of the 12 images (Figure 3.5B). Finally, a total of 240 chondrocytes were measured for the height of hypertrophic cells, i.e. the 20 most hypertrophied chondrocytes measured for each of the 12 images (Figure 3.5B). 20X-magnified images were used for the evaluation of these three last histomorphometric parameters (Figure 3.5B).

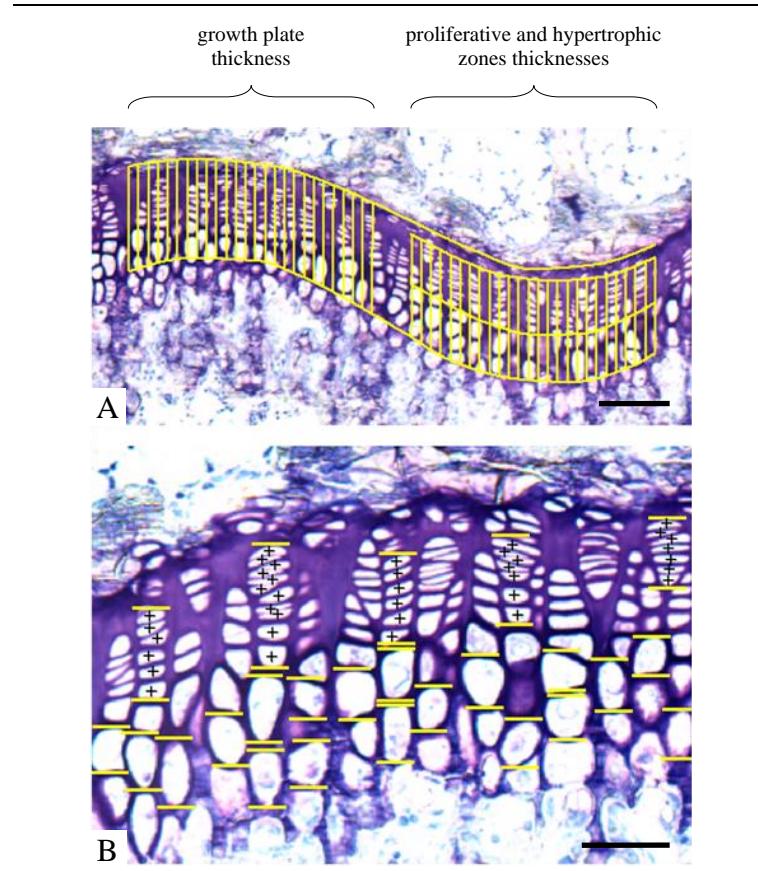


Figure 3.5: Growth plate section embedded in MMA and stained with toluidine blue. (A) Evaluation of the total growth plate and zonal thicknesses. Scale bar represents 100  $\mu$ m. (B) Evaluation of the number of chondrocytes per column and the columnar density of chondrocytes in the proliferative zone as well as the height of hypertrophic cells. Scale bar represents 50  $\mu$ m.

Based on previous work by Cancel et al. [8] who investigated the effects of static compression on bone growth rate and growth plate thickness, six rats per groups were similarly chosen to detect significant differences. Statistical analyses were done using SigmaPlot (Systat Software, Chicago, IL, USA). One-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures was used to detect differences between the means obtained in each group (control, sham, static and dynamic). The test was distinctly completed for each vertebra (Cd5, Cd7 and Cd9). Post-hoc comparisons

between groups were done using Tukey's method. For all tests, two levels of significance were investigated,  $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ . Results are presented as mean value  $\pm$  standard deviation (SD). The relationship between the number of chondrocytes per column and the proliferative zone thickness as well as the relationship between the height of chondrocytes and the hypertrophic zone thickness were also evaluated using Pearson correlation analysis. Correlations were considered significant if  $p < 0.001$ .

## 3.4 Results

### 3.4.1 Similar reduction in Cd7 growth rate following both static and dynamic loadings

Cd7 growth rate was reduced by 20.6% and 20.8% respectively for the static and dynamic groups when compared to the control group and by 19.3% and 19.6% when compared to the sham group. All these reductions were statistically significant ( $p < 0.001$ ) (Figure 3.4B and Table 3.1). No significant differences were found in growth rates between all groups for Cd5 and Cd9, the inter-animal control vertebrae (Figure 3.4B, Table 3.2 and Table 3.3).

Table 3.1: Growth rate and histomorphological measurements of Cd7 rat growth plates for control, sham, static and dynamic groups (mean value  $\pm$  SD)

loaded Cd7	control (n = 6)	sham (n = 6)	static (n = 6)	dynamic (n = 6)
growth rate ( $\mu\text{m/day}$ )	$38.4 \pm 1.6$	$37.8 \pm 1.1$	$30.5 \pm 1.2^{\text{a,b}}$	$30.4 \pm 1.8^{\text{a,b}}$
growth plate thickness ( $\mu\text{m}$ )	$189.5 \pm 5.0$	$175.5 \pm 5.1$	$150.9 \pm 7.8^{\text{a,b}}$	$168.9 \pm 13.0^{\text{c,d}}$
hypertrophic zone thickness ( $\mu\text{m}$ )	$69.7 \pm 5.1$	$66.4 \pm 5.1$	$54.4 \pm 3.2^{\text{a,e}}$	$61.1 \pm 4.9$
proliferative zone thickness ( $\mu\text{m}$ )	$99.1 \pm 6.8$	$91.2 \pm 3.7$	$80.4 \pm 5.0^{\text{a}}$	$85.3 \pm 7.6^{\text{c}}$
reserve zone thickness ( $\mu\text{m}$ )	$20.7 \pm 5.6$	$17.9 \pm 8.1$	$16.1 \pm 7.4$	$22.6 \pm 5.4$
number of prolif. cells per column (cells)	$9.4 \pm 0.5$	$8.3 \pm 0.6$	$6.4 \pm 0.3^{\text{a,b}}$	$7.6 \pm 0.6^{\text{a,d}}$
columnar density of prolif. cells (cells/ $\mu\text{m}$ )	$0.134 \pm 0.01$	$0.128 \pm 0.007$	$0.123 \pm 0.009$	$0.127 \pm 0.007$
hypertrophic cells height ( $\mu\text{m}$ )	$30.6 \pm 1.0$	$28.6 \pm 2.1$	$23.1 \pm 1.2^{\text{a,b}}$	$25.9 \pm 1.1^{\text{a}}$

a:  $p < 0.001$  compared to control Cd7, b:  $p < 0.001$  compared to sham Cd7, c:  $p < 0.01$  compared to control Cd7, d:  $p < 0.01$  compared to static Cd7, e:  $p < 0.01$  compared to sham Cd7.

Table 3.2: Growth rate and histomorphological measurement of Cd5 rat growth plates for control, sham, static and dynamic groups (mean value  $\pm$  SD)

inter-animal control Cd5	control (n = 6)	sham (n = 6)	static (n = 6)	dynamic (n = 6)
growth rate ( $\mu\text{m}/\text{day}$ )	$34.2 \pm 1.0$	$34.0 \pm 1.2$	$35.3 \pm 2.0$	$33.9 \pm 1.1$
growth plate thickness ( $\mu\text{m}$ )	$179.3 \pm 9.5$	$172.5 \pm 4.2$	$167.6 \pm 3.3$	$170.1 \pm 10.2$
hypertrophic zone thickness ( $\mu\text{m}$ )	$67.2 \pm 5.7$	$64.5 \pm 4.2$	$62.6 \pm 4.9$	$61.5 \pm 7.5$
proliferative zone thickness ( $\mu\text{m}$ )	$94.0 \pm 6.0$	$91.7 \pm 8.0$	$88.2 \pm 6.6$	$92.5 \pm 7.1$
reserve zone thickness ( $\mu\text{m}$ )	$18.1 \pm 4.2$	$16.3 \pm 10.6$	$16.7 \pm 7.9$	$16.0 \pm 5.1$
number of prolif. cells per column (cells)	$8.5 \pm 0.6$	$8.1 \pm 0.4$	$8.3 \pm 0.5$	$8.8 \pm 0.2$
columnar density of prolif. cells (cells/ $\mu\text{m}$ )	$0.130 \pm 0.006$	$0.139 \pm 0.006$	$0.132 \pm 0.003$	$0.137 \pm 0.009$
hypertrophic cells height ( $\mu\text{m}$ )	$27.8 \pm 1.3$	$27.9 \pm 1.5$	$26.3 \pm 0.7$	$27.1 \pm 1.2$

Table 3.3: Growth rate and histomorphological measurement of Cd9 rat growth plates for control, sham, static and dynamic groups (mean value  $\pm$  SD)

inter-animal control Cd9	control (n = 6)	sham (n = 6)	static (n = 6)	dynamic (n = 6)
growth rate ( $\mu\text{m}/\text{day}$ )	$40.5 \pm 1.6$	$39.6 \pm 2.1$	$41.4 \pm 1.2$	$39.9 \pm 1.8$
growth plate thickness ( $\mu\text{m}$ )	$201.6 \pm 12.7$	$205.7 \pm 4.8$	$204.9 \pm 6.1$	$207.1 \pm 11.8$
hypertrophic zone thickness ( $\mu\text{m}$ )	$77.4 \pm 5.2$	$76.6 \pm 3.4$	$78.0 \pm 6.3$	$78.1 \pm 5.8$
proliferative zone thickness ( $\mu\text{m}$ )	$99.2 \pm 9.0$	$102.7 \pm 6.9$	$101.5 \pm 6.3$	$99.6 \pm 7.3$
reserve zone thickness ( $\mu\text{m}$ )	$25.1 \pm 6.5$	$26.3 \pm 5.4$	$25.4 \pm 8.4$	$29.4 \pm 3.4$
number of prolif. cells per column (cells)	$11.0 \pm 0.3$	$10.9 \pm 0.5$	$10.0 \pm 0.3^{\text{f,g}}$	$10.5 \pm 0.5$
columnar density of prolif. cells (cells/ $\mu\text{m}$ )	$0.143 \pm 0.007$	$0.135 \pm 0.006$	$0.130 \pm 0.010$	$0.131 \pm 0.005$
hypertrophic cells height ( $\mu\text{m}$ )	$33.0 \pm 1.5$	$34.1 \pm 1.1$	$33.8 \pm 2.3$	$33.0 \pm 1.7$

f: p < 0.01 compared to control Cd9, g: p < 0.01 compared to sham Cd9.

For control and sham groups, growth rates generally increased from the shorter and thicker vertebra (Cd5) to the longer and thinner vertebra (Cd9) (Figure 3.4, Table 3.1, Table 3.2 and Table 3.3).

### **3.4.2 More significant reduction in Cd7 growth plate thickness following static loading compared to dynamic loading**

When compared to the control group, a reduction of 20.4% was observed in Cd7 growth plate thickness for the static group whereas a 10.9% reduction was observed in the dynamic group. When compared to the sham group, these reductions reached 14.0% and 3.8% for the static and dynamic groups respectively. The thickness reduction was highly significant ( $p < 0.001$ ) in the static group when compared to both sham and control groups. For the dynamic group, it was only significant ( $p < 0.01$ ) when compared to the controls. A statistically significant ( $p < 0.01$ ) difference was also noted between static and dynamic groups (Figure 3.6A and Table 3.1). No significant differences were observed in growth plate thickness between all groups in Cd5 and Cd9 inter-animal control vertebrae (Figure 3.6A, Table 3.2 and Table 3.3). For control and sham groups, growth plate thicknesses generally increased from the shorter and thicker vertebra (Cd5) to the longer and thinner vertebra (Cd9) (Figure 3.6A, Table 3.1, Table 3.2 and Table 3.3).

### **3.4.3 Similar proportions for the three growth plate zones thicknesses following both static and dynamic loadings**

Reserve, proliferative and hypertrophic zones thicknesses resulted in similar proportions of the complete growth plate in all groups and all caudal vertebrae. No statistically significant differences were found between groups for Cd5, Cd7 and Cd9 vertebrae. The average proportions in Cd7 vertebra reached 37%, 52% and 11% for the hypertrophic, proliferative and reserve zones respectively (Figure 3.6B). For Cd7 vertebra, highly significant reductions ( $p < 0.001$ ) were observed for both proliferative and hypertrophic zones thicknesses in the static group when compared to controls. The proliferative zone thickness was also significantly reduced ( $p < 0.01$ ) when compared to the sham group. For the dynamic group, a significant reduction ( $p < 0.01$ ) was observed in the proliferative zone thickness when compared to the controls (Table 3.1).

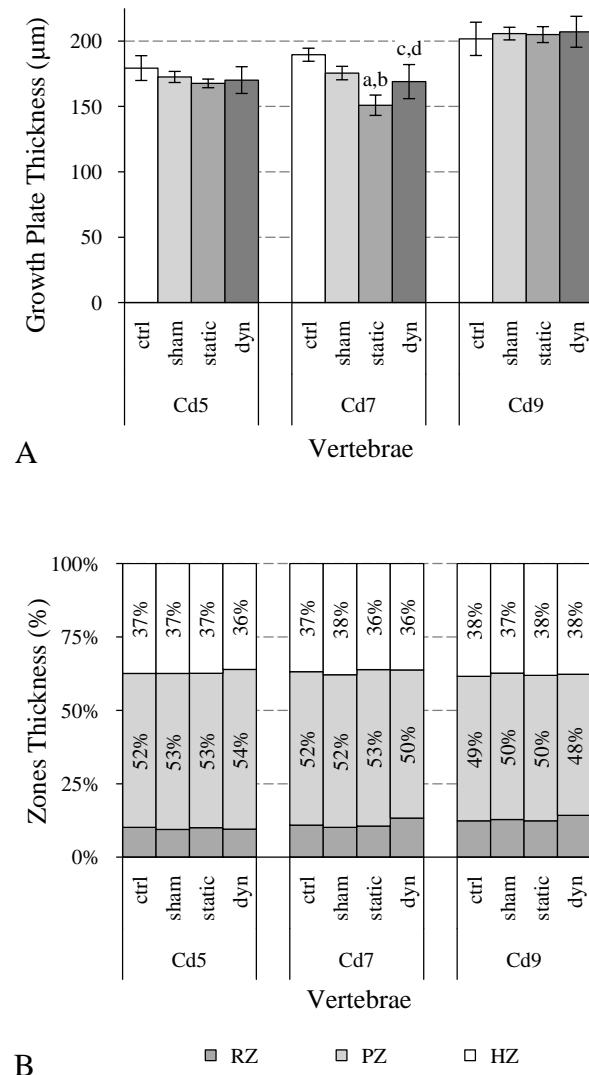


Figure 3.6: Histomorphological measurements. (A) Growth plate thickness (μm) along the rat tail (for Cd5, Cd7 and Cd9) for the control, sham, static and dynamic groups (mean value  $\pm$  SD). a:  $p < 0.001$  compared to control Cd7, b:  $p < 0.001$  compared to sham Cd7, c:  $p < 0.01$  compared to control Cd7, d:  $p < 0.01$  compared to static Cd7. (B) Thickness proportion (%) of the reserve (RZ), proliferative (PZ) and hypertrophic (HZ) zones with respect to the complete growth plate.

### 3.4.4 More significant changes in Cd7 cellular characteristics following static loading compared to dynamic loading

For Cd7 vertebra, the number of proliferative chondrocytes per column was statistically ( $p < 0.001$ ) reduced by 31.9% and 19.1% respectively for the static and dynamic groups when compared to the control group. When compared to the sham group, this reduction reached 22.9% and 8.4% and was statistically significant ( $p < 0.001$ ) for the static group only. Finally, a statistically significant ( $p < 0.01$ ) difference was noted between static and dynamic groups (Figure 3.7A and Table 3.1). In parallel, the columnar density of proliferative chondrocytes remained similar in all groups and for all vertebrae (Cd5, Cd7 and Cd9) and no significant difference was observed (Table 3.1, Table 3.2 and Table 3.3). For the Cd7 vertebra, hypertrophic chondrocyte height was statistically reduced ( $p < 0.001$ ) by 24.5% and 15.3% respectively for the static and dynamic groups when compared to the control group. When compared to the sham group, this reduction reached 19.2% and 9.4% and was statistically significant ( $p < 0.001$ ) for the static group only. Finally, the difference between static and dynamic group very closely approached significance ( $p = 0.014$ ) (Figure 3.7B and Table 3.1). No significant differences were found in Cd5 and Cd9 inter-animal control vertebrae for these three histomorphometric parameters except for the number of proliferative cells per column for the static Cd9 ( $p < 0.01$ ) when compared to control and sham Cd9 (Figure 3.7A, Figure 3.7B, Table 3.2 and Table 3.3). For control and sham groups, the number of chondrocytes per column in the proliferative zone as well as the height of hypertrophic chondrocytes generally increased from the shorter and thicker vertebra (Cd5) to the longer and thinner vertebra (Cd9) (Figure 3.7A, Figure 3.7B, Table 3.1, Table 3.2 et Table 3.3).

### 3.4.5 Correlations between cell characteristics and zone thicknesses

The proliferative zone thickness significantly correlated with the number of proliferative chondrocytes per column ( $r = 0.7$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 72$ ) (Figure 3.7C). In addition, a significant correlation was found between the hypertrophic zone thickness and hypertrophic chondrocyte height ( $r = 0.8$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 72$ ) (Figure 3.7D).

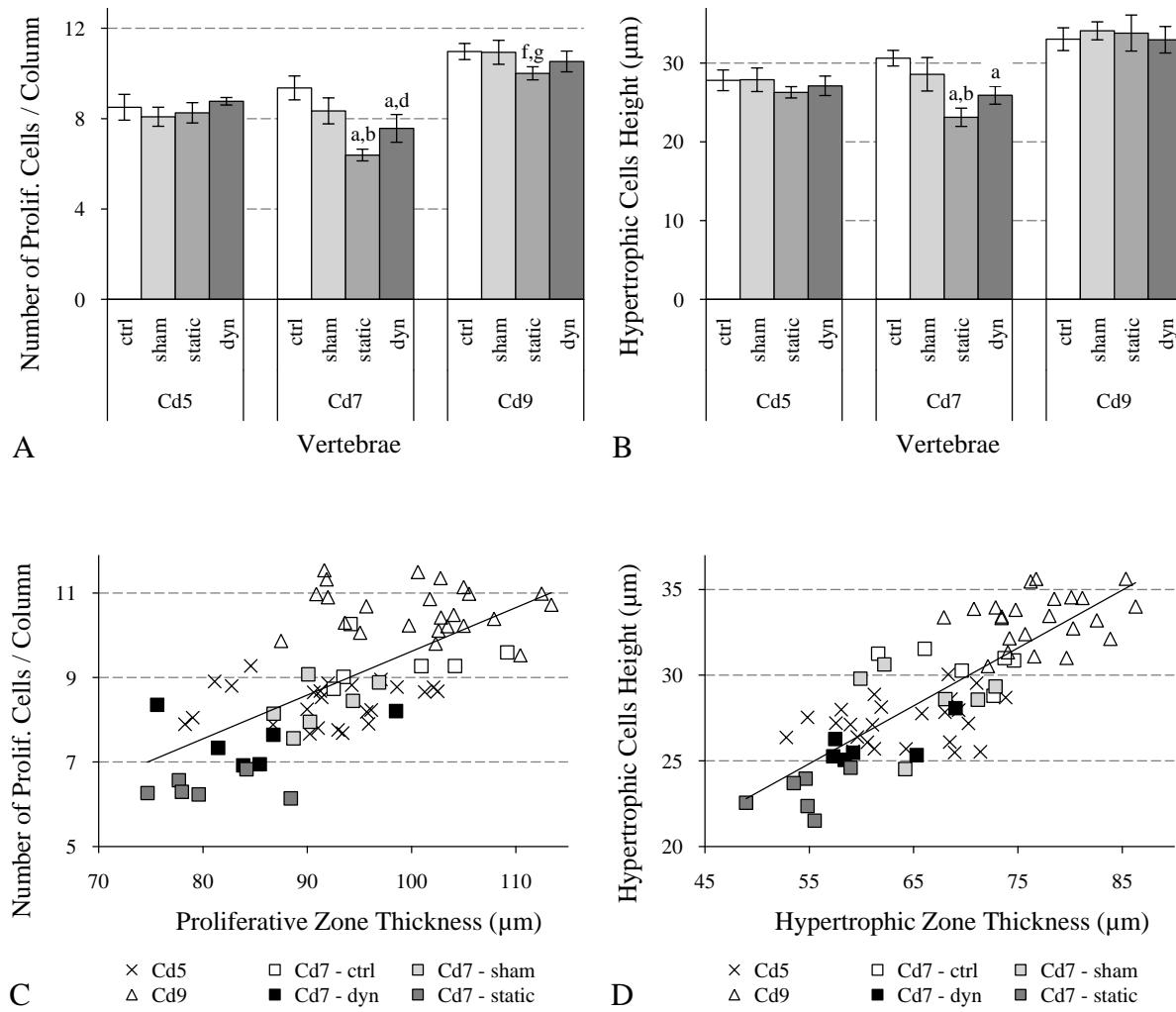


Figure 3.7: Cellular characterization. (A) Number of proliferative chondrocytes along the rat tail (for Cd5, Cd7 and Cd9) for the control, sham, static and dynamic groups. (B) Height (μm) of hypertrophic chondrocytes (mean value  $\pm$  SD). a:  $p < 0.001$  compared to control Cd7, b:  $p < 0.001$  compared to sham Cd7, d:  $p < 0.01$  compared to static Cd7, f:  $p < 0.01$  compared to control Cd9, g:  $p < 0.01$  compared to sham Cd9. (C) Correlation between the number of proliferative cells per column and the proliferative zone thickness. Pearson correlation coefficient = 0.7 ( $p < 0.001$ ,  $n = 72$ ). (D) Correlation between the hypertrophic cell height and the hypertrophic zone thickness. Pearson correlation coefficient = 0.8 ( $p < 0.001$ ,  $n = 72$ ).

### 3.5 Discussion

In the present study, the effects of *in vivo* static and dynamic loading were compared using finely controlled, normalized and equivalent 0.2 MPa compressive stresses applied for 15 days on rat Cd7 growth plates. This period was centered around the age of 35 days old, which corresponds to the rat pubertal growth spurt [2, 24] where the most important growth modulation effects are expected. Growth rate and growth plate histomorphometry results showed that Cd7 growth plates respond differently to *in vivo* static and dynamic compression.

Static and dynamic loadings, which were matched in terms of average compressive stresses, were as effective in modulating the bone growth of rat caudal vertebrae. In this study, both loading regimens resulted in significant and similar reductions of rat caudal growth rate with respect to control and sham groups. Considering that the cyclic stress oscillating around 0.2 MPa (between 0.14 and 0.26 MPa) was the same compressive stress as the one sustained in the static group, these results suggest that average compressive stresses rather than peak compressive stresses would be active biomechanical factors modulating bone growth. However, the effects of the loading frequency (0.1 Hz in this study) and of the cycling magnitude around the average stress (30% in this study) remain to be clearly determined. The reduction observed in bone growth rate following static loading is in accordance with reported *in vivo* studies on growth plate compression, which all verify the Hueter-Volkmann law [4, 8, 10-15]. Notably, resulting static growth modulation magnitude is very similar to the study by Cancel et al. [8], in which a significant growth rate reduction of 29% with respect to controls was observed for a similar experimental protocol and the same animal model. Conversely, Stokes et al [13] found a growth rate reduction of 40% with respect to their controls for a similar 0.2 MPa static compression and the same animal model. This greater growth rate reduction most probably results from the estimated growing Cd7 transverse area used to adjust loading in terms of normalized stress (force/area). Indeed, by comparing approaches used to evaluate Cd7 transverse area, our estimation is two times smaller than that of Stokes et al. [12-14]. Consequently, for the same targeted stress, our transmitted force would also be two times smaller. In terms of dynamic bone growth modulation, comparisons with reported studies are challenging due to the various loading protocols used to induce *in vivo* dynamic loading. The study by Robling et al. [11] observed a similar and significant reduction (4%) in bone length of rat ulnae undergoing compression (17 N)

for brief daily periods (ten minutes per day), regardless of the loading regimen, static or dynamic (2 Hz). However, this similar bone growth suppression was achieved with average loads that were not matched between static and dynamic groups and not normalized to transverse bone area. This finding contradicts the present study which reported the predominance of average compressive stresses over peak magnitude stresses but was achieved with a 20-fold greater loading frequency. The comparable static and dynamic induced bone growth modulations obtained in the present study are not in accordance with Akyuz et al. [9], who reported a significantly greater effect on rat caudal vertebrae wedging for continuous dynamic loading (15°) compared to static loading (10°), where asymmetrical (unilateral) compression was fixed at 55% of the rat body weight. However, control of the loading parameters, notably the calibration and adjustment of devices to compensate for longitudinal growth as well as the match between static and dynamic average loads, was not clearly demonstrated. Moreover, this study used a frequency of 1 Hz (ten-fold higher than the frequency used in our case).

Dynamic loading caused less detrimental effects on growth plate histomorphometry compared to static loading, although both loading regimens modulated bone growth similarly. This study showed a highly significant reduction in growth plate thickness, but only in the static group when compared to both sham and control groups. These reductions in growth plate thickness occurred in conjunction with a reduction in the thicknesses of the three zones, whose proportions nonetheless remained constant with respect to the total growth plate for all groups. The observed 20% reduction in growth plate thickness in the static group is consistent with the study by Cancel et al. [8], in which a significant reduction of 25% was observed. These morphological changes following static loading are supported by several *in vivo* studies demonstrating decreases in growth plate thickness as well as in proliferative and hypertrophic zones thicknesses [10, 13, 15-17]. In an *in vitro* study compressing swine growth plate explants under matched static or dynamic (0.1 Hz) 10% strains (displacement/thickness) for 48 hours, Sergerie et al. [23] found the same significant reduction in the total growth plate thickness for both compressive strain regimens but a lower reduction in the combined thickness of proliferative and hypertrophic zones following dynamic strain compared to static strain (reduction of 18% and 39% respectively). These findings are partly consistent with our results, but as opposed to the present study, the proportions of the three different zones did not remain constant. Robling et al. [11], who observed an increased growth plate thickness together with an increased hypertrophic zone

thickness, showed reverse trends compared to our results. This study also found an increased growth plate thickness following static loading, an unexpected and inconsistent finding compared with several *in vivo* static loading studies [10, 13, 15-17]. Finally, Othman et al. [25] found similar conclusions in their *in vitro* study with a significant increase (3%) in growth plate thickness observed following a 200 mN dynamic (1 Hz) compression (approximately 10% strain and 0.027 MPa stress) on cranial base growth plate explants. Reported relationships between bone growth rate and growth plate thickness obtained from several *in vivo* studies [2, 8, 13] are supported in this study with the lowest growth rate associated with the thinnest growth plate (Cd5), and, conversely, the highest growth rate associated with the thickest growth plate (Cd9). Moreover, the reduced Cd7 growth rate following loading is correlated with a reduced growth plate thickness, which is supported by other *in vivo* studies investigating bone growth rate after compression [8, 13].

Reductions in the number of proliferative chondrocytes per column and in hypertrophic chondrocyte height greatly contribute to the decreased growth plate thickness following static compression. This was demonstrated by statistically significant reductions for these two parameters in the static group when compared to both sham and control groups as well as by the two significant correlations observed between these two cellular parameters and the proliferative and hypertrophic zones thicknesses. Similar histomorphometric changes have been reported for growth plates undergoing static loading [10, 13, 15] and, as for the growth plate thickness, these decreases would correlate with reduced bone growth rates [2, 10, 13, 15]. For dynamic loading, these reductions in the number of proliferative chondrocytes per column and hypertrophic chondrocyte height, although present, were less important and not significant when compared to shams. Except for the study of Ohashi et al. [20], which showed an increase in the number of hypertrophic chondrocytes, the present study is, based on our knowledge, the first which investigated these types of cellular changes following *in vivo* dynamic compression.

The less significant impact of dynamic compression on growth plate thickness, proliferative chondrocyte number and hypertrophic chondrocyte height could be attributed to different loading effects on the growth plate extracellular matrix. In the growth plate, extracellular matrix synthesis and degradation as well as its zone dependant composition are essential for chondrocyte proliferation and hypertrophy [2, 24], two cellular processes that are strongly involved in bone longitudinal growth [1-3, 26]. Several studies reported a decreased expression of both type II and

type X collagens following sustained loading [8, 16, 27], while no change in the expression (both at the gene and protein level) of these two important components of the extracellular matrix were observed in other dynamic studies [19, 20]. In a recent study by Sergerie et al.[23], who investigated the effects of static *versus* dynamic loading, it was shown that, as opposed to static compression, dynamic compression contributed to the synthesis of type II collagen and aggrecan. Compared to static compression, dynamic compression is a better representation of the everyday stresses experienced by growth plates, notably in terms of fluid flow diffusion within the growth plate. This could produce variable effects on the extracellular matrix and potentially explain the resulting differences in growth plate thickness as well as in proliferative and hypertrophic chondrocyte changes following static/dynamic loading.

Limitations of this study include a subtle, although not significant sham effect, which was noted in several measurements. A potential increased rigidity of the operated vertebral segment due to micro-loading device implantation could partly explain this surgical effect. This sham effect was also reported in several other studies using similar devices on caudal vertebrae [8, 12-14]. Secondly, this experimental study focused on one load level, one frequency level and one variation around the average stress for dynamic load. Consequently, further research is needed to investigate (1) other dynamic loading parameters (load and frequency levels) within growth plate physiological ranges, (2) the effects of full-time, day-time or night-time loading, which were not investigated for dynamic loading, (3) the potential resumption of normal growth after removal of compressive loading and (4) the comparative effects of these two loading regimens on growth plate biology, including protein and gene expression as well as feedback loops involved in bone growth.

In conclusion, our results suggest that dynamic compressive loading is as efficient but more conservative than static loading for bone growth modulation and hence the hypothesis that the growth plate responds differently to *in vivo* static and dynamic loading is confirmed. Based on our knowledge, this *in vivo* static/dynamic comparative study is the first experiment investigating the effects of continuous loading on growth plate histomorphometry and using finely controlled and normalized loading parameters, a well controlled surgical procedure and perfectly matched averaged stresses. It consequently allowed conclusive comparisons between these two loading regimens. Growth plate response to dynamic loading would be very promising in terms of less-detrimental bone growth modulation. This knowledge is greatly relevant for the improvement

and/or development of new minimally invasive approaches, which are based on the local modulation of growth to correct several progressive musculoskeletal deformities. In particular, young patients would significantly benefit from these new interventions, which present fewer surgical risks and complications while preserving segment mobility and function.

### 3.6 Acknowledgements

Thank you to Vinciane Bocquenet, Denise Carrier, Martin Cousineau, Marc-Olivier Lacoursière, Thierry Lafrance, Souad Rhalmi and Kim Sergerie for their technical assistance. Thank you to Roxanne Wosu and Kessen Patten for the editorial revision of this manuscript. This study was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (I.V.) and the Canada Research Chair in Mechanobiology of the Pediatric Musculoskeletal System (I.V.).

### 3.7 Références

- [1] G. J. Breur, M. D. Lapierre, K. Kazmierczak, K. M. Stechuchak, et G. P. McCabe, "The domain of hypertrophic chondrocytes in growth plates growing at different rates," *Calcified tissue international*, vol. 61, no. 5, pp. 418-25, 1997.
- [2] E. B. Hunziker et R. K. Schenk, "Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats," *The Journal of physiology*, vol. 414, pp. 55-71, 1989.
- [3] N. J. Wilsman, C. E. Farnum, E. M. Leiferman, M. Fry, et C. Barreto, "Differential growth by growth plates as a function of multiple parameters of chondrocytic kinetics," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 14, no. 6, pp. 927-36, 1996.
- [4] D. D. Aronsson, I. A. F. Stokes, J. Rosovsky, et H. Spence, "Mechanical modulation of calf tail vertebral growth: implications for scoliosis progression," *J Spinal Disord*, vol. 12, no. 2, pp. 141-6, 1999.
- [5] I. A. F. Stokes, D. D. Aronsson, et J. P. G. Urban, "Biomechanical factors influencing progression of angular skeletal deformities during growth," *European Journal Exp Musculoskel Res*, vol. 3, pp. 51-60, 1994.

- [6] T. M. Gorman, R. Vanderwerff, M. Pond, B. MacWilliams, et S. D. Santora, "Mechanical axis following staple epiphysiodesis for limb-length inequality," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 91, no. 10, pp. 2430-9, 2009.
- [7] R. R. Betz, A. Ranade, A. F. Samdani, R. Chafetz, L. P. D'Andrea, J. P. Gaughan, J. Asghar, H. Grewal, et M. J. Mulcahey, "Vertebral body stapling: a fusionless treatment option for a growing child with moderate idiopathic scoliosis," *Spine*, vol. 35, no. 2, pp. 169-76, 2010.
- [8] M. Cancel, G. Grimard, D. Thuillard-Crisinel, F. Moldovan, et I. Villemure, "Effects of in vivo static compressive loading on aggrecan and type II and X collagens in the rat growth plate extracellular matrix," *Bone*, vol. 44, no. 2, pp. 306-15, 2009.
- [9] E. Akyuz, J. T. Braun, N. A. Brown, et K. N. Bachus, "Static versus dynamic loading in the mechanical modulation of vertebral growth," *Spine*, vol. 31, no. 25, pp. E952-8, 2006.
- [10] C. E. Farnum, A. Nixon, A. O. Lee, D. T. Kwan, L. Belanger, et N. J. Wilsman, "Quantitative three-dimensional analysis of chondrocytic kinetic responses to short-term stapling of the rat proximal tibial growth plate," *Cells Tissues Organs*, vol. 167, no. 4, pp. 247-58, 2000.
- [11] A. G. Robling, K. M. Duijvelaar, J. V. Geevers, N. Ohashi, et C. H. Turner, "Modulation of appositional and longitudinal bone growth in the rat ulna by applied static and dynamic force," *Bone*, vol. 29, no. 2, pp. 105-13, 2001.
- [12] I. A. Stokes, D. D. Aronsson, A. N. Dimock, V. Cortright, et S. Beck, "Endochondral growth in growth plates of three species at two anatomical locations modulated by mechanical compression and tension," *J Orthop Res*, vol. 24, no. 6, pp. 1327-34, 2006.
- [13] I. A. Stokes, K. C. Clark, C. E. Farnum, et D. D. Aronsson, "Alterations in the growth plate associated with growth modulation by sustained compression or distraction," *Bone*, vol. 41, no. 2, pp. 197-205, 2007.
- [14] I. A. Stokes, J. Gwadera, A. Dimock, C. E. Farnum, et D. D. Aronsson, "Modulation of vertebral and tibial growth by compression loading: diurnal versus full-time loading," *J Orthop Res*, vol. 23, no. 1, pp. 188-95, 2005.

- [15] I. A. Stokes, P. L. Mente, J. C. Iatridis, C. E. Farnum, et D. D. Aronsson, "Enlargement of growth plate chondrocytes modulated by sustained mechanical loading," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 84-A, no. 10, pp. 1842-8, 2002.
- [16] A. Reich, N. Jaffe, A. Tong, I. Lavelin, O. Genina, M. Pines, D. Sklan, A. Nussinovitch, et E. Monsonego-Ornan, "Weight loading young chicks inhibits bone elongation and promotes growth plate ossification and vascularization," *J Appl Physiol*, vol. 98, no. 6, pp. 2381-9, 2005.
- [17] A. Alberth, J. Peltonen, et V. Ritsila, "Effects of distraction and compression on proliferation of growth plate chondrocytes. A study in rabbits," *Acta Orthop Scand*, vol. 64, no. 4, pp. 449-55, 1993.
- [18] M. G. Ehrlich, H. J. Mankin, et B. V. Treadwell, "Biochemical and physiological events during closure of the stapled distal femoral epiphyseal plate in rats," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 54, no. 2, pp. 309-22, 1972.
- [19] A. Niehoff, U. G. Kersting, F. Zaucke, M. M. Morlock, et G. P. Bruggemann, "Adaptation of mechanical, morphological, and biochemical properties of the rat growth plate to dose-dependent voluntary exercise," *Bone*, vol. 35, no. 4, pp. 899-908, 2004.
- [20] N. Ohashi, A. G. Robling, D. B. Burr, et C. H. Turner, "The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate," *J Bone Miner Res*, vol. 17, no. 2, pp. 284-92, 2002.
- [21] P. L. Mente, D. D. Aronsson, I. A. Stokes, et J. C. Iatridis, "Mechanical modulation of growth for the correction of vertebral wedge deformities," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 17, no. 4, pp. 518-24, 1999.
- [22] A. J. Walsh et J. C. Lotz, "Biological response of the intervertebral disc to dynamic loading," *Journal of biomechanics*, vol. 37, no. 3, pp. 329-37, 2004.
- [23] K. Sergerie, S. Parent, P. F. Beauchemin, I. Londono, F. Moldovan, et I. Villemure, "Growth plate explants respond differently to in vitro static and dynamic loadings," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 29, no. 4, pp. 473-80, 2011.

- [24] J. Alvarez, M. Balbin, F. Santos, M. Fernandez, S. Ferrando, et J. M. Lopez, "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," *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 15, no. 1, pp. 82-94, 2000.
- [25] H. Othman, E. J. Thonar, et J. J. Mao, "Modulation of neonatal growth plate development by ex vivo intermittent mechanical stress," *Journal of biomechanics*, vol. 40, no. 12, pp. 2686-93, 2007.
- [26] R. T. Ballock et R. J. O'Keefe, "The biology of the growth plate," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 85-A, no. 4, pp. 715-26, 2003.
- [27] I. Villemure, M. A. Chung, C. S. Seck, M. H. Kimm, J. R. Matyas, et N. A. Duncan, "Static compressive loading reduces the mRNA expression of type II and X collagen in rat growth-plate chondrocytes during postnatal growth," *Connect Tissue Res*, vol. 46, no. 4-5, pp. 211-9, 2005.

## CHAPITRE 4 ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES COMPLÉMENTAIRES

Ce chapitre complète la méthodologie détaillée dans l'article scientifique (Chapitre 3) en décrivant les différentes étapes de développement du protocole expérimental. Il détaille notamment les composantes de l'étude ainsi que les différentes techniques de conception et de calibration.

### 4.1 Composantes de l'étude

Des explications concernant le modèle animal et le chargement utilisé sont apportées dans les deux sections suivantes.

#### 4.1.1 Modèle animal (identification des vertèbres)

Basé sur les travaux de Cancel et al. [3], les vertèbres sont comptées à partir du pelvis tel que décrit sur la Figure 4.1, la première vertèbre qui s'articule avec le *sacrum* étant considérée comme la première vertèbre caudale (Cd1).

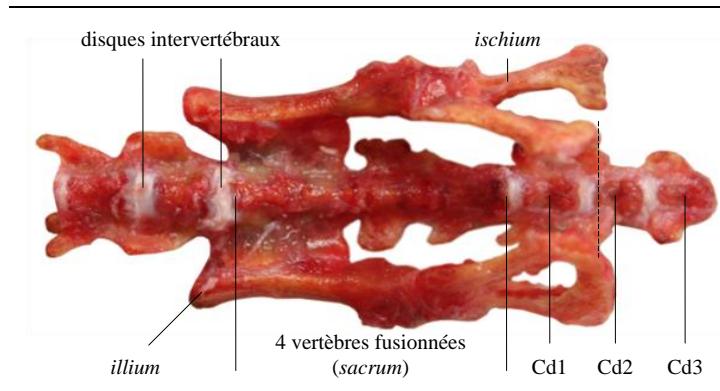


Figure 4.1: Vue ventrale d'un pelvis de rat disséqué.

La référence importante est la ligne passant par les sommets distaux des deux *ischiums* (segment inférieur de l'*ilium*). Cette ligne est matérialisée par un trait pointillé sur la Figure 4.1 et sur les

différents clichés radiographiques de la Figure 4.2. Dans cette étude comme dans l'étude de Cancel et al. [3], la vertèbre Cd1 se trouve immédiatement à l'intérieur des *ischiums* (Figure 4.1, Figure 4.2A et Figure 4.2B). Il est à noter que selon les études de Stokes et al. [6, 8] et d'Akyuz et al. [1], la vertèbre considérée comme première vertèbre caudale (Cd1) est située immédiatement à l'extérieur des *ischiums* (Figure 4.2C et Figure 4.2D).

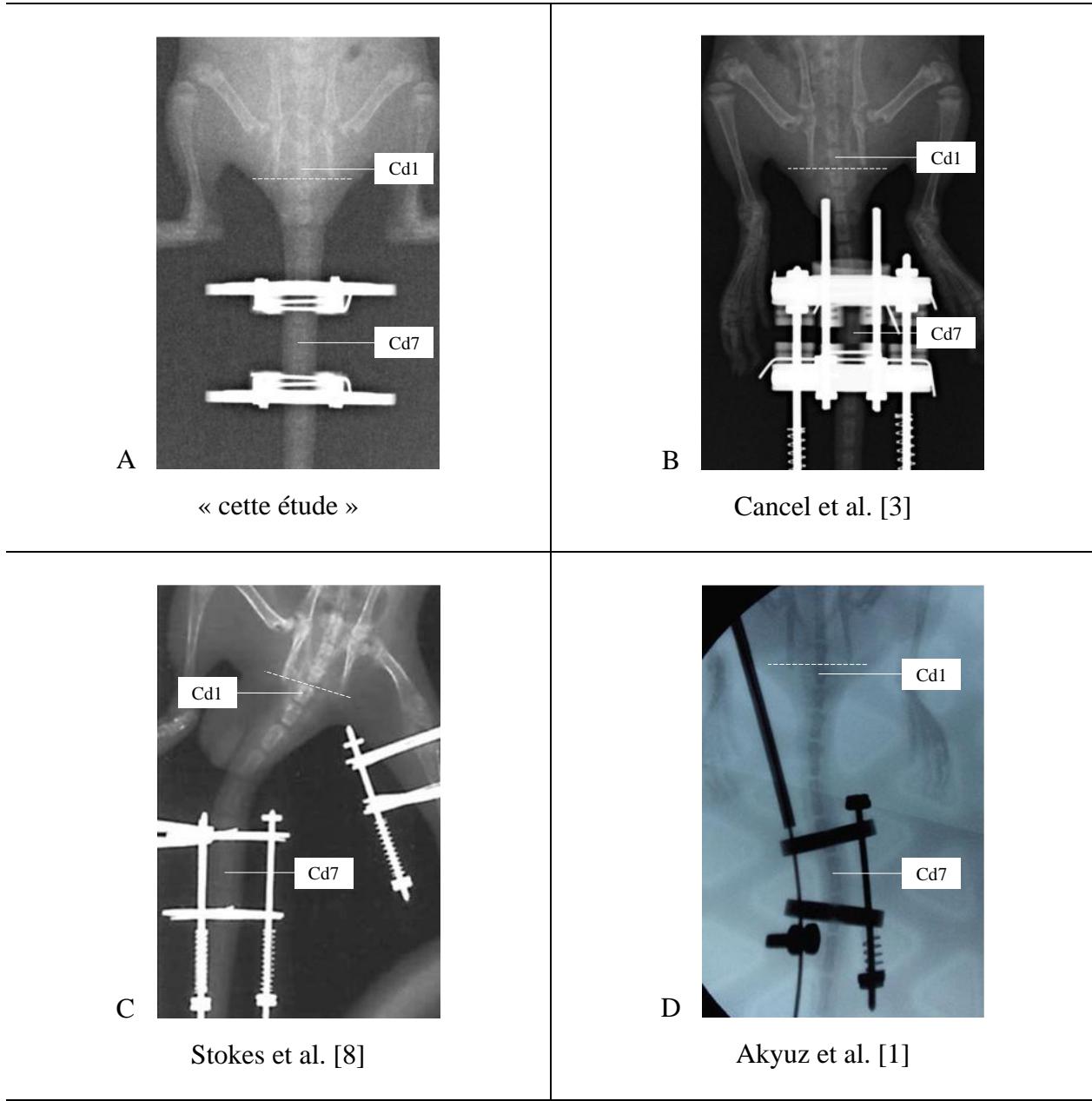
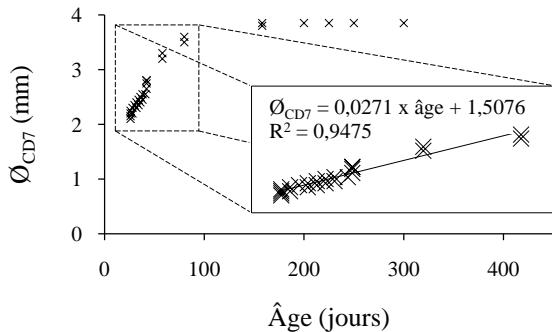


Figure 4.2: Identification des vertèbres caudales chez le rat.

### 4.1.2 Chargement

Le chargement utilisé est une compression de 0,2 MPa. Tel que mentionné dans la revue de littérature (Chapitre 1), l'intensité de ce chargement est physiologique. Il déforme la plaque de croissance d'environ 10% [125] et permet de ralentir la croissance sans l'interrompre complètement. De plus, 0,2 MPa est un niveau de chargement utilisé dans de nombreuses études [3, 6-8]. Les paramètres de chargement dynamique (fréquence de 0.1 Hz et variation de  $\pm 30\%$  autour du chargement moyen) sont basés sur des travaux de recherche *in vitro* effectués précédemment au laboratoire par Sergerie et al. [120]. Ils correspondent à une oscillation entre 0,14 et 0,26 MPa sur une période de 10 secondes. Ces niveaux de chargement demeurent physiologiques et la fréquence s'approche des fréquences de sollicitation du corps humain lors de la réalisation de tâches de la vie quotidienne. L'influence de ces deux paramètres (niveau de chargement et fréquence) sur la plaque de croissance reste cependant à déterminer.

Ce chargement est normalisé par rapport à la taille de la vertèbre Cd7 dont l'aire transverse ne cesse d'augmenter au cours des 15 jours d'expérience. Tel que mentionné dans l'article scientifique (Chapitre 3), l'équation (1) est utilisée pour estimer cette aire. Cette équation est tirée d'une étude morphologique effectuée par Cancel et al. [3] (Figure 4.3).



$$\text{Aire}_{\text{Cd7}}(\text{mm}^2) = \frac{\pi}{4} \times (0,0271 \times \text{âge (jrs)} + 1,5076)^2 \quad (1)$$

$$\text{Aire}_{\text{Cd7}}(\text{mm}^2) = 9,9 \times \left( \frac{\text{poids (g)}}{125} \right)^{\frac{2}{3}} \quad (2)$$

Figure 4.3: Évolution du diamètre de Cd7 en fonction de l'âge, chez le rat (adapté de [3]).

Il est à noter que Stokes et al. [8] utilisent une autre équation (2) pour approximer l'aire de la vertèbre Cd7. En se fiant à la moyenne de poids des animaux obtenue tout au long de cette étude

(~ 85 g à 28 jours et ~ 205 g à 43 jours), il est à noter que l'évaluation de l'aire transverse de la vertèbre Cd7 est deux fois supérieure avec la méthode de Stokes et al. [8] comparée à la méthode de Cancel et al. [3] (respectivement 8 et 4 mm<sup>2</sup> à 28 jours et respectivement 14 et 6 mm<sup>2</sup> à 43 jours). Par conséquent, pour la même contrainte ciblée, la force transmise serait deux fois plus importante avec la méthode de Stokes et al. [8] comparativement à celles transmises dans l'étude de Cancel et al. [3] ainsi que dans cette étude.

## 4.2 Appareil de microchargement

### 4.2.1 Conception

Tel que décrit dans l'article scientifique (Chapitre 3), un appareil de microchargement pneumatique a été conçu afin de transmettre une compression statique ou dynamique sur la 7<sup>ème</sup> vertèbre caudale (Cd7) d'un modèle animal de rat.

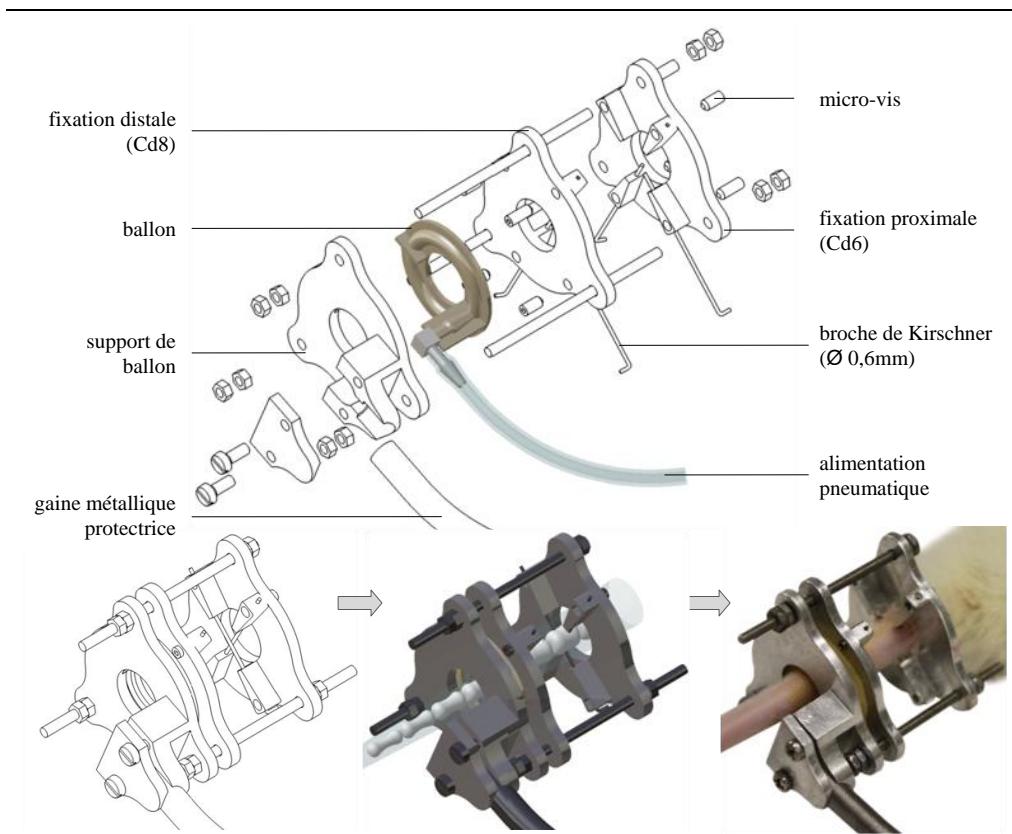


Figure 4.4: Conception de l'appareil de microchargement.

Inspiré de très nombreuses études [2, 6-9, 116, 129, 130, 134, 135], l'appareil est implanté à la manière « Ilizarov » [2, 6, 8]. Il est composé de deux fixations implantées par l'intermédiaire de broches de Kirschner (Medeco-Ch, 33.0306.100) qui traversent de manière percutanée les 6<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> vertèbres caudales (Cd6 et Cd8) (Figure 3.1A, Figure 3.3, Figure 4.2A et Figure 4.4). Ces broches sont fermement maintenues dans les fixations par l'intermédiaire de micro-vis; ce type de conception est directement inspiré de montages utilisés en clinique. Inspiré de l'étude de Walsh et al. [134], la transmission des efforts s'effectue de manière pneumatique par l'intermédiaire d'un ballon qui peut être gonflé ou dégonflé. Ce ballon est maintenu en place dans son support et connecté à l'alimentation pneumatique par l'intermédiaire d'un coude à 90° (McMaster-Carr, 5116K23). Cette alimentation pneumatique est protégée des rongeurs par une gaine métallique de type ressort (McMaster-Carr, 9665K53). Le diamètre des broches utilisées (0,6 mm) et le poids de l'appareil (~ 15 g) sont minimisés et la tubulure d'alimentation pneumatique choisie (McMaster-Carr, 5231K311) est extrêmement souple. Tous ces éléments visent à réduire les effets de la procédure chirurgicale et permettent une évolution très aisée des rats dans leur environnement. Un dispositif anti-torsion composé d'un connecteur rapide (McMaster-Carr, 5012K33 + 5012K24), d'un « swivel » (Lomir, RSP16) et de son support (Lomir, RS02) est fixé au-dessus de la cage. Ce dispositif empêche le tube d'alimentation pneumatique de se torsader, ce qui empêcherait le passage de l'air et entraverait les mouvements du rat (Figure 4.5).

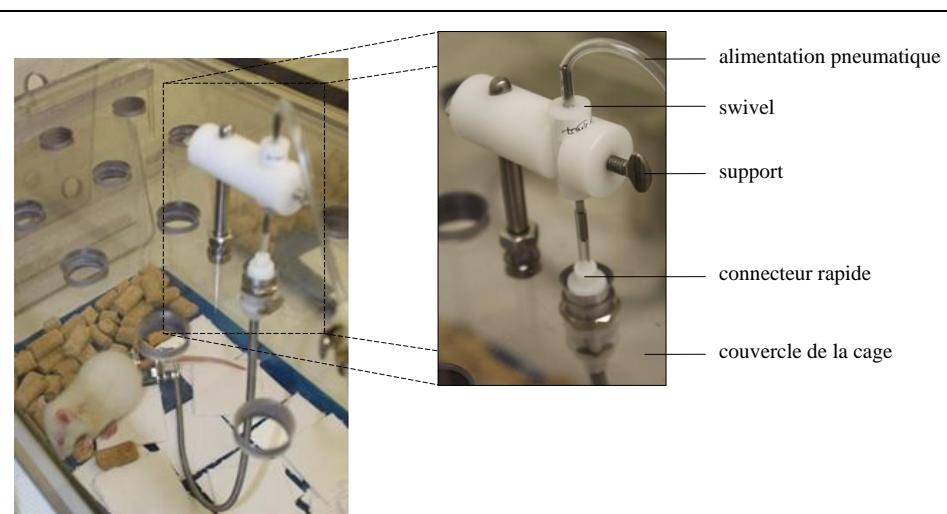


Figure 4.5: Dispositif anti-torsion

## 4.2.2 Calibration

Afin de connaître précisément la force transmise par le ballon en fonction de la tension d'entrée de l'oscilloscope, les appareils de microchargement ont été préalablement calibrés à l'aide d'une machine de microchargement (Biomomentum, Mach-1). Tel qu'illustré sur la Figure 4.6, l'appareil est monté sur deux tiges spécialement conçues qui simulent la queue de rat et qui transmettent les efforts de l'appareil à la cellule de charge (17 N, résolution: 0.026 N).

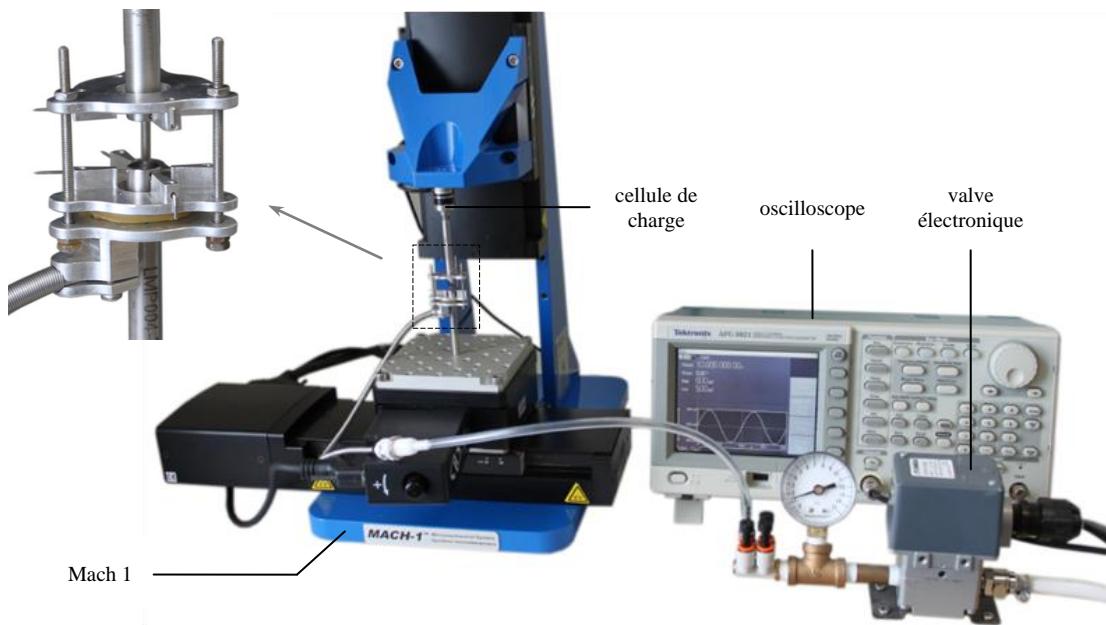


Figure 4.6: Dispositif expérimental pour la calibration des appareils de microchargement.

La tension d'entrée de l'oscilloscope est augmentée par pallier de 100 mV et la force transmise par le ballon est enregistrée par la machine de microchargement. La courbe de calibration résultante est présentée dans la Figure 3.2 de l'article et dans la Figure 4.7. Afin de vérifier cette courbe, un processus de calibration inverse est effectué. Il consiste à vérifier à partir de l'équation de calibration, la bonne obtention d'un niveau de chargement préalablement choisi et ceci autant de manière statique que dynamique. Enfin, tel que mentionné dans l'article (Chapitre 3), la calibration fut à nouveau effectuée après la série d'expériences; la parfaite superposition des résultats illustrée sur la Figure 4.7 démontre la bonne stabilité des ballons au cours du temps.

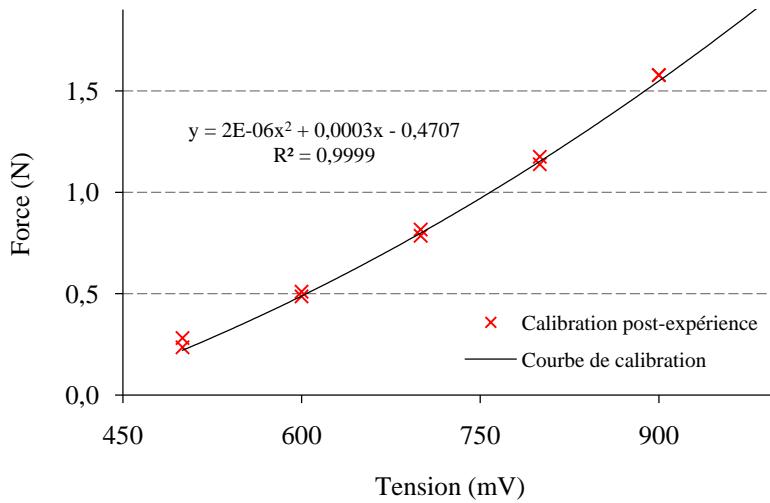


Figure 4.7: Courbe de calibration et vérification post-expérimentale

## 4.3 Procédure chirurgicale et collecte des résultats

### 4.3.1 Guide chirurgical

Un guide a été conçu afin de faciliter, d'uniformiser et de contrôler les différentes étapes de la manœuvre chirurgicale. Pour ce faire, une étude morphologique préliminaire a d'abord permis de déterminer les dimensions de la queue des rats (6.24 mm) à 28 jours, soit l'âge de la chirurgie et au niveau de la 7<sup>ème</sup> vertèbre caudale. Le guide chirurgical a été conçu en fonction de cette mesure. Il est constitué d'une plate forme sur lequel le rat anesthésié est placé sur le dos et d'un support qui maintient la queue au centre des deux fixations de l'appareil de microchargement. Ces fixations sont maintenues perpendiculairement à l'axe de la queue par deux mors; alors que le mors proximal est fixe, le mors distal est placé sur un coulisseau afin de pouvoir ajuster l'écartement entre les deux fixations (Figure 4.8). Avec ce guide chirurgical, l'implantation des appareils est très aisée. De plus, tel que montré sur la Figure 3.3B de l'article, le bon centrage ainsi que la perpendicularité des fixations par rapport à la queue sont garantis. Il est à noter qu'un guide similaire est utilisé dans l'étude de MacLean et al. [135] portant sur l'étude du disque intervertébral.

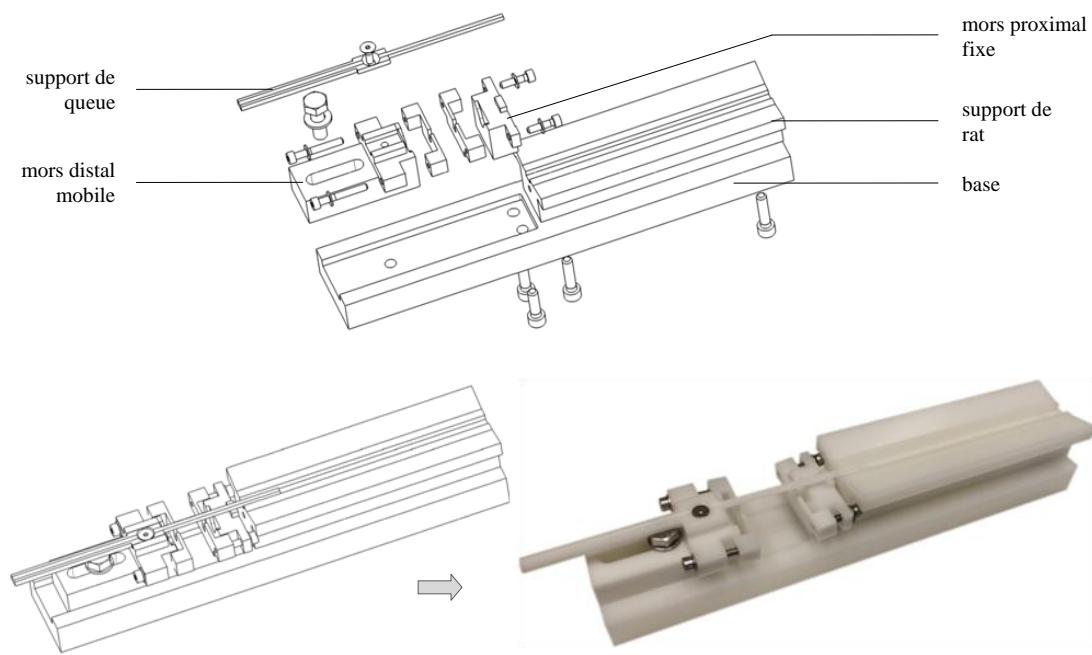
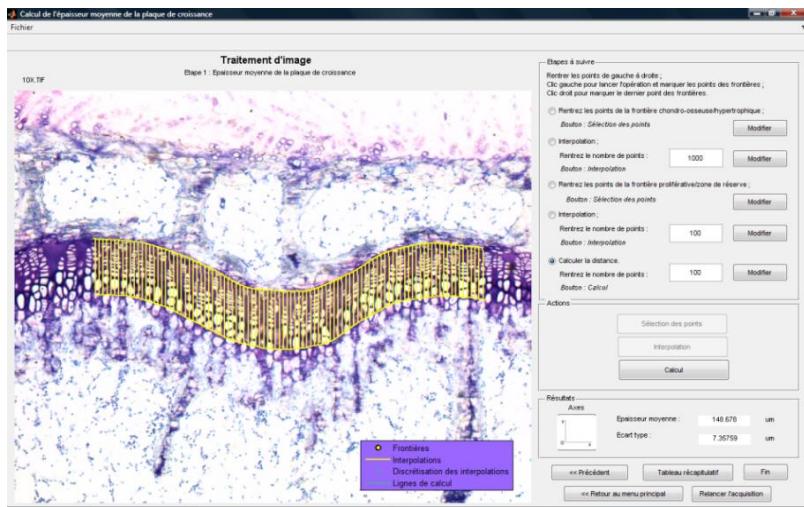


Figure 4.8: Conception du guide chirurgical

### 4.3.2 Logiciel de mesure

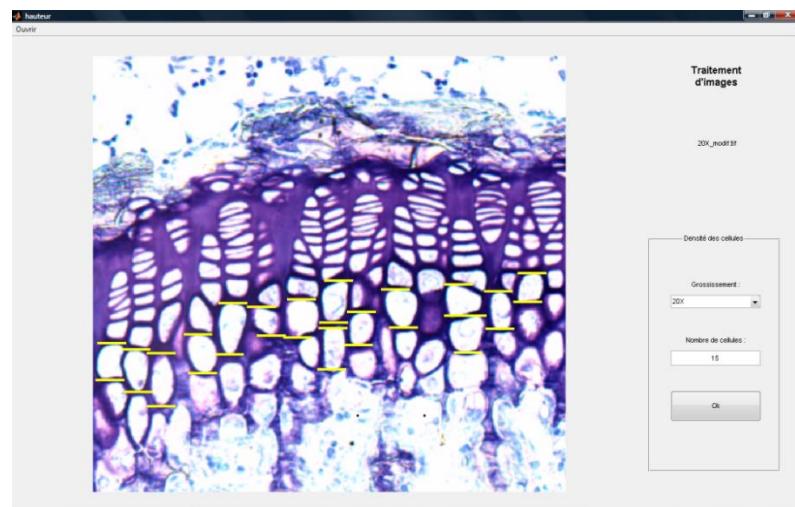
Un logiciel de mesure a été développé au sein du laboratoire afin d'assister la réalisation des mesures de taux de croissance et de paramètres histomorphométriques. Il est codé sous Matlab à l'aide de l'interface GUIDE et est composé de trois modules. Le module n°1 a déjà été utilisé dans l'étude de Sergerie et al. [120], il permet de mesurer la distance entre deux fronts. Ce module a donc été utilisé pour déterminer le taux de croissance, l'épaisseur de la plaque de croissance ainsi que l'épaisseur de chacune de ses trois zones. Deux modules supplémentaires ont été conçus pour cette étude. Le module n°2 permet de mesurer la distance entre deux points. Il a donc été utilisé pour déterminer la hauteur des cellules. Enfin, le module n°3 combine à la fois une mesure de distance entre deux points et un compteur. Il a été utilisé pour déterminer le nombre de cellules par colonne et la densité linéaire des cellules dans la zone proliférative. La Figure 4.9 illustre ces trois modules et détaille brièvement leur fonctionnement.



## Module 1: épaisseurs

L'utilisateur sélectionne les points de la première frontière puis les points de la seconde frontière.

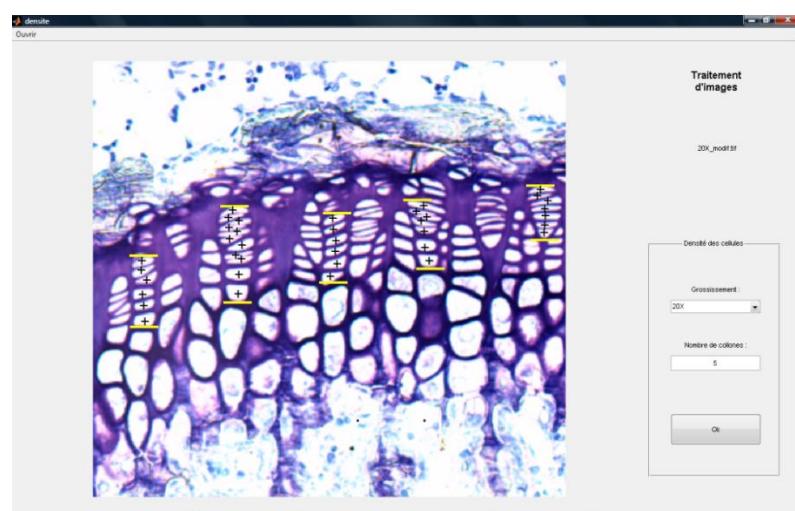
Le logiciel crée des courbes d'interpolation passant par ces points puis mesure la distance qui les sépare en utilisant un nombre de mesures spécifié par l'utilisateur (100 dans le cadre de cette étude)



## Module 2: hauteur des cellules

L'utilisateur sélectionne successivement la frontière supérieure puis inférieure de chaque cellule.

Un compteur indique à l'utilisateur le nombre de cellules mesurées, à partir duquel l'utilisateur peut décider d'interrompre les mesures (20 cellules dans le cadre de cette étude).



## Module 3: densité linéaire

L'utilisateur sélectionne la frontière supérieure d'une colonne, chacune des cellules de cette colonne puis la frontière inférieure.

Un compteur indique à l'utilisateur le nombre de colonnes mesurées, à partir duquel l'utilisateur peut décider d'interrompre les mesures (cinq colonnes dans le cadre de cette étude).

Figure 4.9: Modules du logiciel de mesures

## CHAPITRE 5 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Ce chapitre constitue un complément de résultats. Il présente notamment des données morphologiques ainsi que différentes corrélations non décrites dans l'article scientifique (Chapitre 3).

### 5.1 Études morphologiques

#### 5.1.1 Poids des animaux

Le poids des animaux est similaire pour les trois groupes opérés; aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les groupes sham, statique et dynamique (one-way ANOVA). En revanche, les rats du groupe contrôle sont significativement plus lourds ( $p < 0,001$ ) à la fin de l'expérience. Cette différence de poids pourrait s'expliquer par le nombre de manipulation quasiment nul pour les rats du groupe contrôle comparé aux rats instrumentés dont les appareils sont réglés quotidiennement sous légère anesthésie. Les résultats (taux de croissance, paramètres histomorphométriques) rapportés dans l'article (Chapitre 3, partie 3.4) pour les vertèbres contrôles inter-animal (Cd5 et Cd9) sont similaires; par conséquent, cette différence de poids ne semble influencer ni la croissance, ni l'histomorphométrie de la plaque de croissance.

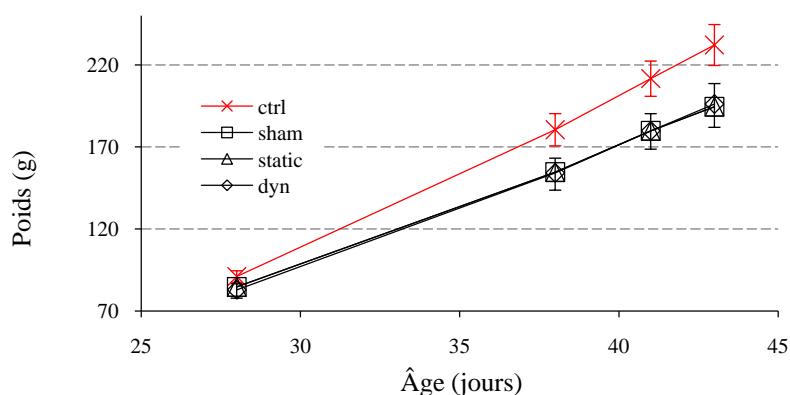


Figure 5.1: Poids des animaux en fonction de l'âge

### 5.1.2 Caractérisations morphologiques des vertèbres

Toutes les vertèbres de Cd4 à Cd9 du projet ont été collectées et nettoyées de leurs tissus environnants (Figure 5.2). Avant fixation, déshydratation puis enrobage dans le méthylmétacrylate, toutes ces vertèbres ont été mesurées à l'aide d'un micromètre électronique (résolution 0,01 mm) et pesées à l'aide d'une balance électronique (résolution 0,0001 g). La longueur des vertèbres (mesurée entre les deux plateaux vertébraux parallèles) ainsi que leur masse sont présentées dans la Figure 5.3.



Figure 5.2: Vertèbre collectée et nettoyée

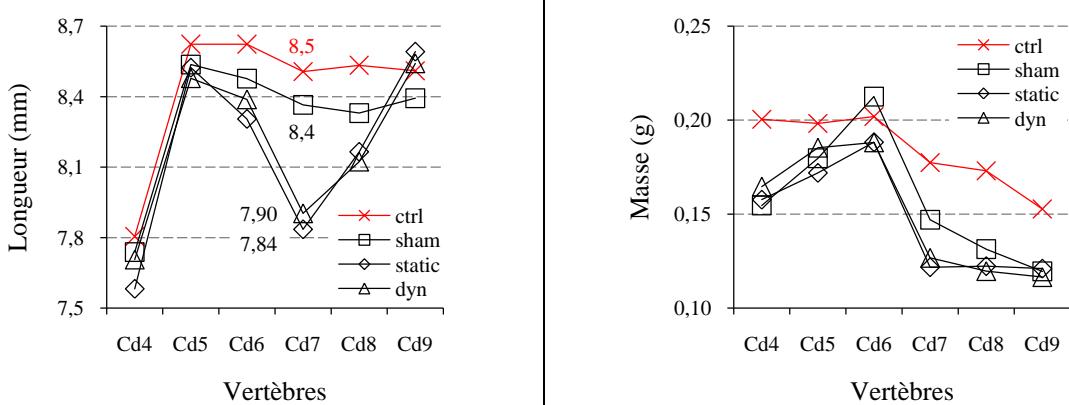


Figure 5.3: Longueur et masse des vertèbres Cd4 à Cd9.

Ce type de mesures macroscopiques est beaucoup moins précis que les mesures de taux de croissance à l'échelle microscopique (marquage à la calcéine); il est tout de même intéressant de constater que les tendances obtenues dans l'article (Chapitre 3, partie 3.4.1) sont très bien représentées. En effet, la longueur de la vertèbre Cd7 est statistiquement réduite (one-way

ANOVA,  $p < 0,05$ ) pour les groupes statique et dynamique lorsque comparés aux groupes sham et contrôle. Il est aussi très intéressant d'observer une réduction de longueur pour les vertèbres Cd6 et Cd8. En effet, les broches étant implantées au centre de ces deux vertèbres, la plaque de croissance adjacente à la vertèbre Cd7 se situe à l'intérieur de l'appareil de microchargement et subit donc une compression. Il est de ce fait cohérent d'observer une réduction, bien que plus faible, au niveau de la longueur de ces vertèbres. Cependant, ce type de mesures ne permet pas de déterminer directement le taux de croissance et ne donne pas les mêmes variations de croissance que celles évaluées avec le marquage à la calcéine. En effet, la réduction de croissance selon ces mesures morphologiques est d'environ 500  $\mu\text{m}$  pour les groupes statique et dynamique lorsque comparés au groupe sham. Si l'on multiplie la réduction de taux de croissance obtenus avec le marquage à la calcéine (environ 7,5  $\mu\text{m/jour}$ , Table 3.1) par 15 pour le nombre de jours de chargement et par deux pour les plaques de croissance distale et proximale, on obtient environ 225  $\mu\text{m}$ . Cette différence pourrait être expliquée par la faible précision des mesures morphologiques ainsi que par la réduction du taux de croissance mesurée en fin d'expérience par le marquage à la calcéine et qui n'est pas nécessairement constante au cours des 15 jours de chargement.

Bien que non significatives, des tendances similaires sont observées au niveau de la masse des vertèbres. Les tendances légèrement plus élevées pour les masses des vertèbres du groupe contrôle pourraient être en partie expliquées par la plus grande masse corporelle observée chez ces rats (partie 5.1.1).

## 5.2 Corrélations supplémentaires

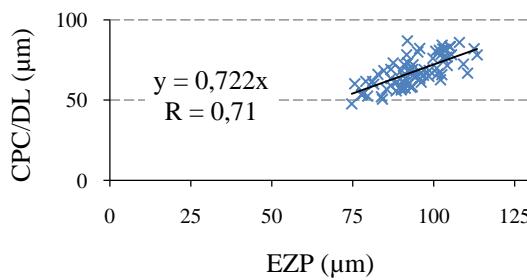
### 5.2.1 Paramètres histomorphométriques

Les paramètres histomorphométriques de la plaque de croissance étudiés dans le cadre de ce projet sont résumés ci-dessous. Tous ces paramètres ont été mesurés indépendamment:

- épaisseur totale de la plaque de la plaque de croissance (EPC -  $\mu\text{m}$ );
- épaisseurs des zones proliférative et hypertrophique (respectivement EZP et EZH,  $\mu\text{m}$ );
- densité linéaire (DL, cellules/ $\mu\text{m}$ ) et nombre de chondrocytes par colonne (CPC, cellules) dans la zone proliférative;
- hauteur des chondrocytes hypertrophiques (CH,  $\mu\text{m}$ ).

L'épaisseur de la zone de réserve (EZR,  $\mu\text{m}$ ) est quant à elle déduite en soustrayant EZP et EZH de EPC. Afin d'étudier la cohérence de tous ces paramètres, les relations entre les épaisseurs de la plaque de croissance et les caractéristiques cellulaires ont été investiguées. Pour cela, les hypothèses suivantes ont été posées:

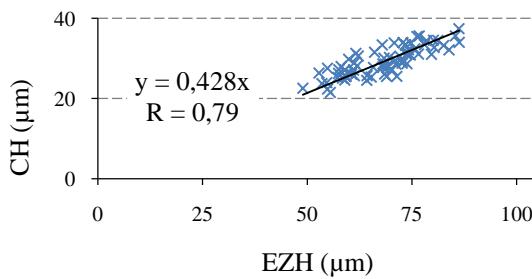
- L'épaisseur de la zone proliférative (EZP) peut être exprimée en fonction de la densité linéaire (DL) et du nombre de chondrocytes par colonne (CPC) dans la zone proliférative. Intuitivement la meilleure façon d'exprimer cette épaisseur est de considérer la hauteur des colonnes, égale à la division de CPC par DL.
- L'épaisseur de la zone hypertrophique (EZH) peut être exprimée en fonction de la hauteur des cellules hypertrophiques. L'existence de cette relation a été prouvée dans l'article scientifique par la bonne corrélation entre ces deux paramètres (Figure 3.7D).



De cette relation, dont le passage par zéro a été forcé, il peut être déduit:

$$\frac{\text{CPC}}{\text{DL}} = 0,722 \times \text{EZP}$$

$$\text{EZP} = 1,38 \times \frac{\text{CPC}}{\text{DL}} \quad (1)$$



De cette relation, dont le passage par zéro a été forcé, il peut être déduit:

$$\text{CH} = 0,428 \times \text{EZH}$$

$$\text{EZH} = 2,34 \times \text{CH} \quad (2)$$

Figure 5.4: Relations entre l'épaisseur des zones et les caractéristiques cellulaires de la plaque de croissance.

Les deux hypothèses sont confirmées, il est possible d'exprimer les épaisseurs des zones proliférative et hypertrophique de la plaque de croissance en fonction des paramètres cellulaires. La relation (1) indique que la hauteur des colonnes (CPC/LD) correspond à 72 % de l'épaisseur de la zone proliférative. Cela signifie en d'autres termes, que toutes les colonnes mesurées ne traversent pas intégralement l'épaisseur de la zone proliférative. La relation (2) indique qu'il y entre 2 et 3 cellules superposées dans l'épaisseur de la zone hypertrophique. La Figure 5.5 illustre ces observations, quelque soit la vertèbre et quelque soit le groupe de rats considéré.

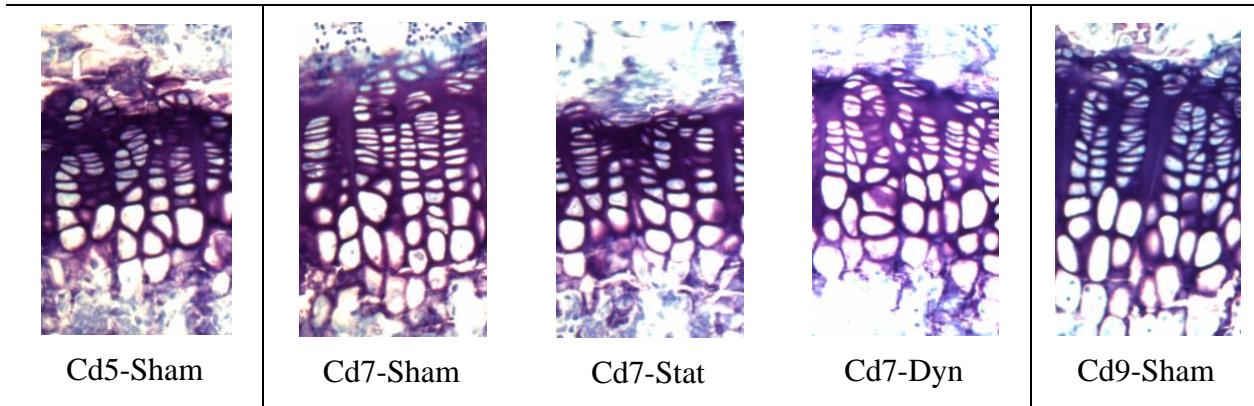


Figure 5.5: Sections histomorphométriques de la plaque de croissance.

Finalement, il est possible d'exprimer la hauteur totale de la plaque de croissance en fonction de ces caractéristiques cellulaires en utilisant la relation suivante:

$$EPC = EZR + EZP + EZH = EZR + 1,38 \times \frac{CPC}{DL} + 2,34 \times CH$$

La très bonne fidélité de cette relation pour les 72 vertèbres du projet est illustrée sur la Figure 5.6. En conclusion, quelque soit le régime de chargement utilisé et quelque soit la vertèbre considérée, l'épaisseur de la plaque de croissance peut être exprimée grâce à une unique combinaison de ses caractéristiques cellulaires rassemblant: l'épaisseur de la zone de réserve, la densité linéique et le nombre de chondrocytes dans la zone proliférative et enfin la hauteur des chondrocytes hypertrophiques.

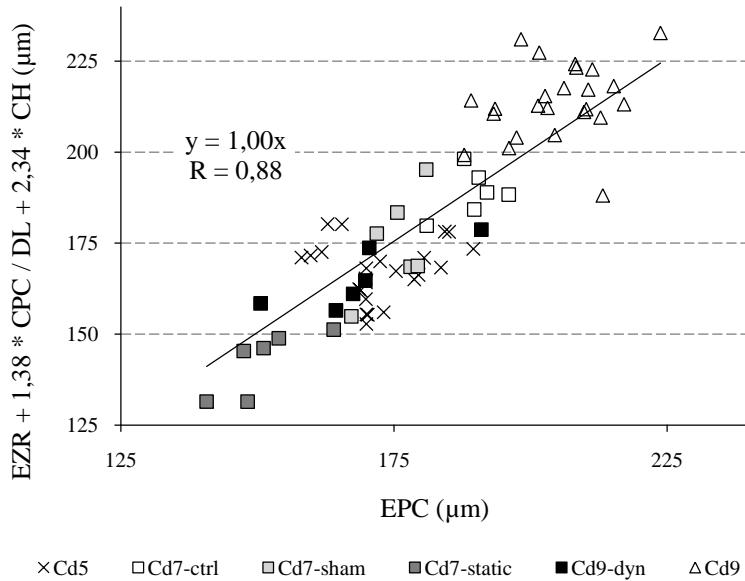


Figure 5.6: Relation entre l'épaisseur totale et les caractéristiques cellulaires de la plaque de croissance.

### 5.2.2 Relation avec le taux de croissance

L'article scientifique a confirmé la corrélation reportée par plusieurs études [3, 7, 14] entre le taux de croissance (TC,  $\mu\text{m/jour}$ ) et l'épaisseur de la plaque de croissance. En effet, les taux de croissance les plus importants sont associés aux plus grandes épaisseurs de plaque de croissance. Cette corrélation est confirmée par une analyse par la méthode de Pearson qui révèle un haut niveau de signification ( $p < 0,001$ ;  $n = 60$ ) pour les deux graphiques présentés dans la Figure 5.7 (corrélations représentées par un trait noir). Le premier graphique considère la mesure directe d'épaisseur de la plaque de croissance, l'épaisseur de la plaque de croissance est exprimée en fonction de la relation trouvée dans la section précédente (partie 5.2.1) pour le second graphique. Ces corrélations entre épaisseur de la plaque de croissance et taux de croissance sont obtenues avec les 60 vertèbres non chargées du projet soit les vertèbres: Cd5 (quatre groupes confondus), Cd7 contrôle, Cd7 sham et Cd9 (quatre groupes confondus).

Pour les 12 vertèbres chargées de manière statique ou dynamique, l'article scientifique a démontré que, pour la même modulation de croissance, les effets sur l'histomorphométrie de la

plaques de croissance étaient différents. Principalement, la réduction au niveau de l'épaisseur de la plaque de croissance était plus importante pour le groupe statique que pour le groupe dynamique. Le nombre de vertèbre (n = 6 dans chacun des groupes statique et dynamique) est trop faible pour pouvoir relever des corrélations significatives (Figure 5.7 - corrélations représentées par un trait rouge). La Figure 5.7 illustre cependant très bien la préservation de l'épaisseur de la plaque de croissance dans le groupe dynamique; ces points se situent en effet au-dessus de la courbe de tendance globale. En revanche, pour des taux de croissance similaires, les points relatifs au groupe statique sont principalement retrouvés en-dessous de la courbe de tendance.

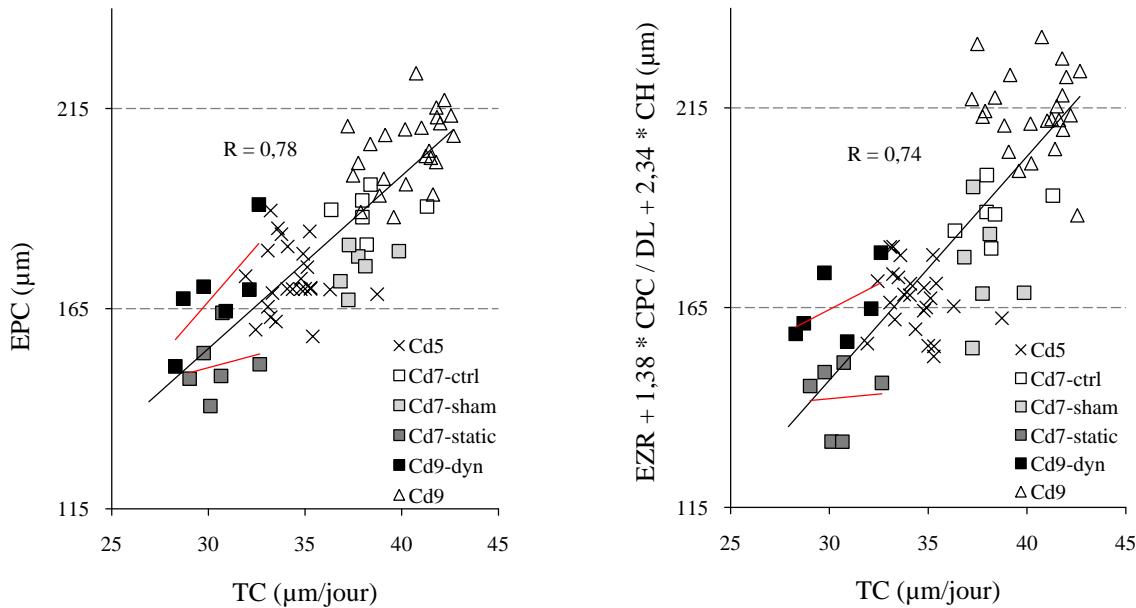


Figure 5.7: Corrélation entre le taux de croissance et l'épaisseur de la plaque de croissance.

## CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce projet de maîtrise visait à investiguer la réponse mécanobiologique de la plaque de croissance soumise à une compression statique ou dynamique durant 15 jours. Contrairement aux études répertoriées investiguant l'effet des charges dynamiques [1, 5, 11, 12], cette étude utilise un chargement continu, finement contrôlé, normalisé par rapport à la taille de la vertèbre et surtout équivalent en termes de contrainte moyenne résultante. Cette rigueur dans l'exécution du protocole expérimental donne du poids à l'étude et du crédit aux comparaisons effectuées entre les différents groupes. Les principales conclusions de cette étude réalisée sur un modèle animal vivant sont les suivantes:

- Une compression statique ou dynamique de 0,2 MPa réduit significativement et similairement le taux de croissance de vertèbres caudales de rat.
- Le chargement statique altère plus sévèrement l'histomorphométrie de la plaque de croissance que le chargement dynamique.
- Ces modifications se traduisent par une réduction plus importante de l'épaisseur de la plaque de croissance pour le groupe statique.
- Cette réduction est accompagnée d'une plus importante réduction du nombre de chondrocytes par colonne dans la zone proliférative et d'une plus importante réduction de la hauteur des cellules hypertrophiques pour le groupe statique.

Des éléments de discussion complémentaires à la discussion de l'article scientifique (Chapitre 3, section 3.5) sont présentés ci-dessous.

Nos résultats pour les groupes contrôle, sham et statique sont très similaires à l'étude de Cancel et al. [3] effectuée au sein du même laboratoire. Cette étude investiguait l'effet du chargement statique uniquement et utilisait un protocole expérimental similaire et le même modèle animal. Certains raffinements au niveau du protocole ont tout de même été effectués. Premièrement, l'ajustement de l'appareil pour compenser la croissance latérale et longitudinale de la vertèbre, a été effectué tous les jours *versus* tous les quatre jours dans l'étude de Cancel et al. [3], cet ajustement quotidien permet de maintenir une contrainte plus constante dans le temps et pourrait expliquer les effets légèrement supérieur dans l'étude de Cancel et al [3] observé pour le taux de

croissance (29% *versus* 21% dans cette étude lorsque comparé au groupe contrôle) et l'épaisseur de la plaque de croissance (25% *versus* 20% dans cette étude). Aussi, le design de l'appareil a été repensé afin de pouvoir transmettre des charges dynamiques mais aussi de minimiser son poids (~ 15 g *versus* 21 g). Cette réduction de poids a permis notamment de réduire les effets de la procédure chirurgicale et donc les différences entre les groupes contrôle et sham. En effet, une réduction de 2% dans cette étude *versus* 15% dans l'étude de Cancel et al. [3] est observée entre les groupes contrôle et sham pour le taux de croissance des vertèbres Cd7. Par ailleurs, une réduction de 7% dans cette étude *versus* 8% dans l'étude de Cancel et al. [3] est observée pour l'épaisseur de la plaque de croissance des vertèbres Cd7. La procédure chirurgicale a aussi été améliorée avec la conception d'un guide chirurgical qui permet d'assurer la transmission du chargement dans l'axe longitudinal de la vertèbre en garantissant le centrage de l'appareil et la perpendicularité des fixations par rapport à l'axe de la queue. Par ailleurs, contrairement à l'étude de Cancel et al. [3], les lames pour la mesure des taux de croissance ont été déplastifiées et montées de manière permanente (colle + lamelle). Cette étape de déplastification des lames a permis d'obtenir une définition beaucoup plus nette des fronts de calcéine. Enfin, le développement d'une application Matlab pour automatiser les mesures a permis de multiplier leur nombre et de grandement faciliter leur réalisation et leur compilation. Tous ces éléments ont eu pour effet de minimiser la variabilité des résultats. En effet, une dispersion moyenne des résultats (écart type divisé par la moyenne) de 4% est observée pour le taux de croissance des vertèbres Cd7 dans cette étude *versus* 14% dans l'étude de Cancel et al. [3] et une dispersion moyenne de 5% dans cette étude *versus* 9% dans l'étude de Cancel et al. [3] est observée pour l'épaisseur de la plaque de croissance des vertèbres Cd7. Cette étude montre l'importance d'avoir un groupe sham, l'appareil (~ 15 g) constituant environ 18% de la masse corporelle du rat (~ 85 g) en début d'expérience, ce qui est non négligeable. À la fin de l'expérience, ce ratio diminue à 7%. Cette étude démontre aussi l'importance d'avoir des vertèbres contrôle inter-animal (Cd5 et Cd9). En effet, les résultats similaires obtenus pour ces vertèbres, quelque soit le groupe considéré, ainsi que les faibles différences observées entre le groupe contrôle et le groupe sham démontrent que les effets observés sur les vertèbres Cd7 des groupes chargés sont bien dus à la compression transmise par l'appareil.

Les mesures du taux de croissance au niveau microscopique (marquage à la calcéine) ont été associées à des mesures de la longueur de la vertèbre au niveau macroscopique. Cette technique

*post-mortem* de mesure directe de la longueur des os est utilisée dans d'autres études [5, 11, 12]. Cette étude montre que cette technique, bien que beaucoup moins précise, donne de manière très efficace les tendances quant à la croissance longitudinale des os. En revanche, ce type de mesures ne permet pas de déterminer directement le taux de croissance. Des corrélations ont également été effectuées entre l'épaisseur de la plaque de croissance et ses caractéristiques cellulaires ainsi qu'entre l'épaisseur de la plaque de croissance et le taux de croissance. Ces analyses complémentaires ont démontré que, quelque soit le régime de chargement utilisé et quelque soit la vertèbre considérée, l'épaisseur de la plaque de croissance peut être estimée grâce à une unique combinaison de ses caractéristiques cellulaires rassemblant des paramètres relatifs à chacune de ses trois zones: l'épaisseur de la zone pour la zone de réserve, la densité linéique et le nombre de chondrocytes par colonne pour la zone proliférative et enfin la hauteur des chondrocytes pour la zone hypertrophique. Cette étude a aussi démontré la bonne corrélation entre l'épaisseur de la plaque de croissance et le taux de croissance, relation qui a été confirmée à plusieurs reprises dans la littérature [3, 7, 14].

Des formules analytiques permettant de relier la prolifération cellulaire au taux de croissance sont reportées dans la littérature. En effet, en faisant l'hypothèse que chacun des chondrocytes nouvellement formés dans la zone proliférative terminent sa différentiation terminale dans la zone hypertrophique et qu'il n'y a pas de synthèse de matrice extracellulaire entre les chondrocytes d'une même colonne [7, 8, 136], alors le taux de croissance (TC, en  $\mu\text{m}/\text{jour}$ ) peut être exprimé par le produit du taux de formation des chondrocytes dans la zone proliférative (N, en cellules/jour) avec la hauteur moyenne des chondrocytes dans la zone hypertrophique (CH, en  $\mu\text{m}/\text{cellule}$ ), voir équation (1) [7, 8, 136].

$$\text{TC} \left( \frac{\mu\text{m}}{\text{jour}} \right) = N \left( \frac{\text{cellule}}{\text{jour}} \right) \times CH \left( \frac{\mu\text{m}}{\text{cellule}} \right) \quad (1)$$

De plus, N peut être exprimé par le produit du nombre de chondrocytes en prolifération  $N_{\text{prolif}}$  dans la zone proliférative (en cellule, mesurable grâce à un marquage à la bromodeoxyuridine, voir ci-dessous) avec leur taux de division (T, en  $\text{jour}^{-1}$ ), voir équation (2) [7, 8, 136].

$$N \left( \frac{\text{cellule}}{\text{jour}} \right) = N_{\text{prolif}}(\text{cellule}) \times T(\text{jour}^{-1}) \quad (2)$$

Dans ce projet, le nombre de chondrocytes par colonne dans la zone proliférative a été évalué. Bien que ce paramètre histomorphométrique soit relié à la prolifération cellulaire ( $N_{\text{prolif}}$ ), cette dernière n'a pas été mesurée directement. Tel qu'effectuée dans plusieurs études, ce paramètre, qui joue un rôle clé dans le processus de croissance [13, 14], pourrait être évalué dans le futur à l'aide d'un marquage au bromodeoxyuridine [4, 7, 8, 21, 91, 92, 116, 117, 129, 130]. Enfin, le dernier facteur qui pourrait expliquer les différences observées entre les groupes statique et dynamique est la durée du cycle de différentiation cellulaire. Farnum et al. [4] mentionne que, si le cycle cellulaire est fortement accéléré, les cellules ne sont pas remplacées à la vitesse à laquelle elles complètent leur différentiation, ce qui peut entraîner une réduction au niveau de l'épaisseur de la plaque de croissance.

Une autre limite de cette étude concerne l'investigation des effets du chargement statique et dynamique sur la biologie de la plaque de croissance qui n'a pas été effectuée dans ce projet. L'investigation resterait à compléter dans une étude ultérieure, en particulier sur la composition de la matrice extracellulaire (par exemple, collagène type II et X, aggrécane, collagénases et aggrécanases) ou sur les boucles de rétraction impliquées dans la croissance longitudinale (par exemple, protéine PTHrP (*parathyroidhormone-related protein*), IHH (*Indian Hedgehog*) et facteurs de croissance tels que les IGFs (*insulin-like growth factors*) et les TGF $\beta$ s (*transforming growth factors*)). Tel que discuté dans l'article (Chapitre 3, section 3.5), l'étude de la variation d'expression génique et/ou protéique de tels composants biologiques permettrait de fournir des explications quant aux processus de modulation de croissance qui semblent s'opérer différemment sous chargement statique et dynamique, notamment au niveau de l'histomorphométrie de la plaque de croissance. Enfin, le médium utilisé pour la fixation des vertèbres (formol) peut produire des changements dans les tissus [137]; cependant, il est assumé que ces effets sont systématiques et identiques pour toutes les vertèbres du projet et ainsi, que cela n'a pas d'impact sur les conclusions de cette étude.

En plus des qualités énoncées dans l'article, le modèle animal de rat a été choisi pour son accessibilité, son faible coût et ses facilités d'hébergement. Il pose cependant la question de la

transposition des résultats chez l'humain. À la vue des résultats de nombreuses études portant sur le chargement statique, qui sont transposés chez l'humain pour le développement d'approches de traitement minimalement invasives [109], les résultats de cette étude de recherche fondamentale portant sur le chargement dynamique devraient donc être tout aussi transposables. Afin de le confirmer, des modèles animaux plus grands ( cochon...) et d'autres sites de localisation (tibia...) pourraient être investigués et documentés. Le développement de nouvelles approches de traitement requerra l'utilisation de tels modèles animaux, plus volumineux et plus proches de l'humain, pour des raisons de faisabilité technique et de transposition des manœuvres chirurgicales.

## CONCLUSION

Dans ce projet, un protocole de chargement *in vivo* a été développé puis réalisé sur un modèle animal de rat afin de déterminer quel type de chargement, statique ou dynamique, produit le meilleur potentiel de modulation mécanique de croissance et le moins de dommage à la plaque de croissance. Des mesures de taux de croissance et des mesures histomorphométriques ont été effectuées puis comparées. Basé sur nos connaissances, cette étude comparant les effets des charges statique et dynamique est la première qui utilise un chargement continu, normalisé, finement contrôlé et équivalent en termes de contrainte moyenne résultante.

Cette étude a montré qu'une compression de 0,2 MPa appliquée durant 15 jours sur la 7<sup>ème</sup> vertèbre caudale du rat produit la même modulation mécanique de croissance que le chargement soit statique ou dynamique. Ce résultat suggère que le chargement moyen résultant serait le facteur biomécanique prépondérant dans la modulation mécanique de croissance comparativement aux variations minimale et maximale de compression. L'hypothèse de recherche selon laquelle la plaque de croissance répond différemment à la compression statique ou dynamique est confirmée. En effet, pour une modulation mécanique de croissance similaire, la compression dynamique est moins dommageable pour l'histomorphométrie de la plaque de croissance que la compression statique. Ces résultats sont très prometteurs pour le développement et l'amélioration de nouvelles approches minimalement invasives utilisant des chargements dynamiques (plus représentatifs des conditions physiologiques) pour le traitement de nombreuses déformations musculosquelettiques. Les jeunes patients bénéficieraient grandement de ces nouvelles approches basées sur la modulation de croissance locale qui diminuent de façon importante les risques liés à la chirurgie et qui préservent la mobilité segmentaire.

Les limites de cette étude résident entre autres dans l'investigation d'un unique niveau de chargement et d'une unique fréquence pour le chargement dynamique. Certaines avenues et recommandations pour de futurs travaux connexes sont listées ci-dessous:

- investiguer d'autres niveaux de chargement;
- investiguer d'autres fréquences et d'autres pourcentages de variation autour de la moyenne pour le chargement dynamique;

- investiguer la reprise de la croissance après retrait du chargement;
- investiguer l'effet du chargement de jour ou de nuit pour le chargement dynamique;
- investiguer les effets comparatifs des compressions statique et dynamique sur la biologie de la plaque de croissance (effets sur la composition de la matrice extracellulaire et sur les boucles de rétraction impliquées dans la croissance longitudinale des os);
- investiguer d'autres modèles animaux et d'autres tissus osseux.

L'étude de ces différents paramètres contribuera à améliorer davantage la compréhension du processus de modulation de croissance, qui constitue la base scientifique essentielle pour améliorer le traitement des déformations musculosquelettiques évolutives chez l'enfant et l'adolescent en utilisant des techniques non invasives.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. Akyuz, J. T. Braun, N. A. Brown, et K. N. Bachus, "Static versus dynamic loading in the mechanical modulation of vertebral growth," *Spine*, vol. 31, no. 25, pp. E952-8, 2006.
- [2] D. D. Aronsson, I. A. F. Stokes, J. Rosovsky, et H. Spence, "Mechanical modulation of calf tail vertebral growth: implications for scoliosis progression," *J Spinal Disord*, vol. 12, no. 2, pp. 141-6, 1999.
- [3] M. Cancel, G. Grimard, D. Thuillard-Crisinel, F. Moldovan, et I. Villemure, "Effects of in vivo static compressive loading on aggrecan and type II and X collagens in the rat growth plate extracellular matrix," *Bone*, vol. 44, no. 2, pp. 306-15, 2009.
- [4] C. E. Farnum, A. Nixon, A. O. Lee, D. T. Kwan, L. Belanger, et N. J. Wilsman, "Quantitative three-dimensional analysis of chondrocytic kinetic responses to short-term stapling of the rat proximal tibial growth plate," *Cells Tissues Organs*, vol. 167, no. 4, pp. 247-58, 2000.
- [5] A. G. Robling, K. M. Duijvelaar, J. V. Geevers, N. Ohashi, et C. H. Turner, "Modulation of appositional and longitudinal bone growth in the rat ulna by applied static and dynamic force," *Bone*, vol. 29, no. 2, pp. 105-13, 2001.
- [6] I. A. Stokes, D. D. Aronsson, A. N. Dimock, V. Cortright, et S. Beck, "Endochondral growth in growth plates of three species at two anatomical locations modulated by mechanical compression and tension," *J Orthop Res*, vol. 24, no. 6, pp. 1327-34, 2006.
- [7] I. A. Stokes, K. C. Clark, C. E. Farnum, et D. D. Aronsson, "Alterations in the growth plate associated with growth modulation by sustained compression or distraction," *Bone*, vol. 41, no. 2, pp. 197-205, 2007.
- [8] I. A. Stokes, J. Gwadera, A. Dimock, C. E. Farnum, et D. D. Aronsson, "Modulation of vertebral and tibial growth by compression loading: diurnal versus full-time loading," *J Orthop Res*, vol. 23, no. 1, pp. 188-95, 2005.

- [9] I. A. Stokes, P. L. Mente, J. C. Iatridis, C. E. Farnum, et D. D. Aronsson, "Enlargement of growth plate chondrocytes modulated by sustained mechanical loading," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 84-A, no. 10, pp. 1842-8, 2002.
- [10] I. A. F. Stokes, D. D. Aronsson, et J. P. G. Urban, "Biomechanical factors influencing progression of angular skeletal deformities during growth," *European Journal Exp Musculoskel Res*, vol. 3, pp. 51-60, 1994.
- [11] A. Niehoff, U. G. Kersting, F. Zaucke, M. M. Morlock, et G. P. Bruggemann, "Adaptation of mechanical, morphological, and biochemical properties of the rat growth plate to dose-dependent voluntary exercise," *Bone*, vol. 35, no. 4, pp. 899-908, 2004.
- [12] N. Ohashi, A. G. Robling, D. B. Burr, et C. H. Turner, "The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate," *J Bone Miner Res*, vol. 17, no. 2, pp. 284-92, 2002.
- [13] G. J. Breur, M. D. Lapierre, K. Kazmierczak, K. M. Stechuchak, et G. P. McCabe, "The domain of hypertrophic chondrocytes in growth plates growing at different rates," *Calcified tissue international*, vol. 61, no. 5, pp. 418-25, 1997.
- [14] E. B. Hunziker et R. K. Schenk, "Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats," *The Journal of physiology*, vol. 414, pp. 55-71, 1989.
- [15] E. N. Marieb et R. Lachaîne, *Anatomie et physiologie humaines*, 3<sup>e</sup> éd., Saint-Laurent: Éditions du Renouveau Pédagogique, 2005.
- [16] J. Alvarez, M. Balbin, F. Santos, M. Fernandez, S. Ferrando, et J. M. Lopez, "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," *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 15, no. 1, pp. 82-94, 2000.
- [17] A. R. Poole, Y. Matsui, A. Hinek, et E. R. Lee, "Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix," *The Anatomical record*, vol. 224, no. 2, pp. 167-79, 1989.
- [18] L. J. Sandell, J. V. Sugai, et S. B. Trippel, "Expression of collagens I, II, X, and XI and aggrecan mRNAs by bovine growth plate chondrocytes in situ," *Journal of orthopaedic*

- research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 12, no. 1, pp. 1-14, 1994.
- [19] M. Suttmuller, J. A. Bruijn, et E. de Heer, "Collagen types VIII and X, two non-fibrillar, short-chain collagens. Structure homologies, functions and involvement in pathology," *Histology and histopathology*, vol. 12, no. 2, pp. 557-66, 1997.
  - [20] N. Balmain, D. Leguellec, A. Elkak, G. Nars, R. Toury, et D. Schoevaert, "Zonal variations of types II, IX and XI collagen mRNAs in rat epiphyseal cartilage chondrocytes: quantitative evaluation of in situ hybridization by image analysis of radioautography," *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, vol. 41, no. 1, pp. 197-212, 1995.
  - [21] J. J. Mao et H. D. Nah, "Growth and development: hereditary and mechanical modulations," *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*, vol. 125, no. 6, pp. 676-89, 2004.
  - [22] F. Mwale, E. Tchetina, C. W. Wu, et A. R. Poole, "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," *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 17, no. 2, pp. 275-83, 2002.
  - [23] P. Radhakrishnan, N. T. Lewis, et J. J. Mao, "Zone-specific micromechanical properties of the extracellular matrices of growth plate cartilage," *Annals of biomedical engineering*, vol. 32, no. 2, pp. 284-91, 2004.
  - [24] S. Sundaramurthy et J. J. Mao, "Modulation of endochondral development of the distal femoral condyle by mechanical loading," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 24, no. 2, pp. 229-41, 2006.
  - [25] W. W. Robertson, Jr., "Newest knowledge of the growth plate," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 253, pp. 270-8, 1990.
  - [26] R. T. Ballock et R. J. O'Keefe, "The biology of the growth plate," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 85-A, no. 4, pp. 715-26, 2003.

- [27] M. Diab, J. J. Wu, et D. R. Eyre, "Collagen type IX from human cartilage: a structural profile of intermolecular cross-linking sites," *The Biochemical journal*, vol. 314 ( Pt 1), pp. 327-32, 1996.
- [28] D. R. Eyre, S. Apon, J. J. Wu, L. H. Ericsson, et K. A. Walsh, "Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage," *FEBS letters*, vol. 220, no. 2, pp. 337-41, 1987.
- [29] F. Ruggiero, B. Petit, M. C. Ronziere, J. Farjanel, D. J. Hartmann, et D. Herbage, "Composition and organization of the collagen network produced by fetal bovine chondrocytes cultured at high density," *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, vol. 41, no. 6, pp. 867-75, 1993.
- [30] M. van der Rest et R. Mayne, "Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen," *The Journal of biological chemistry*, vol. 263, no. 4, pp. 1615-8, 1988.
- [31] G. J. Gibson et M. H. Flint, "Type X collagen synthesis by chick sternal cartilage and its relationship to endochondral development," *The Journal of cell biology*, vol. 101, no. 1, pp. 277-84, 1985.
- [32] T. Kirsch, G. Harrison, E. E. Golub, et H. D. Nah, "The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage," *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 45, pp. 35577-83, 2000.
- [33] C. A. Francomano, "Key role for a minor collagen," *Nature genetics*, vol. 9, no. 1, pp. 6-8, 1995.
- [34] S. Ekman et D. Heinegard, "Immunohistochemical localization of matrix proteins in the femoral joint cartilage of growing commercial pigs," *Veterinary pathology*, vol. 29, no. 6, pp. 514-20, 1992.
- [35] S. Ekman, D. Heinegard, O. Johnell, et H. Rodriguez-Martinez, "Immunohistochemical localization of proteoglycans and non-collagenous matrix proteins in normal and osteochondrotic porcine articular-epiphyseal cartilage complex," *Matrix (Stuttgart, Germany)*, vol. 10, no. 6, pp. 402-11, 1990.

- [36] H. J. Haussner, M. A. Ruegg, R. E. Brenner, et I. Ksiazek, "Agrin is highly expressed by chondrocytes and is required for normal growth," *Histochemistry and cell biology*, vol. 127, no. 4, pp. 363-74, 2007.
- [37] A. R. Poole, C. Webber, I. Pidoux, H. Choi, et L. C. Rosenberg, "Localization of a dermatan sulfate proteoglycan (DS-PGII) in cartilage and the presence of an immunologically related species in other tissues," *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, vol. 34, no. 5, pp. 619-25, 1986.
- [38] B. C. van der Eerden, M. Karperien, et J. M. Wit, "Systemic and local regulation of the growth plate," *Endocrine reviews*, vol. 24, no. 6, pp. 782-801, 2003.
- [39] H. Mitani, I. Takahashi, K. Onodera, J. W. Bae, T. Sato, N. Takahashi, Y. Sasano, et K. Igarashi, "Comparison of age-dependent expression of aggrecan and ADAMTSs in mandibular condylar cartilage, tibial growth plate, and articular cartilage in rats," *Histochemistry and cell biology*, vol. 126, no. 3, pp. 371-80, 2006.
- [40] Y. Wang, F. Middleton, J. A. Horton, L. Reichel, C. E. Farnum, et T. A. Damron, "Microarray analysis of proliferative and hypertrophic growth plate zones identifies differentiation markers and signal pathways," *Bone*, vol. 35, no. 6, pp. 1273-93, 2004.
- [41] M. R. Hutchison, M. H. Bassett, et P. C. White, "Insulin-like growth factor-I and fibroblast growth factor, but not growth hormone, affect growth plate chondrocyte proliferation," *Endocrinology*, vol. 148, no. 7, pp. 3122-30, 2007.
- [42] E. Monsonego, O. Halevy, A. Gertler, S. Hurwitz, et M. Pines, "Growth hormone inhibits differentiation of avian epiphyseal growth-plate chondrocytes," *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 114, no. 1-2, pp. 35-42, 1995.
- [43] E. Zerath, X. Holy, J. M. Mouillon, B. Farbos, M. Machwate, C. Andre, S. Renault, et P. J. Marie, "TGF-beta2 prevents the impaired chondrocyte proliferation induced by unloading in growth plates of young rats," *Life sciences*, vol. 61, no. 24, pp. 2397-406, 1997.
- [44] M. Iwamoto, I. M. Shapiro, K. Yagami, A. L. Boskey, P. S. Leboy, S. L. Adams, et M. Pacifici, "Retinoic acid induces rapid mineralization and expression of mineralization-

- related genes in chondrocytes," *Experimental cell research*, vol. 207, no. 2, pp. 413-20, 1993.
- [45] W. Wang et T. Kirsch, "Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization," *The Journal of cell biology*, vol. 157, no. 6, pp. 1061-9, 2002.
- [46] J. Wroblewski et C. Edwall-Arvidsson, "Inhibitory effects of basic fibroblast growth factor on chondrocyte differentiation," *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 10, no. 5, pp. 735-42, 1995.
- [47] D. Demarquay, M. F. Dumontier, L. Tsagris, J. Bourguignon, V. Nataf, et M. T. Corvol, "In vitro insulin-like growth factor I interaction with cartilage cells derived from postnatal animals," *Hormone research*, vol. 33, no. 2-4, pp. 111-4; discussion 115, 1990.
- [48] R. T. Ballock, A. Heydemann, L. M. Wakefield, K. C. Flanders, A. B. Roberts, et M. B. Sporn, "TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases," *Developmental biology*, vol. 158, no. 2, pp. 414-29, 1993.
- [49] B. H. Thorp, I. Anderson, et S. B. Jakowlew, "Transforming growth factor-beta 1, -beta 2 and -beta 3 in cartilage and bone cells during endochondral ossification in the chick," *Development (Cambridge, England)*, vol. 114, no. 4, pp. 907-11, 1992.
- [50] E. Yoshida, M. Noshiro, T. Kawamoto, S. Tsutsumi, Y. Kuruta, et Y. Kato, "Direct inhibition of Indian hedgehog expression by parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide and up-regulation by retinoic acid in growth plate chondrocyte cultures," *Experimental cell research*, vol. 265, no. 1, pp. 64-72, 2001.
- [51] H. F. Oettinger et M. Pacifici, "Type X collagen gene expression is transiently up-regulated by retinoic acid treatment in chick chondrocyte cultures," *Experimental cell research*, vol. 191, no. 2, pp. 292-8, 1990.
- [52] R. M. Leach, Jr., M. P. Richards, C. A. Praul, B. C. Ford, et J. P. McMurtry, "Investigation of the insulin-like growth factor system in the avian epiphyseal growth plate," *Domestic animal endocrinology*, vol. 33, no. 2, pp. 143-53, 2007.

- [53] R. J. O'Keefe, L. S. Loveys, D. G. Hicks, P. R. Reynolds, I. D. Crabb, J. E. Puzas, et R. N. Rosier, "Differential regulation of type-II and type-X collagen synthesis by parathyroid hormone-related protein in chick growth-plate chondrocytes," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 15, no. 2, pp. 162-74, 1997.
- [54] A. M. Makower, J. Wroblewski, et A. Pawlowski, "Effects of IGF-I, EGF, and FGF on proteoglycans synthesized by fractionated chondrocytes of rat rib growth plate," *Experimental cell research*, vol. 179, no. 2, pp. 498-506, 1988.
- [55] I. Takahashi, K. Onodera, J. W. Bae, H. Mitani, et Y. Sasano, "Age-related changes in the expression of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in mandibular condylar, growth plate, and articular cartilage in rats," *Journal of molecular histology*, vol. 36, no. 5, pp. 355-66, 2005.
- [56] J. F. Woessner, Jr., "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling," *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 5, no. 8, pp. 2145-54, 1991.
- [57] V. Knauper, H. Will, C. Lopez-Otin, B. Smith, S. J. Atkinson, H. Stanton, R. M. Hembry, et G. Murphy, "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," *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 29, pp. 17124-31, 1996.
- [58] A. J. Fosang, K. Last, V. Knauper, G. Murphy, et P. J. Neame, "Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13)," *FEBS letters*, vol. 380, no. 1-2, pp. 17-20, 1996.
- [59] H. G. Welgus, C. J. Fliszar, J. L. Seltzer, T. M. Schmid, et J. J. Jeffrey, "Differential susceptibility of type X collagen to cleavage by two mammalian interstitial collagenases and 72-kDa type IV collagenase," *The Journal of biological chemistry*, vol. 265, no. 23, pp. 13521-7, 1990.
- [60] P. G. Mitchell, H. A. Magna, L. M. Reeves, L. L. Lopresti-Morrow, S. A. Yocum, P. J. Rosner, K. F. Geoghegan, et J. E. Hambor, "Cloning, expression, and type II

- collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage," *The Journal of clinical investigation*, vol. 97, no. 3, pp. 761-8, 1996.
- [61] J. Keeling et G. A. Herrera, "Human matrix metalloproteinases: characteristics and pathologic role in altering mesangial homeostasis," *Microscopy research and technique*, vol. 71, no. 5, pp. 371-9, 2008.
- [62] G. Murphy, H. Nagase, et C. E. Brinckerhoff, "Relationship of procollagenase activator, stromelysin and matrix metalloproteinase 3," *Collagen and related research*, vol. 8, no. 4, pp. 389-91, 1988.
- [63] K. Suzuki, J. J. Enghild, T. Morodomi, G. Salvesen, et H. Nagase, "Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin)," *Biochemistry*, vol. 29, no. 44, pp. 10261-70, 1990.
- [64] Z. Gunja-Smith, H. Nagase, et J. F. Woessner, Jr., "Purification of the neutral proteoglycan-degrading metalloproteinase from human articular cartilage tissue and its identification as stromelysin matrix metalloproteinase-3," *The Biochemical journal*, vol. 258, no. 1, pp. 115-9, 1989.
- [65] Y. Kawashima-Ohya, H. Satakeda, Y. Kuruta, T. Kawamoto, W. Yan, Y. Akagawa, T. Hayakawa, M. Noshiro, Y. Okada, S. Nakamura, et Y. Kato, "Effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide on expressions of matrix metalloproteinase-2, -3, and -9 in growth plate chondrocyte cultures," *Endocrinology*, vol. 139, no. 4, pp. 2120-7, 1998.
- [66] K. Brew, D. Dinakarpandian, et H. Nagase, "Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1477, no. 1-2, pp. 267-83, 2000.
- [67] D. E. Gomez, D. F. Alonso, H. Yoshiji, et U. P. Thorgeirsson, "Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions," *European journal of cell biology*, vol. 74, no. 2, pp. 111-22, 1997.
- [68] G. Haeusler, I. Walter, M. Helmreich, et M. Egerbacher, "Localization of matrix metalloproteinases, (MMPs) their tissue inhibitors, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in growth plates of children and adolescents indicates a role for MMPs in human

- postnatal growth and skeletal maturation," *Calcified tissue international*, vol. 76, no. 5, pp. 326-35, 2005.
- [69] I. Abbaszade, R. Q. Liu, F. Yang, S. A. Rosenfeld, O. H. Ross, J. R. Link, D. M. Ellis, M. D. Tortorella, M. A. Pratta, J. M. Hollis, R. Wynn, J. L. Duke, H. J. George, M. C. Hillman, Jr., K. Murphy, B. H. Wiswall, R. A. Copeland, C. P. Decicco, R. Bruckner, H. Nagase, Y. Itoh, R. C. Newton, R. L. Magolda, J. M. Trzaskos, T. C. Burn, et al., "Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family," *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 33, pp. 23443-50, 1999.
- [70] E. C. Arner, "Aggrecanase-mediated cartilage degradation," *Current opinion in pharmacology*, vol. 2, no. 3, pp. 322-9, 2002.
- [71] M. Tortorella, M. Pratta, R. Q. Liu, I. Abbaszade, H. Ross, T. Burn, et al. E. Arner, "The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage," *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 33, pp. 25791-7, 2000.
- [72] G. J. Breur, B. A. VanEnkevort, C. E. Farnum, et al. N. J. Wilsman, "Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 9, no. 3, pp. 348-59, 1991.
- [73] I. Villemure, M. A. Chung, C. S. Seck, M. H. Kimm, J. R. Matyas, et al. N. A. Duncan, "Static compressive loading reduces the mRNA expression of type II and X collagen in rat growth-plate chondrocytes during postnatal growth," *Connect Tissue Res*, vol. 46, no. 4-5, pp. 211-9, 2005.
- [74] J. A. Buckwalter, D. Mower, J. Schafer, R. Ungar, B. Ginsberg, et al. K. Moore, "Growth-plate-chondrocyte profiles and their orientation," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 67, no. 6, pp. 942-55, 1985.
- [75] J. A. Buckwalter, D. Mower, R. Ungar, J. Schaeffer, et al. B. Ginsberg, "Morphometric analysis of chondrocyte hypertrophy," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 68, no. 2, pp. 243-55, 1986.

- [76] C. E. Farnum et N. J. Wilsman, "Chapter 13 : Growth Plate Cellular Function," in *Skeletal Growth and Development : Clinical Issues and Basic Science Advances*, J. A. Buckwalter, M. G. Ehrlich, L. J. Sandell, et S. B. Trippel, Éds., Rosemont, IL.: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1998, pp. 203-23.
- [77] E. B. Hunziker, R. K. Schenk, et L. M. Cruz-Orive, "Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 69, no. 2, pp. 162-73, 1987.
- [78] S. Soeta, H. Shimoura, N. Hatakeyama, T. Kodaka, H. Amasaki, S. Yamano, K. Taniguchi, et Y. Naito, "Immunohistochemical examination of epiphyseal growth plates of Japanese Brown cattle with chondrodysplasia," *Journal of comparative pathology*, vol. 136, no. 2-3, pp. 145-55, 2007.
- [79] T. Fujii, S. Takai, Y. Arai, W. Kim, D. Amiel, et Y. Hirasawa, "Microstructural properties of the distal growth plate of the rabbit radius and ulna: biomechanical, biochemical, and morphological studies," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 18, no. 1, pp. 87-93, 2000.
- [80] W. A. Horton et M. M. Machado, "Extracellular matrix alterations during endochondral ossification in humans," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 6, no. 6, pp. 793-803, 1988.
- [81] C. E. Farnum, R. Lee, K. O'Hara, et J. P. Urban, "Volume increase in growth plate chondrocytes during hypertrophy: the contribution of organic osmolytes," *Bone*, vol. 30, no. 4, pp. 574-81, 2002.
- [82] E. B. Hunziker, "Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes," *Microscopy research and technique*, vol. 28, no. 6, pp. 505-19, 1994.
- [83] B. C. van der Eerden, M. Karperien, E. F. Gevers, C. W. Lowik, et J. M. Wit, "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," *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 15, no. 6, pp. 1045-55, 2000.

- [84] K. J. Noonan, E. B. Hunziker, J. Nessler, et J. A. Buckwalter, "Changes in cell, matrix compartment, and fibrillar collagen volumes between growth-plate zones," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 16, no. 4, pp. 500-8, 1998.
- [85] G. Hausler, M. Helmreich, S. Marlovits, et M. Egerbacher, "Integrins and extracellular matrix proteins in the human childhood and adolescent growth plate," *Calcified tissue international*, vol. 71, no. 3, pp. 212-8, 2002.
- [86] S. V. Webster, C. Farquharson, D. Jefferies, et A. P. Kwan, "Expression of type X collagen, Indian hedgehog and parathyroid hormone related-protein in normal and tibial dyschondroplastic chick growth plates," *Avian pathology : journal of the W.V.P.A*, vol. 32, no. 1, pp. 69-80, 2003.
- [87] C. W. Wu, E. V. Tchetina, F. Mwale, K. Hasty, I. Pidoux, A. Reiner, J. Chen, H. E. Van Wart, et A. R. Poole, "Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization," *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 17, no. 4, pp. 639-51, 2002.
- [88] D. Stickens, D. J. Behonick, N. Ortega, B. Heyer, B. Hartenstein, Y. Yu, A. J. Fosang, M. Schorpp-Kistner, P. Angel, et Z. Werb, "Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice," *Development (Cambridge, England)*, vol. 131, no. 23, pp. 5883-95, 2004.
- [89] C. E. Farnum et N. J. Wilsman, "Determination of proliferative characteristics of growth plate chondrocytes by labeling with bromodeoxyuridine," *Calcified tissue international*, vol. 52, no. 2, pp. 110-9, 1993.
- [90] V. Abad, J. L. Meyers, M. Weise, R. I. Gafni, K. M. Barnes, O. Nilsson, J. D. Bacher, et J. Baron, "The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis," *Endocrinology*, vol. 143, no. 5, pp. 1851-7, 2002.
- [91] N. J. Wilsman, C. E. Farnum, E. M. Green, E. M. Lieberman, et M. K. Clayton, "Cell cycle analysis of proliferative zone chondrocytes in growth plates elongating at different

- rates," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 14, no. 4, pp. 562-72, 1996.
- [92] N. J. Wilsman, C. E. Farnum, E. M. Leiferman, M. Fry, et C. Barreto, "Differential growth by growth plates as a function of multiple parameters of chondrocytic kinetics," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 14, no. 6, pp. 927-36, 1996.
- [93] J. L. Kuhn, J. H. DeLacey, et E. E. Leenellett, "Relationship between bone growth rate and hypertrophic chondrocyte volume in New Zealand white rabbits of varying ages," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 14, no. 5, pp. 706-11, 1996.
- [94] O. Alvarez-Garcia, E. Carbajo-Perez, E. Garcia, H. Gil, I. Molinos, J. Rodriguez, F. A. Ordonez, et F. Santos, "Rapamycin retards growth and causes marked alterations in the growth plate of young rats," *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, vol. 22, no. 7, pp. 954-61, 2007.
- [95] B. F. LeVeau et D. B. Bernhardt, "Developmental biomechanics. Effect of forces on the growth, development, and maintenance of the human body," *Physical therapy*, vol. 64, no. 12, pp. 1874-82, 1984.
- [96] E. Storey et S. A. Feik, "Remodelling of bone and bones: effects of altered mechanical stress on caudal vertebrae," *J Anat*, vol. 140 no. 1, pp. 37-48, 1985.
- [97] F. Bonnel, A. Dimeglio, P. Baldet, et P. Rabischong, "Biomechanical activity of the growth plate. Clinical incidences," *Anatomia clinica*, vol. 6, no. 1, pp. 53-61, 1984.
- [98] N. Tanaka, S. Ohno, K. Honda, K. Tanimoto, T. Doi, M. Ohno-Nakahara, E. Tafolla, S. Kapila, et K. Tanne, "Cyclic mechanical strain regulates the PTHrP expression in cultured chondrocytes via activation of the Ca<sup>2+</sup> channel," *Journal of dental research*, vol. 84, no. 1, pp. 64-8, 2005.
- [99] B. K. Hall, *Bones and cartilage : developmental and evolutionary skeletal biology*, Australia ; San Diego, Calif.: Elsevier Academic Press, 2005.

- [100] G. Ducher et C. J. Blimkie, "Adaptations architecturales du tissu osseux en réponse à l'exercice physique : intérêts et limites des méthodes non invasives utilisées chez l'homme," *Science & Sports*, vol. 21, no. 5, pp. 255-267, 2006.
- [101] C. E. Farnum et N. J. Wilsman, "Chapter 30 : Effects of Distraction and Compression on Growth Plate Function," in *Skeletal Growth and Development : Clinical Issues and Basic Science Advances*, J. A. Buckwalter, M. G. Ehrlich, L. J. Sandell, et S. B. Trippel, Éds., Rosemont, IL.: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1998, pp. 517-31.
- [102] H. M. Frost, "Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 3. The hyaline cartilage modeling problem," *Anat Rec*, vol. 226, no. 4, pp. 423-32, 1990.
- [103] F. Bonnel, E. Peruchon, P. Baldet, A. Dimeglio, et P. Rabischong, "Effects of compression on growth plates in the rabbit," *Acta orthopaedica Scandinavica*, vol. 54, no. 5, pp. 730-3, 1983.
- [104] M. R. Safran, J. J. Eckardt, J. M. Kabo, et W. L. Oppenheim, "Continued growth of the proximal part of the tibia after prosthetic reconstruction of the skeletally immature knee. Estimation of the minimum growth force in vivo in humans," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 74, no. 8, pp. 1172-9, 1992.
- [105] A. Reich, N. Jaffe, A. Tong, I. Lavelin, O. Genina, M. Pines, D. Sklan, A. Nussinovitch, et E. Monsonego-Ornan, "Weight loading young chicks inhibits bone elongation and promotes growth plate ossification and vascularization," *J Appl Physiol*, vol. 98, no. 6, pp. 2381-9, 2005.
- [106] H. N. Herkowitz, R. H. Rothman, et F. A. Simeone, *Rothman-Simeone, the spine*, 5th<sup>e</sup> éd., Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006.
- [107] P. Salenius et E. Vankka, "The development of the tibiofemoral angle in children," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 57, no. 2, pp. 259-61, 1975.
- [108] W. B. Greene, "Infantile tibia vara," *Instructional course lectures*, vol. 42, pp. 525-38, 1993.
- [109] R. R. Betz, A. Ranade, A. F. Samdani, R. Chafetz, L. P. D'Andrea, J. P. Gaughan, J. Asghar, H. Grewal, et M. J. Mulcahey, "Vertebral body stapling: a fusionless treatment

- option for a growing child with moderate idiopathic scoliosis," *Spine*, vol. 35, no. 2, pp. 169-76, 2010.
- [110] E. J. Wall, D. I. Bylski-Austrow, R. J. Kolata, et A. H. Crawford, "Endoscopic mechanical spinal hemiepiphysiodesis modifies spine growth," *Spine*, vol. 30, no. 10, pp. 1148-53, 2005.
- [111] T. M. Gorman, R. Vanderwerff, M. Pond, B. MacWilliams, et S. D. Santora, "Mechanical axis following staple epiphysiodesis for limb-length inequality," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 91, no. 10, pp. 2430-9, 2009.
- [112] J. T. Braun, E. Akyuz, H. Udall, J. W. Ogilvie, D. S. Brodke, et K. N. Bachus, "Three-dimensional analysis of 2 fusionless scoliosis treatments: a flexible ligament tether versus a rigid-shape memory alloy staple," *Spine*, vol. 31, no. 3, pp. 262-8, 2006.
- [113] P. O. Newton, F. D. Faro, C. L. Farnsworth, G. S. Shapiro, F. Mohamad, S. Parent, et K. Fricka, "Multilevel spinal growth modulation with an anterolateral flexible tether in an immature bovine model," *Spine*, vol. 30, no. 23, pp. 2608-13, 2005.
- [114] J.-F. Stoltz et X. Wang, "De la Biomécanique à la Mécanobiologie," in *XVème Congrès Français de Mécanique, Nancy*, 2001.
- [115] M. C. van der Meulen et R. Huiskes, "Why mechanobiology? A survey article," *Journal of biomechanics*, vol. 35, no. 4, pp. 401-14, 2002.
- [116] S. S. Apte et J. Kenwright, "Physeal distraction and cell proliferation in the growth plate," *J Bone Joint Surg Br*, vol. 76, no. 5, pp. 837-43, 1994.
- [117] X. Wang et J. J. Mao, "Chondrocyte proliferation of the cranial base cartilage upon in vivo mechanical stresses," *J Dent Res*, vol. 81, no. 10, pp. 701-5, 2002.
- [118] X. Wang et J. J. Mao, "Accelerated chondrogenesis of the rabbit cranial base growth plate by oscillatory mechanical stimuli," *J Bone Miner Res*, vol. 17, no. 10, pp. 1843-50, 2002.
- [119] H. Othman, E. J. Thonar, et J. J. Mao, "Modulation of neonatal growth plate development by ex vivo intermittent mechanical stress," *Journal of biomechanics*, vol. 40, no. 12, pp. 2686-93, 2007.

- [120] K. Sergerie, S. Parent, P. F. Beauchemin, I. Londono, F. Moldovan, et I. Villemure, "Growth plate explants respond differently to in vitro static and dynamic loadings," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 29, no. 4, pp. 473-80, 2011.
- [121] L. I. Hansson, "Chapter II: Method for determining growth in length of the diaphysis," in *Daily growth in length of diaphysis measured by oxytetracycline in rabbit normally and after medullary plugging*: Acta orthopaedica Scandinavica, 1967, pp. Suppl 101:1+.
- [122] L. I. Hansson, K. Menander-Sellman, A. Stenstrom, et K. G. Thorngren, "Rate of normal longitudinal bone growth in the rat," *Calcified tissue research*, vol. 10, no. 3, pp. 238-51, 1972.
- [123] P. L. Mente, D. D. Aronsson, I. A. Stokes, et J. C. Iatridis, "Mechanical modulation of growth for the correction of vertebral wedge deformities," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 17, no. 4, pp. 518-24, 1999.
- [124] I. A. F. Stokes, "Mechanical effects on skeletal growth," *J Musculoskelet Neuronat Interact*, vol. 2, no. 3, pp. 277-80, 2002.
- [125] I. Villemure et I. A. Stokes, "Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding," *Journal of biomechanics*, vol. 42, no. 12, pp. 1793-803, 2009.
- [126] B. Cohen, W. M. Lai, et V. C. Mow, "A transversely isotropic biphasic model for unconfined compression of growth plate and chondroepiphysis," *Journal of biomechanical engineering*, vol. 120, no. 4, pp. 491-6, 1998.
- [127] D. I. Bylski-Austrow, E. J. Wall, M. P. Rupert, D. R. Roy, et A. H. Crawford, "Growth plate forces in the adolescent human knee: a radiographic and mechanical study of epiphyseal staples," *Journal of pediatric orthopedics*, vol. 21, no. 6, pp. 817-23, 2001.
- [128] K. J. Noonan, C. E. Farnum, E. M. Leiferman, M. Lampl, M. D. Markel, et N. J. Wilzman, "Growing pains: are they due to increased growth during recumbency as documented in a lamb model?," *Journal of pediatric orthopedics*, vol. 24, no. 6, pp. 726-31, 2004.

- [129] A. Alberth et J. Peltonen, "Proliferation of the hypertrophic chondrocytes of the growth plate after physeal distraction. An experimental study in rabbits," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 297, pp. 7-11, 1993.
- [130] A. Alberth, J. Peltonen, et V. Ritsila, "Effects of distraction and compression on proliferation of growth plate chondrocytes. A study in rabbits," *Acta Orthop Scand*, vol. 64, no. 4, pp. 449-55, 1993.
- [131] M. R. Simon, "The effect of dynamic loading on the growth of epiphyseal cartilage in the rat," *Acta anatomica*, vol. 102, no. 2, pp. 176-83, 1978.
- [132] M. G. Ehrlich, H. J. Mankin, et B. V. Treadwell, "Biochemical and physiological events during closure of the stapled distal femoral epiphyseal plate in rats," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 54, no. 2, pp. 309-22, 1972.
- [133] J. F. Taylor, E. Warrell, et R. A. Evans, "The response of the rat tibial growth plates to distal periosteal division," *J Anat*, vol. 151, pp. 221-31, 1987.
- [134] A. J. Walsh et J. C. Lotz, "Biological response of the intervertebral disc to dynamic loading," *Journal of biomechanics*, vol. 37, no. 3, pp. 329-37, 2004.
- [135] J. J. MacLean, C. R. Lee, S. Grad, K. Ito, M. Alini, et J. C. Iatridis, "Effects of immobilization and dynamic compression on intervertebral disc cell gene expression in vivo," *Spine*, vol. 28, no. 10, pp. 973-81, 2003.
- [136] N. F. Kember, "Cell kinetics and the control of bone growth," *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992). Supplement*, vol. 82 Suppl 391, pp. 61-5, 1993.
- [137] H. Lum et W. Mitzner, "Effects of 10% formalin fixation on fixed lung volume and lung tissue shrinkage. A comparison of eleven laboratory species," *The American review of respiratory disease*, vol. 132, no. 5, pp. 1078-83, 1985.